

## IMUNODEPRESSÃO INDUZIDA POR TALIDOMIDA E CICLOSPORINA EM TRANSPLANTE CARDÍACO HETEROTÓPICO DE COELHO

### IMUNODEPRESSION INDUCED BY THALIDOMIDE AND CYCLOSPORINE IN HETEROTOPIC HEART TRANSPLANTATION OF RABBITS

João Batista Vieira de Carvalho<sup>1</sup>  
Andy Petroianu, TCBC-MG<sup>2</sup>

**RESUMO: Objetivo:** A talidomida, por seus efeitos antiinflamatórios e imunodepressores, tem sido utilizada no tratamento de doenças dermatológicas e na doença enxerto-contrá-hospedeiro no transplante de medula óssea. O objetivo deste trabalho é avaliar a ação deste medicamento como imunodepressor em transplante de órgãos, estudando sua ação isoladamente ou em combinação com a ciclosporina na prevenção da rejeição ao aloenxerto cardíaco heterotópico em coelho. **Método:** Foram utilizados 50 coelhos, sendo 25 doadores e 25 receptores. Os animais receptores foram subdivididos em cinco grupos (n= 5): Grupo I (controle) animais não-imunodeprimidos; Grupo II (imunodeprimidos com ciclosporina na dose de 10 mg/kg/dia); Grupo III (imunodeprimidos com talidomida na dose de 100 mg/kg/dia); Grupo IV (imunodeprimidos com ciclosporina na dose de 5,0 mg/kg/dia) e Grupo V (imunodeprimidos com ciclosporina na dose de 5,0 mg/kg/dia associada a talidomida na dose de 50 mg/kg/dia). Os medicamentos foram administrados através de cateter orogástrico, a partir do dia anterior ao transplante. **Resultados:** O coração do doador foi implantado no abdome dos receptores. A associação de talidomida e ciclosporina apresentou o menor escore histopatológico de rejeição (p < 0,05). Observou-se que a talidomida empregada isoladamente ou associada à ciclosporina foi efetiva contra a rejeição, aumentando a sobrevida (p < 0,01) de animais submetidos ao transplante cardíaco heterotópico em posição abdominal. **Conclusões:** A talidomida empregada isoladamente, ou associada à ciclosporina, pode representar uma opção de imunodepressão em transplantes cardíaco heterotópico experimental de coelho.

**Descritores:** Talidomida; Ciclosporina; Transplante de coração; Coelhos.

## INTRODUÇÃO

O sucesso atual com o transplante de órgãos deve-se aos avanços na terapia imunodepressora e à aplicação de ampla variedade de agentes farmaco-

lógicos. Progrediu-se da terapia citotóxica, com elevada morbidade, para uma voltada à regulação da resposta imune e indução de tolerância imunológica. A busca de novas drogas imunossupressoras efetivas,

1. Mestre e Doutor em Cirurgia; Professor Adjunto I do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFMG; Professor e Cirurgião Cardiovascular do Hospital Universitário Alzira Velano, Faculdade de Ciências Médicas da UNIFENAS.
2. Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFMG; Docente-Livre em Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Escola Paulista de Medicina, UNIFESP; Docente-Livre em Gastroenterologia Cirúrgica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP; Doutor em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG; Pesquisador IA do CNPq

Recebido em: 11/10/2001

Aceito para publicação em: 02/04/2002

Trabalho realizado no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais e na Faculdade de Ciências Médicas de Alfenas, Minas Gerais.

com menor toxicidade e efeitos colaterais reduzidos constitui um desafio para uma intensa pesquisa<sup>1-7</sup>.

Um medicamento que parece ter ação imunossupressora é a talidomida. Esta droga mostrou-se válida no tratamento da doença enxerto-contrahospedeiro observada no transplante de medula óssea. Estudos experimentais têm evidenciado a ação da talidomida como droga imunossupressora e antiinflamatória em transplantes de órgãos e no tratamento de uma série de doenças. Em ratos, a associação da talidomida com ciclosporina foi eficaz tanto no tratamento quanto na prevenção dos episódios de rejeição ao aloenxerto cardíaco após indução inicial com ciclosporina<sup>8-17</sup>.

