

LUCAS REGATIERI BARBIERI

Uso de nanoemulsões lipídicas como veículos de paclitaxel e de metotrexato no tratamento da doença vascular do coração transplantado em coelhos

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Noedir Antonio Groppo Stolf

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Barbieri, Lucas Regatieri

Uso de nanoemulsões lipídicas como veículos de paclitaxel e metotrexato no tratamento da doença vascular do coração transplantado em coelhos / Lucas Regatieri Barbieri. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientador: Noedir Antonio Groppo Stolf.

Descritores: 1.Transplante de coração 2.Doenças vasculares 3.Imunossupressão
4.Rejeição de enxerto 5.Nanopartículas 6.Metotrexato 7.Paclitaxel 8.Colesterol
9.Coelhos

USP/FM/DBD-187/16

Dedicatória

Aos meus pais Lercio Emílio Barbieri e Lycia Vânia Regatieri Barbieri, eternos amigos, eu agradeço infinitamente pelo carinho, apoio e incentivo. Obrigado por acreditarem em mim, mesmo quando nem eu queria acreditar.

Ao meu irmão Laercio e minha cunhada Claudia, eu agradeço pela sua presença constante me auxiliando em todos os momentos de minha vida.

Aos meus tios Haroldo e Marcia, eu agradeço por me receberem em sua casa, pela amizade, apoio espiritual e por se tornarem meus segundo pais em São Paulo.

Aos Tios e Primos Emilio Celso, Cristina, Camilo, Caio e Carol, pelo apoio e otimização no começo da minha morada em São Paulo.

Agradecimientos

Ao longo de quatro anos este trabalho foi aperfeiçoado, tal como a construção de uma casa pelo seu futuro morador. A materialização de um desejo que se torna efetivamente real, perante a todas as dificuldades.

Bom, durante a preparação e elaboração desta tese, muitos momentos difíceis também aconteceram. Por vezes pensei que o desejo seria apenas um sonho distante; desistir seria o caminho mais fácil e até compreensível, mas não para mim. Consegui, com o auxílio de várias pessoas, reunir forças para continuar, apesar de todas as adversidades, e provar para mim mesmo de que tudo isso não era apenas mais um sonho idealista. Por isso, venho através deste pequeno espaço, expressar meus sinceros agradecimentos àqueles que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação e à elaboração deste trabalho.

À Deus, eu agradeço pela minha existência e pela oportunidade de encontrar minha vocação ao lado de pessoas tão especiais.

Aos meus pais, eternos amigos, eu agradeço infinitamente pelo carinho, apoio e incentivo. Obrigada por acreditarem em mim, mesmo quando nem eu queria acreditar.

Ao meu querido orientador, Prof.Dr. Noedir Antônio Groppo Stolf, Professor Emérito da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, eu agradeço em inúmeros aspectos. Prof. Noedir me incentivou e motivou a elaboração deste trabalho. Em momentos difíceis ele soube transmitir tranqüilidade, serenidade e acima de tudo, objetividade. Sua agradável convivência, sugestões, e a oportunidade de contínuo aprendizado e desenvolvimento científico ao seu lado.

Ao Prof. Dr. Fabio Biscele Jatene, Professor Titular de Cirurgia Cardiovascular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Diretor do Serviço de Cirurgia Cardiovascular e Vice-Presidente do Conselho Diretor do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Ao Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes, Professor Titular do Departamento de Cardiopneumologia, Disciplina de Cirurgia Torácica, Faculdade De Medicina da Universidade de São Paulo, pela disposição do laboratório de cirurgia experimental do Instituto do Coração da FMUSP, durante sua coordenação.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira, Professor Associado da Disciplina de Cirurgia Cardiovascular e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Torácica e Cardiovascular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; Diretor do Laboratório Cirúrgico de Pesquisa Cardiovascular do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade, atenção, disponibilidade em avaliar este trabalho, conferindo e valorizando o mérito científico de todo o nosso esforço.

Ao Prof. Dr. Raul Maranhão, Professor Titular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e diretor do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de utilização e aprendizado

em seu laboratório. Dra. Elaine e equipe, eu agradeço pela paciência, colaboração, oportunidade de conhecê-los e de participar deste projeto.

Ao Prof. Dr. Fernando Bacal, Diretor da Unidade Clínica de Transplante Cardíaco do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, eu agradeço muito respeitosamente pela competência, simpatia, experiência, imparcialidade e rigorosidade, que me transmitiu, em minha formação na pós-graduação.

Ao Dr. Paulo Sampaio Gutierrez, laboratório de anatomia patológica Instituto do Coração, pela excelente assistência técnica para a execução do presente trabalho.

Ao Dr. Domingos Lourenço Filho, eu agradeço pela amizade, carinho, disposição, troca de idéias e pelas correções sempre bem detalhadas.

Ao Dr. Ronaldo Honorato dos Santos, pelo incentivo e apoio profissional.

Aos colegas da Pós-Graduação, pela amizade e experiências compartilhadas.

Ao Dr. Paulo Vargas, um "velho", recente e sempre amigo, eu sou muito grato
pelas palavras otimistas e incentivadoras.

A Dra. Mariane Martins Manso, pelo incentivo, apoio psicológico e
profissional.

A Neusa, Juliana e todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em
Cirurgia Torácica e Cardiovascular, Senso Estrito, da Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo, pela constante e simpática presença,
auxiliando na resolução das partes burocráticas da Pós-Graduação.

À CNPq, FAPESP e Pró-Reitoria de Pós-Graduação da USP, pelo apoio
financeiro concedido.

Epígrafe

"Homo sun, humani a me nihil alienum puto."

"Homem sou, e nada que é humano considero alheio a mim."

(Terêncio, Heautontimorumenos, I)

Normatização adotada

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

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

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

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

LISTA DE FIGURAS**LISTA DE TABELAS**

1	INTRODUÇÃO.	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1	A Rejeição no Transplante Cardíaco	10
2.1.1	Rejeição Aguda Celular	10
2.1.2	Rejeição Mediada por Anticorpos.	12
2.2	Doença Vascular do Enxerto.....	12
2.3	Expressão Gênica de Receptores Celulares, Mediadores Inflamatórios e Metaloproteinases na Doença Vascular do Enxerto.....	19
2.4	Modelos em Animais.....	21
2.4.1	Animal estudado	21
2.4.1.1	Anatomia do coelho	22
2.4.1.2	Fisiologia do sistema cardiovascular	24
2.4.1.3	Anatomia Coronariana.....	25
2.4.1.4	Modelo de Doença Vascular do Enxerto	25
2.5	Nanotecnologia e Nanociência	27
2.6	Nanopartículas e liberação de fármacos.	28
2.7	Nanopartícula de colesterol ou LDE.....	30
2.7.1	A Nanopartícula de LDE-Paclitaxel	36
2.7.2	A Nanopartícula de LDE-Metotrexato	37
2.8	O Paclitaxel no Transplante	37
2.9	O Metotrexato no Transplante	40
3.	OBJETIVOS	45
3.1	Objetivo Principal	46
3.2	Objetivo Secundário	46
4	METÓDOS	47
4.1	Distribuição dos Animais e a Dieta.....	48

4.2	Preparo da nanoemulsão lipídica sólida (LDE), a incorporação do paclitaxel e a incorporação do metotrexato.....	51
4.3	Preparo da Dieta Rica em Colesterol	53
4.4	Tática Operatória.....	54
4.4.1	Anestesia dos Animais.....	54
4.4.2	Ato operatório	55
4.5	Antibioticoprofilaxia e Controle da Viabilidade do Enxerto.....	60
4.6	Protocolo de Imunossupressão	60
4.7	Parâmetros Operatórios Eleitos para Análise.....	62
4.8	Avaliação da Toxicidade, Perfil Ponderal, Hematológico Lipídico	62
4.9	Análise da Expressão Gênica de Receptores Celulares, Mediadores Inflamatórios e Metaloproteinases no Miocárdio...	63
4.10	Avaliação Histológica	67
4.10.1	Avaliação Histológica do Miocárdio	68
4.11	Morfometria e Imuno-histoquímica.....	69
4.12	Análise Estatística	72
5	RESULTADOS	73
5.1	Tempo de isquemia	74
5.2	Perfil Lipídico	74
5.3	Consumo de ração.....	77
5.4	Controle do peso.....	78
5.5	Perfil Hematológico	78
5.6	Avaliação da estenose coronária e do miocárdio.....	79
5.6.1	Expressão gênica dos mediadores inflamatórios e receptores de lipoproteínas no miocárdio.....	82
6	DISCUSSÃO	88
6.1	Considerações Gerais.....	89
6.2	Considerações sobre o Modelo Experimental.....	93
6.3	Considerações sobre o Consumo de Ração	95
6.4	Considerações sobre o Tempo de Isquemia.....	95
6.5	Considerações sobre o Perfil Lipídico.....	96
6.6	Considerações sobre o Perfil Hematológico.....	96
6.7	Considerações sobre o Morfometria.....	97

6.8	Considerações sobre a Análise da Expressão Gênica relativa no Miocárdio de Receptores Celulares, Mediadores Inflamatórios e Metaloproteinases determinados por PCR em tempo real.....	99
6.8.1	Receptor de Trombospondina – (CD-36).....	99
6.8.2	Receptor Lipoprotéico de Baixa Densidade – (LDLR).....	100
6.8.3	Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade Relacionada à Proteína 1 – (LRP-1).....	101
6.8.4	Interleucina-1 β – (IL-1 β).....	102
6.8.5	Interleucina-18 – (IL-18).....	103
6.8.6	Fator de Necrose Tumoral fração α – (TNF α).....	104
6.8.7	Molécula-1 de Adesão de Célula Vascular – (VCAM-1).....	105
6.8.8	Proteína Quimiotática de Monócitos 1 – (MCP-1).....	106
6.8.9	Metaloproteinase-12 da Matriz – (MMP-12).....	107
6.9	Considerações sobre os Aspectos Histopatológicos.....	110
6.10	Considerações Finais.....	112
6.11	Limitações do Estudo.....	113
7	CONCLUSÕES	114
8	ANEXOS	116
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

Listas

CD36:	grupamento de diferenciação 36
cDNA:	ácido desoxirribonucleico complementar
GVD:	Doença vascular do enxerto
GAPDH:	gliceraldeído 3 fosfato - desidrogenase
HDL:	lipoproteína de alta densidade
IL-1β:	interleucina Beta 1
IL-10:	interleucina 10
IL-18:	interleucina 18
LDL:	lipoproteína de baixa densidade
LDLR:	receptor de lipoproteína de baixa densidade
LRP-1:	receptor de lipoproteína de baixa densidade relacionado a proteína 1
MCP-1:	proteína quimiotática de monócitos
MMP-12:	matriz de metaloproteinase 12
MMP-9:	matriz de metaloproteinase 9
mRNA:	ácido ribonucléico mensageiro
MTX:	metotrexate
PACLI:	paclitaxel
qRT-PCR:	reação em cadeia da polimerase em tempo real
TNF-α:	fator de necrose tumoral alfa
VCMA-1:	proteína 1 de adesão da célula vascular

	Pág.
Tabela 1- Receptores Celulares, Mediadores Inflamatórios Metaloproteinases analisados por PCR em tempo real.....	20
Tabela 2- SONDA/PCR: Marcadores inflamatórios, quimiotáticos, receptores de membrana celular e metaloproteinases analisados por PCR quantitativo em tempo real.....	66
Tabela 3- Tempo de isquemia (minutos) dos animais dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.....	74
Tabela 4- Concentração de colesterol total, HDL-c e triglicérides dos animais transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.....	76
Tabela 5- Peso dos animais entre o dia do transplante (basal) e o final do período de estudo (final) dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.....	78
Tabela 6- Perfil hematológico dos animais transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.....	79
Tabela 7- Medidas das artérias coronárias obtidas por morfometria em microscopia ótica em corações transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.....	80
Tabela 8- Medidas das artérias coronárias obtidas por morfometria em microscopia ótica em corações nativos dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.....	80
Tabela 9- Morfologia do miocárdio dos corações transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.....	81
Tabela 10- Porcentagem de área infiltrada de macrófagos no miocárdio de corações nativos e transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.....	82

	Pág.
Figura 1- Doença Vascular do Enxerto.....	16
Figura 2- Mecanismos e fatores de risco para DVE e Aterosclerose.....	17
Figura 3- Ilustração dos diferentes tipos de Nanopartículas para entrega de fármacos.....	30
Figura 4- Estrutura da lipoproteína de densidade baixa (LDL).....	31
Figura 5- Estrutura da nanoemulsão lipídica (LDE).....	32
Figura 6- Mecanismo de ação do Receptor da LDL.....	33
Figura 7- Estrutura tridimensional e bioquímica do Paclitaxel.....	38
Figura 8- Mecanismo de ação do Paclitaxel.....	39
Figura 9- Ação do metotrexato.....	42
Figura 10- Principais etapas do transplante heterotópico do coração de coelho na região cervical.....	59
Figura 11- Corte histológico do miocárdio do coração de coelho para determinação da porcentagem de estenose.....	71
Figura 12- Média do consumo diário de ração dos animais ao final de cada semana de seguimento dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.....	77
Figura 13- Expressão gênica relativa de IL-1 β , IL-10, IL-18, VCAM-1, MCP-1, TNF- α , MMP-9 e MMP-12 nos corações transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.....	84
Figura 14- Expressão gênica relativa dos receptores de lipoproteínas LDL-R, CD-36 e LRP-1 nos corações transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.....	85

- Figura 15-** Expressão gênica relativa de IL-1 β , IL-10, IL-18, VCAM-1, MCP-1, TNF- α , MMP-9 e MMP-12 nos corações nativos dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato..... 86
- Figura 16-** Expressão gênica relativa dos receptores de lipoproteínas LDL-R, CD-36 e LRP-1 nos corações nativos dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato..... 87

Resumo

Barbieri LR. *Uso de nanoemulsões lipídicas como veículos de paclitaxel e de metotrexato no tratamento da doença vascular do coração transplantado em coelhos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: A doença vascular do coração transplantado, consiste em um processo inflamatório proliferativo que compromete o sucesso a longo prazo do transplante cardíaco e não há prevenção ou tratamentos efetivos. Uma nanoemulsão lipídica (LDE) pode carregar agentes quimioterápicos na circulação e concentrá-los nos enxertos cardíacos dos coelhos. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do paclitaxel combinado a LDE; do metotrexate combinado ao LDE e a associação de ambos quimioterápicos ao LDE nos corações transplantados.

Método: 28 coelhos alimentados com dieta com teor de 0,5% de colesterol e submetidos a transplante cardíaco heterotópico foram tratados com ciclosporina (dose 10 mg/kg/ dia por via oral) e alocados em 4 grupos de 7 animais. Um grupo recebeu a associação de Metotrexate e LDE endovenosa (4 mg/kg/semana); segundo grupo recebeu por via endovenosa a combinação de Paclitaxel e LDE; o terceiro grupo recebeu a associação de LDE com metotrexate e paclitaxel; grupo controle que recebeu somente solução salina intravenosa. Os animais foram sacrificados 6 semanas após o procedimento. Foram realizadas análises da morfologia, histologia, imunohistoquímica e análise da expressão gênica do enxerto e dos corações nativos.

Resultado: Em comparação com o grupo controle, coelhos transplantados e tratados com paclitaxel associado ao LDE apresentaram redução em 50% de estenose em artérias coronárias. Já nos grupos que usaram metotrexate associado a LDE ou paclitaxel combinado com metotrexate e associado a LDE, houve redução em 18% da estenose coronariana em relação ao grupo controle, mas a diferença não apresentou significância estatística. Nos três grupos tratados, houve redução do infiltrado macrófágico. No grupo que recebeu metotrexate associado a LDE, a expressão gênica de fatores pró-inflamatórios (TNF-alfa; MCP1; IL 18; VCAM-1 e MMP-12) foi reduzida drasticamente; enquanto a expressão de agentes anti-inflamatórios (IL 10 por exemplo) aumentou. Nos outros dois grupos (LDE+paclitaxel e LDE+paclitaxel e metotrexate) não houve influência consistente na expressão de genes pró e anti-inflamatórios.

Conclusão: A associação paclitaxel e LDE promoveu melhora importante na vasculopatia dos enxertos. A associação metotrexate e LDE e a metotrexate mais paclitaxel e LDE reduziram a estenose de coronárias porém sem significância estatística. O infiltrado macrófagocítico foi reduzido nos três grupos tratados. Tais resultados podem servir de ponte para novos ensaios clínicos.

Descritores: transplante de coração; doenças vasculares; imunossupressão; rejeição de enxerto; nanopartículas; metotrexato; paclitaxel; colesterol; coelhos.

Abstract

Barbieri LR. Does paclitaxel associated to a lipid nanoparticle, methotrexate associated to a lipid nanoparticle or the combination of both improve the cardiac allograft vasculopathy and the inflammatory profile in rabbit heterotopic heart transplantation? [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Background: Coronary allograft vasculopathy is an inflammatory-proliferative process that compromises the long-term success of heart transplantation and currently has no effective prevention and treatment. A lipid nanoemulsion (LDE) can carry chemotherapeutic agents in the circulation and concentrates them in the heart graft in rabbits. The aim of this study was to investigate the effects of paclitaxel (PACLI) binded tire parenthesis to LDE, methotrexate (MTX) binded to LDE and the association of both particles in transplanted heart.

Methods: Twenty eight rabbits fed 0,5% cholesterol diet and submitted to heterotopic heart transplantation were treated with cyclosporine A (10mg/kg/daily orally) and allocated to four groups of 7 animals. One group was treated with intravenous LDE-MTX (4mg/kg B.W., weekly); a second with LDE-paclitaxel, the third one with association of LDE-PACLI with LDE-MTX and the control group received only weekly intravenous saline solution. Animals were sacrificed 6 weeks later for morphometric, histological, immunohistochemical and gene expression analysis of the graft and native hearts.

Results: Compared to controls, grafts of LDE-PACLI treated rabbits showed 50% reduction of coronary stenosis and in the LDE-MTX and LDE-MTX/PACLI stenosis was around 18% less than control but this difference was not statistically significant. In the 3 treatment groups macrophage infiltration was decreased. In LDE-MTX group, gene expression of pro-inflammatory factors TNF- α , MCP-1, IL-18 and VCAM-1, and MMP-12 was strongly diminished whereas expression of anti-inflammatory IL-10 increased. In the other two treatment groups (LDE-PACLI and LDE-PACLI/MTX) there was not a consistent influence in pro and anti-inflammatory gene expression.

Conclusions: LDE-PACLI promoted strong improvement of the cardiac allograft vasculopathy. LDE-MTX and LDE-MTX/PACLI decreased coronary stenosis but without statistic significance. Macrophage infiltration was decrease in the three treatment groups. This new preparation maybe candidate for future clinical trials.

Descriptors: heart transplantation; vascular diseases; immunosuppression; graft rejection; nanoparticles; methotrexate; paclitaxel; cholesterol; rabbits.

1. Introdução

O transplante cardíaco é o procedimento de escolha para o tratamento das doenças cardíacas em fase terminal, refratárias ao tratamento médico. A introdução da ciclosporina na década de 1980, que revolucionou o manejo da imunossupressão e rejeição, aliada à evolução das técnicas de manejo do doador e do recipiente, melhorou muito o prognóstico dos pacientes submetidos ao procedimento. No entanto, além da rejeição, a doença vascular do coração transplantado é ainda um grande obstáculo ao sucesso clínico do transplante cardíaco.

A doença vascular do coração transplantado é uma complicação insidiosa, de progressão acelerada, e caracterizada por inflamação perivascular persistente e hiperplasia intimal. Foi descrita pela primeira vez por THOMPSON et al (1969)¹ e emerge como o fator mais importante que afeta a sobrevida a longo prazo após o transplante cardíaco.²

A doença vascular do coração transplantado é considerada a principal causa de morte após o primeiro ano de transplante e sua incidência é de 6-18% no primeiro ano, 23% no segundo ano, e chega a 50-80% ao fim do quinto ano^{2,3,4,5}. Na apresentação clínica, a angina pectoris está raramente presente, mas apesar da sintomatologia discreta, ela apresenta todas as complicações clássicas da doença coronária: infarto do miocárdio, morte súbita e diminuição da função ventricular com presença de insuficiência cardíaca congestiva. Ocorrem lesões proximais, que se apresentam como lesões focais com placas ateroscleróticas assimétricas idênticas às que ocorrem na aterosclerose clássica; e lesões difusas, que apresentam estreitamento luminal concêntrico,

afetando por extenso toda a parede do vaso, originando a oclusão dos pequenos ramos penetrantes intramiocárdicos. Este é considerado como o padrão típico das alterações coronárias na doença vascular do coração transplantado, às vezes denominada de rejeição crônica no enxerto ².

Os achados anatomopatológicos descritos são de lesões ateroscleróticas, principalmente de células de músculo liso com presença de poucos linfócitos e alguns macrófagos, tendo como particularidade o espessamento intimal coberto por células endoteliais, diferentemente da aterosclerose natural. O endotélio é disfuncional e admite-se que uma lesão endotelial pode levar à ativação da migração e à proliferação de células da musculatura lisa. ⁵

A patogênese é controversa e provavelmente multifatorial, sendo considerados como fatores de risco a idade do doador, presença de anticorpos citotóxicos B e infecção por citomegalovírus e dislipidemias, algumas descritas em nosso laboratório ^{6,7,8}. O dano endotelial consequente da isquemia fria e a injúria de reperfusão resultam na liberação de uma variedade de fatores dos leucócitos e plaquetas que aderem à parede do vaso sanguíneo. Dentre estes fatores estão: eicosanoides, fator ativador de plaquetas, fatores de crescimento e citocinas, formando o cenário inicial da doença vascular do enxerto. A perda de um endotélio intacto e funcional, combinada com o ataque imunológico crônico, pode ser o deflagrador que resulta na migração e proliferação de células musculares lisas. É possível que a neutralização de um ou mais destes fatores resulte na inibição ou retardo da proliferação de células musculares lisas e na inibição da doença vascular do coração transplantado. ⁹

Apesar dos avanços no diagnóstico e descrição dos mecanismos da doença, esta continua sendo pouco entendida, assim é crucial o uso de modelos animais, os quais podem nos dar uma melhor compreensão dos mecanismos, além de nos dar a possibilidade de testar regimes terapêuticos que permitam prevenir ou tratar a doença vascular do coração transplantado. A maior parte desses estudos é realizada em ratos ou coelhos.

Um dos modelos primordialmente empregados é o de transplante cardíaco em coelhos.^{5,9} Neste realiza-se o transplante cardíaco de forma heterotópica, ao nível cervical^{5,9,10} ou abdominal^{11,12} desenvolveu o modelo de forma apurada e ressaltou suas características e vantagens em relação ao modelo em ratos, a saber:

- A doença vascular do enxerto é tubular, e não segmentar como observada em ratos, sendo assim semelhante à que desenvolvem os humanos.
- O tempo de desenvolvimento de doença vascular do enxerto é curto, de 5 a 6 semanas, enquanto que em ratos é de 12 a 24 semanas.
- O modelo da doença em coelhos tem sido considerado mais parecido com o transplante cardíaco no homem.

Em estudos anteriores, MARANHÃO et al (1994)¹³ demonstraram que, após injeção endovenosa, uma nanoemulsão rica em colesterol concentra-se em tumores malignos. Isto se dá porque a nanoemulsão é captada pelos receptores de LDL, que estão muito aumentados nas células neoplásicas.^{13,14,15}

Dessa forma, associando-se quimioterápicos de ação antitumoral à nanoemulsão, é possível levar estes fármacos especificamente ao tecido-alvo, evitando os órgãos e tecidos normais. Em estudos pré-clínicos mostrou-se que o uso da nanoemulsão rica em colesterol diminui a toxicidade e aumenta o efeito farmacológico de quimioterápicos como a carmustina, o etoposídeo e o paclitaxel^{16,17,18}. Nos estudos clínicos, que envolveram mais de 50 pacientes, mostrou-se uma acentuada redução da toxicidade tanto com a associação da nanoemulsão à carmustina¹⁶ quanto com o etoposídeo e o paclitaxel.^{19,20}

Em trabalho recente, em coelhos com aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol, mostrou-se que a LDE concentra-se nas lesões ateroscleróticas. Quando os coelhos com aterosclerose foram tratados com o paclitaxel associado à LDE, ocorreu uma acentuada redução do processo de aterogênese, em cerca de 60%, e o tratamento não apresentou toxicidade.²¹ O tratamento com outro agente quimioterápico, o metotrexato associado à LDE, também resultou em redução das lesões, em proporção equivalente, de 65%.^{22,23}

Em experiências realizadas com suporte financeiro da FAPESP (Proc. 08/54318-3, Auxílio à Pesquisa, Prof. Noedir Stolf), utilizamos o modelo do coelho com transplante cardíaco heterotópico para avaliar se o tratamento com LDE-paclitaxel pode ter efeito sobre o desenvolvimento da doença vascular coronária do transplante. A LDE foi captada pelo coração exógeno em número quatro vezes maior do que pelo coração nativo, o que mostra sua enorme capacidade de direcionamento para este alvo. O tratamento com LDE-paclitaxel teve resultado extremamente favorável, com uma redução de 50%

da estenose que afetou os corações transplantados. O lúmen arterial nos corações transplantados tratados ficou três vezes mais amplo do que nos animais não-tratados e a infiltração por macrófagos foi reduzida em sete vezes. O tratamento inibiu a destruição da camada média e reduziu a espessura da íntima. Não foi observada toxicidade e os corações nativos não sofreram modificações.²⁴

O paclitaxel, um derivado diterpenóide do *Taxus brevifolia*, induz a polimerização de tubulinas, resultando na formação de microtúbulos anormalmente estáveis e não funcionantes. O paclitaxel liga-se aos microtúbulos; assim, a divisão celular é bloqueada nas fases G₂/M do ciclo celular.

O metotrexato, que, quando incorporado à LDE, mostrou-se igualmente efetivo na regressão das lesões do coelho, é um antifolato que pode inibir três diferentes enzimas: a diidrofolato redutase (DHFR), a timidilato sintase (TS) e a aminoimidazol carboxiimida ribonucleotídeo formil transferase (AICAR). A DHFR é uma enzima intracelular que atua diretamente nos cofatores do folato reduzido. A TS e a AICAR são enzimas importantes na síntese *de novo* de timidilato e purina, respectivamente. A ação do metotrexato resulta na inibição da síntese e replicação do DNA.²⁵

Por ser um antifolato clássico, o metotrexato requer transporte de membrana especializado, via transportador de folato reduzido, e é um substrato para poliglutamação intracelular pela enzima folilpoliglutamato sintase (FPGS), um processo pelo qual mais de seis glutamatos são adicionados para formar metotrexato poliglutamatos. Estes são hidrolisados pela folilpoliglutamil

hidrolase (FPGH). A poliglutamação aumenta o tempo de retenção intracelular do metotrexato e os metabólitos metotrexato poliglutamatos de cadeias longas melhoram bastante o tempo de retenção intracelular e a potência do fármaco como inibidor de TS e AICAR.²⁵ Um aspecto marcante dos experimentos em que testamos a preparação do metotrexato incorporado às nanoemulsões lipídicas foi o significativo aumento da captação celular do fármaco, da ordem de cem vezes, obtido pela veiculação com as nanoemulsões²⁶. Isto redundou em grande aumento da atividade farmacológica do metotrexato. De fato, ao utilizar-se a nanoemulsão como veículo medicamentoso, resolveu-se um grande problema relativo à farmacologia deste quimioterápico: a dificuldade de sua entrada na célula. Na prática, a associação do metotrexato com a nanoemulsão lipídica semelhante à LDL resulta em medicamento com propriedades farmacológicas potencialmente exacerbadas.

O metotrexato tem duas linhas de ação farmacológica distintas, a ação antiproliferativa e a ação imunossupressora e antiinflamatória. Portanto, este fármaco, veiculado na LDE, pode ter aplicação tanto no controle da doença vascular do coração transplantado quanto nos processos de rejeição ao órgão transplantado.

2. Revisão da Literatura

O Transplante Cardíaco (TxC) é atualmente considerado como a primeira opção terapêutica dos pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, refratária ao tratamento clínico e sem possibilidade de tratamento cirúrgico convencional.²⁷

O estado fisiopatológico, como consequência da cardiomiopatia severa, é representado por vários graus de disfunção tanto sistólica quanto diastólica, tendo como reflexo baixos volumes de ejeção e elevados volumes diastólicos finais e elevadas pressões diastólicas de enchimento, respectivamente.²⁸

Os pacientes nesse contexto fisiopatológico também apresentam, entre outros sintomas, alterações neuro-hormonais do sistema renina-angiotensina-aldosterona, diminuição da perfusão renal, visceral e esplâncnica e aumento dos níveis de catecolaminas.

A primeira referência de transplante cardíaco é de Carrel e Guthrie (1905), que realizaram o transplante de coração de animal jovem no pescoço de animal adulto²⁹. Foram, no entanto, os trabalhos de Lower e Shumway (1960), nas décadas de 50 e 60, que padronizaram a técnica – que proporcionou uma longa sobrevivência a cães com imunossupressão –, e estabeleceram as bases para o sucesso deste tratamento cirúrgico. Barnard et al., em 1967,³⁰ realizaram o primeiro transplante cardíaco ortotópico entre seres humanos com relativo sucesso, sendo Zerbini (1969)³¹ o primeiro a realizá-lo no Brasil.³²

A presença de altas taxas de rejeição ao enxerto e de infecção acusou sobrevivência pequena e originou grande desinteresse e abandono da técnica na década de 70^{33,34}. No entanto, a experiência acumulada pelos grupos que mantiveram o TxC como tratamento, e principalmente após a introdução da ciclosporina A, primeiro no transplante de rim em 1978, e em 1980 no TxC, revigorou esta opção terapêutica, permitindo o verdadeiro desenvolvimento e a aplicação deste tratamento mundialmente.

