VIVIANE FERREIRA PAES E SILVA DE JESUS

Efeitos do Micofenolato de sódio no aparelho mucociliar: estudo experimental em ratos

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

Programa de: Cirurgia Torácica e Cardiovascular.

Orientador: Paulo Manuel Pêgo Fernandes.

SÃO PAULO

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Viviane
Efeitos do micofenolato de sódio no aparelho mucociliar : estudo experimental em ratos / Viviane Ferreira. -- São Paulo, 2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientador: Paulo Manuel Pêgo Fernandes.

Descritores: 1.Depuração mucociliar/efeitos de drogas 2.Ácido micofenólico/efeitos de drogas 3.Imunossupressores 4.Transplante de pulmão 5.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-397/10

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, minha mãe pela sua luta e dedicação para que eu e a minha irmã tivéssemos as melhores oportunidades de estudo, responsável pela pessoa que me tornei e por tudo que ainda tenho a conseguir na minha vida; e o meu pai, que sempre foi um exemplo de esforço e dedicação aos estudos e de tudo que podemos conseguir se formos à luta.

À minha irmã, Anna Paula, que dentro das suas características e particularidades, é uma pessoa que sempre me incentivou para que eu continuasse indo em frente na minha convicção e nos meus sonhos.

Ao meu irmão, Paulo Junior, que como eu, segue por esta vida de dedicação à saúde alheia, em uma busca contínua de aperfeiçoamento, com o objetivo de ajudar muitas vezes um desconhecido.

À minha pequena irmã, Raphaela, e minha querida madrasta, Cléia, pela paciência e estímulo para que eu continuasse nesta luta.

Aos meus sogros, Maria Zilma e Luiz, que sempre foram pessoas maravilhosas e que me ajudaram nos momentos mais difíceis.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao melhor marido do mundo, Antônio Marcos, o homem que eu escolhi para me acompanhar nesta difícil batalha que é a vida, aquele com quem eu divido minhas alegrias, meus triunfos, minhas conquistas, minhas descobertas e minhas tristezas.

Ao homem, marido, companheiro que me manteve firme nos momentos de dificuldade e enfrentou com muita paciência e dedicação o período da realização desta Tese.

À minha querida mãezinha, Darci, novamente, por tudo que ela representa na minha vida, responsável pelo meu caráter, pela minha formação e grande incentivadora sempre, me acolhendo e me estimulando a continuar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o grande responsável por tudo e por todos nós.

Ao meu orientador, Professor Paulo Manuel Pêgo Fernandes, responsável pela minha entrada na pós- graduação e escolha da minha Tese, suas idéias e intervenções foram decisivas na confecção e condução deste trabalho.

Ao Rogério Pazett, Marcelo Zeviani e a Karina Andrigetti, biólogos do laboratório, LIM 61, que me ensinaram e me ajudaram na confecção desta Tese.

À Mariana, Sônia e Natália, estagiárias do laboratório, foram importantíssimas e essências para que a Tese chegasse ao seu final, por sua ajuda nas cirurgias, administração da medicação, no sacrifício, entre outros.

À maravilhosa equipe do Museu de Anatomia Patológica; Aristídes, pela sua paciência e análise estatística, Márcia, por ser sempre prestativa e disposta a me ajudar nos momentos mais difíceis, e Eliana, por sua amizade e estímulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed.
São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS
RESUMO
SUMMARY

1. INTRODUÇÃO **1**

2. OBJETIVO **5**

3. REVISÃO DA LITERATURA **7**
3.1. Transplante pulmonar 8
3.1.1. Histórico 8
3.2. Sistema respiratório e mecanismo de defesa 12
3.2.1. Aparelho Mucociliar 14
3.2.2. Resposta Imunológica 20
3.3. Terapia Imunossupressora 22
3.3.1. Drogas Imunossupressoras 24
3.3.1.1. Micofenolato 27
3.4. Imunossupressão em transplante pulmonar 31

4. MÉTODOS **33**
4.1. Grupos experimentais 34
4.2. Desenho experimental 34
4.3. Secção e anastomose brônquica 36
4.4. Administração do Micofenolato 38
4.5. Sacrifício 38
4.6. Coleta de muco 39
4.7. Medidas da freqüência do batimento ciliar 40
4.8. Análise do transporte mucociliar *in situ* 42
4.9. Avaliação das características do muco 43
4.10. Transporte no palato de rã 43
4.11. Análise estatística 46