Desta forma, a talidomida pode representar uma nova opção imunodepressora farmacológica podendo ser útil no controle da rejeição ao aloenxerto cardíaco. Ela poderia eventualmente reduzir a necessidade de outros medicamentos, como os corticosteróides e ser associada a imunossupressores utilizados em enxerto, com especial destaque para a ciclosporina e o FK-506 ( Tacrolimus ).

Com o objetivo de avaliar a ação imunodepressora da talidomida isolada ou associada à ciclosporina, realizou-se o presente trabalho.

## MÉTODOS

Foram utilizados 50 coelhos mestiços, adultos e de ambos os sexos ( 32 machos e 18 fêmeas), sendo 25 doadores e 25 receptores. O peso dos animais variou entre 1,8 e 2,4 kg ( 2,1 +/- 1,8 kg ).

Os receptores foram divididos em cinco grupos:

Grupo I: controle, sem imunodepressão.

Grupo II: ciclosporina administrada na dose de 10 mg/kg/dia .

Grupo III: talidomida administrada na dose de 100 mg/kg/dia .

Grupo IV: ciclosporina administrada na dose de 5,0 mg/kg/dia.

Grupo V : ciclosporina administrada na dose de 5,0 mg/kg/dia associada a talidomida na dose de 50 mg/kg/dia.

Os medicamentos foram injetados através de cateter orogástrico no dia anterior à operação, no dia da cirurgia e nos dias subsequentes do pós-operatório. O acompanhamento dos animais estendeu-se até o óbito dos coelhos ou até a cessação dos batimentos cardíacos do coração transplantado.

Os transplantes foram realizados sob anestesia geral endovenosa com punção da veia marginal da orelha e injeção de pentobarbital sódico na dose de 30 mg/kg. A antisepsia foi feita com solução alcoólica de iodo a 2% após adequada tricotomia do tórax e abdome.

Procedeu-se à abertura longitudinal das cavidades torácica e abdominal desde o manúbrio esternal até a sínfise púbica. O pericárdio foi aberto, e o coração e grandes vasos foram dissecados. As veias cava cranial e caudal foram ligadas com fio de seda 2-0 e seccionadas entre essas ligaduras. Dissecou-se então a aorta e o tronco pulmonar. Um cateter calibre nº 27 G foi introduzido na porção alta da aorta ascendente e injetada a solução cardioplégica de Saint Thomas a 4°C e 0,3 ml de heparina sódica . Após a parada do coração em diástole, a aorta e o tronco pulmonar foram ligados com seda 2-0, cranialmente, a 4,0 cm do coração. Em seguida, o coração junto com os grandes vasos foram removidos. As veias e artérias pulmonares foram ligadas com seda 4-0 junto ao hilo pulmonar . Os pulmões então foram separados do bloco coração-pulmão por meio de secção dos vasos do pedículo pulmonar. O coração doador foi conservado em solução de cloreto de sódio a 0,9% e a 4°C, até o seu implante no receptor.

O transplante cardíaco heterotópico foi realizado segundo a técnica descrita por Mann *et al*<sup>1</sup>. A cavidade abdominal foi aberta através de incisão mediana xifopúbica. Procedeu-se à abertura do retroperitônio com incisão no peritônio parietal posterior longitudinalmente e dissecação da aorta abdominal e veia cava, caudalmente aos vasos renais. Após exposição desses vasos por uma extensão de 6,0 centímetros, longitudinalmente, heparina sódica foi injetada por punção da veia cava com agulha 30 ½ G conectada a seringa de 1ml na quantidade de 0,3 ml. Após dois minutos, colocaram-se duas pinças *bulldog*, proximal e distalmente ao local escolhido para as anastomoses vasculares, com interrupção sangüínea e hemostasia temporária. Procedeu-se à abertura longitudinal anterior da aorta e veia cava, na extensão correspondente ao calibre do tronco pulmonar e da aorta do coração a ser implantado. As anastomoses foram feitas com o auxílio de lupa cirúrgica, com aumento de 2,5 vezes. A aorta do coração doador foi anastomosada à aorta abdominal do receptor, com sutura término-lateral, contínua, utilizando fio de Prolene 7-0 . O tronco pulmonar do coração doador foi anastomosado à veia cava caudal do receptor, com

sutura término-lateral, contínua, utilizando fio de Prolene 7-0 (Figura-1).