2.1 A Rejeição no Transplante Cardíaco

2.1.1 Rejeição Aguda Celular

Na rejeição aguda celular, as células apresentadoras de antígeno levam, direta ou indiretamente, a mensagem imune do enxerto até o linfócito T, num fenômeno denominado de alorreconhecimento. Neste processo, a membrana do linfócito T passa a ser bombardeada por múltiplos estímulos imunes que ativam diferentes efetores, tendo como especial destaque a calcineurina que, por meio da interleucina-2, promove a expansão clonal dos linfócitos T, levando então à produção dos seguintes clones celulares e enzimas^{35,36}.

Linfócitos T auxiliares (CD4 – Linfócitos T Helper) – identificam os antígenos na membrana das células que sofreram fagocitose pelos macrófagos e, dessa forma, ativam a imunidade específica do organismo;

Linfócitos T citotóxicos (CD8 – Linfócitos T Killer) – têm a capacidade de induzir a lise das células alvo, no caso em questão as células do enxerto;

Linfócitos B – são responsáveis pela imunidade humoral devido à produção de anticorpos contra antígenos estranhos, podendo dar origem aos plasmócitos (células produtoras de anticorpos) ou às células de memória;

Células citotóxicas naturais (Células Natural Killer) – são linfócitos granulares que destroem células alvo por aderência, à semelhança dos linfócitos T citotóxicos (CD8); e o sinal de proliferação ou enzima alvo da rapamicina (mTOR – *Target of Rapamycin*) – regulamenta a transcrição do RNA mensageiro, atuando no crescimento, proliferação, motilidade, sobrevivência e síntese proteica do linfócito.

A imunossupressão geralmente se baseia em regimes de indução, manutenção e tratamento da rejeição aguda,³⁷ descritos a seguir:

- O regime de indução procura obter e induzir tolerância ao enxerto. Esta terapia vem sendo reservada aos pacientes em alto risco de rejeição ou falência renal.
- A terapia de manutenção geralmente consiste da combinação terapêutica de corticosteroides, agentes antiproliferativos e inibidores de calcineurina. A terapia de combinação de drogas procura atingir a ativação das células linfócitos T em vários estágios, permitindo assim diminuir as doses de cada uma das drogas.
- A terapia de rejeição ou de resgate refere-se à terapia imunossupressora utilizada para reverter um episódio de rejeição aguda. A

rejeição é tratada mediante o aumento da terapia oral, com pulsos de corticosteroides orais ou endovenosos, com mudanças na terapia oral ou com o uso de agentes antilinfocíticos monoclonais ou policlonais.

2.1.2 Rejeição Mediada por Anticorpos

A rejeição mediada por anticorpos pode ser entendida como outra modalidade de reação imunológica que tem curso geralmente mais grave, pois já existem anticorpos pré-formados circulantes contra os aloantígenos do sistema HLA (*Human Leukocyte Antigens*) do enxerto. Trata-se de uma situação catastrófica que leva à disfunção aguda do órgão, e os imunossupressores não conseguem exercer qualquer efeito imediato.^{38,39,40} Como medida preventiva para coibir este evento, tem-se preconizado o conhecimento prévio da reatividade do potencial receptor frente a um painel de linfócitos e o conhecimento prospectivo da prova cruzada de linfócitos. Desta forma, torna-se possível alocar os corações doados de modo mais racional aos receptores mais adequados.

2.2 Doença Vasculiar do Enxerto

A doença vascular do enxerto no transplante cardíaco é uma complicação insidiosa, caracterizada por inflamação perivascular persistente e hiperplasia intimal. Foi descrita pela primeira vez por Thomson, 1969,¹ e

emerge como o fator mais importante que afeta a sobrevivência em longo prazo após o transplante.^{2,4,}

A doença vascular do enxerto e a aterosclerose coronária são doenças ateromatosas com algumas semelhanças e diferenças na sua apresentação macroscópica e microscópica. Ambas as doenças são caracterizadas pelo aumento da expressão de células de adesão molecular e infiltração leucocitária, ambiente similar e perfis de citocinas, matriz extracelular aberrante e acúmulo precoce e prolongado de lipídios extracelular e intracelular, assim como migração de células musculares lisas, disfunção endotelial e anormalidade na apoptose celular.

Representa um tipo de rejeição na qual a agressão imune ao endotélio da coronária ocorre de forma persistente e se constitui na principal complicação tardia, limitando a sobrevida do paciente e do próprio enxerto em longo prazo.⁴¹

Muito embora a falência aguda do enxerto após transplante tenha melhorado nas últimas duas décadas, o mesmo não se pode dizer em longo prazo, no qual as conquistas têm sido menos pronunciadas. A doença vascular do enxerto aparece como a principal complicação após o primeiro ano de transplante e carece de uma terapêutica específica e eficaz. A importância desta entidade pode ser observada na análise comparativa das curvas de sobrevida apresentadas pelo Registro de Transplante Cardíaco da International Society for Heart and Lung Transplantation, na qual os pacientes que desenvolveram a vasculopatia apresentaram maior taxa de mortalidade em relação aos demais.⁴¹ A doença vascular do enxerto é responsável por 17% das mortes e pode ser detectada já a partir do primeiro ano após o transplante,

atingindo no terceiro ano cifras da ordem de 42% pela cinecoronariografia e 75% pela ultrassonografia intravascular.^{41,42,43,44,45}

A designação “doença vascular do enxerto” tem recebido maior aceitação em detrimento das demais – aterosclerose pós-transplante, rejeição crônica, aterosclerose acelerada, vasculopatia do enxerto e outras –, por expressar de forma mais adequada o fenômeno imunológico que é comum aos transplantes de órgãos sólidos³⁸.

A doença vascular do enxerto é uma forma de vasculopatia coronária acelerada de origem imune ainda não totalmente esclarecida, na qual concorrem também fatores não imunológicos. Contudo, a porta de entrada muito provavelmente é a disfunção endotelial, pois permite a agressão da camada subintimal e estimula a proliferação miointimal na parede da artéria. O processo inflamatório se estende para todo o leito arterial e, ocasionalmente, para as veias, poupando apenas os vasos nativos do receptor^{36,46}.

Na fase inicial da lesão pode-se observar discreto espessamento da íntima, com fibrose hiperplásica pouco intensa e aumento das proteínas da matriz extracelular. Nesta fase a lâmina elástica interna ainda está intacta e o acometimento limita-se às artérias proximais. Posteriormente, o espessamento progride difusamente pela vasculatura coronária, com o surgimento de placas de tecido fibroadiposo e depósito gradativo de cálcio com a formação futura de placas isoladas de ateroma^{47,48}. As primeiras alterações da íntima podem ser observadas já a partir do sexto mês após o transplante.^{43,44,47}

Na fase tardia da doença observa-se que o espessamento da íntima é difuso, com hiperplasia e fibrose concêntrica. Em estudo detalhado das artérias

coronárias tem-se constatado a incorporação de lipídios e placas focais de ateromas entremeadas à arterite difusa^{47,48}. O espessamento das artérias ocorre pela infiltração de células inflamatórias mononucleares em resposta aos estímulos aloimunes ou por infecção, sendo que nesta última situação merece especial destaque a participação do citomegalovírus. Em fase mais avançada, a camada média pode ser total ou parcialmente substituída por tecido fibroso. Somente os vasos com pouca ou nenhuma camada muscular podem ser poupados.^{49,50,51}

A participação da rejeição aguda é controversa no desenvolvimento da doença vascular do enxerto^{52,53,54}. Dentre os fatores não imunológicos considerados de risco para a doença vascular do enxerto destacam-se aqueles que podem comprometer a integridade do endotélio, abaixo classificados.^{52,53,54,55,56,57}

Quanto ao doador: etiologia da morte encefálica, idade, sexo, doença aterosclerótica e as suas características clínicas.

Quanto à preservação do enxerto: condições hemodinâmicas no momento da cardiectomia, tempo de uso de catecolaminas endovenosas, tempo de isquemia, as injúrias de isquemia e reperfusão.

Quanto ao receptor: idade, sexo, infecção pelo citomegalovírus, diabetes melito, hipertensão, dislipidemia, tabagismo, obesidade e a hiperhomocisteinemia. Entre estes se destacam a hiperlipidemia e o diabete melito, com incidência entre 50% a 80%.

A Figura 1 destaca de forma esquemática os principais fatores envolvidos no desenvolvimento da doença vascular do enxerto.

A Figura 2 apresenta os mecanismos e fatores de risco para DVE e Aterosclerose.

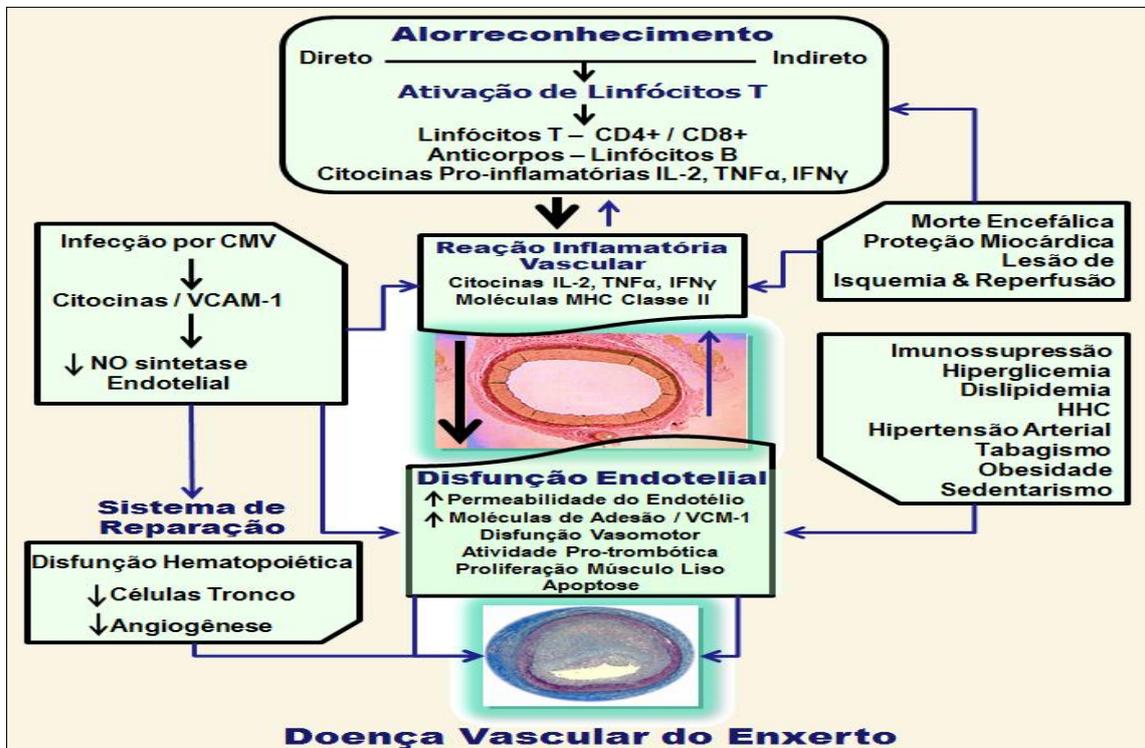


Figura 1- Doença Vascular do Enxerto. O primeiro passo no desencadeamento da doença vascular do enxerto é o alorreconhecimento que ocorre após a reperfusão do enxerto, agravada pela disfunção endotelial pós-anóxica. As principais citocinas envolvidas no processo de rejeição são: a interleucina-2 (IL-2), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A IL-2 induz a proliferação e diferenciação de linfócitos T; o IFN- γ ativa os macrófagos, e o TNF- α por si só é citotóxico para o coração transplantado. Além disso, o TNF- α aumenta a expressão das moléculas MHC de classe I, enquanto que IFN- γ aumenta a expressão do MHC de ambas as classes I e II. Em geral, estas citocinas podem levar à rejeição crônica do enxerto. O IFN- γ e o TNF- α induzem a produção de molécula de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1), promovendo a adesão de monócitos e a passagem através do endotélio e, conseqüentemente, a doença vascular do enxerto. A morte encefálica oriunda de forma explosiva promove maior liberação de citocinas, moléculas de adesão e aumenta a expressão de antígenos classe I e II do sistema MHC, promovendo uma reação inflamatória exacerbada no coração do potencial doador e levando à disfunção endotelial.

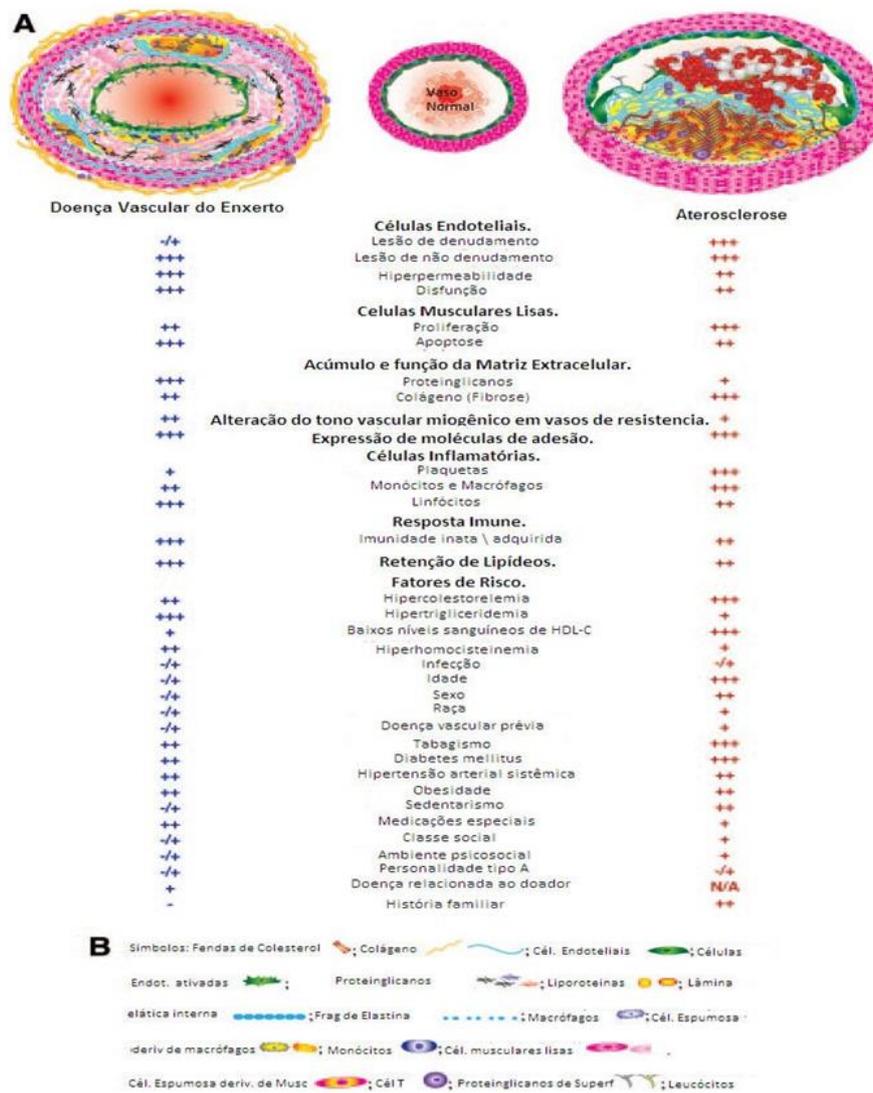


Figura 2- Mecanismos e fatores de risco para DVE e Aterosclerose. Topo (A): O vaso normal mantém um endotélio intacto, sem espessamento intimal e lâmina elástica interna não comprometida. Apresenta uma muscular média uniforme, e a adventícia é uma zona delicada e resistente de tecido fibro elástico. Na DVE e Aterosclerose grave, o endotélio é severamente danificado e disfuncional, promovendo a inflamação, aumento do espessamento intimal, e, finalmente, o desenvolvimento de placas fibrogordurosas proliferativas e focos degenerativos. A lesão da DVE, indicada na ilustração, mostra o desenvolvimento de uma lesão ateromatosa com íntima espessada, enquanto a lesão aterosclerótica nativa mostra trombose em cima de um núcleo necrótico definido com fendas de colesterol e placas, rachaduras e fissuras. Os mecanismos de progressão de base contributiva de cada doença e alguns fatores de risco importantes são listados e ponderados sinopticamente. A contribuição para a patogênese de cada um desses fatores é enfatizada por uma grade entre + a +++++, na qual + é ligeiramente contributivo e + + + + é muito contributivo. A cor azul indica as contribuições para DVE; a vermelha, as contribuições para a aterosclerose. Fundo(B): Definição dos símbolos. Modificado de Rahmani et al., 2006.⁵⁸

O diagnóstico clínico da doença vascular do enxerto é difícil, pois a isquemia miocárdica apresenta curso silencioso por tratar-se de um coração desnervado. Na fase avançada, a doença manifesta-se frequentemente com sinais de insuficiência cardíaca, arritmias ou até morte súbita.^{47,49,59,60}

A angiocoronariografia pode não expressar a real gravidade da doença vascular do enxerto, uma vez que o exame permite somente a análise do diâmetro interno da artéria e não da parede^{57,59,60,61}. Tem-se proposto a complementação do exame com a ultrassonografia intravascular, que permite detectar o espessamento da parede da artéria coronária mesmo na fase inicial do processo.⁴⁵ Contudo, este método ainda não está amplamente difundido, é invasivo e limita-se apenas à análise das artérias de maior calibre.

Em relação aos métodos não invasivos, o ecocardiograma de estresse com dobutamina tem mostrado vantagens como um exame de triagem não invasivo e com boa sensibilidade para selecionar os pacientes com maior risco de doença vascular do enxerto.^{44,62,63,64}

Dentre os métodos cirúrgicos alternativos merecem especial destaque a revascularização direta do miocárdio ou por angioplastia, embora ambas apresentem sérias restrições pela própria distribuição universal da inflamação nas artérias; portanto, o prognóstico da doença é sombrio e poucos pacientes conseguem se beneficiar com o retransplante.^{59,65,66}

Em última análise, o tratamento efetivo da doença vascular do enxerto em humanos é inexistente, limitando-se simplesmente à aplicação de medidas profiláticas para reduzir os fatores de risco. Desta forma, o tratamento desta

terrível doença constitui-se um campo fértil de pesquisa, porém com múltiplos desafios.

2.3 Expressão Gênica de Receptores Celulares, Mediadores Inflamatórios e Metaloproteinases na Doença Vascular do Enxerto

A doença vascular do enxerto é uma inflamação eminentemente de origem imune que acomete as artérias coronárias e diferentes mediadores participam deste complexo processo ^{46,48,50}. Considerando-se a extensão e a complexidade do tema, na Tabela 1 encontram-se descritos alguns desses fatores que participam de formas e proporções variáveis no desenvolvimento da doença vascular do enxerto; no futuro alguns deles poderão talvez transformar-se em marcadores diagnósticos da reação inflamatória que acomete a doença vascular do enxerto.

Tabela 1- Receptores Celulares, Mediadores Inflamatórios e Metaloproteínas analisados por PCR em tempo real

Sigla	Descrição	Atividade
Receptores Celulares		
CD 36	Receptor de Trombospondina (<i>Thrombospondin receptor</i>)	Antiangiogênica. Participa no reparo das lesões, na migração e proliferação celular.
LDLR	Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade (<i>Low density lipoprotein receptor</i>)	Carreadores captadores de lipoproteínas de baixa densidade.
LRP-1	Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade Relacionada à Proteína 1 (<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>)	Participa da função endocítica da célula, metabolismo das lipoproteínas, degradação de proteases e a ativação do lisossomo.
Mediadores Inflamatórios		
IL-1β	Interleucina-1 β	Pró-inflamatória. Origem da IL-1 pela ação da caspase-1. Induz a expressão de selectina E, VCAM-1 e ICAM-1.
IL-10	Interleucina-10	Inibe as citocinas pró-inflamatórias, tais como interferon- γ , IL-2, IL-3 e TNF- α . Inibe os macrófagos e ativa os linfócitos B.
IL-18	Interleucina-18	Pró-inflamatória. Estimula macrófagos, IL-12 e o interferon- γ .
TNFα	Fator de Necrose Tumoral fração α (<i>Tumor necrosis factor-α</i>)	Migração de células dendríticas intersticiais para os órgãos linfoides, ativando as células T efetoras.
VCAM1	Molécula de Adesão de Célula Vascular 1 (<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>)	Adesão de proteínas de linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos ao endotélio vascular.
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos 1 (<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>)	Diapedese de monócitos, células T de memória e células dendríticas. Efeito protetor na restauração cardíaca.
Metaloproteínas		
MMP-9	Metaloproteinase de Matriz 9 (<i>Matrix metalloproteinase 9</i>)	Facilita a invasão dos leucócitos nos tecidos.
MMP-12	Metaloproteinase de Matriz 12 (<i>Matrix metalloproteinase 12</i>)	Participa na quebra da matriz extracelular. Aumenta na doença vascular do enxerto.

ICAM-1 – Intercellular Adhesion Molecule 1; PCR – Polymerase Chain Reaction.

Outras citocinas também têm sido incriminadas na gênese da doença vascular do enxerto, como a interleucina-16, produzida pelas células endoteliais e linfócitos, com função quimioatraente e moduladora dos linfócitos T⁶⁷. A interleucina-17 e a interleucina-12 são citocinas pró-inflamatórias e, à semelhança do interferon- γ , agem no recrutamento de monócitos e neutrófilos no sítio da inflamação. Assim, o bloqueio dessas interleucinas diminui a produção de interleucina-6, Proteína-1 Quimiotática de Monócitos (MCP-1) e a doença vascular do enxerto.^{68,69,70}

2.4. Modelos em Animais

Na atualidade, é cada vez maior a dificuldade de realizar pesquisas em modelos animais de grande porte, devido aos altos custos de obtenção, manuseio e manutenção dos mesmos, assim como as restrições impostas pela bioética. Por isso os modelos em pequenos animais são considerados preferenciais nas pesquisas cardiovasculares⁷¹. A maior parte desses estudos é realizada em ratos, camundongos e coelhos.

2.4.1. Animal estudado

O coelho (*Oryctolagus cuniculus*) é animal de experimentação amplamente utilizado em pesquisa. Em 1899, Elsberg⁷² publicou estudo

experimental sobre o tratamento das feridas do coração por meio de suturas ao músculo cardíaco, modelo desenvolvido em coelhos, numa época em que a cirurgia cardiovascular era rudimentar.

2.4.1.1 Anatomia do coelho

As estruturas mais proeminentes da cabeça deste animal, em formato de funil, são os ouvidos externos (orelhas); localizados lateralmente, os olhos permitem um campo visual amplo, incluindo visão binocular posterior pequena, apresentam uma bem desenvolvida terceira pálpebra que se movimenta do canto medial sobre a córnea durante a anestesia ou sono; as pupilas são capazes de ampla dilatação, resultando em uma alta sensibilidade da retina quando as luzes estão baixas.

As orelhas representam 12% da área corporal total, são altamente vascularizadas e quando há calor apresentam grandes *shunts* arteriovenosos. São livremente móveis e apresentam movimentação independente. A face convexa das orelhas é levemente pilosa, e apresenta uma artéria central altamente acessível e veias laterais. A orelha é frágil, e composta por uma cartilagem elástica central coberta por uma fina camada de pele, o que as torna inapropriadas para a sujeição do animal.

O pescoço se diferencia do crânio ventralmente por uma prega de pele pedunculada, chamada papada.

De modo semelhante ao formato usual dos mamíferos, o tronco se subdivide em tórax anterior, abdome caudal e costas ou dorso.

O membro anterior é dividido em ombro, braço, antebraço e mão, e cada um deles possui cinco dedos, com uma garra longa e curva. O membro posterior se divide em coxa, perna e pé, que apresenta quatro dedos diferenciados externamente.

O timo é consideravelmente grande no coelho adulto, descansa parcialmente ventral sobre o coração e se estende até o interior do tórax. A cavidade pleural bilateral contém os pulmões, que estão separados pelo mediastino, onde se localiza o coração. O mediastino posterior é ocupado pelo esôfago, aorta torácica, brônquios, vasos pulmonares e nódulos linfáticos.

O coração do coelho se diferencia de outros mamíferos por conter uma valva atrioventricular direita composta por duas cúspides em vez de três, o que torna o termo “valva tricúspide” inapropriado.

A região do nó sinusal é menos complexa que em outras espécies. Somente um pequeno grupo de células marca passo gera os impulsos no coelho.

A mais óbvia diferença morfológica entre o tecido cardíaco de condução e o músculo cardíaco é a presença de túbulos transversos nas células musculares, inexistentes nas células de Purkinje.

No coelho o nervo aórtico não responde a quimiorreceptores, somente a barorreceptores, enquanto o nervo do seio carotídeo responde a ambos.

No coelho, assim como no ser humano, o bulbo carotídeo está localizado na bifurcação da carótida comum.

A artéria carótida interna é relativamente pequena em coelhos, mas é a maior fonte de irrigação do cérebro.

A artéria pulmonar e seus ramos são mais musculares que em humanos.⁷³

2.4.1.2 Fisiologia do sistema cardiovascular

Na região do nó sinoatrial do coelho, só um pequeno número de células gera o impulso elétrico de despolarização celular. As valvas atrio-ventriculares do coração de coelhos são capazes de gerar espontaneamente impulsos de despolarização celular *in vitro* na solução de Tyrode; esta propriedade difere das valvas de caninos, que precisam catecolaminas para automatismo.

O coração do coelho é relativamente resistente se comparado ao do cachorro, ao dano oxidativo. Isto pode ser atribuído em parte ao baixo nível miocárdico de xantina oxidase, e desempenha papel importante na produção de espécies citotóxicas de oxigênio, as quais estão implicadas no dano cardíaco. A atividade da xantina oxidoreductase varia segundo os mamíferos, sendo baixa em coelhos e humanos. Apesar de o coração do coelho ser relativamente livre de xantina oxidase, existem radicais livres que contribuem para a disfunção pós-isquêmica.⁷⁴

2.4.1.3 Anatomia Coronariana

No coelho, a anatomia coronariana define-se pela emergência da artéria coronária direita de óstio próprio, dirigindo-se para a margem do ventrículo direito, originando o ramo interventricular posterior.

A artéria coronária esquerda também emerge de óstio próprio, dirige-se para a margem do ventrículo esquerdo, bifurcando-se pouco antes de atingir a margem propriamente dita, em ramo interventricular anterior e ramo circunflexo, que emite ramos ventriculares posteriores.⁷⁵

2.4.1.4 Modelo de Doença Vascular do Enxerto

Um dos modelos frequentemente empregados para o estudo da DVE é o de transplante cardíaco heterotópico em coelhos.

Esse modelo foi idealizado por Alonso et al., que em 1977 realizaram o TxC conforme descrito por Carrel e Guthrie (1905), e aprimorado posteriormente por Foegh e Ewel et al. Neste se realiza o TxC de forma heterotópica, ao nível cervical ou abdominal.^{5,9,10,11,12, 76,77,78}

Foegh (1993)⁵ desenvolveu o modelo de forma apurada e ressaltou suas características e vantagens ao compará-lo com o modelo em ratos, sendo estas:

- o modelo em coelhos tem sido considerado mais semelhante ao dos humanos;
- a lesão se desenvolve de forma tubular semelhante ao que ocorre em humanos, ao contrário dos ratos, que é segmentar; e
- curto tempo de desenvolvimento da arterite, entre 5 a 6 semanas, ao contrário dos ratos, que requerem de 12 a 24 semanas.

Neste modelo, a doença vascular do enxerto é caracterizada pela presença da hiperplasia fibrosa da íntima exacerbada pela infiltração gordurosa. Na gênese do processo observam-se o sinergismo de dois eventos, a reação inflamatória imune sobre as coronárias do enxerto devido à rejeição e a hipercolesterolemia induzida, uma vez que o coelho não tem habilidade para metabolizar o colesterol ²⁴. Modelo semelhante foi desenvolvido no Laboratório de Lípidos do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HCFMUSP) e se encontra muito bem padronizado; em tal modelo, ficou demonstrada a preferência do depósito de colesterol no coração transplantado em relação aos demais órgãos nativos. ^{26,79, 80, 81}

2.5 Nanotecnologia e Nanociência

A nanotecnologia e nanociência, que têm como escala valores de 1 a 100 nanômetros (nm), se focalizam em materiais de tamanho atômico, molecular e supramolecular, que apontam o controle e manipulação desses novos materiais precisamente configurando átomos e moléculas, produzindo novos agregados moleculares e desenhando sistemas de autoagregação para criar dispositivos supramoleculares à escala celular ou menor.

A nanoescala é prevalente nos sistemas naturais, já que vários componentes de importância funcional das células vivas encaixam-se nesta classificação antropométrica, mas poucas drogas ou dispositivos de diagnóstico, terapêutica e reparação têm sido desenvolvidos nesta escala.

As propriedades da nanoescala permitem alta densidade de função em pequenos pacotes para minimizar a invasibilidade e facilitar intervenções terapêuticas inteligentes com aumento da especificidade de liberação e ação, diminuição de efeitos secundários e capacidade de resposta a estímulos externos e de reportar-se a receptores externos.

A nanotecnologia e nanomedicina são duas áreas de grande crescimento que têm proporcionado novas oportunidades diagnósticas e terapêuticas para as doenças cardiovasculares, pulmonares, hematológicas e do sono. No futuro próximo a nanotecnologia desempenhará um papel cada vez mais significativo na prática cotidiana de cardiologistas, pneumonologistas e hematologistas.