5. RESULTADOS **47**

6. DISCUSSÃO **51**

7. CONCLUSÃO **67**

8. ANEXOS **69**

9. **REFERÊNCIAS** **88**

Esta pesquisa recebeu subsídio financeiro

Fapesp- Auxílio Pesquisa Regular- Processo nº 2007/ 50089-7

Capes- Bolsa de Doutorado

CBF: Frequência de Batimento Ciliar

D: lado direito

E: lado esquerdo

FBC: Frequência de Batimento Ciliar

S: grupo de pulmões de ratos controles que receberam solução salina

SBO: Síndrome da Bronquiolite Obliterante

SC: grupo de pulmões de ratos operados que receberam solução salina

M: grupo de pulmões de ratos controles que receberam Micofenolato

MC: grupo de pulmões de ratos operados que receberam Micofenolatoio

MCTS: Velocidade de Transporte Mucociliar *in vivo*

PLT: Velocidade de Transporte Mucociliar *in vitro*

VTMC: Velocidade de Transporte Mucociliar *in vivo*

RESUMO

JESUS, VFPS. Efeitos do Micofenolato de Sódio no aparelho mucociliar: estudo experimental em ratos [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010, 101 p.

O transplante pulmonar tem se tornado a opção de tratamento para os pacientes com doença pulmonar terminal. Maiores problemas associados são a rejeição e a infecção; por isso, a importância de se estudar os mecanismos de defesa do aparelho respiratório e o efeito de drogas imunossupressoras sobre o mesmo. O micofenolato de sódio é uma droga imunossupressora que inibe a proliferação dos linfócitos, envolvidos no mecanismo de defesa celular. Objetivo: Avaliar os efeitos do micofenolato de sódio versus solução salina no aparelho mucociliar de ratos. Métodos: Foram utilizados 60 ratos machos Wistar. Todos foram submetidos à cirurgia de secção e anastomose brônquica esquerda. Distribuídos aleatoriamente em dois grupos, um grupo de 30 ratos que recebeu solução salina, pulmão direito controle (S) e pulmão esquerdo operado (SC); enquanto que o segundo grupo recebeu, também por gavagem, micofenolato, pulmão direito controle (M) e pulmão esquerdo operado (MC); até o sacrifício no 7º, 15º e 30º dia de tratamento. Avaliados a frequência do batimento ciliar (FBC), velocidade do transporte mucociliar *in vivo* (VTMC); e a velocidade de transporte mucociliar *in vitro* (PLT). Resultados: A FBC é menor no grupo MC em relação ao grupo M, no período de 30 dias (p= 0, 003); e dentro do grupo MC, ao compararmos o 7º e o 30º (p=0, 0001) dia e o 15º e o 30º dia (p=0, 026) de tratamento notamos uma piora da FBC. Em relação à VTMC houve uma melhora no grupo SC no 7º e 30º dia (p=0, 003) e 15º e 30 º dia (p= 0, 005) de

tratamento. Comparando o grupo SC e MC no período de 30 dias, verificamos que esta VTMC é menor no segundo grupo (p= 0, 0001). No PLT não houve diferença estatística entre os grupos. Conclusões: O micofenolato associado à secção brônquica diminui a FBC no decorrer do tempo; a VTMC no grupo que recebeu solução salina associado ao procedimento cirúrgico apresentou uma recuperação no decorrer do tempo, o mesmo não foi observado quando associado ao procedimento cirúrgico foi administrado micofenolato; e não houve alteração na qualidade do muco na amostra estudada.

Descritores: 1.Depuração mucociliar/efeitos de drogas 2.Ácido micofenólico/efeitos de drogas 3.Imunossupressores 4.Transplante de pulmão 5.Ratos Wistar

SUMMARY

JESUS, VFPS. Effects of Mycophenolate on mucociliary clearance: experimental study in rats [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010, 101 p.