Os movimentos respiratórios, coloração das mucosas, batimentos cardíacos nos corações próprios e transplantados foram avaliados em intervalos de cinco minutos até a recuperação da atividade cardíaca normal, com ritmo e frequência adequados. A seguir, os animais foram transferidos para gaiolas adequadas, um animal por gaiola, e mantidos aquecidos por holofotes equipados com lâmpadas fluorescentes de 100 Watts de potência. Os animais receberam ração e água previamente filtrada à vontade.

Colheram-se 3 ml de sangue dos animais imunodeprimidos com ciclosporina para medida dos níveis séricos da droga por meio de radioimunoensaio (RIE).

No pós-operatório, os animais foram pesados diariamente. Observou-se o seu estado geral e, por palpação abdominal, identificou-se a presença de batimentos no coração transplantado.

Quando cessaram os batimentos cardíacos no coração transplantado, os animais foram mortos com indução de parada cardiorrespiratória por injeção endovenosa de pentobarbital sódico. O coração transplantado, os pulmões e os rins do receptor foram

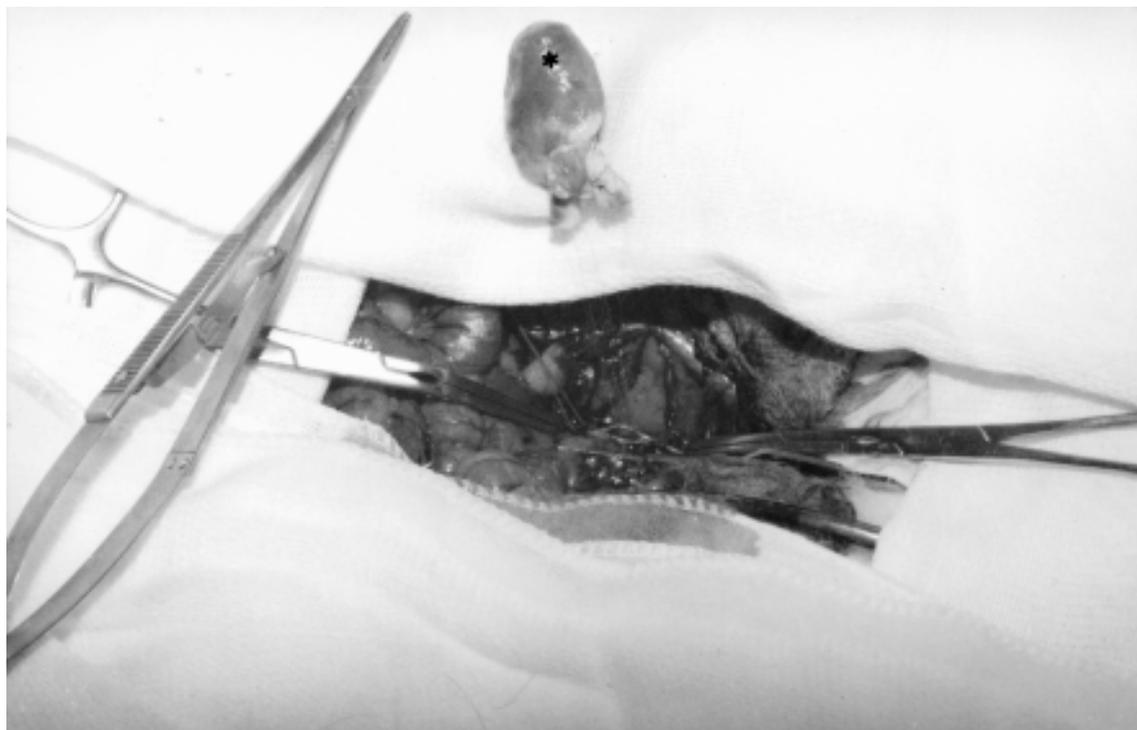
retirados e enviados para exame histopatológico. Em caso de morte súbita do receptor, o animal era submetido a necropsia para identificar-se a possível causa de óbito e os órgãos já citados eram removidos para exame histopatológico.