Buxton et al. (2003)⁸² identificaram quatro áreas da bionanotecnologia como as mais promissoras em descobertas e aplicação. São elas:

- Biossensores e diagnósticos.
- Liberação de drogas e terapêutica.
- Imagens.
- Engenharia de tecidos e biomateriais.

2.6 Nanopartículas e liberação de fármacos

O uso de nanopartículas em medicina foi primeiramente realizado no tratamento do câncer e progrediu rapidamente, sendo bem utilizadas para resolver as limitações que apresentam os sistemas de liberação de drogas convencionais, tais como a biodistribuição inespecífica e alvo, solubilidade em água, pobre biodisponibilidade oral e baixos índices terapêuticos.

Uma forma efetiva para obter eficiência na entrega de fármacos será desenvolver de maneira racional nanossistemas baseados no conhecimento de suas interações com o ambiente biológico, a população de células-alvo, as mudanças dos receptores celulares que acontecem com a progressão da doença, o mecanismo e sítio de ação do fármaco, a retenção da droga, a administração de múltiplos medicamentos, o mecanismo molecular e a patobiologia da doença em consideração.⁸³

Cho et al., 2008⁸⁴ classificaram os tipos de nanopartículas usadas como sistema de liberação ou entrega de fármacos em:

- Carreadores de drogas baseados em polímeros, nos quais a droga pode ser fisicamente aderida ou covalentemente ligada a uma matriz polimérica; os polímeros utilizados como conjugados de drogas podem ser divididos em dois grupos:
 - Micelas poliméricas.
 - Dendrímeros.

- Carreadores de drogas baseados em lípides:
 - Lipossomas são estruturas coloidais fechadas de automontagem, compostas por duas camadas de lípides ao redor de um espaço aquoso central.

Nanopartículas virais. Uma variedade de vírus tipo parvovirus canino e bacteriófagos foi desenvolvida para aplicação biomédica e de nanotecnologia, que inclui a liberação de drogas e terapia de tecidos.

Nanotubos de carbono. São cilindros compostos por anéis de benzeno, e têm sido aplicados na biologia como sensores de detecção de DNA e proteínas, dispositivos de diagnósticos para discriminação de diferentes proteínas para amostras séricas e carreadores de liberação de vacinas ou proteínas. (Figura 3).

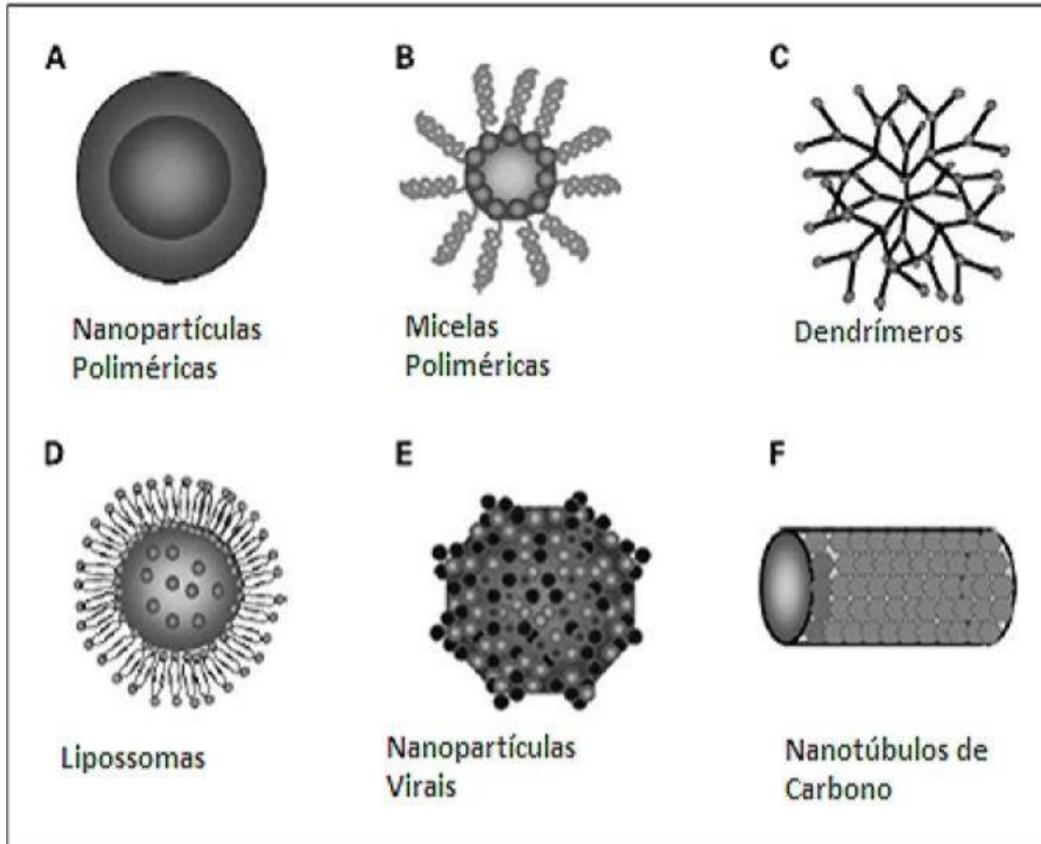


Figura 3- Ilustração dos diferentes tipos de Nanopartículas para entrega de fármacos. Modificado de Cho et al., 2008.⁸⁴

2.7 Nanopartícula de colesterol ou LDE

Na área da nanotecnologia biomédica, o grupo liderado por Maranhão tem realizado contribuições pioneiras no mundo: descreveram o primeiro sistema de nanopartículas s (não lipossomais) produzidas em laboratório, capazes de direcionar e concentrar fármacos no sítio de ação (*drug targeting*) para tratamento de doenças proliferativas como o câncer e a aterosclerose.

Entre 1992 e 1994 Maranhão descreveu a criação do sistema de nanoemulsões lipídicas artificiais (LDE) que são parecidas com a estrutura lipídica da lipoproteína de densidade baixa (LDL), a qual transporta a maior parte do colesterol circulante no homem. Tanto a LDE como a LDL podem ser observadas nas figuras 4 e 5. Foi demonstrado que, quando injetadas na circulação, as partículas da nanoemulsão são captadas pelas células através de endocitose mediada pelos receptores da LDL.⁸⁵

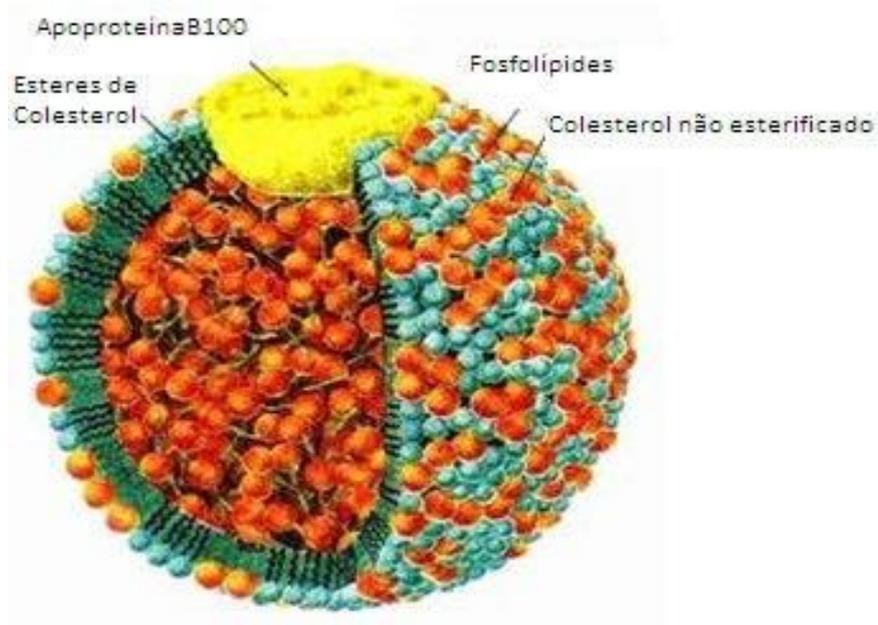


Figura 4- Estrutura da lipoproteína de densidade baixa (LDL). Modificado de www.foodspace.wordpress.com

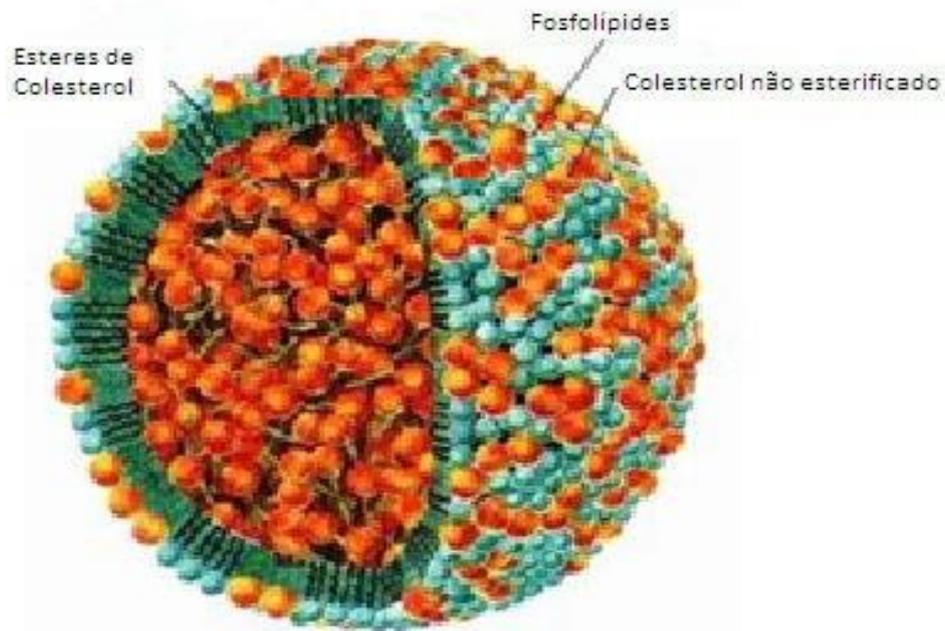


Figura 5- Estrutura da nanoemulsão lipídica (LDE). Modificado de www.foodspace.wordpress.com

As partículas LDE são esféricas, com diâmetro da ordem de 25-50 nm. Assim como a LDL, têm um núcleo constituído de ésteres de colesterol, com quantidades residuais de triglicérides, envolvido por uma monocamada de fosfolípides; na monocamada superficial há uma proporção pequena de colesterol na forma livre. A LDE é feita sem proteínas e não apresenta a apolipoproteína B 100; mas em contato com o plasma, em colisões com as diversas lipoproteínas, as apolipoproteínas (apo), como a apo CII, apo A1, apo E e outras, aderem à superfície das partículas. A apo E serve de ligante da LDE aos receptores da LDL. Por isso, a LDE é removida mais rapidamente da circulação do que a própria LDL natural: a apo E tem de 20 a 30 vezes mais afinidade pelo receptor do que a apo B100, única apo da LDL natural e ligante da LDL ao receptor, como mostra a figura 6.

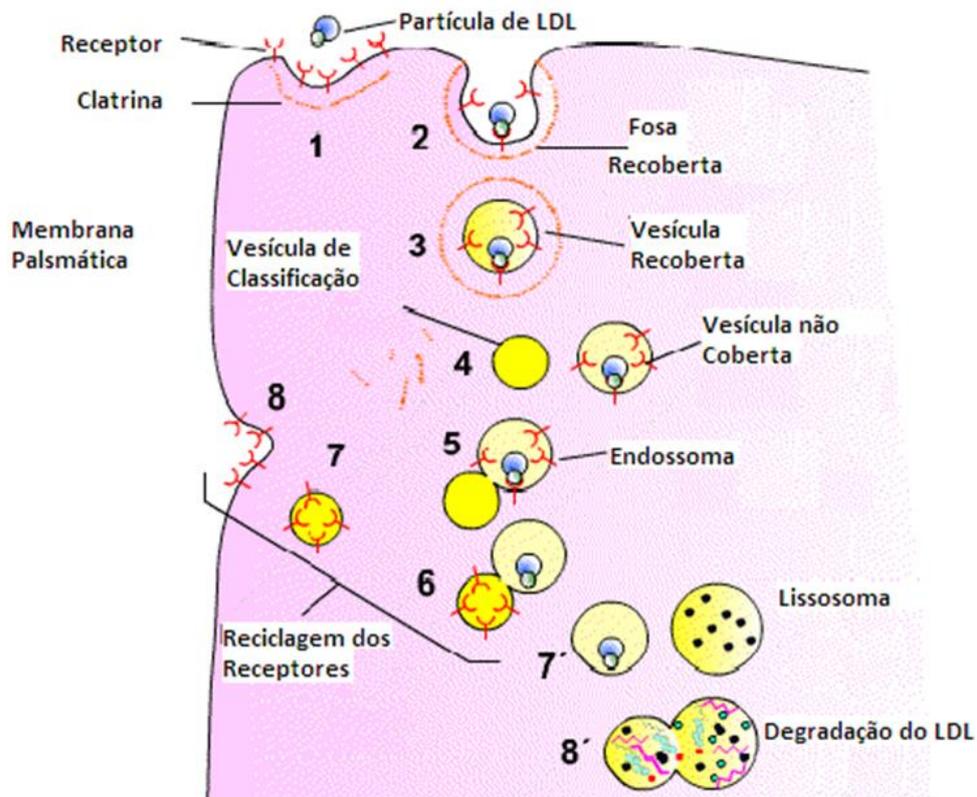


Figura 6- Mecanismo de ação do Receptor da LDL. Modificado de www.biologia.edu.br

Um fascinante terreno de aplicações de impacto foi aberto com a descoberta de que a LDE, após injeção na corrente circulatória, concentra-se nos tecidos tumorais e pode ser usada no tratamento do câncer como veículo para direcionar quimioterápicos para as células neoplásicas ⁸⁶. A célula neoplásica, provavelmente pela necessidade de aporte lipídico maior exigido pela proliferação acelerada, apresenta acentuado aumento na expressão dos receptores da LDL. Isto possibilita o uso da LDE como veículo para concentrar no tecido neoplásico quimioterápicos associados às partículas. Os quimioterápicos são assim desviados dos tecidos normais do organismo. Com isso, pode-se aumentar a eficiência terapêutica desses agentes e diminuir os

efeitos colaterais que constituem limitação importante à quimioterapia. A descoberta inicial foi descrita em pacientes com leucemia mielocítica aguda,^{79,81} em que a superexpressão dos receptores atingiu até 100 vezes. Mais recentemente, foi descoberto que a LDE pode concentrar-se também em tecidos onde haja processos proliferativos não neoplásicos.⁸⁷ Em seguida descobriu-se, em coelhos com aterosclerose induzida por dieta rica em colesterol, que o processo inflamatório existente na aterosclerose também propicia a concentração da nanoemulsão nas artérias lesadas.⁸⁸ Essas descobertas ampliaram o leque de potenciais aplicações da nanoemulsão como veículo de fármacos, não só nas neoplasias, mas na aterosclerose e em outros processos inflamatórios crônicos.

Nos experimentos visando ao tratamento do câncer com a nanoemulsão como veículo, foram obtidos progressos significativos. Isto foi mostrado não só em animais de experimentação, mas também em pacientes nos quais tanto a LDE quanto os fármacos a ela incorporados se concentram nos tumores^{15,17,18,89}. A incorporação e a estabilidade de fármacos no interior da LDE foram otimizadas com a modificação dos fármacos sem que houvesse perda do seu efeito farmacológico. Dessa forma, com a modificação desses fármacos, foi possível prosseguir com a montagem de um arsenal terapêutico associado às nanoemulsões. Preparações da LDE, associada a formas modificadas dos agentes quimioterápicos etoposídeo),⁸⁹ paclitaxel¹⁸ e metotrexato,⁹⁰ estão prontas e com eficiência testada *in vitro* e *in vivo*. Em todos os casos, comparando-se essas associações com nanoemulsões às respectivas preparações comerciais, mostrou-se em cultura de células

neoplásicas e modelos de tumores implantados em animais (tumor de Walker e melanoma B-16), uma ação terapêutica maior em doses mais baixas, melhor eficiência na regressão tumoral e maior sobrevida dos animais ^{91,18,92}. Em ensaios clínicos com a carmustina, etoposídeo e paclitaxel ^{19,20,86} verificou-se que no uso desses fármacos associados à LDE, mesmo em doses mais altas do que as usualmente empregadas na clínica, a toxicidade esteve praticamente ausente.

Os resultados descritos acima nos direcionaram, então, para a aplicação dessas nanoemulsões no tratamento dos pacientes com transplante cardíaco, em que predominam dois problemas principais: a rejeição do receptor ao órgão transplantado e a DVE. Trata-se de duas entidades de difícil manejo clínico, que comprometem seriamente o êxito dos transplantes cardíacos e que demandam novas soluções terapêuticas. Para a DVE, em geral, não há tratamento convencional, apenas o retransplante. As bases inflamatórias e proliferativas da DVE são semelhantes às da doença cardiovascular aterosclerótica. Desta forma, o fato de um agente antiproliferativo associado à LDE ter sido eficiente na promoção da regressão da aterosclerose experimental faz supor que seja igualmente eficiente como abordagem terapêutica da DVE.

2.7.1 A Nanopartícula de LDE-Paclitaxel

No tocante à aplicação do sistema de nanoemulsões artificiais que se ligam aos receptores da LDL no tratamento das doenças cardíacas, Maranhão e colaboradores recentemente mostraram que o paclitaxel, associado às nanoemulsões artificiais, produz regressão acentuada dos ateromas de coelhos com indução de aterosclerose, da ordem de 60% no tratamento de quatro semanas ²¹. A fundamentação para o uso do paclitaxel é a ação antiproliferativa celular deste quimioterápico, largamente utilizado no tratamento do câncer. A aterosclerose é basicamente um processo inflamatório-proliferativo, em que a multiplicação das células musculares lisas e macrófagos ao lado do depósito lipídico é componente central na formação da placa de ateroma. A concentração do paclitaxel nas lesões, que bloqueia a mitose celular, é o mecanismo que produziu os resultados obtidos nesses experimentos, em que houve acentuada redução das lesões. Conforme esperado pela documentação acumulada nos modelos animais e pacientes oncológicos, a toxicidade aos coelhos durante o tratamento foi desprezível. Portanto, esse avanço permite uma nova abordagem para o tratamento das doenças cardiovasculares. Proporcionaria também uma terapia de resgate na doença cardiovascular grave e conjugaria o uso de potentíssimos agentes antiproliferativos com um sistema que, neutralizando seus efeitos colaterais, os leva para os sítios de lesão.

2.7.2 A Nanopartícula de LDE-Metotrexato

Majoros et al., em 2009,⁹⁰ publicaram ampla revisão dos avanços obtidos na Universidade de Michigan com o emprego de nanofármacos, com especial destaque ao metotrexato, pela sua ampla aplicabilidade como quimioterápico e pela facilidade de incorporação. O metotrexato anexado apresentou bom desempenho *in vitro* e *in vivo*, produzindo melhores resultados nos animais e com redução dos efeitos colaterais quando comparado à administração convencional.

Seguindo a linha de pesquisa adotada pelos pesquisadores do InCor-HCFMUSP, a confecção da partícula de LDE-Metotrexato obedeceu aos mesmos princípios empregados na obtenção de outros fármacos ligados à LDE56. Para tanto, é necessário que inicialmente a molécula do metotrexato sofra um processo de esterificação para que seja possível a sua agregação à partícula LDE, o que leva à formação do complexo LDE-Metotrexato.

2.8 O Paclitaxel no Transplante

Paclitaxel é o fármaco precursor de uma nova classe de agentes estabilizantes de microtúbulos, os taxanos. Sua descoberta foi fruto de trabalho laborioso em que foram investigados pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI-USA) aproximadamente 12.000 compostos naturais, os

quais foram testados contra um painel de tumores experimentais; no final, apenas aqueles que apresentaram alguma atividade foram selecionados.⁹³

O paclitaxel foi extraído primariamente no começo dos anos 60 a partir do extrato de casca do teixo do Pacífico, chamado *Taxus brevifolia*. Sua forma pura somente foi obtida em 1969 e sua estrutura, descrita pela primeira vez em 1971,⁹⁴ está demonstrada na figura 7.

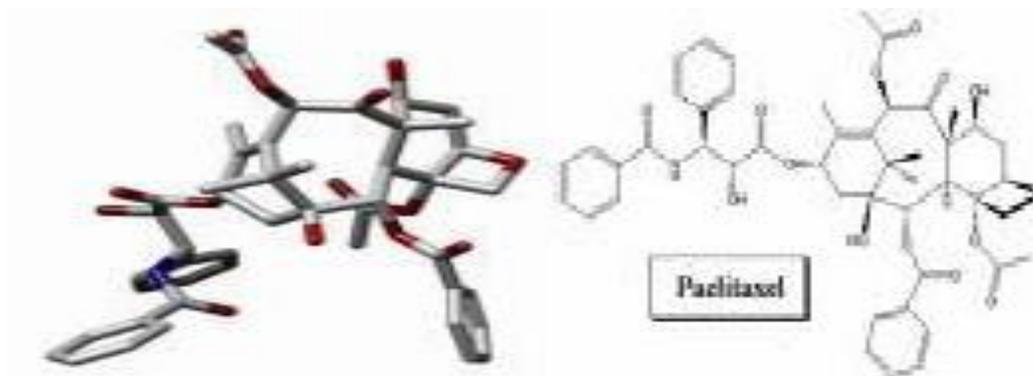


Figura 7- Estrutura tridimensional e bioquímica do Paclitaxel. Modificado de www.wikipedia.org e www.biotech.icmb.utexas.edu, respectivamente.

O paclitaxel não era um agente de reconhecida importância até o final dos anos 70, quando foi descoberto que possuía um mecanismo de ação único^{95,96,97}. O paclitaxel tem atividade antineoplásica em carcinoma epitelial de ovário, câncer de mama, colo uterino, células não-pequenas de pulmão e sarcoma de Kaposi.⁹³ É utilizado em vários países, dentre os quais o Brasil, como tratamento de primeira linha em câncer refratário de ovário e segunda linha em câncer de mama.

O mecanismo de ação do paclitaxel foi divulgado em 1984 por Manfredi et al.⁹⁸. Diferentemente de outros agentes que atuam nos microtúbulos, induzindo o desarme dos mesmos, tais como os alcaloides da vinca e colchicina, o paclitaxel promove a polimerização da tubulina, o que, por sua vez, estabiliza os microtúbulos, tornando-os não funcionantes. Os microtúbulos são componentes essenciais no processo de mitose, necessários durante a divisão celular e requeridos na manutenção do formato celular, assim como em várias outras atividades, como mobilidade, ancoragem, transporte entre organelas celulares, processos de secreção extracelular, modulação da interação entre os receptores celulares de superfície e os fatores de crescimento e sinais de transdução intracelular. Esse mecanismo pode ser visto na figura 8.



Figura 8- Mecanismo de ação do Paclitaxel. Modificado de www.vasmedtech.com.

Os microtúbulos estão em um equilíbrio dinâmico com suas sub-unidades de proteínas solúveis, os heterodímeros α e β tubulinas; a interferência no equilíbrio normal entre os microtúbulos e suas sub-unidades pode levar a uma paralisação da divisão e mobilidade celular, como também outras atividades dependentes dos microtúbulos.

O paclitaxel liga-se reversivelmente aos microtúbulos e assim as células tratadas com paclitaxel não conseguem dividir-se e estão bloqueadas na fase G2 tardia ou M do ciclo celular. Da mesma forma, a movimentação, mudanças na forma, transporte intracelular e funções secretoras também estão inibidas.^{96,97}

Adicionalmente à inibição de neoplasias, o paclitaxel mostrou ter efeito sobre as células musculares lisas, controlando e/ou inibindo a proliferação intimal em modelos animais de lesão arterial em ratos,^{99, 100, 101} é usado atualmente revestindo *stents* para o tratamento hemodinâmico de aterosclerose coronária importante ou em reestenose após tratamento com *stent* convencional^{102,103,104}; porém não existe na literatura relato do uso na doença vascular do enxerto após transplante.

2.9 O Metotrexato no Transplante

As propriedades antineoplásicas do metotrexato são amplamente conhecidas e foram inicialmente descritas por FARBER e DIAMOND em crianças portadoras de leucemia, em 1948¹⁰⁵. Trata-se de um antimetabólito

que inibe o metabolismo do ácido fólico, e suas indicações estenderam-se para o tratamento de doenças autoimunes e, mais recentemente, como coadjuvante no controle de rejeição após transplante de órgãos. Os principais efeitos colaterais incluem: anemia, neutropenia, mielodepressão, equimoses, mucosites, náusea, vômitos, diarreia, dermatite, hepatite, fibrose pulmonar e efeitos teratogênicos.¹⁰⁶

O metotrexato exerce o seu efeito antimetabólito por meio da potente inibição da di-hidrofolato redutase e a interrupção da síntese da purina. Desta forma, promove a interrupção da replicação e função de linfócitos T e B, possivelmente devido à ação sobre a replicação do DNA (Deoxyribonucleic Acid). O mecanismo de ação celular do metotrexato encontra-se esquematizado na Figura 9, onde se nota a sua ação inibitória sobre o metabolismo do ácido fólico e, conseqüentemente, a proliferação celular.¹⁰⁶ Os principais efeitos celulares do metotrexato manifestam-se da seguinte forma sobre as células imunes:

Neutrófilos – a liberação de adenosina promovida pelo metotrexato induz a redução da aderência do neutrófilo no endotélio e a liberação do fator de crescimento do neutrófilo.

Macrófagos – por mecanismo semelhante ao dos neutrófilos, os macrófagos perdem a capacidade de aderência, opsonização e fagocitose.

Células Endoteliais – pela liberação de adenosina há diminuição da permeabilidade do endotélio, limitando os danos aos tecidos. A produção de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8 e a expressão de moléculas de adesão) também é suprimida pela liberação de adenosina. Por outro lado, a liberação

aumentada de adenosina pode acelerar a apoptose das células endoteliais e permitir o extravasamento para os tecidos dos elementos inflamatórios.

Resposta Imune e Humoral – a ação direta do metotrexato sobre anticorpos circulantes e linfócitos T é controversa.

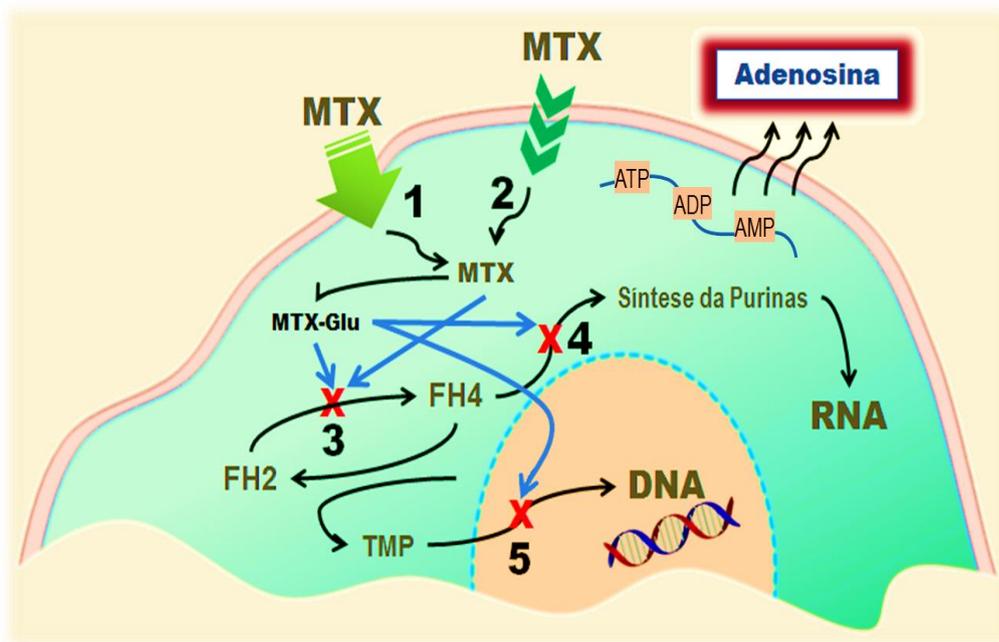


Figura 9- Ação do metotrexato. O metotrexato tem como alvo inibir o metabolismo do ácido fólico. O metotrexato (MTX) atinge o citoplasma da célula passando através da membrana com auxílio do transportador de folato reduzido (1), utilizando uma via endocítica que é ativada por um receptor de folato (2). No interior da célula o metotrexato transforma-se em metotrexato-glutamato (MTX-Glu) e juntamente com o próprio metotrexato, passam a inibir a formação do tetra-hidrofolato (FH4) a partir da di-hidrofolato (FH2) (3). O complexo, metotrexato-glutamato inibe também a síntese das purinas (4), que é necessária para a síntese no RNA, e do timidilato (TMP) (5), que participa na formação do DNA. Desta forma, inibe a proliferação celular. As alterações metabólicas celulares induzidas pelo metotrexato levam à liberação extracelular de adenosina, conseqüente à degradação da cadeia de adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP).