Todos os procedimentos envolvendo os animais seguiram rigorosamente os preceitos estabelecidos no Código Brasileiro de Experimentação Animal (1988) e pelo Comitê de Ética em experimentação animal da Universidade Federal de Minas Gerais<sup>18,19</sup>.

Os órgãos retirados dos animais mortos foram fixados em solução de formaldeído a 10% e posteriormente preparados para confecção de lâminas para estudo histológico, corados por hematoxilina e eosina. Foram retirados três fragmentos para inclusão em parafina. Foram feitas secções longitudinais desde a base até o ápice cardíaco, na espessura de 4  $\mu$ .

Para obtenção de escore patológico de rejeição foram observados os critérios de Billingham *et al.* e adotados pela International Society for Heart Transplantation com as modificações da Tabela-1<sup>20,21</sup>.

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Como as respostas medidas foram qualitativas (grau de rejeição) os resultados



**Figura 1** - Coração doador (\*) sendo implantado no receptor em posição abdominal.

foram submetidos à análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis, com ordenações médias comparadas pelo teste t de Student. Adotou-se como nível de significância  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

A sobrevida foi maior nos grupos II, III e V em relação aos grupos I e IV (Tabela-2).

Não houve diferença em relação à sobrevida nos grupos II, III e V. Os imunossuppressores empregados nesses grupos em associação ou isoladamente, foram efetivos em aumentar a sobrevida dos animais submetidos aos tratamentos (Tabela-2).

A rejeição foi menor, não havendo diferença significativa, nos grupos II, III e V. Portanto, os três tratamentos foram efetivos no controle da rejeição ( $p < 0,01$ ) (Tabela-2 e Figura-2).

A ciclosporina na dose de 5,0 mg/kg/dia (grupo IV) também foi efetiva no controle da rejeição em relação ao Grupo I (controle), porém, não foi eficaz no controle da rejeição em relação às demais

drogas utilizadas nas doses empregadas, em associação ou isoladamente (Tabela-2 e Figura-2).

## DISCUSSÃO

A técnica de transplante heterotópico em posição abdominal do aloenxerto cardíaco<sup>1</sup>, tem sido utilizada como modelo para estudo da ação farmacológica de medicamentos, hormônios, para verificar a intensidade da lesão miocárdica secundária à reperfusão e do padrão histológico de rejeição ao aloenxerto cardíaco<sup>10-17, 23-27</sup>. Este método é simples e relativamente fácil de ser reproduzido em diversos animais.

Com o objetivo de verificar o comportamento da rejeição e o tempo de sobrevida dos coelhos em face a diferentes doses de medicação imunodepressora empregaram-se doses diferentes de talidomida e ciclosporina. O emprego de doses menores com resultados aceitáveis em relação à diminuição do escore histopatológico de rejeição e o correspondente aumento da sobrevida podem representar uma considerável redução no custo do procedimento de transplante e a ocorrência de menores efeitos adversos

**Tabela 1** - Classificação da rejeição ao aloenxerto cardíaco modificada da *The International Society for Heart Transplantation*

Grau	Nomenclatura nova	Nomenclatura antiga
0	Sem rejeição	Sem rejeição
1	Infiltrado local perivascular ou intersticial sem necrose	Rejeição
2	Infiltrado difuso disperso sem necrose	Rejeição ligeira
3	Apenas um foco com infiltração Intensa ou lesão focal dos miócitos	Rejeição focal moderada
4	Infiltrados intensos multifocais e/ou lesões dos miócitos baixa	Rejeição moderada
5	Processo inflamatório difuso com necrose	Rejeição limítrofe grave
6	Infiltrado polimórfico agressivo, +/- infiltrado, +/- edema, +/- hemorragia, +/- vasculite com necrose	Rejeição grave aguda

Rejeição "em resolução" - grau menor. Rejeição solucionada - Grau 0.

**Tabela 2** - Tempo médio de sobrevida ( em dias ) e escore médio de rejeição segundo os grupos experimentais.

Grupos	Tempo de sobrevida ( em dias )	Rejeição *
GRUPO I	5,2 a	4,0 c
GRUPO II	18,2 c	1,4 a b
GRUPO III	17,6 c	1,6 a b
GRUPO IV	9,0 b	2,4 b
GRUPO V	17,8 c	0,4 a

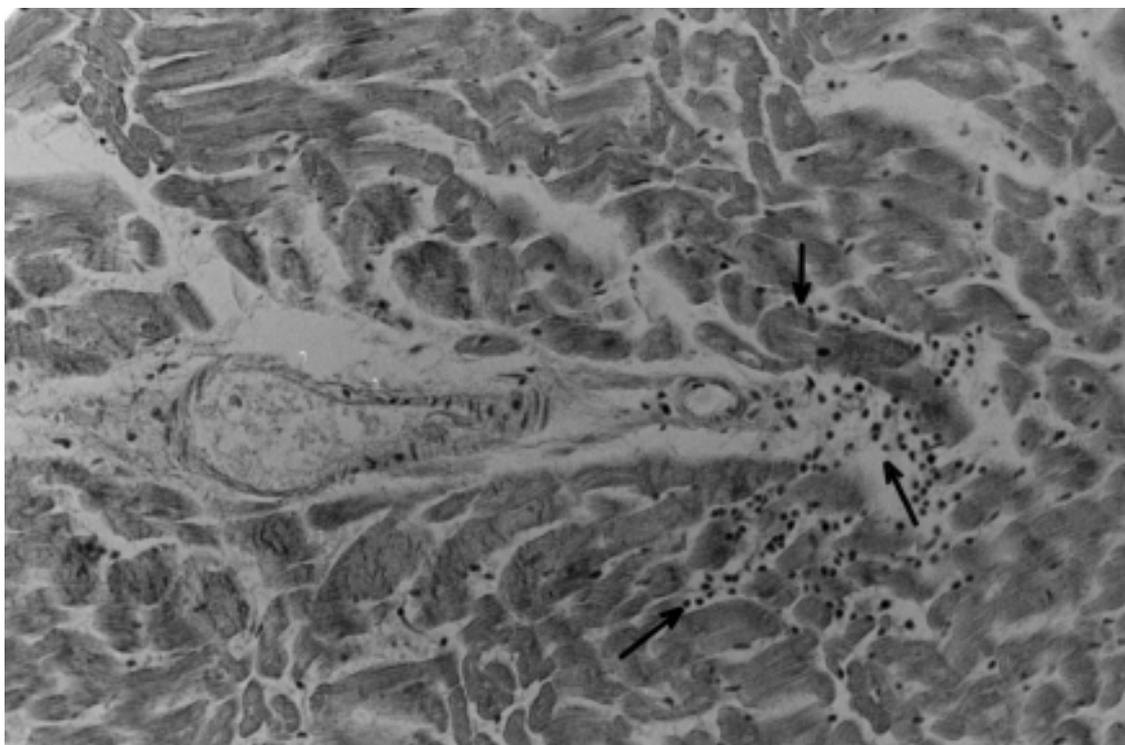
\*Escore histopatológico de rejeição segundo a classificação modificada da International Society for Heart Transplantation.