O uso do metotrexato em baixas doses como fármaco coadjuvante alternativo em pacientes com rejeição aguda refratária à terapia convencional foi inicialmente proposta por Costanzo-Nordin et al., em 1988 ¹⁰⁷. Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado que essa associação aumenta a sobrevida dos enxertos cardíacos e tende a reduzir a ação tóxica dos demais imunossupressores. Os bons resultados apresentados em pequenas séries clínicas, mesmo que de forma controversa, têm entusiasmado diferentes autores a utilizá-lo em situações especiais ^{108,109,110,111, 112, 113}. Pacientes que receberam o metotrexato como fármaco de manutenção por cerca de um ano exibiram maiores taxas de rejeição aguda, porém, sem interferência no desenvolvimento de doença vascular do enxerto. ⁶⁷ Estes achados poderiam levantar a questão se o metotrexato forneceria algum efeito protetor sobre o desenvolvimento de doença vascular do enxerto cardíaco neste grupo de alto risco; contudo, essas observações não são uniformes e carecem de maiores investigações. ¹¹⁰

O metotrexato diminuiu a infiltração de linfócitos T e a expressão das moléculas de adesão celular CD-18 e ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), porém, não foi capaz de modificar a expressão do TNF- α . ^{112,113} Todavia, a associação de metotrexato com ciclosporina exibe efeito sinérgico e a redução da expressão gênica desses marcadores torna-se mais pronunciada. Essa associação de imunossupressores também tem demonstrado habilidade para reduzir a expressão de citocinas citotóxicas, tais como TNF- β , linfotoxinas e serina proteases, e, desta forma, tem prolongado a sobrevida dos enxertos.

As informações acima descritas encontram ressonância com aquelas observadas na prática clínica, que apontam as vantagens do uso do metotrexato como fármaco coadjuvante à imunossupressão e limitações quando usado como agente isolado. A literatura ainda carece de maiores investigações que tenham por objetivo a análise da ação do metotrexato como agente capaz de inibir ou retardar o desenvolvimento da doença vascular do enxerto.^{108,109,116}

3. Objetivo

3.1 Objetivo Principal

- Verificar se o tratamento da doença vascular do enxerto com LDE-paclitaxel associado ao LDE-metotrexate é eficaz, e se é possível conseguir um efeito terapêutico adicional, em comparação com o efeito isolado dos dois fármacos associados à LDE.

3.2 Objetivo Secundário

- Investigar se a expressão gênica dos mediadores inflamatórios no tecido cardíaco se altera após o tratamento em combinação com LDE-paclitaxel e LDE-metotrexato.
- Investigar a toxicidade do tratamento associado de LDE-paclitaxel com LDE-metotrexato.

4. Método

4.1 Distribuição dos Animais e a Dieta

Na presente investigação experimental foram empregados 52 coelhos machos, assim distribuídos: 28 coelhos da raça New Zealand brancos, que fizeram parte do grupo dos receptores de corações provenientes de 28 coelhos do grupo de doadores da raça New Zealand vermelhos. Os corações dos doadores foram transplantados de forma heterotópica na região cervical dos animais receptores e se constituíram no alvo deste estudo. Todos os animais receptores receberam diariamente, no pós-operatório, ciclosporina via oral, como imunossupressor, para controle da rejeição celular aguda.

Todos os animais, tanto doadores como receptores, consumiram ração habitual comercial durante uma semana para adaptação também às condições ambientais do biotério. Esta dieta é constituída por 16% de proteínas, 7% de lipídeos, 14% de fibra bruta, 7% de cinzas e 50% de extrato não nitrogenado. Após o transplante os animais receptores passaram a receber diariamente 150g de ração enriquecida com 0,5% de colesterol (peso/peso) durante todo o período do experimento, o qual teve duração de seis semanas. A água foi sempre oferecida à vontade.

Para fins de análise do comportamento da doença vascular do enxerto frente aos fármacos eleitos, os coelhos brancos, considerados receptores, foram divididos em quatro grupos de estudo, assim designados:

Grupo Controle – constituído por sete animais submetidos ao transplante heterotópico e tratados diariamente com 10mg/Kg de peso corpóreo de ciclosporina e semanalmente com 3mL de solução salina por via endovenosa (veia auricular) durante 6 semanas, com início no dia do transplante;

Grupo LDE-Paclitaxel – constituído por sete animais submetidos ao transplante heterotópico e tratados diariamente com 10mg/Kg de peso corpóreo de ciclosporina e semanalmente com 4mg/Kg de peso corpóreo de LDE-Paclitaxel por via endovenosa (veia auricular), com início no dia da operação e término após seis semanas de seguimento, antes da eutanásia.

Grupo LDE-Metotrexato – constituído por sete animais submetidos ao transplante heterotópico e tratados diariamente com 10mg/Kg de peso corpóreo de ciclosporina e semanalmente com 4mg/Kg de peso corpóreo de LDE-Metotrexato por via endovenosa (veia auricular), com início no dia da operação e término após seis semanas de seguimento, antes da eutanásia.

Grupo LDE-Paclitaxel / LDE-Metotrexato (Combinado) – constituído por sete animais submetidos ao transplante heterotópico e tratados diariamente com 10mg/Kg de peso corpóreo de ciclosporina, semanalmente com 4mg/Kg de peso corpóreo de LDE-Paclitaxel e 4mg/Kg de peso corpóreo de LDE-Metotrexato por via endovenosa (veia auricular), com início no dia da operação e término após seis semanas de seguimento, antes da eutanásia.

O preparo e a composição da partícula encontram-se mais bem descritas no próximo item a seguir – **4.2** – que versará sobre o preparo da

nanoemulsão lipídica sólida (LDE), a incorporação do paclitaxel e a incorporação do metotrexato.

Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais apropriadas e confortáveis, com temperatura ambiente controlada entre 20°C e 22°C, mantendo-se um ciclo alternado entre claro e escuro, a cada 12 horas.

As gaiolas eram limpas diariamente, assim como a dieta e a água eram também trocadas concomitantemente. Ao cabo de seis semanas de observação os coelhos receptores receberam heparina sódica (5.000UI/mL) por via endovenosa na dose de 10.000UI/Kg de peso corpóreo, e a seguir foram submetidos à eutanásia com a infusão endovenosa de dose letal (30mg/Kg) de pentobarbital sódico a 5%. Estes cuidados estão em concordância com as orientações preconizadas pelas normas brasileiras de experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, e a Lei N° 11.794 de 08/10/2008, ou Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais, que revogou a Lei N° 6.638 de 08/05/1979.

O presente projeto foi aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Coração HC-FMUSP, na sessão de 09 de maio de 2012, sob SDC 3739/11/157, tendo recebido fomento pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob o N° 2011/50032-0.

4.2 Preparo da nanoemulsão lipídica sólida (LDE), a incorporação do paclitaxel e a incorporação do metotrexato

A nanoemulsão lipídica (LDE) foi preparada segundo a técnica modificada por MARANHÃO,⁸⁰ a qual consiste em se colocar em um frasco 40mg de fosfatidilcolina, com auxílio de pipeta, e adicionar 20mg de oleato de colesterol, 1mg de trioleína e 0,5mg de colesterol, diluídos em clorofórmio e metanol na proporção de 2:1. Os solventes residuais foram então evaporados da mistura acima com fluxo de nitrogênio e com o emprego de um dessecador a vácuo, por 16h, a 4°C⁸⁰. Posteriormente, foram adicionados à mistura 10mL de solução tampão tris-HCl a 0,01M e com pH de 8,0. A seguir, a mistura de lípides foi emulsionada com irradiação ultrassônica, utilizando-se equipamento Branson Sonifier® – modelo 450A (Arruda Ultra-Som, São Paulo, Brasil), durante 3h, em atmosfera rica em nitrogênio, e com temperatura no intervalo entre 51°C e 55°C.

Para obtenção da nanoemulsão com partículas com diâmetro e tamanho dentro do espectro desejado para tal fim, a solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação, empregando-se uma ultracentrífuga com rotor modelo Beckman SW-41® (Beckman Coulter, Inc/USA). Na primeira etapa, a mistura sofreu centrifugação de 200.000 x g por 30 minutos, a 4°C, obtendo-se assim uma fração sobrenadante, de cerca de 1mL, a qual foi retirada por aspiração e desprezada. A mistura restante recebeu brometo de potássio ajustando-se a densidade para 1,21g/mL. A seguir, praticou-se uma segunda centrifugação a 200.000 x g por 2h a 4°C, e a nanoemulsão LDE foi recuperada do topo do tubo por aspiração. O excesso de

brometo de potássio foi removido por diálise com duas trocas de 1000 volumes de solução tampão tris-HCl a 0,01M e pH de 8,0. Finalmente, a nanoemulsão foi esterilizada por ultrafiltração em membrana do tipo Milipore™ com 0,22µm de diâmetro e porosidade de 70%, em capela e armazenada a 4°C por até 30 dias.

A molécula de paclitaxel foi modificada e associada à nanoemulsão através de cossonicação ou irradiação ultrassônica, conforme descrito por Rodrigues et al. (2005).¹⁸

A molécula do metotrexato de sódio (Purifarma - São Paulo-SP, Brasil) necessita sofrer modificações na sua estrutura para aumentar a sua lipofilicidade, ou seja, aumentar a sua capacidade de se dissolver em lípides. Desta forma, a incorporação da molécula em partículas de nanoemulsão torna-se mais fácil e eficiente. Este processo consiste na di-esterificação da molécula do metotrexato de sódio com o brometo de dodecila na presença de carbonato de cézio como catalisador, obedecendo aos postulados de ROSOWSKY et al., descritos em 1984.¹⁷ Desta forma, obtém-se a molécula de metotrexato modificada, agora denominada de di-dodecilmetotrexato, a qual foi purificada pelo método da cromatografia.

Assim, o paclitaxel e o metotrexato modificados, conforme descrito anteriormente,^{18,26} foram incorporados separadamente à nanoemulsão LDE na razão de 5:1 em massa de lípides:fármaco. A solução resultante foi então agitada com auxílio de um dispositivo de homogeneização ultrassônico Digital Sonifier® modelo 450 (BRANSON Ultrasonics Corporation/USA), durante 40 minutos a 55°C, dotado de uma sonda de 1 centímetro de titânio liso. A mistura

resultante foi centrifugada a 3500 rpm durante 40 minutos a 55°C, em banho de água e gelo para separar e excluir os fármacos livres (paclitaxel/metotrexato). A nanoemulsão LDE com o paclitaxel incorporado e o metotrexato incorporado foi preparada no mesmo dia do experimento e esterilizada em filtro de membrana com poros 0,22µm de diâmetro (Millipore) e armazenada a 4°C. A taxa de incorporação do fármaco à nanoemulsão foi medida por HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), antes de ela ser administrada aos animais²⁶.

4.3 Preparo da Dieta Rica em Colesterol

A dieta rica em colesterol a 0,5% foi obtida pela técnica de preparo incorporada pelo Laboratório de Lípidos do Incor-HCFMUSP, conforme descrito em pesquisas anteriores^{21,24, 26 79, 80, 81, 86}. O processo consiste na vaporização de uma solução de colesterol, éter etílico e etanol a 70% sobre a ração comercial habitualmente utilizada para estes animais (Purina Inc.®), obedecendo a proporção de 0,5g de colesterol para cada 100g de ração. O colesterol foi dissolvido em solução composta por 50mL de éter etílico e 100mL de álcool a 70% por grama de colesterol, mantendo-se a solução final sob agitação a 40°C. A ração comercial recebeu a solução acima descrita e permaneceu em repouso por 24 horas em capela para evaporação dos solventes. Após este período, a ração enriquecida de colesterol foi fracionada em amostras isoladas de 150g e armazenada a -20°C.

4.4 Tática Operatória

4.4.1 Anestesia dos Animais

A indução anestésica dos coelhos foi realizada inicialmente com cloridrato de xilazina (2,3g/100mL) na dose de 23mg/Kg de peso corpóreo por via intramuscular na região de uma das coxas e a seguir foi administrado cloridrato de cetamina (1,16g/10mL) na dose de 50mg/Kg de peso corpóreo por via intramuscular na coxa contralateral.

Com o animal sob anestesia geral foi realizada tricotomia em uma das orelhas para punção e cateterismo da veia auricular com dispositivo de acesso de veia superficial modelo Jelco® de calibre 24G, seguindo-se a sua fixação com fita adesiva apropriada. A seguir, administrou-se por via endovenosa dose única de 0,5mL da solução de sulfato de atropina (0,25mg/mL) e 15.000UI de heparina sódica (5.000UI/mL). Para manutenção do acesso venoso e hidratação do animal foi instalado soro fisiológico, mantendo-se a infusão contínua na razão de 1mL/min.

O aporte de oxigênio suplementar foi garantido imediatamente após a indução anestésica e mantido durante todo o procedimento operatório através de máscara facial fixada de forma confortável. O oxigênio somente foi suspenso ao término do procedimento e após o completo despertar do animal. A proteção dos olhos foi realizada com gazes umedecidas em soro fisiológico, mantidas durante todo o procedimento.

A manutenção da anestesia foi realizada com a infusão endovenosa contínua de 3,5mL/h da solução composta por 200mg de cetamina em 20mL de soro fisiológico, com auxílio de bomba específica para tal fim. Durante a operação, quando o coelho apresentava sinais de que a anestesia havia passado para um plano superficial, eram administradas doses adicionais de 0,5mL da solução de cetamina a cada 15min até que houvesse abolição completa dos movimentos involuntários.

Considerando-se a alta sensibilidade dos animais aos fármacos em geral, a administração do anestésico suplementar era feita sempre de forma lenta para não promover depressão respiratória, considerando-se que a ventilação ocorria de forma espontânea.

4.4.2 Ato operatório

Após indução da anestesia geral, os coelhos foram posicionados em mesa operatória apropriada em decúbito dorsal horizontal com fixação protegida e confortável dos quatro membros. O aporte suplementar de oxigênio e os acessos venosos foram mais uma vez conferidos antes do início do procedimento operatório propriamente dito. Estas mesmas atitudes foram empregadas tanto nos animais receptores como nos doadores de coração.

A tricotomia foi realizada de forma ampla nas áreas operatórias, com especial atenção à região cervical anterior direita no receptor e a região torácica mediana no doador. A antissepsia da área demarcada foi realizada

inicialmente com sabonete antisséptico líquido de digluconato de clorexidina (2,0%), seguida com solução alcoólica de digluconato de clorexidina (0,5%). A proteção das áreas operatórias foi realizada com a colocação de panos estéreis que delimitavam o campo operatório.

A intervenção foi iniciada pela cervicotomia vertical direita na face anterior do pescoço do receptor para exposição da artéria carótida comum e da veia jugular externa, após diérese e dissecação dos tecidos adjacentes. Os vasos foram dissecados e isolados para receberem o coração doador, como apresentado na Figura 10A. A seguir, deu-se início à toracotomia mediana transternal no animal doador. Ambas as operações foram sincronizadas de tal forma que os animais permanecessem o menor tempo possível sob a ação dos anestésicos.

A pericardiotomia ampla e a dissecação dos vasos que chegam e emergem do coração foram realizadas de forma rápida e com muito cuidado, tendo em vista a fragilidade das estruturas envolvidas. Cuidado especial foi destinado às pleuras para se evitar lesão das mesmas, uma vez que os animais eram mantidos com ventilação espontânea. Todavia, não raramente uma das pleuras foi perfurada, contudo, os animais toleravam muito bem.

Os vasos cardíacos foram inicialmente reparados com fio de algodão 4-0 para minimizar o tempo de isquemia quente durante a cardiectomia (Figura 10B). A retirada do coração obedeceu sempre à seguinte sequência: ligadura e secção das veias cavas e pulmonares; adição de soro fisiológico gelado a 4°C; secção bem distal da aorta e artérias pulmonares. Finalizada a cardiectomia, o coração foi imerso em soro fisiológico a 4°C, quando se realizava a revisão das

ligaduras, dissecação da aorta e tronco pulmonar com preparo dos seus cotos distais para as respectivas anastomoses (Figura 10 C).

Todos os corações doadores, antes de serem transplantados, eram retirados da solução salina gelada e devidamente protegidos em gaze estéril para serem pesados em balança de precisão.

O implante do coração doador no coelho receptor iniciava-se pelo seu posicionamento do órgão na região cervical do receptor, sobre os vasos dissecados, de tal forma que a parede anterior do ventrículo esquerdo ficasse voltada para a região caudal do animal. Os segmentos dos vasos para a realização das anastomoses eram escolhidos, de modo que o coração adquirisse posição confortável e sem o risco de torção ou angulações das anastomoses.

A artéria carótida comum foi ocluída com pinças vasculares delicadas do tipo *Bulldog* retas ou anguladas, escolhidas em função da situação anatômica. As pinças foram colocadas em posição proximal e distal à região onde se praticaria a abertura longitudinal do vaso para confecção da anastomose término-lateral com a aorta do doador (Figura 10D). A anastomose vascular foi realizada com sutura contínua empregando-se fio monofilamentar de polipropileno 7-0. Essa mesma tática operatória foi empregada na confecção da anastomose entre o tronco pulmonar do doador e a veia jugular externa, seguindo com modificações sobre o modelo experimental proposto por Alonso et al., em 1997 ⁷⁶. Durante a confecção das anastomoses o coração permaneceu envolto em gaze umedecida com soro fisiológico gelado, que era colocado periodicamente para garantir a proteção miocárdica com hipotermia.

Ao término das anastomoses a pinça proximal da carótida comum foi aberta de forma intermitente e progressivamente para minimizar os efeitos da reperfusão do coração e facilitar a saída de ar, seguindo-se a retirada da pinça distal. Posteriormente, as pinças proximal e distal da veia jugular foram retiradas, respeitando-se esta ordem para facilitar a drenagem venosa do coração. Algumas vezes a recuperação da contratilidade miocárdica foi auxiliada com massagens delicadas e a instilação de soro fisiológico aquecido. Ao término do procedimento o coração doador adotava posição anatômica com o ápice voltado superiormente em direção à porção posterior da mandíbula. Confeccionou-se então uma loja subcutânea adequada para receber de forma confortável o coração, sem produzir compressão ou mantê-lo excessivamente livre (Figuras 10E e 10F). A síntese dos tecidos somente foi realizada com fio monofilamentar de nylon 4-0, após extensa revisão da hemostasia para se evitar a formação de hematomas.

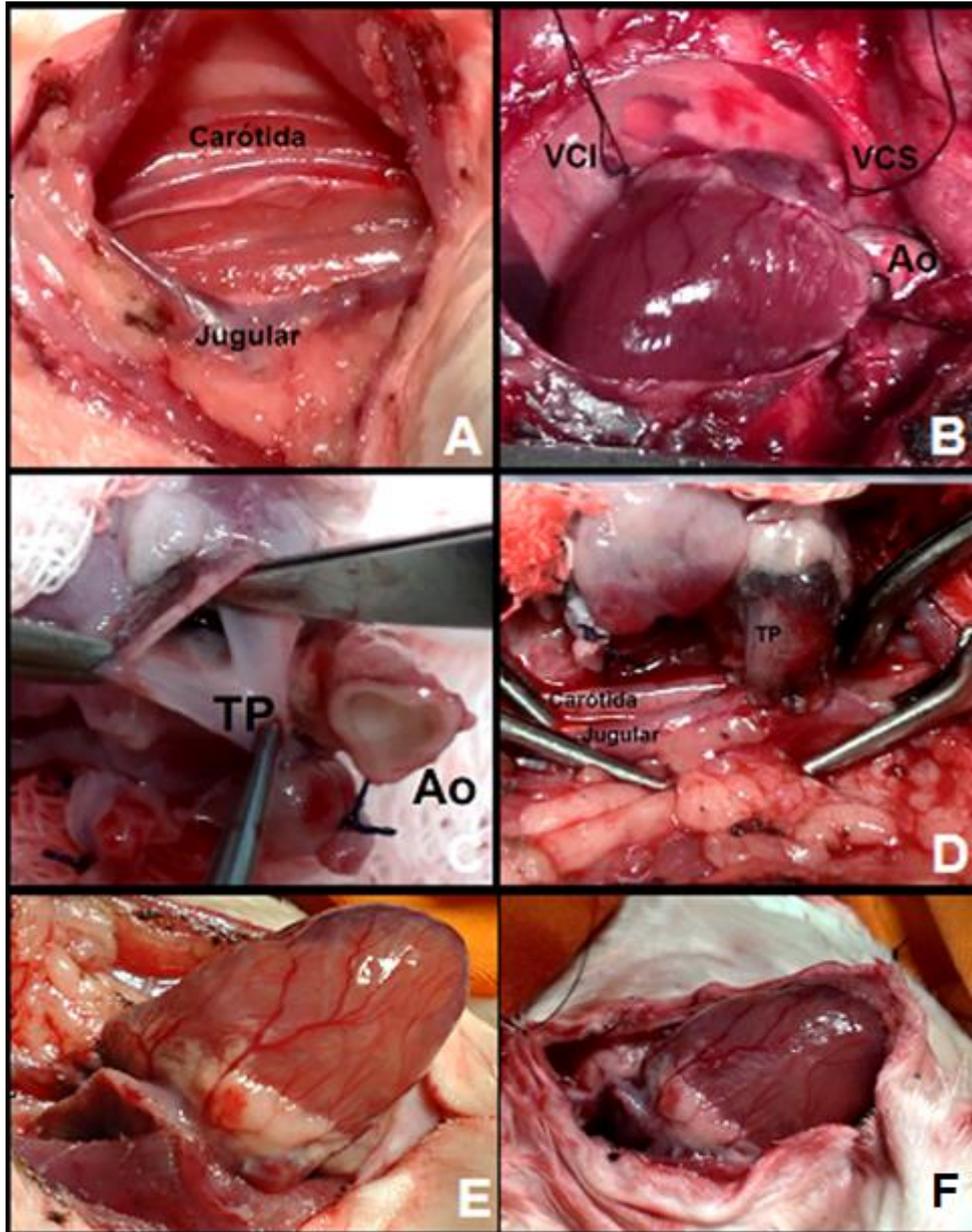


Figura 10- Principais etapas do transplante heterotópico do coração de coelho na região cervical. **A** – Exposição dos vasos cervicais artéria carótida e veia jugular. **B** – A veia cava superior (VCS) e a inferior (VCI) encontram-se ligadas e a aorta (Ao), preparada para a cardiectomia. **C** – Término da dissecação do tronco pulmonar (TP) e aorta (Ao). **D** – Término do implante com exposição da anastomose do tronco pulmonar (TP) na veia jugular. **E** – Término das anastomoses e reperusão do enxerto. **F** – Posição do coração no interior da loja cervical.

4.5 Antibioticoprofilaxia e Controle da Viabilidade do Enxerto

Após a anestesia geral, todos os coelhos receberam dose única, 300.000UI de penicilina benzatina (300.000UI/mL) por via intramuscular em uma das coxas como antibioticoprofilaxia.

A viabilidade do enxerto era controlada diariamente pela identificação dos batimentos cardíacos por meio da palpação direta do órgão sobre a pele. Deve-se ressaltar que a análise da função ventricular do enxerto não fez parte dos objetivos da presente investigação, portanto, outros parâmetros hemodinâmicos habitualmente utilizados para este fim não foram aqui utilizados. Procurou-se garantir sempre que os batimentos estivessem preservados para que a resposta inflamatória sobre as artérias coronárias pudesse se manifestar na sua plenitude. Os animais que apresentaram assistolia do coração transplantado em algum momento do período de estudo foram automaticamente excluídos da investigação.

4.6 Protocolo de Imunossupressão

A imunossupressão consistiu na administração diária de ciclosporina A na dose de 10mg/Kg de peso corpóreo desde o momento do transplante até o dia anterior à eutanásia, conforme preconizado por FOEGH et al., em 1993.⁵

No dia do transplante, os coelhos receptores já estavam previamente destinados para um dos quatro grupos de estudo. Os animais do **Grupo**

Controle foram tratados diariamente com 10mg/Kg de peso corpóreo de ciclosporina e semanalmente com 3mL de solução salina (0,9%) por via endovenosa (veia auricular) durante 6 semanas, com início no dia do transplante. Os animais do **Grupo LDE-Paclitaxel** foram tratados diariamente com 10mg/Kg de peso corpóreo de ciclosporina e semanalmente com 4mg/Kg de peso corpóreo de LDE-Paclitaxel por via endovenosa (veia auricular), com início no dia da operação e término após seis semanas de seguimento, antes da eutanásia. Os animais do **Grupo LDE-Metotrexato** foram tratados diariamente com 10mg/Kg de peso corpóreo de ciclosporina e semanalmente com 4mg/Kg de peso corpóreo de LDE-Metotrexato por via endovenosa (veia auricular), com início no dia da operação e término após seis semanas de seguimento, antes da eutanásia. Os animais do **Grupo LDE-Paclitaxel / LDE-Metotrexato (Combinado)** foram tratados diariamente com 10mg/Kg de peso corpóreo de ciclosporina, semanalmente com 4mg/Kg de peso corpóreo de LDE-Paclitaxel e 4mg/Kg de peso corpóreo de LDE-Metotrexato por via endovenosa (veia auricular), com início no dia da operação e término após seis semanas de seguimento, antes da eutanásia.

4.7 Parâmetros Operatórios Eleitos para Análise

Os seguintes parâmetros foram controlados durante o procedimento operatório e eleitos para análise, dentre outros coletados, a saber:

- **Tempo de Isquemia** – refere-se ao tempo decorrido entre a parada induzida no coração doador e o seu restabelecimento após a reperfusão e após o transplante, medido em minutos;
- **Tempo de Implante** – corresponde ao tempo consumido durante as confecções das anastomoses vasculares, medido em minutos;
- **Tempo de Recuperação dos Batimentos do Coração** – corresponde ao tempo que o coração necessitou para o total restabelecimento dos seus batimentos, medido em minutos.

4.8 Avaliação da Toxicidade, Perfil Ponderal, Hematológico e Lipídico

Para avaliação de toxicidade dos tratamentos, foram analisados o perfil hematológico, a variação semanal de peso corporal e o consumo diário de ração dos animais transplantados durante o período do estudo.

O perfil lipídico dos animais foi avaliado pelas determinações séricas de triglicérides, colesterol total e da lipoproteína de alta densidade – HDL-C. Esses parâmetros serviram para avaliar os efeitos da administração da ração

aterogênica sobre o metabolismo lipídico e como indicador indireto da ingestão e absorção do colesterol fornecido aos animais. O peso dos coelhos e as determinações sanguíneas acima mencionadas foram controlados antes da introdução da dieta e antes da eutanásia.

4.9 Análise da Expressão Gênica de Receptores Celulares, Mediadores Inflamatórios e Metaloproteinases no Miocárdio

Após a remoção dos corações nativos e transplantados, cerca de 100mg de tecido miocárdico de cada um deles foram armazenados em RNA^{later}® Solution (Ambion) e utilizados para a extração do RNA total (*Ribonucleic Acid*). A extração do mRNA (*messenger RNA*) foi feita com a utilização do reagente TRIzol® (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante.

A qualidade das amostras foi analisada pela distribuição do material em corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% e as concentrações das mesmas foram determinadas por meio da leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda entre 260 e 280nm pelo aparelho NanoDrop 8000® (Thermo Scientific). As determinações foram consideradas satisfatórias para as razões 260/280 entre 1,8 e 2,0. Por conta da baixa concentração de RNA total nas amostras de miocárdio, e devido à grande quantidade de fibrose presente nos tecidos estudados foi feito um *pool* para cada grupo. A seguir, amostras de 1µg mRNA foram convertidas por transcrição reversa em cDNA (DNA

complementar) utilizando-se High Capacity RNA-to-cDNA (Master Mix, Applied Biosystems).

A expressão dos genes CD-36, LDL-R, LRP-1, IL-1 β , IL-10, IL-18, TNF- α , VCAM-1, MCP-1, MMP-9 e MMP-12 foi determinada por qRT-PCR (*Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*). O método de detecção utilizado foi o sistema Taqman®, o qual utiliza sondas fluorescentes para permitir a detecção do produto de PCR alvo. Esse tipo de detecção é altamente específico, por isso não requer padronização da reação.

A adoção do qRT-PCR tem como principal vantagem a possibilidade de quantificar a expressão do gene detectado pela amplificação do cDNA. A descrição sumária dos genes estudados encontra-se expressa na Tabela 1 na Introdução deste trabalho.

As reações foram realizadas em duplicata no equipamento RT-PCR StepOnePlus™ (Applied Biosystems Life Technology, Carlsbad, CA, USA). Para a amplificação utilizou-se 1,2 μ L de cDNA em 6 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix, 0,6 μ L de 20x Custom Taqman® Gene Expression Assays (Applied Biosystems Life Technology, Carlsbad, CA, USA) e água Milli-Q para completar o volume final de 12 μ L de reação. As condições de termociclagem foram: 50°C por 2 min, desnaturação a 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1min.

Os dados quantitativos foram normalizados pelo gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH - *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*), como gene de referência endógena da reação (*housekeeping control gene*). Os resultados obtidos foram analisados com auxílio de um

programa de estatística específico (SDS Software), que gera um gráfico de intensidade de fluorescência em função do número de ciclos de amplificação. Um ponto limiar (*threshold*) é definido automaticamente e a intensidade de fluorescência é estatisticamente diferente da fluorescência de fundo (*background*).

A curva obtida encontra-se na fase logarítmica de amplificação. O ciclo da reação onde a fluorescência da amostra intercepta o ponto de limiar é denominado de Ct (*cycle threshold*). A diferença entre os valores de Ct entre as amostras, após normalização com genes de expressão estável, reflete a sua expressão diferencial. Todas as reações foram realizadas em duplicata, e consideradas aceitáveis quando o desvio padrão entre elas foi inferior a 0,05.

A expressão gênica relativa foi calculada por meio da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, proposta por Livak e Schmittgen, descrita em 2001, na qual o valor inferido à Ct equivale à diferença entre o Ct do gene de interesse e o Ct do gene normalizador¹¹⁸. O valor do Ct representa o ciclo do PCR em que a quantidade de fluorescência produzida na reação atinge um limite pré-estabelecido. O cálculo da fórmula Ct envolve a subtração do valor de Ct do pool de amostras do grupo tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato do valor de Ct do pool de amostras do grupo controle. O resultado representa o número de vezes que o gene analisado tem a sua expressão aumentada ou diminuída no miocárdio dos animais tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato em relação ao miocárdio controle.

Tabela 2- SONDA/PCR: Marcadores inflamatórios, quimiotáticos, receptores de membrana celular e metaloproteínas analisados por PCR quantitativo em tempo real.