- Em cada coluna, médias com letras distintas são diferentes estatisticamente sendo  $p < 0,05$  para tempo de sobrevida e  $p < 0,01$  para rejeição.
- Grupo I - Controle- Animais não-imunodeprimidos
- Grupo II - Animais imunodeprimidos com ciclosporina ( 10 mg/kg/dia ).
- Grupo III- Animais imunodeprimidos com talidomida (100 mg/kg/dia ).
- Grupo IV- Animais imunodeprimidos com ciclosporina ( 5.0 mg/kg/dia ).
- Grupo V - Animais imunodeprimidos com talidomida (50 mg/kg/dia) e ciclosporina (5,0 mg/kg/dia).

relacionados à utilização das drogas imunossupressoras.

O presente estudo mostra que a associação da talidomida com a ciclosporina em doses menores

do que as terapêuticas foi tão eficaz quanto o emprego isoladamente de ciclosporina em dose imunodepressora. Os mecanismos relacionados ao sinergismo da ciclosporina com a talidomida permanecem



**Figura 2** - Exame histopatológico em animal submetido a imunodepressão com talidomida e ciclosporina – Escore histopatológico de rejeição: 1. Infiltrado focal ( perivascular ou intersticial ) sem necrose dos cardiomiócitos (setas ). Hematoxilina –eosina; aumento de 100 x.

obscuros, mas existem evidências de que ambos os medicamentos agem seletivamente em diferentes aspectos da resposta imune do hospedeiro.

O mecanismo de ação da talidomida sobre a imunidade humoral e celular ainda não foi estabelecido. É possível que seus efeitos anti-inflamatórios estejam associados à inibição de quimiotaxia dos neutrófilos<sup>8,21,29-31</sup>. A atuação da talidomida na sobrevida dos transplantes de pele em coelhos<sup>11,12</sup> e sua eficácia na prevenção e tratamento da reação enxerto *versus* hospedeiro murino em presença de transplante de medula óssea são conhecidas<sup>13-16</sup>. No presente estudo, a talidomida associada à ciclosporina reduziu o infiltrado inflamatório intersticial, endocárdico e o processo inflamatório mononuclear perivascular (Figura-2).

Concluindo, a maior sobrevida após a administração da talidomida, indica um possível efeito desta droga em retardar a evolução do processo de rejeição. A efetividade da associação da talidomida com a ciclosporina pode representar uma contribuição

importante no sentido de uma eventual aplicação clínica no campo da imunossupressão farmacológica em transplantes de órgãos. O emprego em doses menores que as convencionais, poderia reduzir, pelo menos em parte, os efeitos colaterais da ciclosporina, sem alterar a sua eficácia em termos de sobrevida do enxerto<sup>32-38</sup>. O custo financeiro da imunossupressão também seria consideravelmente reduzido, tendo em vista que a talidomida é um medicamento muito barato.

Estudos futuros são necessários para determinar os mecanismos imunológicos responsáveis pelo sinergismo entre a talidomida e a ciclosporina bem como para estabelecer seu real papel na farmacoterapia dos transplantes de órgãos.

#### *Agradecimentos*

*Os autores são gratos ao CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.*

---

#### **ABSTRACT**

**Background:** Because of its anti-inflammatory and immunodepressive effects, thalidomide has been used for the treatment of dermatologic diseases and of host-versus-graft disease in patients submitted to bone marrow transplantation. In the present study we evaluated the immunodepressive action of thalidomide alone or in combination with cyclosporine on the prevention of rejection of a heterotopic cardiac allograft in rabbits. **Methods:** Fifty rabbits were used, 25 of them as donors and 25 as recipients. Recipient animals were divided into five groups (n = 5 each): Group I (control) – non-immunodepressed animals, Group II (immunodepressed animals with cyclosporine at the dose of 10 mg/kg/day), Group III (immunodepressed animals with thalidomide at the dose of 100 mg/kg/day), Group IV (immunodepressed animals with cyclosporine at the dose of 5.0 mg/kg/day), and Group V (immunodepressed animals with cyclosporine at the dose of 5.0 mg/kg/day in combination with thalidomide at the dose of 50 mg/kg/day). Medications were administered through an orogastric catheter starting on the day before the transplant. The heart of the donors was implanted in the abdomen of the recipients. **Results:** The combination of thalidomide and cyclosporine showed the lowest histopathological rejection score (p < 0.05). Thalidomide administered alone or in combination with cyclosporine was effective against rejection, significantly increasing the survival (p < 0.01) of animals submitted to heterotopic heart transplantation in the abdominal position. **Conclusions:** The effectiveness of the combination of thalidomide and cyclosporine may represent an important application in the field of pharmacological immunosuppression in organ transplants.