Gene	Nome do gene	Assay ID*	Sequência de Nucleotídeos da Sonda	Tamanho do Amplicon (pb)
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Oc03823402_g1	ATGCTGGTGCCGAGTACGTGGTGGGA	82
IL-1β	Interleukin-1 beta	Oc03823250_s1	ACCTGTCCTGCGTGATGAAAGACGA	86
IL-10	Interleukin-10	Oc03396940_m1	GAAGACTTTCTTTCAATCGAAGGAT	70
IL-18	Interleukin-18	Oc03399565_m1	TATTTCTTTAAGGAACTCACTCCT	144
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>	Oc03823583_s1	CGCTTCTGTGCCTGCTGCTCATAGC	69
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>	Oc03397346_m1	CCAAAGAACTACAGGTCTACATTTTC	79
TNFα	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>	Oc3397715_m1	AGGAGGAAGAGTCCCCAAACAACCT	74
MMP-9	<i>matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)</i>	Oc03397520_m1	CAGCTGGCAGAGGAGTACCTGTTCC	78
MMP-12	<i>matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)</i>	Oc03398610_m1	TACATCACCTACAGAATCAAAAATT	81
LDLR	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>	Oc03396245_g1	GGCATCACCTGGATCTTTCCAGCG	71
LRP-1	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein-1</i>	Oc03396403_m1	GGCACAGACCGGAAGATTGTGTACG	66
CD-36	<i>Cluster of differentiation 36</i>	Oc03395926_m1	ATTTGTAGGTCAATCTACGCTGTGT	80

* Ensaio inventariado sintetizado por Applied Biosystems (Life Technologies).

4.10 Avaliação Histológica

O experimento foi finalizado seis semanas após o transplante, quando os coelhos receptores foram submetidos à eutanásia com a infusão endovenosa de dose letal de pentobarbital sódico 5% (70mg/Kg), após receberem heparina sódica na dose de 10.000UI/kg. O coração nativo e o coração transplantado foram retirados e perfundidos com solução fisiológica através da aorta. Fragmentos com cerca de 1g do coração nativo e transplantado foram retirados para extração e análise do RNA.

Posteriormente, os corações foram fixados em solução de paraformaldeído (trioximetileno) a 2% e, a seguir, foram seccionados transversalmente desde o ápice até a base, e três segmentos da porção média foram encaminhados para análise histológica. A porção média do coração foi eleita para análise, pois é considerada a mais representativa no estudo dos vasos em razão de sua maior diversidade. Esta tática tem sido empregada por outros autores⁵⁹. Nesta região encontra-se com muita facilidade vasos de pequeno, médio e grande calibre, o que torna a amostra rica e mais representativa. Todas as artérias coronárias encontradas nas lâminas foram objeto da análise.

Os cortes do coração nativo e do coração transplantado foram fixados em formaldeído a 10%, embebidos em parafina e corados pelo método da hematoxilina-eosina.

4.10.1 Avaliação Histológica do Miocárdio

Tendo em vista que o objeto da presente investigação foi o estudo da progressão da doença vascular do enxerto no coração transplantado, a análise histológica priorizou a descrição da morfologia das artérias coronárias.

A avaliação histológica do miocárdio foi apoiada apenas nos seguintes critérios:

- facilidade no **reconhecimento do tecido miocárdico**;
- determinação da presença e no **grau de inflamação e necrose**; e na presença ou ausência de **esteatose, calcificação e hemorragia**.

As intensidades de **necrose, inflamação e fibrose** foram quantificadas subjetivamente, variando de **Grau 0 a 3**, de acordo com os seguintes critérios:

- **Grau 0** – ausência de alteração;
- **Grau 1** – presença de alteração em menos de 50% da área de cada campo em até 30% dos campos;
- **Grau 2** – presença de alteração em mais de 50% da área de cada campo em até 30% dos campos, ou presença de alteração em menos de 50% da área de cada campo em mais de 30% dos campos;
- **Grau 3** – presença de alteração tomando mais de 50% e menos de 70% da área de cada campo em mais de 30% dos campos.

- **Grau 4** – presença de alteração tomando mais de 70% da área de cada campo em mais de 30% dos campos.

Em relação à **inflamação** procurou-se identificar a presença ou não de padrão histológico granulomatoso, com células gigantes.

A análise do miocárdio limitou-se apenas à quantificação do grau de dificuldade do seu reconhecimento nas lâminas, uma vez que as alterações celulares nesse tipo modelo são muito intensas. Os critérios clássicos propostos de rejeição aguda celular pela *International Society for Heart and Lung Transplantation*, amplamente utilizados na prática clínica, não são aplicáveis no presente modelo⁷⁷. Enfatizamos mais uma vez que o foco deste estudo esteve sempre voltado única e exclusivamente à análise das artérias coronárias com vistas à análise da rejeição vascular do enxerto.

4.11 Morfometria e Imuno-histoquímica

A análise histológica morfométrica do desenvolvimento da doença vascular do enxerto nos corações dos coelhos foi realizada com auxílio de um microscópio modelo Nikon Eclipse 80i com programa NIS-Elements-AR.

Todas as artérias coronárias encontradas nas lâminas dos corações transplantados e nativos, como já anteriormente mencionado, foram devidamente analisadas, independentemente do diâmetro de cada uma delas⁷⁸.

O diâmetro das artérias e a proliferação da íntima foram medidos e quantificados para cada vaso. A razão entre a área da luz da artéria coronária e a área delimitada pela lâmina elástica interna foi utilizada para o cálculo da porcentagem da estenose de cada vaso⁷⁹. O valor do grau de estenose das artérias coronárias quantificado para cada animal foi o resultado da média obtida das determinações das estenoses encontradas em todas as artérias analisadas em cada um deles. Os valores foram expressos em termos de porcentagem, obtidos pela seguinte equação:

$$\% \text{ de Estenose} = \frac{\text{Área delimitada pela Lâmina Elástica Interna} - \text{Área da Luz da Artéria}}{\text{Área delimitada pela Lâmina Elástica Interna}} \times 100$$

Na Figura 11 observa-se um corte histológico representativo de uma artéria coronária de coração de coelho nativo e transplantado do Grupo Controle corado pelo método hematoxilina-eosina, e nela estão indicadas as áreas delimitadas pela lâmina elástica interna e a luz da artéria.

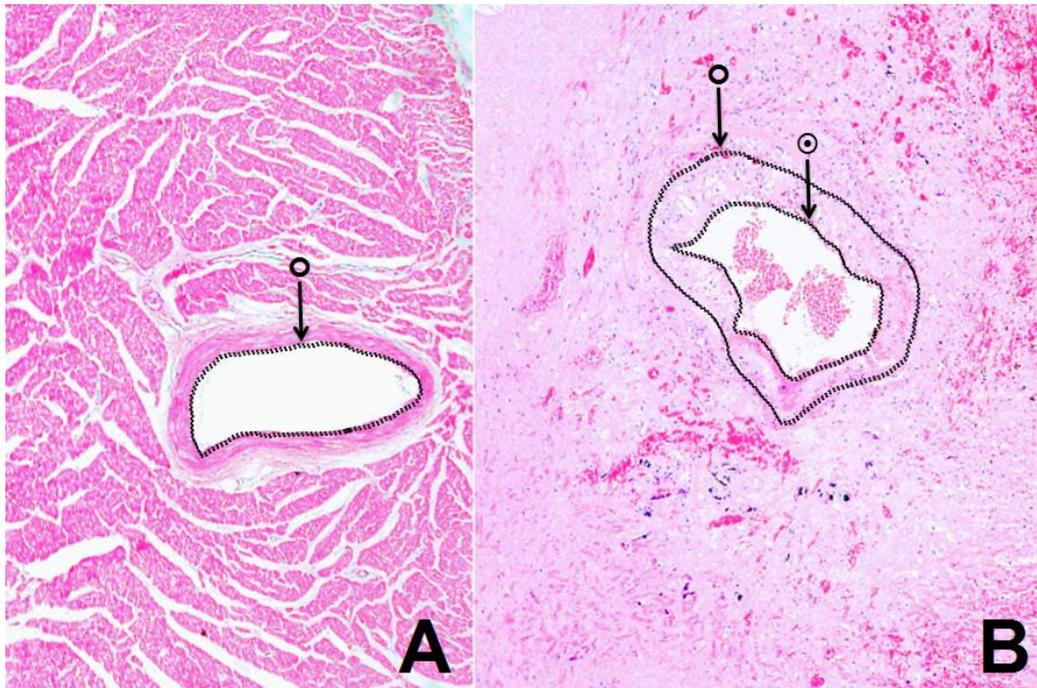


Figura 11- Corte histológico do miocárdio do coração de coelho para determinação da porcentagem de estenose. A – Microfotografia representativa do coração nativo de coelho, onde a seta (□) indica a lâmina elástica interna da artéria íntegra e justaposta ao endotélio. Trata-se de uma artéria sem estenose, na qual pode notar que o miocárdio apresenta aspecto normal e sem infiltração gordurosa. B – Corte representativo de coração transplantado do Grupo Controle, onde a seta (□) indica a lâmina elástica interna e a linha pontilhada correspondente à área delimitada pela mesma. A linha pontilhada indicada pela seta (□) delimita a luz da artéria, podendo se notar o espessamento sofrido pela íntima. Pode-se notar ainda a grande infiltração gordurosa e a destruição do miocárdio, a destruição da parede da artéria e a presença de coágulos pós-morte no interior da artéria. As linhas pontilhadas delimitam a área da elástica (□) e a área da luz da artéria (□), sendo que ambas são utilizadas na determinação do grau de estenose da artéria. Hematoxilina-eosina. Aumento de 100x.

O anticorpo anti-RAM-11, específico contra macrófago de coelho, cora os macrófagos presentes no tecido em marrom e a partir daí quantifica-se indiretamente a sua presença pela distribuição na área analisada.

4.12 Análise Estatística

Os valores dos parâmetros apresentados na condição denominada de **INICIAL** referem-se àqueles obtidos imediatamente antes do transplante; os de **FINAL**, àqueles obtidos ao término da investigação, ou seja, imediatamente antes ou após da eutanásia. Os resultados foram expressos em termos da média, desvio padrão, valor máximo, valor mínimo e nível de significância.

A análise de perfil lipídico, hematológico, variação de peso dos animais antes e depois do tratamento, e a análise da expressão gênica em tempo real relativa foi realizada pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer.

A análise da morfometria das artérias coronárias, o tempo de isquemia total, de implante e de recuperação dos batimentos do enxerto, e a área de infiltração de macrófagos foi realizada pelo teste *t* de Student. O nível *p* de significância adotado foi de 0,05.

5. Resultados

5.1 Tempo de isquemia

A tabela 3 mostra o tempo de isquemia total, que compreende a cardiectomia total e as duas anastomoses, a que foram submetidos os animais dos quatro grupos do estudo. Não houve diferença no tempo de isquemia entre os grupos.

Tabela 3- Tempo de isquemia (minutos) dos animais dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato. Valores expressos em média±desvio padrão.

Isquemia (min)	Controle	LDE-paclitaxel	LDE-metotrexato	LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato
	57±6	55±6	60±26	65 ± 3

5.2 Perfil Lipídico

O perfil lipídico dos coelhos foi determinado no início do experimento (basal) e ao término do tratamento (final) nos coelhos receptores. A tabela 4 mostra os valores de colesterol total, colesterol de HDL e triglicérides dos animais dos grupos controle tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.

O colesterol total final de todos os grupos foi cerca de 10 vezes maior do que o inicial, indicando a efetividade da dieta em causar dislipidemia nos animais. Não houve diferença entre as concentrações de colesterol total iniciais

dos grupos. Houve diferença entre as concentrações finais dos grupos controle e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato. Houve aumento das concentrações iniciais e finais de HDL em todos os grupos do estudo: cerca de 50%. A concentração de triglicérides basal do grupo LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato foi menor que no grupo controle basal. As concentrações de triglicérides no plasma dos animais transplantados apresentaram aumento no grupo controle.

Tabela 4- Concentração de colesterol total, HDL-c e triglicérides dos animais transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato. Valores expressos em média±desvio padrão.

Perfil Lipídico	Controle		LDE-paclitaxel		LDE-metotrexato		LDE-paclitaxel/ LDE-metotrexato	
	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final
Colesterol Total (mg/dL)	66±52**	519±149*○	53±46**	631±106*†	53±33***&	725±134*†‡◇	34±12***&	662±181*†‡■
HDL-c (mg/dL)	9±6	16±4*†	10±3	16±3*†	10±4	15±4	9±2	15±3†
Triglicérides (mg/dL)	198±120	212±30	121±87	148±36	100±70†	177±44	88±33*†	205±36

Colesterol total: *p<0,001 versus controle basal; **p<0,001 versus controle final; †p<0,001 versus LDE-paclitaxel basal; &p<0,001 versus LDE-paclitaxel final; ‡ p<0,001 versus LDE-metotrexato basal; ◇ p<0,001 versus LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato basal; ■ p<0,001 versus LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato basal; ○ p<0,05 versus LDE-metotrexato final.

HDL-c: p<0,05 versus controle basal; † p<0,05 versus LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato basal.

Triglicérides: *p<0,05 versus controle basal; †p<0,05 versus controle final.

5.3 Consumo de ração

O consumo de ração foi avaliado todos os dias ao longo do período experimental. A figura 12 mostra a média do consumo diário dos animais ao final de cada semana de seguimento. Não houve diferença entre o consumo semanal entre os grupos.

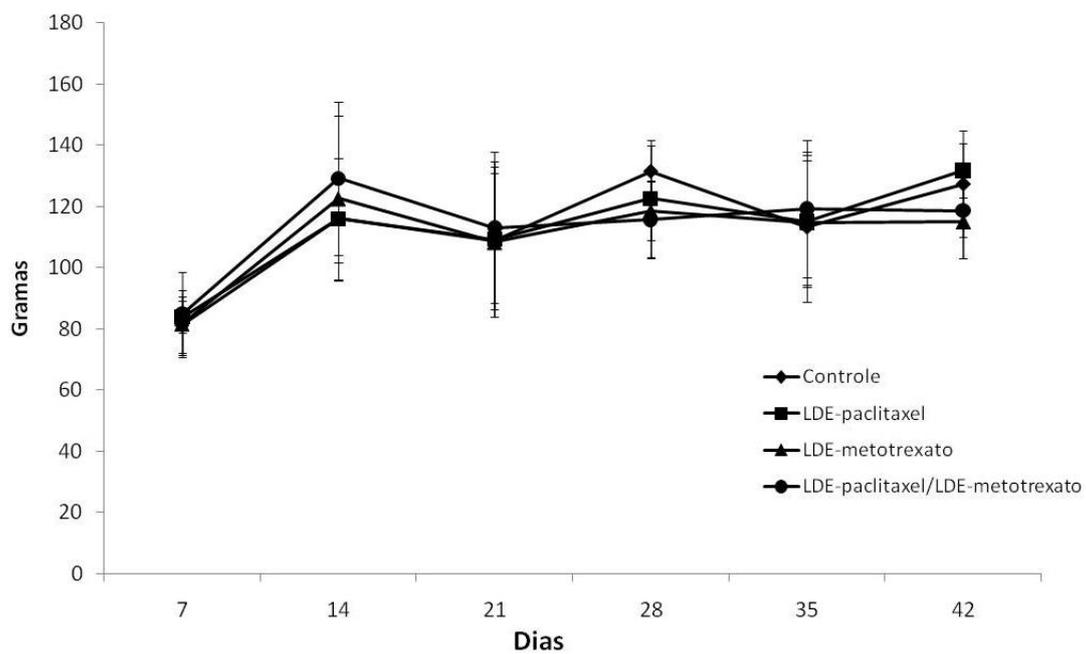


Figura 12- Média do consumo diário de ração dos animais ao final de cada semana de seguimento dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato. Valores expressos em média \pm desvio padrão

5.4 Controle do peso

A Tabela 5 mostra o peso dos animais dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato submetidos ao transplante antes do procedimento (basal) e ao término do protocolo (final). Não houve diferença de peso dos animais entre o início e o final do experimento ou entre os grupos.

Tabela 5- Peso dos animais entre o dia do transplante (basal) e o término do período de estudo (final) dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato. Valores expressos em média±desvio padrão.

Peso (kg)	Controle		LDE-paclitaxel		LDE-metotrexato		LDE-paclitaxel/ LDE-metotrexato	
	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final
	3,9±0,5	3,8±0,8	3,5±0,4	3,6±,9	4,0±0,3	3,7±0,2	3,8±0,2	3,7 ± 0,1

5.5 Perfil Hematológico

Na tabela 6 estão expressos os resultados do perfil hematológico dos animais controles e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato no dia do transplante (basal) e no dia do sacrifício (6ª semana). Não houve diferença nos parâmetros hematológicos estudados entre o início e o término do protocolo ou entre os grupos analisados.

Tabela 6- Perfil hematológico dos animais transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato. Valores expressos em média±desvio padrão.

Perfil Hematológico	Controle		LDE-paclitaxel		LDE-metotrexato		LDE-paclitaxel/ LDE-metotrexato	
	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final	Basal	Final
Hemácias (10 ⁹ /mL)	5,4±0,3	4,9±0,6	5,5±0,4	5,0±0,3	5,3±0,8	4,8±1,4	5,2±0,5	5,6±0,8
Leucócitos (10 ⁶ /mL)	5,9±0,8	6,1±1,5	5,8±0,3	6,0±1,3	5,3±1,8	7,1±3,3	6,8±1,2	6,3±0,8
Linfócitos(%)	71,0±4,4	69,6±4,7	72,7±14,3	76,1±7,1	77,4±11,2	77,0±5,2	76,3±11,8	78,9±5,6
Monócitos (%)	8,0±2,0	9,6±5,9	6,7±3,5	8,7±3,5	7,0±2,8	8,4±4,1	6,1±2,2	9,6±3,6
Neutrófilos (%)	21,0±2,8	20,9±5,2	20,6±12,0	15,4±7,0	15,6±9,3	14,9±5,0	17,6±12,1	11,6±3,4

5.6 Avaliação da estenose coronária e do miocárdio

A tabela 6 apresenta a morfometria das artérias coronárias dos corações transplantados. O tratamento com LDE-paclitaxel reduziu a estenose coronária nos corações transplantados em cerca de 50% ($p < 0,001$ versus grupo controle). A estenose do grupo LDE-paclitaxel também foi menor do que dos dois outros grupos tratados ($p < 0,01$ versus LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato). A estenose medida nos grupos LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato foi igual, cerca de 18% menor que a estenose do grupo controle, apesar de essa diferença não ser significativa estatisticamente. Em todos os grupos, as artérias coronárias dos corações nativos não apresentaram estenose (tabelas 7 e 8).

Tabela 7- Medidas das artérias coronárias obtidas por morfometria em microscopia ótica em corações transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato. Valores expressos em média±desvio padrão.

Morfometria	Controle	LDE-paclitaxel	LDE-metotrexato	LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato
Área da Lâmina Elástica (mm ²)	101,3±98,3	75,6±46,9	191,7±165,4*	31,5±20,9
Área do Lúmen Arterial (mm ²)	12,3±14,5	41,3±31,7*	41,4±23,0*	7,7±8,4
% Estenose	88,7±10,6**	37,7±25,6	72,2±13,4†	74,4±14,2†

*p<0,05 versus LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato; ** p<0,001 versus LDE-paclitaxel; †p<0,01 versus LDE-paclitaxel.

Tabela 8- Medidas das artérias coronárias obtidas por morfometria em microscopia ótica em corações nativos dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato. Valores expressos em média±desvio padrão.

Morfometria	Controle	LDE-paclitaxel	LDE-metotrexato	LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato
Área da Lâmina Elástica (mm ²)	17,7±5,6	16,7±5,4	12,2±3,1	12,2±8,6
Área do Lúmen Arterial (mm ²)	17,7±5,6	16,7±5,4	12,2±3,1	12,2±8,6
% Estenose	0	0	0	0

A tabela 9 apresenta os resultados da análise morfológica do miocárdio dos corações transplantados. O grupo LDE-paclitaxel apresentou menor inflamação, sendo que apenas um coração do grupo foi classificado no grau 3 de inflamação. Não houve diferença entre os grupos controle, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato. Quanto à necrose, o grupo tratado com LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato apresentou o maior número de corações classificados no grau 3 de necrose: 6 animais. Não houve diferenças marcantes entre os grupos controle, LDE-paclitaxel e LDE-metotrexato. Em relação à presença de esteatose e calcificação, os resultados foram semelhantes nos quatro grupos de estudo.

Tabela 9- Morfologia do miocárdio dos corações transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.

	Controle	LDE- paclitaxel	LDE- metotrexato	LDE-paclitaxel/ LDE-metotrexato
Inflamação				
Grau 0	0	0	0	1
Grau 1	2	3	1	1
Grau 2	2	3	2	2
Grau 3	3	1	4	3
Necrose				
Grau 0	3	2	4	0
Grau 1	4	4	2	1
Grau 2	0	1	1	0
Grau 3	0	0	0	6
Esteatose	3	3	4	2
Calcificação	4	3	5	4

A tabela 10 apresenta a porcentagem de área infiltrada de macrófagos no miocárdio de corações nativos e transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato por imunohistoquímica. A área infiltrada por macrófagos nos corações transplantados dos grupos tratados foi menor do que nos corações transplantados do grupo controle ($p < 0,001$). Não houve diferença na porcentagem de área infiltrada por macrófagos no miocárdio dos corações nativos dos grupos.

Tabela 10- Porcentagem de área infiltrada por macrófagos no miocárdio de corações nativos e transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato. Valores expressos em média \pm desvio padrão.

% Macrófagos	Controle	LDE-paclitaxel	LDE-metotrexato	LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato
Coração Nativo	0,14 \pm 0,27	0,10 \pm 0,06	0,06 \pm 0,12	0,07 \pm 0,06
Coração Transplantado	25,85 \pm 8,73	2,36 \pm 3,16*	6,20 \pm 4,23*	11,12 \pm 4,94*

* $p < 0,001$ versus coração transplantado controle.

5.6.1 Expressão gênica dos mediadores inflamatórios e receptores de lipoproteínas no miocárdio

A Figura 13 apresenta os resultados da expressão gênica de mediadores inflamatórios no *pool* preparado com o miocárdio dos corações transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-

metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato. Os resultados demonstraram um aumento de expressão de cerca de duas vezes para IL-10 e TNF- α e diminuição da expressão de IL-1 β no grupo tratado com LDE-paclitaxel. Em contrapartida, no grupo tratado com LDE-metotrexato houve uma diminuição importante da expressão de IL-10, IL-18, VCAM-1, MCP-1, TNF- α , MMP-9 e MMP-12, sem alteração na expressão de IL-1 β . No grupo tratado com LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato, houve grande aumento da expressão de IL-10, IL-18, VCAM-1, MCP-1, TNF- α e MMP-12, e diminuição da expressão de IL-1 β e MMP-9. Em relação aos receptores de lipoproteínas (Figura 14), houve aumento de cerca de uma vez e meia na expressão do LDLR e de duas vezes na expressão do CD-36. Os demais genes analisados mantiveram expressão semelhante à do grupo controle.

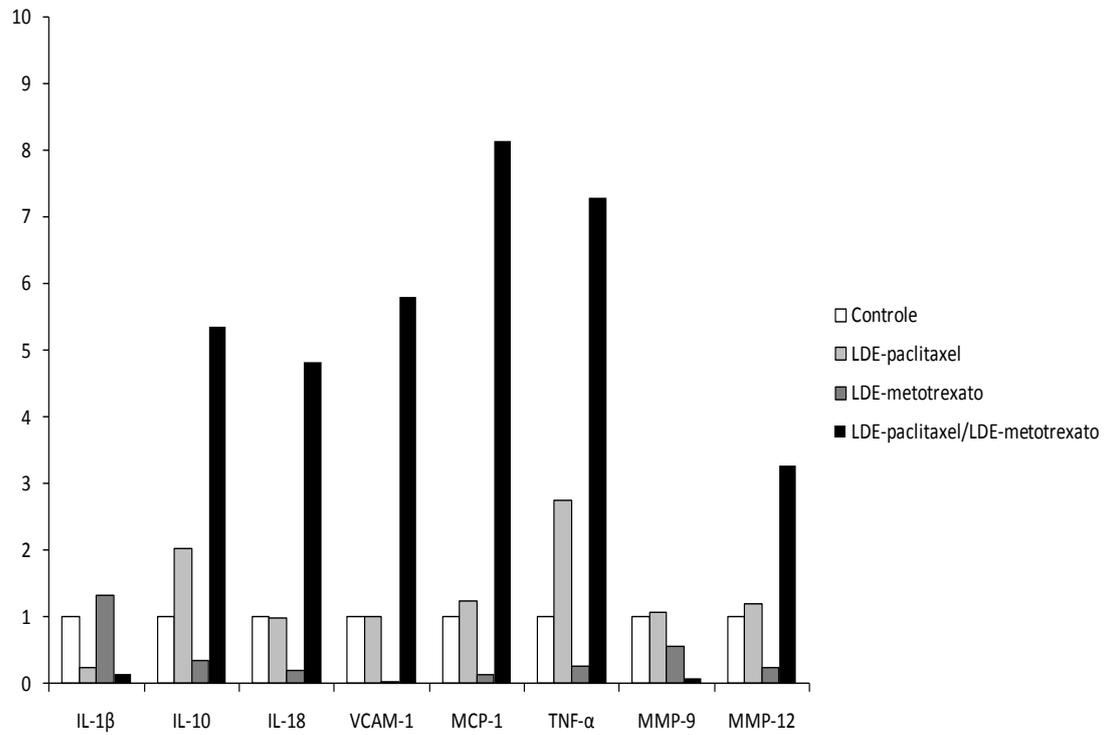


Figura 13- Expressão gênica relativa de IL-1 β , IL-10, IL-18, VCAM-1, MCP-1, TNF- α , MMP-9 e MMP-12 nos corações transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.

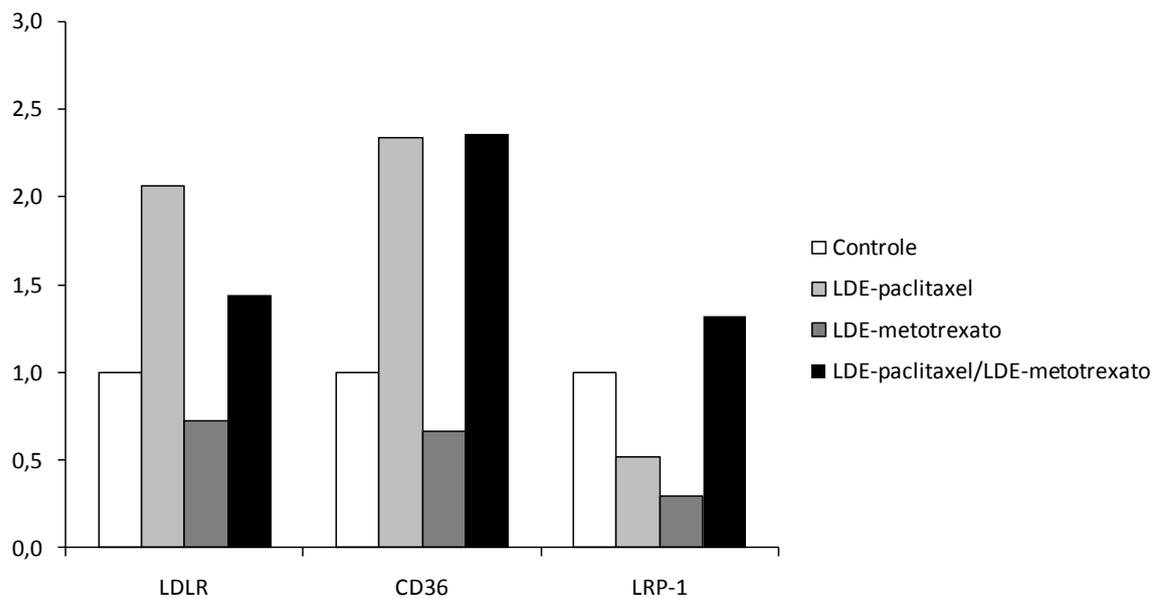


Figura 14- Expressão gênica relativa dos receptores de lipoproteínas LDL-R, CD-36 e LRP-1 nos corações transplantados dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.

A Figura 15 apresenta a expressão gênica de mediadores inflamatórios no *pool* preparado com o miocárdio dos corações nativos dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato. Os resultados demonstraram um aumento de expressão de cerca de uma vez e meia para TNF- α , MMP-9 e diminuição da expressão de IL-10 e MCP-1 no grupo tratado com LDE-paclitaxel. No grupo tratado com LDE-metotrexato houve uma diminuição importante da expressão de IL-18 e MCP-1 e aumento da expressão de VCAM-1, de uma vez e meia. No grupo tratado com LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato, houve grande aumento da expressão de IL-1 β , MCP-1, TNF- α e MMP-9. Houve aumento de cerca de uma vez e meia na expressão do LDLR (Figura 16). Os demais genes analisados mantiveram expressão semelhante à do grupo controle.