**Key words :** Thalidomide; Cyclosporine ; Heart transplantation; Rabbits.

---

## REFERÊNCIAS

1. Mann FC, Priestley JT, Markowitz U, et al. - Transplantation of the intact mammalian. *Heart Ann Surg*, 1933, 26:219-224.
2. Belaube P, Garcin G, Marchand JP, et al. - Should thalidomide be rehabilitated? *Sem Hop*, 1983, 59(45):3101-3104.
3. Calne RY, Collier DS, Lim S, et al. - Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet*, 1989, 2(8656):227.
4. Cosenza CA, Cramer DV, Tusso PJ, et al. - Combination therapy with Brequinar sodium and cyclosporine synergistically prolongs hamster to rat cardiac xenograft survival. *J Heart Lung Transplant*, 1994, 13(3):489-497.
5. Cramer DV, Chapman FA, Jaffee BD, et al. - The effect of a new immunosuppressive drug, brequinar sodium, on heart, liver and kidney allograft rejection in the rat. *Transplantation*, 1992, 53(2):303-308.
6. Fujino Y, Kawamura T, Hullett DA, et al. - Evaluation of cyclosporine, mycophenolate mofetil, and Brequinar sodium combination therapy on hamster-to-rat cardiac xenotransplantation. *Transplantation*, 1994; 57(1):41-46.
7. Nelson PW. - Cyclosporine. *Surg Gynecol Obstet*, 1984; 159(3):297-308.
8. Barnhill RL, Doll NJ, Millikan E, et al. - Studies on the anti-inflammatory properties of thalidomide: effects on polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Am Acad Dermatol*, 1984, 11(5 Pt 1): 814-819.
9. Bore PJ, Scothorne RJ. - Effect of thalidomide on survival on skin homografts in rabbits. *Lancet*, 1966, 1(7449): 1240-1241.
10. Gutierrez-Rodriguez O. - Thalidomide. A promising new treatment for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1984, 27(10): 1118-1121.
11. Hellman K, Duke OI, Tucker DZ. - Prolongation of skin homograft survival by thalidomide. *Br Med J*, 1965, 2: 687.
12. Mouzas GL, Gershon RK. - The effect of thalidomide on skin allografts in mice: survival of the grafts. *Transplantation*, 1968, 6(9): 476-478.
13. Parker PM, Chao N, Nademanee A, et al. - Thalidomide as salvage therapy for chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 1995, 86(9): 3604- 3609.
14. Vogelsang GB, Hess AD, Santos GW. - Thalidomide for treatment of graft-versus- host disease. *Bone Marrow Transplant*, 1988; 3(5): 393- 398.
15. Vogelsang GB, Farmer ER, Hess AD, et al. - Thalidomide for the treatment of chronic graft - *versus* - host disease. *N Engl J Med*, 1992, 326(16): 1055-1058.
16. Wood PM, Proctor SJ. - The potencial use of thalidomide in the therapy of graft-versus-host disease. a review of clinical and laboratory information. *Leuk Res*, 1990, 14(5) : 395-399.
17. Emre S, Sumrani N, Hong J. - Beneficial effect of thalidomide and ciclosporin combination in heterotopic cardiac transplantation in rats. *Eur Surg Res*, 1990 22(6): 336-339.
18. Hoff C. - Sounding board. Immoral and moral uses of animals. *N Eng J Med*, 1980, 302(2): 115-118.
19. Petroianu A. - Aspectos éticos na pesquisa em animais. *Acta Cir Bras*, 1996; 11.
20. Billingham ME, Cary NRB, Hammond ME, et al. - A formulating for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: Heart Rejection Study Group. The International Society for Heart Transplantation. *J Heart Transplant*, 1990, 9(6): 587-593.
21. Billingham ME. - Pathology and etiology of chronic rejection of the heart. *Clin Transplant*, 1994, 8(3 Pt 2): 289-292.
22. Petroianu A. Transplante intestinal. *Rev Cir Hosp Mater Dei*, 1988, 1-2.
23. Kawahara K, Sutherland DE, Rynasiewicz JJ, et al. - Prolongation of heterotopic cardiac allografts in rats by ciclosporin A. *Surgery*, 1980, 88(4): 594-600.
24. Giardina JJ, Malinowska K, Pifarre R, et al. - Use of cyclosporine in the mouse heterotopic heart transplant model. *J Heart Transplant*, 1990, 9(2): 106-113.
25. Babuty D, Aupart M, Cosnay P, et al. - Electrocardiographic and eletrophysiologic properties of cardiac allografts. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1994, 5(12):1053-1063.
26. Amirhamzeh MM, Jia CX, Starr JP, et al. - Diastolic function in the heterotopic rat heart transplant model. Effects of edema, ischemia, and rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1994, 108(5): 928-937.
27. Korecky B, Masika M. - Use of a heterotopic cardiac isotransplant for pharmacological and toxicological studies. *Toxicol Pathol* 1990, 18(4 Pt 1): 541-546.
28. Maurice PD, Barkley AS, Allen BR. - The effect of thalidomide on arachidonic acid metabolism in human polymorphonuclear leukocytes and platelets. *Br J Dermatol*, 1986, 115(6): 677-680.
29. Keenan RJ, Eiras G, Burckart GJ, et al. - Immunosuppressive propertie of thalidomide. Inhibition of in vitro lymphocyte proliferation alone and in combination with cyclosporine or FK506. *Transplantation*, 1991, 52(5) : 908-910.
30. Aronson IK, Webber L, West D, et al. - Thalidomide and lymphocyte function. *J Am Acad Dermatol*, 1986, 14(2 Pt 1): 282-283.
31. Gusdon JP, Cohen C. - Effect of thalidomide on the antibody response. *Am Obstet Gynecol*, 1968, 100(7): 952-956.