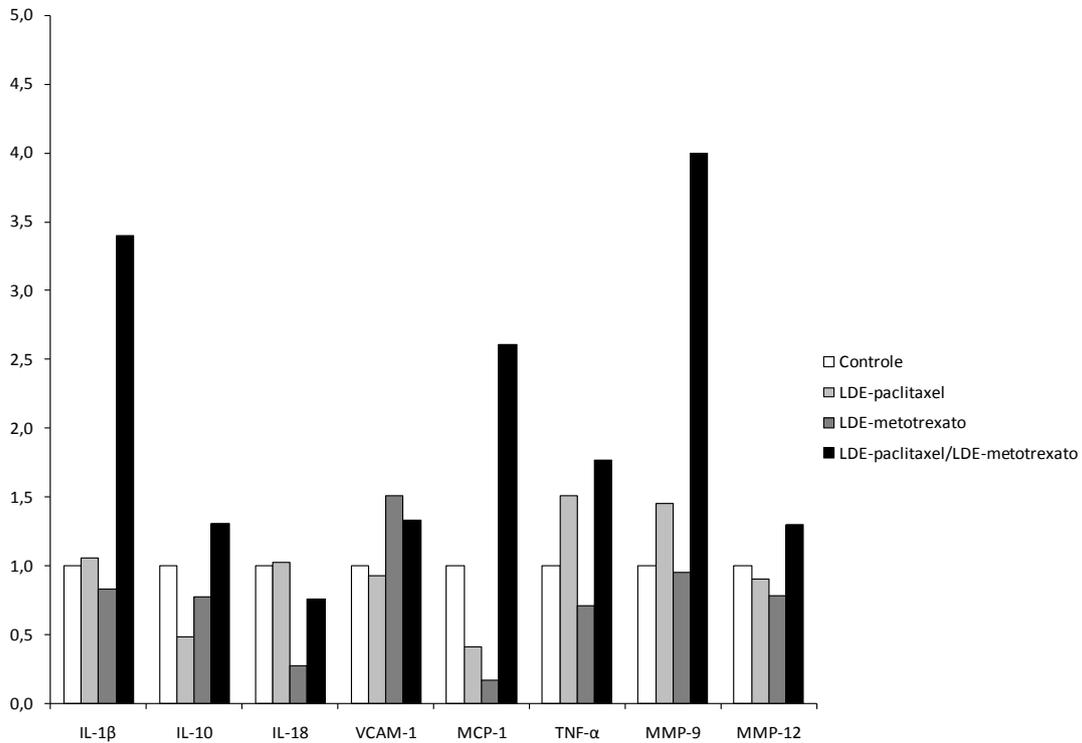


Figura 15- Expressão gênica relativa de IL-1 β , IL-10, IL-18, VCAM-1, MCP-1, TNF- α , MMP-9 e MMP-12 nos corações nativos dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.

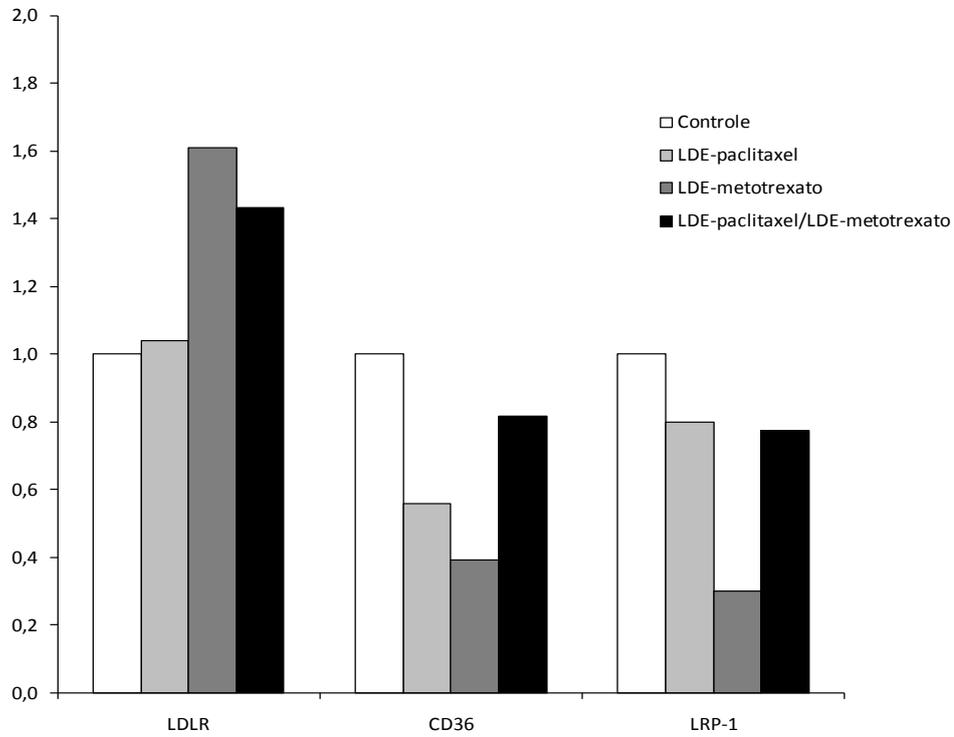


Figura 16- Expressão gênica relativa dos receptores de lipoproteínas LDL-R, CD-36 e LRP-1 nos corações nativos dos grupos controle e tratados com LDE-paclitaxel, LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato.

6. Discussão

6.1 Considerações Gerais

Os resultados obtidos demonstraram que a nanopartícula de colesterol associada aos fármacos, tiveram influência na prevenção ou desenvolvimento da DVE, mostrando-se segura sem apresentar efeitos deletérios ou secundários nos animais tratados em relação aos animais do grupo controle.

Os mecanismos envolvidos na etiopatogenia da doença vascular do enxerto não são totalmente conhecidos. Elas representam um grande desafio para os investigadores na prevenção e tratamento desta complicação^{1,46,47}. Trata-se de uma enfermidade de origem multifatorial que acomete o aloenxerto de forma lenta e progressiva, limitando a sobrevivência do próprio paciente a longo prazo⁴¹.

A incidência aumenta quando a investigação da doença é acompanhada do exame anatomopatológico na identificação da causa da morte⁴⁹.

Em estudo prévio realizado com um grupo de pacientes submetidos ao transplante cardíaco no InCor-HCFMUSP e submetidos à cinecoronariografia anual durante cinco anos revelou que a incidência e alterações arteriais era de 13,6%, 15,0%, 21,1%, 25,0% e 44,4%, no primeiro, segundo, terceiro, quarto e quinto ano respectivamente^{42,43}.

A lesão do endotélio das artérias coronárias representa o estágio inicial no desenvolvimento da doença. Esta lesão se deve a fatores imunológicos e não imunológicos. Outros são considerados como coadjuvantes na gênese desta complicação⁴⁹.

A doença vascular do enxerto está ligada aos fenômenos imunológicos que revestem o transplante de órgãos, e ocorre devido à rejeição celular e humoral que promovem a lesão do endotélio das artérias coronárias. O acometimento do endotélio ocorre de forma difusa sem grandes preferências pelo calibre dos vasos, todavia, o processo inflamatório leva à obstrução mais precoce da microcirculação devido ao menor diâmetro dos vasos^{48,49,50,51}. Outro fator de lesão inicial do endotélio é a isquemia durante o transplante. Além dela, outros fatores não imunológicos que participam no desenvolvimento da doença vascular do enxerto não atuam isoladamente, em geral concorrem de forma associada com predomínio de um deles, ou se potencializando.

As pesquisas têm-se voltado ao desenvolvimento de imunossupressores que além da ação imunossupressora tenham também atividade antiproliferativa associada, tendo em vista a importância que a doença vascular do enxerto tem assumido. Desta forma, seria possível controlar a rejeição celular aguda e reduzir a hiperplasia da íntima da artéria^{119,120,121,122,123,124,125}.

Com este cenário, tem-se procurado investigar os reais benefícios clínicos da ação antiproliferativa do micofenolato de mofetila, sirolimo e everolimo na incorporação do arsenal terapêutico^{122,123,124,125}. Surgem então alguns questionamentos, como: qual deve ser a concentração oferecida pela nanopartícula para que o agente possa exercer os seus efeitos terapêuticos sobre a parede das artérias coronárias, e as concentrações sistêmicas que seriam atingidas, uma vez que, esses fármacos são citotóxicos.

Na presente investigação os objetivos foram delineados em função dos seguintes itens: a falta de uma terapia específica para prevenir e tratar a

doença vascular do enxerto, escassa eficácia dos imunossupressores para retardar o seu desenvolvimento e a citotoxicidade desses agentes para atingir a sua plena ação terapêutica.

Quanto aos estudos experimentais na literatura, avaliando alguns tipos de medicamentos, Alonso et al. (1977), em seus experimentos, desenvolveram lesões ateroscleróticas em duas semanas após dieta rica em colesterol, observando sobrevida dos animais entre 12 dias sem imunossupressão e 101 dias com imunossupressão. Foegh et al. (1987), baseando-se no modelo de Alonso (1977) e utilizando como imunossupressor a ciclosporina A, empregaram o estradiol como droga de estudo, obtendo diminuição no grau da hiperplasia intimal das artérias coronárias, sem destruição da lâmina elástica interna. Porém apresentaram como efeito secundário ginecomastia.

Já Takács e Jellinek, em 1987, utilizaram iloprost, análogo da prostaciclina, obtendo diminuição significativa da hiperplasia intimal através da diminuição direta da proliferação, e preservação da função normal endotelial e da permeabilidade, mas apresentaram como efeito secundário hipotensão. Por outro lado, Foegh et al. (1989), empregando a angiopepina, um análogo do peptídeo somatostatina, inibiram de forma significativa a proliferação intimal coronariana, e mostraram efeito sinérgico quando associada ao uso de ciclosporina aumentando a sobrevida dos enxertos. Da mesma forma, Foegh, em 1993, mostrou que angiopeptina reduz em 50 % a presença da DVE através da inibição da secreção de fatores de crescimento envolvidos na hiperplasia intimal. Já Ewel e Foegh (1993), em revisão da literatura, mostraram a redução da DVE obtida pelo uso de estradiol,

angiopeptina e prostaciclina. Do mesmo modo, Eich et al. (1993) demonstraram que a dihidroepiandrosterona reduz de forma significativa a hiperplasia intimal, talvez por apresentar efeito hipolipidêmico e antiaterogênico. Clausel et al. (1994) demonstraram que o bloqueio seletivo do fator de necrose tumoral α diminui a incidência e severidade das lesões agudas das artérias coronárias em coelhos após transplante cardíaco, pela diminuição da resposta imune-inflamatória vascular e acúmulo de fibronectina. Do mesmo modo, Molossi et al. (1995) evidenciaram diminuição de 50 % da hiperplasia intimal nos coelhos tratados pelo peptídeo do segmento de ligação 1 (CS-1) ao bloquear a interação do antígeno muito tardio-quatro (VLA-4) da intergrina com a fibronectina, evitando a resposta imune-inflamatória da parede arterial. Enquanto Tanaka et al. (1995) evidenciaram que na rejeição aguda, há ativação das células musculares lisas das artérias coronárias e liberação do fator de necrose tumoral α , que apresenta ação autócrina, promovendo a proliferação de células musculares lisas.

Já Lou et al. (1996) evidenciaram que o tratamento com estradiol reduz a hiperplasia intimal, em associação à inibição da expressão dos antígenos classe II do complexo maior de histocompatibilidade e a redução da infiltração da parede arterial por linfócitos e macrófagos. Cowan et al. (1996) verificaram que com o uso da elafina, inibidor específico da serina elastase, houve redução significativa da hiperplasia intimal das artérias coronárias devido à redução da atividade elastolítica vascular.

O uso da nanotecnologia como veículos de drogas é inédito na área do transplante cardíaco, é uma terapia que se mostrou seletiva com

o bloqueio específico no órgão-alvo, proporcionando assim a possibilidade do controle dos efeitos secundários consequentes da terapia sistêmica das drogas, e a diminuição das doses necessárias para obtenção do efeito procurado devido à especificidade do tratamento. (P)

6.2 Considerações sobre o Modelo Experimental

O transplante cardíaco heterotópico em pequenos animais tem sido amplamente empregado no estudo das manifestações da decorrentes das reações imunes e da isquemia seguida de reperfusão. No estudo da doença vascular do enxerto o coelho tem sido o animal de eleição pela sua inabilidade em metabolizar o colesterol e reproduzir em curto espaço de tempo alterações vascular similares^{24,76,126,127,128,129}. Tentativas no emprego de outros animais têm-se mostrado mais laboriosos e reproduzem resultados menos consistentes^{127,130,131}.

A maior resistência do coração do coelho à anóxia permite que a proteção miocárdica seja feita pela simples imersão do órgão em solução salina gelada^{9,24,127}.

A indução da coronariopatia em coelhos tratados com dieta rica em colesterol, bem como, o desenvolvimento de nanopartículas LDE com ação terapêutica encontram-se muito bem padronizadas no Laboratório de lípidos do InCor-HCFMUSP. A presente investigação representa um dos braços dessa

linha de pesquisa e foi apoiada nessa experiência previa. Contudo, o experimento em si reveste-se de dificuldades técnicas que são próprias dos estudos experimentais, mesmo em modelos já bem estabelecidos. Nota-se que nesta série a perda de animais no pós-operatório não ocorreram, ocorreram três óbitos, no entanto, um na anestesia e dois no perioperatório.

Outro ponto que deve ser ressaltado é que esse modelo e com esta configuração presta-se muito bem ao estudo da vasculopatia, mas muito menos às alterações miocárdicas ²⁴. Este fato se deve à intensa infiltração miocárdica pelas altas taxas de colesterol circulante e pela lesão de isquemia pelas estenoses coronárias, levando à potencialização da reação inflamatória e com destruição do tecido normal. Esses aspectos foram muito bem evidenciados na análise histológica neste e em estudo prévio controverso dos corações transplantados.

Outro aspecto a ser comentado refere-se à escolha do fármaco eleito para investigação. O paclitaxel e metotrexato não são os agentes de primeira escolha para compor o protocolo de imunossupressão nos transplantes de órgãos. Todavia, o paclitaxel é um potente inibidor da proliferação celular e o uso do metotrexato na prática clínica como coadjuvante no controle dos episódios de rejeição recorrente tem mostrado importantes benefícios, tendo em vista, a sua potente ação inibitória na proliferação celular e função na dos linfócitos T e B por efeito direto na replicação do DNA ^{26,90,106,107,109,111}.

6.3 Considerações sobre o Consumo de Ração

A análise do consumo da ração mostrou que houve aumento significativo em todos os grupos, sem diferenças entre eles. Isto demonstra que os animais se adaptaram muito bem e de forma similar à dieta enriquecida com colesterol ao longo do experimento e, portanto, a ingesta não interferiu na análise comparativa dos resultados. Por outro lado, a absorção da dieta também ocorreu de forma adequada, tanto assim que o peso dos animais manteve-se sem alterações significativas. Este comportamento já havia sido observado em experimentos anteriores, o que vem a consolidar a eficiência do modelo utilizado^{24,118}. Do mesmo modo, a manutenção da ingestão nos grupos tratados sugere que não houve efeitos colaterais tóxicos.

6.4 Considerações sobre o Tempo de Isquemia

Tem-se incriminado que a lesão do endotélio oriunda da má preservação enxerto ou do tempo prolongado de isquemia é fator de risco no desenvolvimento da doença vascular do enxerto. Na presente investigação o tempo de isquemia, implante e de recuperação dos batimentos cardíacos foram semelhantes em todos os grupos, portanto, não exerceram influência e estão de acordo com experimentos semelhantes realizados por outros autores^{5,24}.

6.5 Considerações sobre o Perfil Lipídico

A hiperlipidemia por si só é considerada como fator de risco independente no desenvolvimento da doença vascular do enxerto^{126,132,133,134,135}. A infiltração de lipídeos e HDL na parede da artéria parecem ser um forte estímulo para atrair monócitos na tentativa de depurar o excesso dessas substâncias¹³⁶. No entanto, os mecanismos patogênicos subjacentes que ligam com hiperlipidemia ao aumento do desenvolvimento da doença vascular do enxerto e o papel das diferentes populações celulares neste processo são ainda menos conhecidas^{137,138,139}.

6.6 Considerações sobre o Perfil Hematológico

Na doença vascular do enxerto ocorre o recrutamento de células do sistema imune para participarem da resposta inflamatória. Estudos experimentais sugerem que neste processo há o envolvimento primário dos monócitos que promoveriam a adesão dos macrófagos na área da inflamação vascular^{137,138,140,141,142}. Este processo é potencializado em ambientes de hipercolesterolemia, onde os macrófagos representam a principal população de células encontradas na neoíntima^{137,140}.

Células derivadas de monócitos progenitores têm a capacidade de se diferenciarem em células musculares lisas e podem contribuir no processo de hiperplasia da íntima¹⁴³. Os neutrófilos também apresentam importante papel

na gênese da doença vascular do enxerto, tendo-se demonstrado acúmulo dessas células no sítio da lesão e a redução dos circulantes ¹⁴⁴.

Nesta série não se observaram alterações significativas na contagem de hemácias e leucócitos ao término do estudo e na comparação entre os grupos. Possivelmente, por se tratar de um animal de maior porte e a duração do experimento fazem com que o recrutamento de células no enxerto não chegue a alterar a contagem circulante. Resultados semelhantes foram observados por outros autores em investigação semelhante ^{24,127,131}. Situação semelhante ocorre também na prática clínica onde não se observam alterações pronunciadas na contagem dos elementos figurados do sangue em portadores da doença vascular do enxerto.

Por outro lado, informação favorável ao uso dos fármacos acoplado à nanopartícula é a ausência da indução de leucopenia, frequentemente observada na prática clínica convencional, também sugerindo ausência de toxicidade nessa formulação.

6.7 Considerações sobre o Morfometria

A análise histológica morfométrica para estudar o desenvolvimento da doença vascular do enxerto nos corações dos coelhos foi realizada com auxílio de um microscópio modelo Nikon Eclipse 80i com programa NIS-Elements-AR.

Todas as artérias coronárias encontradas nas lâminas dos corações

transplantados e nativos, como já anteriormente mencionado, foram devidamente analisadas, independentemente do diâmetro de cada uma delas¹⁰. O diâmetro das artérias e a proliferação da íntima foram medidos e quantificados para cada vaso. A razão entre a área da luz da artéria coronária e a área delimitada pela lâmina elástica interna foi utilizada para o cálculo da porcentagem da estenose de cada vaso¹¹. O valor do grau de estenose das artérias coronárias quantificado para cada animal foi o resultado da média obtida das determinações das estenoses encontradas em todas as artérias analisadas em cada um deles.

O tratamento com LDE-paclitaxel reduziu a estenose coronária nos corações transplantados em cerca de 50%. A estenose medida nos grupos LDE-metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato foi semelhante, cerca de 18% menor que a estenose do grupo controle, apesar de essa diferença não ser significativa estatisticamente. Em todos os grupos, as artérias coronárias dos corações nativos não apresentaram estenose, sugerindo que as alterações coronárias no transplante não são devidas apenas a dieta rica em colesterol.

Ao analisar os valores das médias das áreas da lâmina elástica interna das artérias coronárias dos corações transplantados, chama a atenção no grupo LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato que indica que as artérias analisadas foram menores que as dos demais grupos, podendo significar que o tratamento preservou mais artérias coronárias de pequeno calibre.

6.8 Considerações sobre a Análise da Expressão Gênica relativa no Miocárdio de Receptores Celulares, Mediadores Inflamatórios e Metaloproteinases determinados por PCR em tempo real

6.8.1 Receptor de Trombospondina – (CD-36)

A sigla CD (Cluster of Differentiation) representa a designação de um grupamento de diferenciação formada por antígenos de superfície expressos na membrana do leucócito e outras células, sendo que a numeração é atualizada em função de novas descobertas. As moléculas CD fornecem a imunofenotipagem da célula e podem agir como receptores celulares, ativadores de receptor ou como proteínas de adesão celular ¹⁴⁵.

O antígeno CD-36 é uma glicoproteína transmembrana, altamente glicosilada e expressa nos monócitos, macrófagos, plaquetas, células endoteliais microvasculares e tecido adiposo. O CD-36 é um receptor para trombospondina-1 e pode atuar com habilidade no reconhecimento e eliminação de lipoproteínas oxidadas de baixa densidade, ácidos graxos de cadeia longa, fosfolípidos, trombospondina-1, colágeno tipo I, IV e V ¹⁴⁵.

A trombospondina-1 apresenta habilidade antiangiogênica e desempenha papel de destaque também na migração e proliferação celular durante o reparo das lesões teciduais. Encontra-se elevada em amostras de biópsia endomiocárdica de corações transplantados humanos em relação aos corações nativos, e se associa à proliferação de células musculares lisas neointimal e ao desenvolvimento de doença vascular do enxerto ^{146,147,148}.

Considerando-se então que a trombospondina-1 parece estar intimamente ligada ao desenvolvimento da doença vascular do enxerto, era de se esperar que a expressão gênica relativa do CD-36 estivesse atenuada nos corações transplantados dos coelhos tratados em relação ao Grupo Controle. Pois, estes resultados parecem ter comportamento conflitante quando se observa que o grupo LDE-Paclitaxel e o grupo LDE-Paclitaxel/LDE-Metotrexato tiveram um aumento em relação ao grupo controle, e, o grupo LDE-Metotrexato teve uma diminuição, mesmo os grupos tratados apresentando números menores de macrófagos e estenoses coronárias. Sabe-se que, o CD-36 apresenta atividade pró-inflamatória ^{146,147,148}.

6.8.2 Receptor Lipoprotéico de Baixa Densidade – (LDLR)

O colesterol e triglicérides são carregados do fígado e intestino para as células pelas lipoproteínas denominadas de baixa densidade (LDL), que estão diretamente relacionadas aos eventos cardiovasculares. As partículas de LDL apresentam tamanhos e densidades variadas, e se tem demonstrado que as partículas menores são consideradas de maior risco para o desenvolvimento de doença coronária pela sua maior facilidade em atravessar o endotélio ^{145,150,151,152,153}.

A célula sintetiza receptores de LDL e os insere na membrana para facilitar a captação do colesterol. Neste processo, os receptores de colesterol são reciclados para novas captações. O excesso de colesterol acumulado nos

macrófagos pode levar à transformação dessas células e dar início ao desenvolvimento da aterosclerose^{150,151,152}.

O que se pode observar na presente investigação foi que em ambiente rico em colesterol associado à resposta imunológica inflamatória induzida nos corações transplantados houve aumento significativo da expressão gênica relativa dos LDLR no grupo LDE-Paclitaxel e no grupo LDE-Paclitaxel/LDE-Metotrexato em relação ao grupo controle, e, o grupo LDE-Metotrexato teve uma atenuação em relação ao Grupo Controle. Esses resultados indicam que de alguma forma que LDE-Metotrexato conseguiu bloquear o sítio de captação do colesterol.

6.8.3 Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade Relacionada à Proteína 1 – (LRP-1)

A LRP-1 é uma proteína expressa em diferentes tecidos que participa na formação dos receptores de membrana envolvidos na função endocítica da LDL. A LRP-1 participa também no metabolismo de lipoproteínas, degradação de proteases, ativação de enzimas do lisossomo e na entrada de toxinas bacterianas e vírus na célula. Estudos experimentais revelam que na ausência desta proteína aumenta a liberação de TNF α e aumento do processo de aterosclerose^{154,155,156,157}.

Estudos clínicos e experimentais detectaram ainda aumento da expressão da LRP-1 na parede dos vasos ricos em placas de ateromas, sugerindo a participação efetiva dessa proteína na gênese da vasculopatia. A

LRP-1 contribui também na transformação pró-trombótica das células musculares lisas dos vasos pelo aumento da ativação do fator tecidual e facilitar a cinética de migração e remodelação das células vasculares^{155,156,158,159}.

Nos corações transplantados dos coelhos observou-se aumento significativo na expressão gênica relativa da LRP-1, sendo que nos Grupos LDE-Paclitaxel e LDE-Metotrexato o aumento foi significativamente menor, enquanto o Grupo LDE-Paclitaxel/LDE-Metotrexato foi maior, em relação ao Grupo Controle.

6.8.4 Interleucina-1 β – (IL-1 β)

A interleucina-1 (IL-1) é uma citocina pró-inflamatória, atuando na indução da expressão de genes e na síntese de proteínas que modulam a resposta inflamatória, tanto na fase aguda como crônica. A IL-1 associa-se às elevações de TNF α e IL-6, e, desta forma, se correlaciona com a gravidade da enfermidade^{160,161,162,163}. A IL-1 foi designada inicialmente como pirogênio endógeno pela sua capacidade de induzir febre^{161,162}.

Existem dois tipos estruturalmente distintos de IL-1, assim designados de IL-1 α e **IL-1 β** , ambas sintetizadas a partir do precursor primário conhecido como pro-IL-1, as quais representam as formas ativas dessa interleucina. A IL-1 β é gerada fundamentalmente pela ação proteolítica da caspase-1^{162,163}.

A análise em amostras de coração transplantado obtidas de biopsia para controle da rejeição aguda não conseguiu demonstrar correlação entre a

intensidade da agressão ao miocárdio devido ao evento imune e os valores da IL-1 β , IL-6, IL-18 e TNF α ¹⁶².

Por se tratar de uma citocina altamente pró-inflamatória, semelhante a CD-36, foi evidenciado uma diminuição significativa no grupo LDE-Paclitaxel/LDE-Metotrexato seguido do grupo LDE-Paclitaxel mostrando uma atenuação na reação inflamatória do ponto de vista celular, sendo mais visível na combinação dos fármacos pelo maior efeitos associados.

A literatura também tem apresentado resultados controversos sobre a participação da IL-1 β na resposta aloimune, sendo necessários maiores investigações nessa área, pois, ainda oferece mais perguntas do que respostas^{161,162,163}.

6.8.5 Interleucina-18 – (IL-18)

A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória também conhecida como fator indutor de interferon- γ , sendo produzida pelos macrófagos e outras células. Esta interleucina exerce efeito pleiotrópico, atuando tanto na resposta imune inata como adquirida. Os linfócitos T citotóxicos quando estimulados pela IL-18 liberam outra importante citocina denominada de interferon- γ , o qual atua como um potente ativador de macrófagos e pode promover a rejeição em órgãos sólidos^{164,165,166,167}.

Estudos clínicos e experimentais têm documentado aumento da IL-18 no sangue periférico e em amostras de corações transplantados colhidas

durante os episódios de rejeição aguda, sugerindo que esta citocina poderia atuar como um marcador não invasivo^{165,166}.

A análise da expressão gênica relativa da IL-18 mostrou aumento significativo no Grupo LDE-Paclitaxel/LDE-Metotrexato, porém, no Grupo LDE-Metotrexato essa atividade foi intensamente reduzida.

6.8.6 Fator de Necrose Tumoral fração α – (TNF α)

O TNF α é um componente ativo na migração de células dendríticas intersticiais dos sítios de inflamação para os órgãos linfoides, onde elas são capazes de ativar as células doadoras linfócito T para se tornarem células T efetoras^{168,169,170}. Trata-se de um importante mediador da resposta inflamatória precoce decorrente das lesões da isquemia e reperfusão, as quais são inevitáveis nos transplantes de órgãos sólidos, com consequências tardias. Estudos experimentais têm demonstrado que o uso de anticorpos anti-TNF α são capazes de atenuar a resposta inflamatória após o transplante de órgãos, todavia os mecanismos intrínsecos envolvidos ainda são incertos^{171,172,173}. Estes resultados reforçam também o importante papel do TNF α na resposta inata e adaptativa aloimune, e sugerem que a neutralização precoce do TNF α pode oferecer benefícios nas estratégias de proteção do enxerto cardíaco^{174,175,176}.

As citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, interferon- γ e TNF- α) aumentam nos alotransplantes cardíacos, mas não nos isotransplantes, demonstrando a intensa ativação que ocorre pela resposta inflamatória

induzida pelo fenômeno aloimune^{177,178}. O TNF- α é capaz de promover a apoptose na reação imune pela ativação da caspase-3 e o seu bloqueio pode atenuar a resposta citotóxica ao enxerto, bem como, retardar o desenvolvimento da doença vascular do enxerto. Todavia, essas afirmativas encontram resultados controversos apresentados por outros autores^{175,176}.

Nesta série observou-se que a expressão gênica relativa do TNF- α aumentou significativamente no grupo LDE-paclitaxel/LDE-metotrexato, um pouco menos significante no grupo LDE-Paclitacel, porém, no grupo tratado com a nanopartícula de LDE-Metotrexato foi atenuada em relação ao grupo controle. A interferência do metotrexato sobre a expressão do TNF- α tem sido apontada nos ensaios clínicos de portadores de artrite reumatoide e neoplasias^{176,177,178}.

6.8.7 Molécula-1 de Adesão de Célula Vascular – (VCAM-1)

A VCAM-1 é uma proteína que modula a adesão de proteínas de linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos ao endotélio. Sua ação estende-se também na resposta inflamatória como um sinal celular no fenômeno de transdução de leucócitos através do endotélio, tendo participação no desenvolvimento da aterosclerose e outras doenças inflamatórias¹⁷⁹.

O TNF- α , IL-1 e IL-4, podem intensificar a ação da VCAM-1 sobre as células endoteliais e se estender por período prolongado. O recrutamento dos leucócitos pelo endotélio é mediado pela interação entre os receptores da VCAM-1 expressos na superfície das membranas de ambas as células^{180,181}.

Desta forma, o endotélio é capaz de selecionar o tipo de leucócitos a ser recrutado, como monócitos, linfócitos ou neutrófilos, em função da especificidade das moléculas apresentada na superfície da membrana ^{113,179}.

A análise dos valores obtidos após o transplante nos coelhos revelou aumento significativo da expressão da VCAM-1 no grupo LDE-Paclitaxel/LDE-Metotrexato, acompanhando razoavelmente a relação entre os grupos, quando comparados ao marcador TNF α . Por outro lado, no Grupo LDE-Metotrexato, mostrou o bloqueio importante da VCAM-1. Estes dados estão de acordo com a experiência clínica do uso do metotrexato para outras indicações ^{180,181}.

6.8.8 Proteína Quimiotática de Monócitos 1 – (MCP-1)

A MCP-1 é uma citocina com capacidade de facilitar a diapedese de monócitos, células T de memória e células dendríticas para os sítios de inflamação. Os monócitos recrutados sofrem transformações e passam a participar da fragmentação do colesterol, dando início no processo de formação das placas de aterosclerose ^{182,183,184}.

A MCP-1 atua de forma preponderante na resposta inflamatória das miocardites, na lesão miocárdica devido à isquemia e reperfusão, na rejeição aguda de transplantes, bem como, no desenvolvimento da doença vascular do enxerto. Por outro lado, a MCP-1 exerce efeito protetor na restauração cardíaca, talvez, evitando a desestruturação do retículo endoplasmático que poderia levar à insuficiência miocárdica. A MCP-1 está intimamente ligada também à angiogênese isquêmica ^{185,186,187,188}.

Nos pacientes com disfunção do enxerto e nos episódios de rejeição os valores da MCP-1 encontram-se elevados, contudo, não conseguiu se demonstrar correlação direta com o grau de rejeição identificado em espécimes de miocárdio de humano colhidas nas biopsias de rotina^{186,187,188}.

Na presente investigação, os corações transplantados do grupo LDE-Paclitaxel/LDE-Metotrexato, exibiram aumento significativo da expressão gênica relativa da MCP-1. O LDE-Paclitaxel pouco aumento, ficando próximo do grupo controle. Nota-se que a terapêutica com a nanopartícula de LDE-Metotrexato reduziu significativamente a manifestação da MCP-1 em relação ao Grupo Controle. Estes dados também encontram conformidade com os achados dos exames histopatológicos.

6.8.9 Metaloproteinase-12 da Matriz – (MMP-12)

As metaloproteinases são endopeptidases, do grupo das gelatinases, capazes de quebrar as moléculas da matriz extracelular e os receptores de superfície, mudando desta forma o comportamento celular^{189,190}. A MMP-9 e a MMP-12 estão implicadas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares de origem degenerativa, tais como os aneurismas da aorta^{190,191}.

Nos episódios de rejeição ocorre invasão de leucócitos com destruição dos tecidos e da própria matriz extracelular, sendo que este processo sofre a regulação das metaloproteinases da matriz, com especial destaque para a MMP-2, MMP-9 e MMP-12. Em estudos experimentais foi possível demonstrar os efeitos benéficos do uso de inibidores das metaloproteinases nos episódios

de rejeição de enxertos renais, sugerindo que essas proteínas apresentam papel de destaque nos fenômenos imunes, porém, requerem maiores investigações^{189,190,191}.

Na doença vascular do enxerto o aumento da matriz extracelular ocorre por aumento na proliferação ou diminuição da sua degradação. Estudos experimentais mostraram que a inibição precoce das metaloproteinases foi capaz de retardar o desenvolvimento da doença vascular do enxerto, indicando que de alguma forma esses mediadores exercem papel ativo nesse processo^{189,190,191}.

Os achados deste estudo, mostraram que houve aumento significativo da expressão gênica relativa da MMP-12, porém, de forma atenuada significativa no grupo LDE-metotrexato em relação aos demais grupos tratados e em relação ao grupo Controle. O metotrexato tem sido amplamente utilizado em portadores de artrite reumatoide e neoplasias, e se tem constatado o bloqueio na ação da metaloproteinases e na resposta inflamatória^{192,193}.

Na **Tabela 11** encontram-se apresentados de forma resumida o comportamento das expressões gênicas relativas estudadas nos corações transplantados sob a ação da nanopartícula LDE-Paclitaxel, LDE-Metotrexato e LDE-paclitaxel/LDE-Metotrexato, em relação ao Grupo Controle. Deve-se enfatizar que as informações apresentadas referem-se as variações em função do nível de significância.

Tabela 11 – Comportamento das expressões gênicas relativas estudadas nos corações transplantados sob a interferência da nanopartícula de LDE-Paclitaxel, LDE-Metotrexato e LDE-Paclitaxe/LDE-Metotrexato em relação ao Grupo Controle

	Sigla	Descrição	Atividade Celular e na Doença Vascular do Enxerto	Ação do LDE-Paclitaxel	Ação do LDE-Metotrexato	Ação do LDE-Paclitaxe/ LDE-Metotrexato
Receptores Celulares	CD 36	Receptor de Trombospondina	Antiangiogênica. Aumenta a migração e proliferação celular.	↑	NS	↑
	LDLR	Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade	Carreadores e captadores de lipoproteínas de baixa densidade.	↑	NS	NS
	LRP-1	Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade Relacionada à Proteína 1	Aumenta nas artérias com ateromas.	NS	↓	NS
Mediadores Inflamatórios	IL-1β	Interleucina-1β	Pró-inflamatória e aumenta moléculas de aderência	↓	NS	↓
	IL-10	Interleucina-10	Inibe as citocinas inflamatórias e macrófagos. Ativa linfócitos B.	↑	↓	↑
	IL-18	Interleucina-18	Pró-inflamatória. Estimula macrófagos, IL-12 e o interferon-γ.	NS	↓	↑
	TNFα	Fator de Necrose Tumoral fração α	Pró-inflamatória. Ativa migração de células T efetoras.	↑	↓	↑
	VCAM1	Molécula de Adesão de Célula Vascular 1	Adesão no endotélio de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.	NS	↓	↑
	MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos 1	Diapedese de monócitos e linfócito T pelo	NS	↓	↑
MMP	MMP-9	Metaloproteinase de Matriz 9	Facilita a invasão dos leucócitos nos tecidos.	NS	NS	↓
	MMP-12	Metaloproteinase de Matriz 12	Quebra da matriz extracelular. Aumenta na doença vascular do enxerto.	NS	↓	↑

LDE-MTX – LDE-Metotrexato. **MMP** – Metaloproteinases. **NS** – Não significativo. ↓ - Redução significativa. ↑ - Aumento significativo

6.9 Considerações sobre os Aspectos Histopatológicos

A substituição gradativa das células endoteliais por células do hospedeiro desempenha importante papel na adaptação do enxerto processo denominado tolerância. Existem, no entanto, evidências de que as células progenitoras circulantes são responsáveis pela angiogênese do enxerto e participam na hiperplasia neointimal^{151,152}. As células progenitoras extracardíacas apresentam alta capacidade de substituir a maioria das células do coração transplantado, principalmente do endotélio. Este fato suporta a participação dessas células no desenvolvimento da doença vascular do enxerto¹⁵³. Neste processo a disfunção endotelial abre as portas para o desenvolvimento da arteriopatia.

No presente modelo, a análise histológica dos corações transplantados mostrou a intensa reação inflamatória consequente a superposição da rejeição do enxerto e a infiltração gordurosa. Desta forma foi possível se observar em curto espaço de tempo as manifestações de uma doença crônica e avaliar quanto à intervenção foi capaz de bloquear o processo imune. Esteve longe do escopo principal desta investigação analisar a intensidade da lesão miocárdica ou vascular induzidas pela hipercolesterolemia e sim quanto seria possível atenuar o seu desenvolvimento. Estes pontos merecem ser enfatizados para que se possa aquilatar melhor os achados histopatológicos.

Como o coelho não consegue metabolizar adequadamente o colesterol a oferta da dieta enriquecida com colesterol promove a infiltração gordurosa tecidual generalizada com maiores concentrações nas áreas com inflamação²⁴. A análise do miocárdio revelou intensa destruição tecidual com infiltração

gordurosa e inflamação, de tal forma que, dificuldade no reconhecimento das células miocárdicas normais, a presença de focos de necrose e hemorragia estiveram presentes em todos os grupos de forma aleatória, no entanto, não conseguiu efetuar bloqueio parcial no processo destrutivo.

A atenuação da resposta inflamatória efetuado pelos fármacos pode ser mais bem sentido quando se analisa a distribuição de macrófagos avaliados pela imuno-histoquímica com anticorpo anti-RAM-11. Pode-se observar que a densidade populacional ocupada por estas células esta significativamente diminuídas no grupo tratado em relação ao controle.

A análise sobre a lâmina elástica interna da artéria demonstra que a reação inflamatória é intensa, com proliferação neointimal levando à obstrução da luz do vaso. O comprometimento é difuso com variações individuais entre os animais, por esse motivo optou-se pela análise de todas as artérias. Essas mesmas alterações endoteliais são observadas em corações de humanos que desenvolvem a doença vascular do enxerto.

Os animais que receberam o fármaco LDE-Paclitaxel apresentaram uma redução da estenose significativa e os animais que receberam fármaco LDE-Paclitaxel/LDE-Metotrexato mantiveram quantidade significativa de vasos de menores calibres pérvios em relação aos demais grupos, devido a área delimitada pela lâmina elástica interna serem inferiores em relação aos demais grupos. Muito possivelmente, pela sua ação predominantemente combinada, da ação anti-proliferativa e pela liberação de adenosina celular, o bloqueio inflamatório se faça de um lado coibindo a multiplicação celular local e, de outro, atenuando a aderência dos elementos imune.

6.10 Considerações Finais

A doença vascular do enxerto continua sendo uma grave complicação tardia após o transplante cardíaco que oferece desafios no seu entendimento e propostas terapêuticas. O modelo experimental aqui utilizado demonstrou-se eficaz em relativamente curto espaço de tempo e merece ser bem explorado e aprimorado.

As vantagens do uso associado do LDE-Paclitaxel/LDE- Metotrexato como fármaco coadjuvante aos imunossuppressores em situações de rejeição de difícil controle mostrou-se aqui como possível alternativa no controle da doença vascular do enxerto. Não houve intoxicação quando comparado com os fármacos isolados.

Os efeitos na diminuição da DVE mais acentuadas foram obtidos com o paclitaxel, os do metotrexato e da combinação dos dois fármacos não alcançaram significância estatística. O fato da combinação dos dois fármacos não apresentar ação aditiva em relação ao paclitaxel não está clara, sendo levantadas a possibilidade de competição pela ligação do LDL.

Suas ações puderam ser observadas na expressão genética dos marcadores fatores inflamatórios, assim como, os celulares, de forma aleatórias, não sendo possível determinar uma forte correlação entre os grupos, visto as grandes variedades de interferências correlacionadas.

O emprego de nanopartículas como veículos de paclitaxel e metotrexato associados, atuam no sítio da inflamação, minimizando os efeitos sistêmicos dos fármacos, podendo num futuro breve tornarem-se terapia eficaz de aplicação clínica.

6.11 Limitações do Estudo

Trata-se de um estudo experimental, baseado em um modelo animal que tenta mimetizar um fenômeno biológico que ocorre em humanos. Portanto, todas as conclusões emanadas deste estudo restringem-se aos eventos aqui analisados, todavia, abrem novos questionamentos e, seguramente, novas linhas de pesquisas.

7. Conclusões

No modelo de estudo da doença vascular do enxerto em coração transplantado em coelhos utilizado, verificou-se que:

1. O grupo LDE-Paclitaxel + LDE-Metrotexato, em relação ao grupo controle, mostrou menor grau de estenose porém sem significância estatística.
2. O grupo LDE-Metrotexato, em relação ao grupo controle, mostrou menor grau de estenose porém sem significância estatística.
3. O grupo LDE-Paclitaxel, em relação ao grupo controle, mostrou importante redução do grau de estenose com significância estatística.
4. Suas ações na expressão genica dos marcadores inflamatórios, assim como, os celulares, apresentaram-se de forma aleatória, não sendo possível determinar uma forte correlação entre os grupos.
5. A evolução dos coelhos em termo de consumo de rações, perfil hematológico e ganho de peso, mostram que a ligação dos fármacos a partícula lipídicas, nos grupos tratados, aboliu os efeitos tóxicos.
6. Outros estudos são necessários para esclarecer o fato da associação de partículas não ter mostrado efeito aditivo na doença vascular do enxerto.

3732/11/12


MEDICINA
 USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

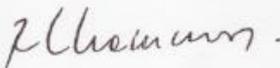
A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **09/05/2012**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **073/12** intitulado: **"USO DE NANOEMULSÕES LIPÍDICAS COMO VEÍCULOS DE METOTREXATO E PACLITAXEL NO TRATAMENTO DA DOENÇA VASCULAR DO CORAÇÃO TRANSPLANTADO EM COELHOS"** que utilizará **80** animais da espécie **Coelho**, apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. Noedir Antonio Groppo Stolf
Pesquisador (a) Executante: Lucas Regatieri Barbieri

CEP-FMUSP, 10 de Maio de 2012.


Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais


Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

COMISSÃO CIENTÍFICA
 RECEBIDO
 11/05/12
 C. Saine

9. Referências Bibliográficas

1. Thomson JG. Production of severe atheroma in a transplanted human heart. *Lancet*. 1969;2:1088-92.
2. Häyry P, Isoniemi H, Yilmaz S, Mennander A, Lemström K, Räisänen-Sokolowski A, Koskinen P, Ustinov J, Lautenschlager I, Taskinen E, et al. Chronic allograft rejection. *Immunological Reviews*. 1993; 134: 33-81.
3. Taylor DO, Olsen SL, Ensley RD, Renlund DG. Methotrexate for rejection prophylaxis after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1995; 14: 950-4. (2003).
4. Braunwald E, Tratado de Medicina Cardiovascular. 1999; 5a Edição, Vol. 1 : 560-2.
5. Foegh ML. Accelerated cardiac transplant atherosclerosis/chronic rejection in rabbits: Inhibition by angiopeptin. *Transplantation Proceedings*. 1993; 25:2095-7.
6. Puk CG, Vinagre CG, Bocchi E, Bacal F, Stolf N, Maranhão RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion in patients submitted to heart transplantation. *Transplantation*. 2004 Oct 27;78(8):1177-81.
7. Puk CG, Bocchi EA, Lo Prete AC, Ferreira SM, Stolf NA, Maranhão RC. Transfer of cholesterol and other lipids from a lipid nanoemulsion to high-density lipoprotein in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2009;28:1075-80
8. Vinagre CG, Stolf NA, Bocchi E, Maranhão RC. Chylomicron metabolism in patients submitted to cardiac transplantation. *Transplantation*. 2000;69:532-7
9. Ewel CH, Foegh ML. Chronic graft rejection: accelerated transplant arteriosclerosis. *Immunological Reviews*. 1993; 134: 21-31.
10. Kuwahara M, Jacobsson J, Kuwahara M, Kagan E, Ramwell PW, Foegh ML. Coronary artery ultrastructural changes in cardiac transplant atherosclerosis in the rabbit. *Transplantation*. 1991; 52: 759-65.

11. Eich DM, Nestler JE, Johnson DE, Dworkin GH, Ko D, Wechsler AS et al. Inhibition of accelerated coronary atherosclerosis with dehydroepiandrosterone in the heterotopic rabbit model of cardiac transplantation. *Circulation*. 1993; 87: 261-9.
12. Mitchell SV, Mottram PL, Purcell LJ, Dumble LJ, Millar RJ, Clunie GJ. A rabbit model for heterotopic cardiac transplantation. *Transplantation*. 1990; 49: 835-7.
13. Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Dorlhiac-Llacer P, Cadena SMS, Coelho IJ et al. Plasma Kinetics and Biodistribution of a Lipid Emulsion Resembling Low-Density Lipoprotein in Patients with Acute Leukemia. *Cancer Research*. 1994; 54: 4660-6.
14. Ades A, Carvalho JP, Graziani SR, Amancio, RF. Souen, JS, Pinotti, JA, Maranhão RC. Uptake of a protein free microemulsion by normal and neoplastic ovarian tissue. *Gynecol Oncol*. 2001; 82: 84.
15. Graziani SR, Igreja FAF, Hegg R, Meneghetti C, Brandizzi LI, Barboza R et al. Uptake of a Cholesterol-Rich Emulsion by Breast Cancer. *Gynecol Oncol*. 2002; 85: 493-7.
16. Maranhão RC, Graziani SR, Yamaguchi N, Melo RF, Latrilha MC, Rodrigues DG et al. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chem Pharmacol*. 2002; 49: 487-98.
17. Azevedo CH, Carvalho JP, Valduga CJ, Maranhão RC. Plasma Kinetics and Uptake by Tumor of a Cholesterol-Rich Microemulsion (LDE) Associated to Etoposide Oleate in Patients with Ovarian Carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2005; 97: 178-82.

18. Rodrigues DG, Maria DA, Fernandes DC, Valduga CI, Couto RD, Ibanez OC et al. Improvement of Paclitaxel Therapeutic Index by Derivatization and Association to a Cholesterol-Rich Microemulsion: In Vitro and In Vivo Studies. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005; 55: 565-76.
19. Pinheiro KV, Hungria VT, Ficker ES, Valduga CI, Mesquita CH, Maranhão RC. Plasma Kinetics of a Cholesterol-Rich Microemulsion (LDE) in Patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's Lymphoma and a Preliminary Study on the Toxicity of Etoposide Associated with LDE. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006; 57: 624-30.
20. Pires LA, Hegg R, Valduga CJ, Graziani SR, Rodrigues DG, Maranhão RC. Use of Cholesterol-Rich Nanoparticles that Bind to Lipoprotein Receptors as a Vehicle to Paclitaxel in the Treatment of Breast Cancer: Pharmacokinetics, Tumor Uptake and a Pilot Clinical Study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009; 63: 281-7.
21. Maranhão RC, Tavares ER, Padoveze AF, Valduga CI, Rodrigues DG, Pereira MD. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis.* 2008; 197: 959-66.
22. Bulgarelli A, Almeida C, Valduga C, Higuchi M, Maranhão R. Methotrexate associated to lipid nanoemulsion reduces atherosclerosis induced in rabbits and has minimal side effects. *Atherosclerosis.* 2009; 10(2 suppl): P468.
23. Vitorio T, Higuchi M, Maranhão R. Combined chemotherapy associated with lipidic nanoemulsions achieves marked atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis Supplement* 2009, 10(2 suppl): P476.

24. Lourenço-Filho DD, Maranhão RC, Méndez-Contreras CA, Tavares ER, Freitas FR, Stolf NAG. An artificial nanoemulsion carrying paclitaxel decreases the transplant heart vascular disease: a study in a rabbit graft model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011; 141:1522-8.
25. Longo-Sorbello GS, Bertino JR. Current understanding of methotrexate pharmacology and efficacy in acute leukemias. Use of newer antifolates in clinical trials. *Haematologica.* 2001;86:121-27.
26. Moura JA, Valduga CJ, Tavares ER, Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Novel formulation of a methotrexate derivative with a lipid nanoemulsion. *Int J Nanomedicine.* 2011; 6:2285-95.
27. Korewicki J. Cardiac transplantation is still the method of choice in the treatment of patients with severe heart failure. *Cardiol J.* 2009; 16: 493–9.
28. Ramakrishna H, Jaroszewski DE, Arabia FA. Adult cardiac transplantation: a review of perioperative management Part-I. *Ann Card Anaesth.* 2009; 12: 71-8.
29. Da Silva PR. Transplante cardíaco e cardiopulmonar: 100 anos de história e 40 de existência. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2008; 23: 145-52.
30. Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S. Afr Med J.* 1967; 41: 1271–4.
31. Zerbini EJ, Décourt LV. Experience on three cases of human heart transplantation. In: Symposium Mondial. Deuxième. Level, 1969. Heart transplantation, Annals of the 2nd. World Symposium, Quebec, 1969. p. 179-82.
32. Fiorelli AI, Coelho HB, Oliveira Junior JL, Oliveira AS. Insuficiência cardíaca e transplante cardíaco. *Rev. Med. (São Paulo).* 2008; 87: 105-20.

33. Griep RB, Stinson EB, Clark DA, Shumway NE. A Two-Year experience with human heart transplantation. *Calif Med.* 1970; 113: 17-26.
34. Rider AK, Copeland JG, Hunt SA, Mason J, Specter MJ, Winkle RA et al. The status of cardiac transplantation, 1975. *Circulation.* 1975; 52; 531-9.
35. Miller LW, Granville DJ, Narula J, Mcmanus BM. Apoptosis in cardiac transplant rejection. *Cardiol Clin.* 2001;19:141–54.
36. Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. *Am J Transplant.* 2001; 1:97–102.
37. Lindenfeld J, Miller GG, Shakar SF, Zolty R, Lowes BD, Wolfel EE. Drug therapy in the heart transplant recipient: part I: cardiac rejection and immunosuppressive drugs. *Circulation.* 2004; 110: 3734-40.
38. Jukes JP, Jones ND. Immunology in the clinic review series; focus on host responses: Invariant natural killer t cell activation following transplantation. *Clin Exp Immunol.*; 2012;167: 32-9.
39. Weis M, Von Scheidt W. Coronary artery disease in the transplanted heart. *Annu Rev Med.*; 2000; 1: 81–100.
40. Diijvestijn AM, Derhaag JG, Van Breda Vriesman PJ. Complement activation by anti-endothelial cell antibodies in MHC-mismatched and MHC-matched heart allograft rejection: anti-MHC-, but not anti non-MHC alloantibodies are effective in complement activation. *Transpl Int.* 2000; 13: 363–71.
41. Aurora P, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Stehlik J, Hertz MI. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirteenth official pediatric lung and heart-lung transplantation report--2010. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29:1129-41.

42. Fiorelli AI. Contribuição ao estudo da função do ventrículo esquerdo no pós-operatório de transplante cardíaco. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.
43. Fiorelli AI, Stolf NAG, Graziosi P, Bocchi EA, Busnardo F, Gaiotto FA, Higushi L, Arie S, Jatene AD. Incidência de coronariopatia após o transplante cardíaco ortotópico. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 1994; 9: 69-80.
44. Bacal F, Veiga VC, Fiorelli AI, Bellotti G, Bocchi EA, Stolf NAG, Ramires JA. Analysis of the risk factors for allograft vasculopathy in asymptomatic patients after cardiac transplantation. *Arq Bras Cardiol.*; 2000; 75: 421-8.
45. Kobashigawa JA, Tobis JM, Starling RC, Tuzcu EM, Smith AL, Valentine HA, Yeung AC, Mehra MR, Anzai H, Oeser BT, Abeywickrama KH, Murphy J, Cretin N. Multicenter intravascular ultrasound validation study among heart transplant recipients: outcomes after five years. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45: 1532–37.
46. Van Loosdregt J, Van Oosterhout MF, Bruggink AH, Van Wichen DF, Van Kuik J, De Koning E, Baan CC, De Jonge N, Gmelig-Meyling FH, De Weger RA. The chemokine and chemokine receptor profile of infiltrating cells in the wall of arteries with cardiac allograft vasculopathy is indicative of a memory T-helper 1 response. *Circulation.*; 2006; 114:1599–1607.
47. Weis M, Von Scheidt W. Coronary artery disease in the transplanted heart. *Annu Rev Med.* 2000; 51: 81–100.
48. Labarrere CA, Nelson DR, Faulk WP. Myocardial fibrin deposits in first month after transplantation predict subsequent coronary artery disease and graft failure in cardiac allograft recipients. *Am J Med.* 1998; 105: 207-13.
49. Aranda JM, Hill J. Cardiac transplant vasculopathy. *Chest.* 2000; 118: 1792-800.

50. Wehner J, Morrell CN, Reynolds T, Rodriguez ER, Baldwin WM. III. Antibody and complement in transplant vasculopathy. *Circ Res.* 2007;100:191–203.
51. Billingham ME. Histopathology of graft coronary disease. *J Heart Lung Transplant.*; 1992; 11: S38-44.
52. Costanzo-Nordin, M.R. Cardiac allograft vasculopathy: relationship with acute cellular rejection and histocompatibility. *J Heart Lung Transplant.* 1992; 11: S90-103.
53. Hammond EH, Yowell RL, Nunoda S, Menlove RL, Renlund DG, Bristow MR, Gay WA JR, Jones KW. O'connell JB. Vascular (humoral) rejection in heart transplantation: pathologic observations and clinical implications. *J Heart Transplant.* 1989;8:430–43.
54. Kemna MS, Valantine HA, Hunt SA. Metabolic risk factors for atherosclerosis in heart transplant recipients. *Am Heart J.*1994;128: 68-72.
55. Colvin-Adams M, Agnihotri A. Cardiac allograft vasculopathy: current knowledge and future direction. *Clin Transplant.* 2011; 25:175-84.
56. Sambiasi NV, Higuchi ML, Nuovo G, Gutierrez PS, Fiorelli AI, Uip DE, Ramires JAF. CMV and transplant-related coronary atherosclerosis: an immunohistochemical, in situ hybridization, and polymerase chain reaction in situ study. *Mod Pathol.*; 2000;13:173-9.
57. Schmauss D, Weis M. Cardiac allograft vasculopathy: recent developments. *Circulation.* 2008; 117: 2131-41.
58. Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus B. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circ. Res.* 2006; 99: 801-815.
59. Crespo-Leiro MG, Marzoa-Rivas R, Barge-Caballero E, Paniagua-Martín MJ. Prevention and treatment of coronary artery vasculopathy. *Curr Opin Organ Transplant.* 2012;17: 546-50.

60. Costanzo MR, Naftel DC, Pritzker MR, Heilman JK, Boehmer JP, Brozena SC, Dec GW, Ventura HO, Kirklin JK, Bourge RC, Miller LW. Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors. *Cardiac Transplant Research Database. J Heart Lung Transplant.* 1998;17: 744-53.
61. Bocchi EA, Higuchi ML, Bellotti G, Kowabota VS, Assis RV, Stolf NAG, Fiorelli A, Barretto AC, Pileggi F, Jatene AD. Acute myocardial infarction with diffuse endarteritis, contraction bands, and distal thrombosis of the coronary arteries in a heart transplant patient. *J Heart Lung Transplant.*; 1992; 11: 31-6.
62. Sade LE, Sezgin A, Eroglu S, Bozbas H, Uluçam M, Müderrisoglu H. Dobutamine stress echocardiography in the assessment of cardiac allograft vasculopathy in asymptomatic recipients. *Transplant Proc.* 2008;40: 267-70.
63. Eroglu E, D'hooge J, Sutherland GR, Marciniak A, Thijs D, Droogne W, Herbots L, Van Cleemput J, Claus P, Bijnens B, Vanhaecke J, Rademakers F. Quantitative dobutamine stress echocardiography for the early detection of cardiac allograft vasculopathy in heart transplant recipients. *Heart.* 2008; 94:e3.
64. Bacal F, Moreira L, Souza G, Rodrigues AC, Fiorelli A, Stolf NAG, Bocchi E, Bellotti G, Ramires JAF. Dobutamine stress echocardiography predicts cardiac events or death in asymptomatic patients long-term after heart transplantation: 4-year prospective evaluation. *J Heart Lung Transplant.* 2004;23: 1238-44.
65. Prada-Delgado O, Estévez-Loureiro R, López-Sainz A, Gargallo-Fernández P, Paniagua-Martín MJ, Marzoa-Rivas R, Barge-Caballero E, Cuenca-Castillo JJ, Castro-Beiras A, Crespo-Leiro MG. Percutaneous coronary interventions and bypass surgery in patients with cardiac allograft vasculopathy: a single-center experience. *Transplant Proc.* 2012; 44: 2657-9.

66. Bocchi EA, Vilas-Boas F, Pedrosa AA, Bacal F, Fiorelli A, Ariê S, Stolf NAG, Bellotti G, Jatene A, Pileggi F. Percutaneous transluminal coronary angioplasty after orthotopic heart transplantation. *Arq Bras Cardiol.* 1994; 62:177-9.
67. Kimura N, Itoh S, Nakae S, Axtell RC, Velotta JB, Bos EJ, Merk DR, Gong Y, Okamura H, Nagamine CM, Adachi H, Kornfeld H, Robbins RC, Fischbein MP. Interleukin-16 deficiency suppresses the development of chronic rejection in murine cardiac transplantation model. *J Heart Lung Transplant.* 2011; 30:1409-17.
68. Piccotti JR, Chan SY, Goodman RE, Magram J, Eichwald EJ, Bishop DK. IL-12 antagonism induces T helper 2 responses, yet exacerbates cardiac allograft rejection. Evidence against a dominant protective role for T helper 2 cytokines in alloimmunity. *J Immunol.* 1996; 157:1951-7.
69. Itoh S, Nakae S, Axtell RC, Velotta JB, Kimura N, Kajiwara N, Iwakura Y, Saito H, Adachi H, Steinman L, Robbins RC, Fischbein MP. IL-17 contributes to the development of chronic rejection in a murine heart transplant model. *J Clin Immunol.* 2010; 30:235-40.
70. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (mcp-1): An overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009; 29:313–26.
71. Schwarz ER, Pollick C, Dow J, Patterson M, Birnbaum Y, Kloner RA. A small animal model of non-ischemic cardiomyopathy and its evaluation by transthoracic echocardiography. *Cardiovasc Res.* 1998; 39: 216-23.
72. Elsberg CA. An Experimental investigation of the treatment of wounds of the heart by: means of suture of the heart muscle. *J Exp Med.* 1899; 4: 479-520.
73. Manning PJ, Ringler DH, Newcomer Ch E. The Biology of the Laboratory Rabbit. Academic press. 2^o Edition. 1994; Chap. 3: 47-61.

74. Manning PJ, Ringler DH, Newcomer Ch E. The Biology of the Laboratory Rabbit. Academic press. 2º Edition. 1994; Chap. 4: 63-9.
75. Rodrigues TMA, Palmeira JAO, Mendonça JT, Gomes OM. Estudo evolutivo da anatomia das artérias coronárias em espécies de vertebrados com técnica de moldagem em acetato de vinil (vinilite). *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 1999; 14: 331-9.
76. Alonso DR, Starek PK, Minick CR. Studies on the pathogenesis of atheroarteriosclerosis induced in rabbit cardiac allografts by the synergy of graft rejection and hypercholesterolemia. *Am J Pathol.* 1977; 87: 415-42.
77. Cowan B, Baron O, Crack J, Coulber C, Wilson GJ, Rabinovitch M. Elafin, a serine elastase inhibitor, attenuates post-cardiac transplant coronary arteriopathy and reduces myocardial necrosis in rabbits after heterotopic cardiac transplantation. *J Clin Invest.* 1996; 97: 2452-68.
78. Carvalho JBY, Petroianu A. Imunodepressão induzida por talidomida e ciclosporina em transplante cardíaco heterotópico de coelho. *Rev Col Bras Cir.* 2003; 30: 106 – 13.
79. Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Dorlhiac-Llacer P, Pileggi FJC, Chamone DAF. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for the treatment of the disease. *Braz J Med Biol Res.* 1992; 25: 1003–7.
80. Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso MTB, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a non protein microemulsion resembling LDL. *Lipids.* 1993; 28: 691–6.

81. Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Dorlhiac-Llacer P, Cadena SM, Coelho IJ, Meneghetti JC, Pileggi FJ, Chamone DA. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res.* 1994;54:4660–6.
82. Buxton DB, Lee SC, Wickline SA, Ferrari M. For the Working Group Members Recommendations of the National Heart, Lung, and Blood Institute Nanotechnology Working Group. *Circulation.* 2003; 108: 2737-42.
83. Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J Occup Med Toxicol.* 2007; 2: 16.
84. Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 1310-6.
85. Hirata RD, Hirata MH, Mesquita CH, Cesar TB, Maranhão RC. Effects of Apolipoprotein B-100 on the Metabolism of a Lipid Microemulsion Model in Rats. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1437: 53-62.
86. Maranhão RC, Graziani SR, Yamaguchi N, Melo RF, Latrilha MC, Rodrigues DG, Couto RD, Schreiber R, Buzaid AC. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2002; 49:487–98.
87. Naoum FA, Gualandro SF, Latrilha MC, Maranhão RC. Plasma Kinetics of a Cholesterol-Rich Microemulsion in Subjects with Heterozygous Beta-Thalassemia. *Am. J. Hematol.* 2004; 77: 340-5.
88. Padoveze AF, Maniero F, Oliveira TV, Vitorio TS, Couto RD, Maranhão RC. Effect of a cholesterol-rich diet on the metabolism of the free and esterified cholesterol components of a nanoemulsion that resembles LDL in rabbits. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42: 172-8.

89. Valduga CI, Fernandes DC, Lo Prete AC, Azevedo CHM, Rodrigues DG, Maranhão RC. Use of a Cholesterol-Rich Microemulsion that Binds to Low-Density Lipoprotein Receptors as Vehicle for Etoposide. *J Pharm Pharmacol.* 2003; 55: 1615-22.
90. Majoros IJ, Williams CR, Becker A, Baker JR JR. Methotrexate delivery via folate targeted dendrimer-based nanotherapeutic platform. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2009; 1: 502-10.
91. Teixeira RS, Curi R, Maranhão RC. Effects on Walker 256 Tumor of Carmustine Associated with a Cholesterol-Rich Microemulsion (LDE). *J Pharm Pharmacol.* 2004; 56: 909-14.
92. Lo Prete AC, Maria DA, Rodrigues DG, Valduga CI, Ibañez OCM, Maranhão RC. Evaluation in melanoma-bearing mice of an etoposide derivative associated to a cholesterol rich-microemulsion. *Pharm. Res.* 2006; 58: 801- 8.
93. Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82: 1247-59.
94. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc.* 1971; 93: 2325-
95. Schiff PB, Horwitz SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77: 1561-5.
96. Horwitz SB. Mechanism of action of taxol. *Science.* 1992; 13: 134-6.
97. Horwitz SB, Cohen D, Rao S, Ringel I, Shen HJ, Yang CP. Taxol: mechanisms of action and resistant. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1993; 15: 55-61.
98. Manfredi JJ, Horwitz SB. Taxol: an antimitotic agent with a new mechanism of action. *Pharmacol Ther.* 1984; 25: 83-125.

-
99. Sollott SJ, Cheng L, Pauly RR, Jenkins GM, Monticone RE, Kuzuya M et al. Taxol inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty in the rat. *J Clin Invest.* 1995; 95: 1869-76.
 100. Signore PE, Machan LS, Jackson JK, Burt H, Bromley P, Wilson JE, et al. Complete inhibition of intimal hyperplasia by perivascular delivery of paclitaxel in balloon injured rat carotid arteries. *J Vasc Interv Radiol* 2001; 12: 79-88.
 101. Drachman DE, Edelman ER, Seifert P, Groothuis AR, Bornstein DA, Kamath KR et al. Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel: Change in composition and arrest of growth over six months. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36: 2325-32.
 102. Waugh J, Wagstaff AJ. The paclitaxel (TAXUS) – eluting stent: a review of its use in the management of de novo coronary artery lesions. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2004; 4: 257-68.
 103. Park SJ, Shim WH, Ho DS, Raizner AE, Park SW, Hong MK et al. A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1537-45.
 104. Liistro F, Stankovic G, Di Mario C, Takagi T, Chieffo A, Moshiri S et al. First clinical experience with a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system implantation for in-stent restenosis: immediate and long-term clinical and angiographic outcome. *Circulation.* 2002; 105: 1883-6.
 105. Farber S, Diamond LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med.* 1948; 238: 787-93.
 106. Cronstein BN. Molecular mechanism of methotrexate action in inflammation. *Inflammation.* 1992; 16: 411-23.

107. Costanzo-Nordin MR, Grusk BB, Silver MA, Sobotka PA, Winters GL, O'connell JB, Pifarré R, Robinson JA. Reversal of recalcitrant cardiac allograft rejection with methotrexate. *Circulation*. 1988; 78:III47-57.
108. Olsen SL, O'connell JB, Bristow MR, Renlund DG. Methotrexate as an adjunct in the treatment of persistent mild cardiac allograft rejection. *Transplantation*. 1990; 50:773-5.
109. Costanzo MR, Koch DM, Fisher SG, Heroux AL, KAO WG, Johnson MR. Effects of methotrexate on acute rejection and cardiac allograft vasculopathy in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 1997;16: 169-78.
110. Forni A, Faggian G, Chiominto B, Mazzucco A. Combined chronic administration of methotrexate and cyclosporine A following cardiac ongoing rejection. *Transplant Proc*. 1998; 30:1140-2.
111. Bacal F, Veiga VC, Fiorelli AI, Bellotti G, Bocchi EA, Stolf NAG, Ramires JA. Treatment of persistent rejection with methotrexate in stable patients submitted to heart transplantation. *Arq Bras Cardiol*. 2000; 74:141-8.
112. Ciesielski CJ, Mei J, Piccinini LA. Effects of cyclosporine A and methotrexate on CD18 expression in recipients of rat cardiac allografts. *Transpl Immunol*. 1998; 6: 122-33.
113. Ciesielski CJ, Pflug JJ, Mei J, Piccinini LA. Methotrexate regulates ICAM-1 expression in recipients of rat cardiac allografts. *Transpl Immunol*. 1998; 6:111-21.
114. Ciesielski CJ, Mei J, Neton JT, Piccinini LA. Effects of cyclosporine A and methotrexate on induction of tumour necrosis factor-alpha in rat cardiac allografts. *Transpl Immunol*. 1997; 5: 25-34.

115. Pizarro TT, Malinowska K, Kovacs EJ, Clancy J Jr, Robinson JA, Piccinini LA. Diminished cytotoxic gene expression in rat cardiac transplants with low-dose cyclosporine/methotrexate combination therapy. *Transplantation*. 1994; 58: 223-32.
116. Michael B, Francos GC, Burke JF Jr, Gaughan WI. Methotrexate is effective in preventing acute and potentially chronic renal allograft rejection. *Transplant Proc.* 1994; 26: 3046-7.
117. Rosowsky A, Forsch RA, Freisheim JH, Galivan J, Wick M. Methotrexate analogues. 23. Synthesis, dihydrofolate reductase affinity, cytotoxicity, and in vivo antitumor activity of some putative degradation products of methotrexate-poly(L-lysine) conjugates. *J Med Chem*. 1984; 27: 888-93
118. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25: 402-8.
119. EISEN, H. Long-term cardiovascular risk in transplantation--insights from the use of everolimus in heart transplantation. **Nephrol Dial Transplant.**; v. 3, p. iii9-13, 2006.
120. SCHWEIGER, M.; STIEGLER, P.; PUNTSCHART, A.; SEREINIGG, M.; PRENNER, G.; WASLER, A.; TSCHELIESSNIGG, K. Everolimus in different combinations as maintenance immunosuppressive therapy in heart transplant recipients. **Exp Clin Transplant.**; v. 10, p. 273-7, 2012.
121. SCHAFFER, S.A.; ROSS, H.J. Everolimus: efficacy and safety in cardiac transplantation. **Expert Opin Drug Saf.**; v. 9, p. 843-54, 2010.
122. RAICHLIN, E.; KUSHWAHA, S.S. Proliferation signal inhibitors and cardiac allograft vasculopathy. **Curr Opin Organ Transplant.**; v. 13, p. 543-50, 2008.
123. GUSTAFSSON, F.; ROSS, H.J. Proliferation signal inhibitors in cardiac transplantation. **Curr Opin Cardiol.**; v. 22, p. 111-6, 2007.

124. KACZMAREK, I.; ZARUBA, M.M.; BEIRAS-FERNANDEZ, A.; REIMANN, R.; NICKEL, T.; GRINNINGER, C.; SADONI, S.; HAGL, C.; MEISER, B. Tacrolimus with mycophenolate mofetil or sirolimus compared with calcineurin inhibitor-free immunosuppression (sirolimus/mycophenolate mofetil) after heart transplantation: 5-year results. **J Heart Lung Transplant.**; v. 32, p. 277-84, 2013.
125. ENSOR, C.R.; DOLIGALSKI, C.T. Proliferation signal inhibitor toxicities after thoracic transplantation. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.**; v.9, p. 63-77, 2013.
126. ESPER, E.; GLAGOV, S.; KARP, R.B.; SIMONSEN, K.K.; FILER, S.R.; SCANU, A.M.; SAND, M.E. Role of hypercholesterolemia in accelerated transplant coronary vasculopathy: results of surgical therapy with partial ileal bypass in rabbits undergoing heterotopic heart transplantation. **J Heart Lung Transplant.**; v. 16, p. 420-35, 1997.
127. PERRAULT, L.P.; EL-HAMAMSY, I.; DUMONT, E.; MALO, O.; CARRIER, M. Effects of crystalloid, blood and Celsior solutions on porcine coronary endothelial function after heart transplantation. **J Heart Lung Transplant.**; v. 24, p. 912-20, 2005.
128. NAKAGAWA, T.; SUKHOVA, G.K.; RABKIN, E.; WINTERS, G.L.; SCHOEN, F.J.; LIBBY, P. Acute rejection accelerates graft coronary disease in transplanted rabbit hearts. **Circulation.**; v. 92, p. 987-93, 1995.
129. FOEGH, M.L.; KHIRABADI, B.S.; CHAMBERS, E.; AMAMOO, S.; RAMWELL, P.W. Inhibition of coronary artery transplant atherosclerosis in rabbits with angiopeptin, an octapeptide. **Atherosclerosis.**; v. 78, p. 229-236, 1989.

130. STUBBENDORFF, M.; DEUSE, T.; HAMMEL, A.; ROBBINS, R.C.; REICHENSPURNER, H.; SCHREPFER, S. Orthotopic aortic transplantation: a rat model to study the development of chronic vasculopathy. **J Vis Exp.**; v. 4, p. 1-3, 2010.
131. PERRAULT, L.P.; MAHLBERG, F.; BREUGNOT, C.; BIDOUARD, J.P.; VILLENEUVE, N.; VILAINE, J.P.; VANHOUTTE, P.M. Hypercholesterolemia increases coronary endothelial dysfunction, lipid content, and accelerated atherosclerosis after heart transplantation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**; v. 20, p. 728-36, 2000.
132. WINTERS, G.L.; KENDALL, T.J.; RADIO S.J. Posttransplant obesity and hyperlipidemia: major predictors of severity of coronary arteriopathy in failed human heart allografts. **J Heart Transplant.**; v. 9, p. 364–371, 1990.
133. EICH, D.; THOMPSON, J.A.; KO, D.J. Hypercholesterolemia in long-term survivors of heart transplantation: an early marker of accelerated coronary artery disease. **J Heart Lung Transplant.**; v. 10, p. 45–49, 1991.
134. KOBASHIGAWA, J.A.; KASISKE, B.L. Hyperlipidemia in solid organ transplantation. **Transplantation.**; v. 63, p. 331–338, 1997.
135. MINICK, C.R.; MURPHY, G.E.; CAMPBELL, W.G. JR. Experimental induction of athero-arteriosclerosis by the synergy of allergic injury to arteries and lipid-rich diet. I. Effect of repeated injections of horse serum in rabbits fed a dietary cholesterol supplement. **J Exp Med.**; v. 124, p. 635-52, 1966.
136. HANSSON G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med.**; v. 352, p. 1685–1695, 2005.
137. RUSSELL, P.S.; CHASE, C.M.; COLVIN, R.B. Accelerated atheromatous lesions in mouse hearts transplanted to apolipoprotein-E-deficient recipients. **Am J Pathol.**; v. 149, p. 91–99, 1996.

138. SHI, C.; LEE, W.S.; RUSSELL, M.E. Hypercholesterolemia exacerbates transplant arteriosclerosis via increased neointimal smooth muscle cell accumulation: studies in apolipoprotein E knockout mice. **Circulation.**; v. 96, p. 2722–2728, 1997.
139. SCHIOPU, A.; NADIG, S.N.; COTOI, O.S.; HESTER, J.; VAN ROOIJEN, N.; WOOD, K.J. Inflammatory Ly-6C(hi) monocytes play an important role in the development of severe transplant arteriosclerosis in hyperlipidemicmaranh recipients. **Atherosclerosis.**; v. 223, p. 291-8, 2012.
140. TANAKA, H.; SUKHOVA, G.K.; LIBBY, P. Interaction of the allogeneic state and hypercholesterolemia in arterial lesion formation in experimental cardiac allografts. **Arterioscler Thromb.**; v. 14, p. 734–745, 1994.
141. FEBBRAIO, M.; GUY, E.; SILVERSTEIN, R.L. Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**; v. 24, p. 2333-8, 2004.
142. CALPE-BERDIEL, L.; ZHAO, Y.; DE GRAAUW, M.; YE, D.; VAN SANTBRINK, P.J.; MOMMAAS, A.M.; FOKS, A.; BOT, M.; MEURS, I.; KUIPER, J.; MACK, J.T.; VAN ECK, M.; TEW, K.D.; VAN BERKEL, T.J. Macrophage ABCA2 deletion modulates intracellular cholesterol deposition, affects macrophage apoptosis, and decreases early atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. **Atherosclerosis.**; v. 223, p. 332-41, 2012.
143. SALAMA, M.; ANDRUKHOVA, O.; ROEDLER, S.; ZUCKERMANN, A.; LAUFER, G.; AHARINEJAD, S. Association of CD14+ monocyte-derived progenitor cells with cardiac allograft vasculopathy. **J Thorac Cardiovasc Surg.**; v. 142, p. 1246-53, 2011.
144. KING, C.L.; DEVITT, J.J.; LEE, T.D.; HANCOCK FRIESEN, C.L. Neutrophil mediated smooth muscle cell loss precedes allograft vasculopathy. **J Cardiothorac Surg.**; v. 52, p. 1-11, 2010.

145. CROMBIE, R.; SILVERSTEIN, R. Lysosomal integral membrane protein II binds thrombospondin-1. Structure-function homology with the cell adhesion molecule CD36 defines a conserved recognition motif. **J. Biol. Chem.**; v. 273, p. 4855–4863, 1998.
146. ZHAO, X.M.; HU, Y.; MILLER, G.G.; MITCHELL, R.N.; LIBBY, P. Association of thrombospondin-1 and cardiac allograft vasculopathy in human cardiac allografts. **Circulation.**; v. 103, p. 525-31, 2001.
147. JIANG, Y.; XIE, X.B.; PENG, L.K.; PENG, F.H.; LAN, G.B.; WANG, Y.; YU, S.J.; FANG, C.H. Dyslipidemia in human kidney transplant recipients receiving cyclosporine and tacrolimus is associated with different expression of CD36 on peripheral blood monocytes. **Transplant Proc.**; v. 43, p. 1612-5, 2011.
148. BOYER, J.F.; BALARD, P.; AUTHIER, H.; FAUCON, B.; BERNAD, J.; MAZIÈRES, B.; DAVIGNON, J.L.; CANTAGREL, A.; PIPY, B.; CONSTANTIN, A. Tumor necrosis factor alpha and adalimumab differentially regulate CD36 expression in human monocytes. **Arthritis Res Ther.**; v. 9, p. R22, 2007.
149. YAMAMOTO, T.; DAVIS, C.G.; BROWN, M.S.; SCHNEIDER, W.J.; CASEY, M.L.; GOLDSTEIN, J.L.; RUSSELL, D.W. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. **Cell.**; v. 39, p. 27–38, 1984.
150. GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. History of discovery: The LDL receptor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**; v. 29, p. 431-8, 2009.
151. HU, Y.; DAVISON, F.; ZHANG, Z.; XU, Q. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. **Circulation.**; v. 108, p. 3122–3127, 2003.
152. MINAMI, E.; LAFLAMME, M.A.; SAFFITZ, J.E.; MURRY, C.E. Extracardiac progenitor cells repopulate most major cell types in the transplanted human heart. **Circulation.**; v. 112, p. 2951–2958, 2005.

153. SIMPER, D.; WANG, S.; DEB, A.; HOLMES, D.; MCGREGOR, C.; FRANTZ, R.; KUSHWAHA, S.S.; CAPLICE, N.M. Endothelial progenitor cells are decreased in blood of cardiac allograft patients with vasculopathy and endothelial cells of noncardiac origin are enriched in transplant atherosclerosis. **Circulation.**; v. 108, p. 143–149, 2003.
154. LILLIS, A.P.; VAN DUYN, L.B.; MURPHY-ULLRICH, J.E.; STRICKLAND, D.K. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. **Physiol Rev.**; v. 88, p. 887-918. 2008.
155. OVERTON, C.D.; YANCEY, P.G.; MAJOR, A.S.; LINTON, M.F.; FAZIO, S. Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse. **Circ Res.**; v. 100, p. 670–677, 2007.
156. CAMINO-LOPEZ, S.; LLORENTE-CORTES, V.; SENDRA, J.; BADIMON, L. Tissuefactor induction by aggregated LDL depends on LDL receptor-related protein expression (LRP1) and Rho A translocation in human vascular smooth muscle cells. **Cardiovasc Res.**; v. 73, p. 208-216, 2008.
157. J. LLORENTE-CORTÉS, V.; BADIMON, L. LDL receptor-related protein and the Vas- cular Wall. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**; v. 25, p. 497–504, 2005.
158. OTERO-VINAS, M.; LLORENTE-CORTÉS, V.; PENA, E.; PADRO, T.; BADIMON, L. Aggregated low lipoproteins decrease metalloproteinase-9 expression and activity in human coronary smooth muscle cells. **Atherosclerosis.**; v. 194, p. 326–333, 2007.
159. J. LLORENTE-CORTÉS, V.; COSTALES, P.; HUESCA-GÓMEZ, C.; BADIMON, L. Angiotensin II upregulates LDL receptor-related protein (LRP1) expression in the vascular wall: a new pro-atherogenic mechanism of hypertension. **Cardiovasc Res.**; v. 78, p. 581-9, 2008.

160. DINARELLO CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. **Adv Immunol.**; v. 44, p. 153-205, 1989.
161. DINARELLO A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. **FASEB J.**; v. 8, p. 1314-1325, 1994.
162. BREINHOLT, J.P.; VALLEJO, J.G.; GATES, C.M.; CLUNIE, S.K.; KEARNEY, D.L.; DREYER, W.J.; TOWBIN, J.A.; BOWLES, N.E. Myocardial pro-inflammatory cytokine expression and cellular rejection in pediatric heart transplant recipients. **J Heart Lung Transplant.**; v. 27, p. 317-24, 2008.
163. RAO, D.A.; TRACEY, K.J.; POBER, J.S. IL-1alpha and IL-1beta are endogenous mediators linking cell injury to the adaptive alloimmune response. **J Immunol.**; v. 179, p. 6536-46, 2007.
164. BARKER, A.K.; MCDANIEL, D.O.; ZHOU, X.; HE, Z.; ARU, G.; THOMAS, T.; MOORE, C.K. Combined analysis of allograft inflammatory factor-1, interleukin-18, and Toll-like receptor expression and association with allograft rejection and coronary vasculopathy. **Am Surg.**; v. 76, p. 872-8, 2010.
165. DUDLER, J.; SIMEONI, E.; FLEURY, S.; LI, J.; PAGNOTTA, M.; PASCUAL, M.; VON SEGESSER, L.K.; VASSALLI, G. Gene transfer of interleukin-18-binding protein attenuates cardiac allograft rejection. **Transpl Int.**; v. 20, p. 460-6, 2007.
166. SIMON, T.; OPELZ, G.; WIESEL, M.; PELZL, S.; OTT, R.C.; SÜSAL, C. Serial peripheral blood interleukin-18 and perforin gene expression measurements for prediction of acute kidney graft rejection. **Transplantation.**; v. 77, p. 1589-95, 2004.

167. AFFLECK, D.G.; BULL, D.A.; ALBANIL, A.; SHAO, Y.; BRADY, J.; KARWANDE, S.V.; EICHWALD, E.J.; SHELBY, J. Interleukin-18 production following murine cardiac transplantation: correlation with histologic rejection and the induction of INF-gamma. **J Interferon Cytokine Res.**; v. 21, p. 1-9, 2001.
168. HANCOCK, W.W.; WANG, L.; YE, Q. Chemokine-directed dendritic cell trafficking in allograft rejection. **Curr Opin Organ Transplant.**; v. 8, p. 35–39, 2003.
169. LARSEN, C.P.; MORRIS, P.J.; AUSTYN, J.M. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens: a novel route for initiation of rejection. **J Exp Med.**; v. 171, p. 307–314, 1990.
170. WEI, R.Q.; SCHWARTZ, C.F.; LIN, H.; CHEN, G.H.; BOLLING, S.F. Anti-TNF antibody modulates cytokine and MHC expression in cardiac allografts. **J Surg Res.**; v. 81, p. 123–128, 1999.
171. BOLLING, S.F.; KUNKEL, S.L.; LIN, H. Prolongation of cardiac allograft survival in rat by anti-TNF and cyclosporine combination therapy. **Transplantation.**; v. 53, p. 283–286, 1992.
172. SEU, P.; IMAGAWA, D.K.; WASEF, E.; OLTHOFF, K.M.; HART, J.; STEPHENS, S.; DEMPSEY, R.A.; BUSUTTIL, R.W. Monoclonal anti-tumor necrosis factor-alpha antibody treatment of rat cardiac allografts: synergism with low-dose cyclosporine and immunohistological studies. **J Surg Res.**; v. 50, p. 520–528. 1991.
173. LATTMANN, T.; HEIN, M.; HORBER, S.; ORTMANN, J.; TEIXEIRA, M.M.; SOUZA, D.G.; HAAS, E.; TORNILLO, L.; MÜNTER, K.; VETTER, W.; BARTON, M. Activation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in host organs during chronic allograft rejection: role of endothelin receptor signaling. **Am J Transplant.**; v. 5, p. 1042–1049, 2005.

-
174. ISHII, D.; SCHENK, A.D.; BABA, S.; FAIRCHILD, R.L. Role of TNFalpha in early chemokine production and leukocyte infiltration into heart allografts. **Am J Transplant.**; v. 10, p. 59-68, 2010.
175. LÁCHA, J.; BUSHELL, A.; SMETANA, K.; ROSSMANN, P.; PRIBYLOVÁ, P.; WOOD, K.; MALÝ, P. Intercellular cell adhesion molecule-1 and selectin ligands in acute cardiac allograft rejection: a study on gene-deficient mouse models. **J Leukoc Biol.**; v. 71, p. 311–318, 2002.
176. TERNSTROM, L.; JEPPSSON, A.; RICKSTEN, A.; NILSSON, F. Tumor necrosis factor gene polymorphism and cardiac allograft vasculopathy. **J Heart Lung Transplant.**; v. 24, p. 433-8, 2005.
177. PULKKINEN, V.P.; SIHVOLA, R.K; KOSKINEN, PK.; LEMSTRÖM, K.B. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha does not prevent cardiac allograft arteriosclerosis in the rat. **Transplant Proc.**; v. 33, p. 347, 2001.
178. AALTONEN, K.J.; VIRKKI, L.M.; MALMIVAARA, A.; KONTTINEN, Y.T.; NORDSTRÖM, D.C.; BLOM, M. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of existing TNF blocking agents in treatment of rheumatoid arthritis. **PLoS One.**; v. 7, p. e30275, 2012.
179. MARUI, N.; OFFERMANN, M.K.; SWERLICK, R.; KUNSCH, C.; ROSEN, C.A.; AHMAD, M.; ALEXANDER, R.W.; MEDFORD, R.M. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. **J Clin Invest.**; v. 92, p. 1866-74, 1993.
180. LATTMANN, T.; HEIN, M.; HORBER, S.; ORTMANN, J.; TEIXEIRA, M.M.; SOUZA, D.G.; HAAS, E.; TORNILLO, L.; MÜNTER, K.; VETTER, W.; BARTON, M. Activation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in host organs during chronic allograft rejection: role of endothelin receptor signaling. **Am J Transplant.**; v. 5, p. 1042–1049, 2005.

-
181. LÁCHA, J.; BUSHELL, A.; SMETANA, K.; ROSSMANN, P.; PRIBYLOVÁ, P.; WOOD, K.; MALÝ, P. Intercellular cell adhesion molecule-1 and selectin ligands in acute cardiac allograft rejection: a study on gene-deficient mouse models. **J Leukoc Biol.**; v. 71, p. 311–318, 2002.
182. DESHMANE, S.L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B.E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. **J Interferon Cytokine Res.**; v. 29, p. 313–326, 2009.
183. CARR, M. W.; ROTH, S. J.; LUTHER, E.; ROSE, S. S.; SPRINGER, T. A. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. Georgiou KR, Scherer MA, King TJ, Foster BK, Xian CJ. Deregulation of the CXCL12/CXCR4 axis in methotrexate chemotherapy-induced damage and recovery of the bone marrow microenvironment. **Int J Exp Pathol.**; v. 93, p. 104-14, 2012.
184. NIU, J.; KOLATTUKUDY, P.E. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. **Clin Sci.**; v. 117, p. 95-109, 2009.
185. BHARAT, A.; KUO, E.; STEWARD, N.; ALOUSH, A.; HACHEM, R.; TRULOCK, E. P.; PATTERSON, G. A.; MEYERS, B. F.; MOHANAKUMAR, T. Immunological link between primary graft dysfunction and chronic lung allograft rejection. **Ann. Thorac. Surg.**; v. 86, p. 189-195, 2008.
186. DE GROOT-KRUSEMAN, H. A.; MOL, W. M.; NIESTERS, H. G.; MAAT, A. P.; VAN GELDER, T.; BALK, A. H.; WEIMAR, W.; BAAN, C. C. Differential intragraft cytokine messenger RNA profiles during rejection and repair of clinical heart transplants: a longitudinal study. **Transplant. Int.**; v. 16, p. 9-14, 2003.

-
187. DE GROOT-KRUSEMAN, H. A.; BAAN, C. C.; LOONEN, E. H.; MOL, W. M.; NIESTERS, H. G.; MAAT, A. P.; BALK, A. H.; WEIMAR, W. Failure to down-regulate intragraft cytokine mRNA expression shortly after clinical heart transplantation is associated with high incidence of acute rejection. **J. Heart Lung Transplant.**; v. 20, p. 503-510, 2001.
188. FAHMY, N. M.; YAMANI, M. H.; STARLING, R. C.; RATLIFF, N. B.; YOUNG, J. B.; MCCARTHY, P. M.; FENG, J.; NOVICK, A. C.; FAIRCHILD, R. L. Chemokine and chemokine receptor gene expression indicates acute rejection of human cardiac transplants. **Transplantation.**; v. 75, p. 72-78, 2003.
189. CURCI, J.A.; LIAO, S.; HUFFMAN, M.D.; SHAPIRO, S.D.; THOMPSON, R.W. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. **J. Clin. Invest.**; v. 102, p. 1900–10, 1998.
190. LUTZ, J.; YAO, Y.; SONG, E.; ANTUS, B.; HAMAR, P.; LIU, S.; HEEMANN, U. Inhibition of matrix metalloproteinases during chronic allograft nephropathy in rats. **Transplantation.**; v. 79, p. 655-61, 2005.
191. VISVANATHAN, S.; WAGNER, C.; ROJAS, J.; KAY, J.; DASGUPTA, B.; MATTESON, E.L.; MACK, M.; BAKER, D.G.; RAHMAN, M.U. E-selectin, interleukin 18, serum amyloid a, and matrix metalloproteinase 9 are associated with clinical response to golimumab plus methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy. **J Rheumatol.**; v. 36, p. 1371-9, 2009.
192. GEORGIU, K.R.; SCHERER, M.A.; KING, T.J.; FOSTER, B.K.; XIAN, C.J. Deregulation of the CXCL12/CXCR4 axis in methotrexate chemotherapy-induced damage and recovery of the bone marrow microenvironment. **Int J Exp Pathol.**; v. 93, p. 104-14, 2012.

193. VISVANATHAN, S.; WAGNER, C.; ROJAS, J.; KAY, J.; DASGUPTA, B.; MATTESON, E.L.; MACK, M.; BAKER, D.G.; RAHMAN, M.U. E-selectin, interleukin 18, serum amyloid a, and matrix metalloproteinase 9 are associated with clinical response to golimumab plus methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy. **J Rheumatol.**; v. 36, p. 1371-9, 2009.