32. Chen TL, Vogelsang GB, Petty BG, et al. - Plasma pharmacokinetics and urinary excretion of thalidomide after oral dosing in healthy male volunteers. *Drug Metab Dispos*, 1989, 17(4): 402-405.
33. Czejka MI, Koch HP. - Determination of thalidomide and its major metabolites by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1987, 413: 181-187.
34. Eriksson T, Bjorkman S, Fyge A, et al. - Determination of thalidomide in plasma and blood by high-performance liquid chromatography: avoiding hydrolytic degradation. *J Chromatogr*, 1992, 582(1-2): 211-216.
35. Williams JW, Xiao F, Foster PF, et al. - Immunosuppressive effects of leflunomide in a cardiac allograft model. *Transplant Proc.*, 1993, 25(1 Pt 1): 745-746.
36. Eriksson T, Riesbeck K, Ostraat O, et al. - Drug exposure and flow cytometry analyses in a thalidomide treatment schedule that prolongs rat cardiac graft survival. *Transplant Proc.* 1992, 24(6): 2560-2561.
37. Ostraat O, Qi Z, Gannedahl G, et al. - Moderate additive immunosuppressive effect of thalidomide combined with cyclosporin A in rat cardiac transplantation. *Transpl Immunol.* 1996, 4(3): 241-246.
38. Lin Y, Segers C, Mikhalsky D, et al. - Xanthines: ideal immunosuppressants for combination with cyclosporine? *Transplant Proc.* 1996, 28(6): 3102.

Endereço para correspondência:

Rua Domingos Vieira, 587, sala 1210

Bairro Santa Efigênia,

30150-240 - Belo Horizonte, MG.

Tel: (31) 32414092, (35) 99740475, (35)32911522

E-mail: drjoaobvc@uol.com.br