The lung transplantation has become the treatment option for the patients with terminal lung illness. Major problems associated are rejection and infection; that´s the reason the importance of studying the mechanism of respiratory system defense and the immunosuppressive drugs effects about itself. The sodium Mycophenolate is an immunosuppressive drug that inhibits the proliferation of lymphocytes, involved in cellular defense mechanism. Purpose: evaluating the sodium Mycophenolate effects versus salt solution in the mucociliary system of rats. Methods: sixty male Wistar rats were used. Every rat was submitted to section surgery and left bronchial anastomosis. The rats were randomly divided: a group of 30 rats which received saline solution; Right lung control (S) and operated Left lung (SC); meanwhile the second group received also by gavage Mycophenolate, Right lung control (M) and Left operated lung (MC); until the sacrifice at the seventh, fifteenth and thirtieth day of treatment. Ciliary beat frequency (CBF) has been evaluated, mucociliary transport speed in vivo (MCTS); and the Velocity of Transport of the Mucociliary in vitro (PLT). Results: the CBF is smaller in the MC group than M group, in thirty days (p=0,003), and inside MC group, when comparing with the seventh and the thirtieth (p=0, 0001) day and the fifteenth and the thirtieth day (p= 0,026) of the treatment we noticed a worsening of CBF. About the MCTS there was an improvement in the SC group in the seventh and the thirtieth day (p=0,003) and the seventh and the thirtieth day (p=0,005) of treatment. The comparing the SC and the MC groups in thirty days

we noticed that this MCTS is smaller in the second group (p=0, 0001). In the PLT there were no statistic differences between those groups. Conclusions: the Mycophenolate associated to bronchial section reduces the CBF over time; the MCTS in the group that received salt solution associated to surgical procedure showed recovery, the same was not observed when associated to surgical procedure when submitted to Mycophenolate; and there was not any change in the quality of mucus in the studied sample.

Descriptors: 1.Mucociliary clearence 2. Sodium Mycophenolate 3.Immunosupression 4. Lung Transplantation 5. Wistar Rats

1.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O transplante de pulmão é a opção terapêutica efetiva em uma variedade de doenças pulmonares terminais, como: enfisema pulmonar, fibrose cística, bronquiolite obliterante, bronquiectasia, entre outras (Chen et al., 2004; Cooper et al., 1991; Kaiser et al., 1991; Studer et al., 2004).

Os problemas decorrentes do transplante pulmonar estão principalmente relacionados ao alto índice de rejeição aguda e consequentemente de infecção (Calhoon et al.,1992; Knoop et al., 2004).

O aparecimento de rejeição aguda, principalmente nas primeiras semanas após o transplante, torna obrigatória a utilização de drogas imunossupressoras, o que facilita o surgimento de infecções; desta forma, buscar o equilíbrio entre imunossupressão e a menor incidência de infecção passou a ser o grande objetivo dos estudos nesta linha de pesquisa (Fishman et al, 1998; Knoop et al, 2004; McGee et al, 1996).

Dentre as substâncias imunossupressoras, o Micofenolato ocupa um lugar efetivo, o que justifica a sua utilização em inúmeros estudos que continuam sendo realizados sobre este fármaco (Trulock et al., 2009; Knoop et al., 2004).

O Micofenolato é um inibidor do ciclo celular, derivado do *Penicillium sp*, e tem reduzido a incidência de rejeição aguda em pacientes transplantados renais e cardíacos, quando comparado a outros imunossupressores como a azatioprina (Knoop et al., 2004; Studer et al., 2004). Este fármaco reduz a produção de células

que expressam o antígeno humano IL-2R, receptores de transferrina, células CD4 e CD8, inibe a proliferação dos Linfócitos T e B, ambos responsáveis pela mitose e estimulação alogênica, além da migração de leucócitos para o local da inflamação ou rejeição (Hausen et al., 1997).

Os agentes imunossupressores, utilizados após o transplante pulmonar são determinantes nas infecções pulmonares, causas comuns de morbidade e mortalidade relacionadas aos pacientes receptores de diferentes tipos de enxerto. Entretanto, infecções pulmonares pós-transplantes podem não estar relacionadas somente à terapia imunossupressora, mas a procedimentos executados durante o procedimento cirúrgico, como a secção brônquica, a anestesia e a ventilação mecânica, entre outros, que podem levar a danos transitórios e permanentes do sistema de transporte mucociliar (Aeba et al., 1993).

O sistema mucociliar é o principal mecanismo de defesa do aparelho respiratório humano, e funciona basicamente pela ação de dois de seus componentes: o muco e os cílios. Este sistema tem se mostrado prejudicado nos pacientes submetidos à transplante pulmonar.

Vários estudos relatam que após o transplante ocorre a diminuição do transporte mucociliar e da freqüência do batimento ciliar, bem como o aumento da rigidez do muco, associado ou não ao uso de drogas imunossupressoras (Newhouse et al., 1987; Read et al., 1991; Rivero et al., 2001; Shankar et al., 1991). Até o momento, pouco se sabe sobre o efeito direto dos agentes imunossupressores sobre o sistema mucociliar.

Assim propõe-se, através deste estudo, dar continuidade a esta importante

linha de pesquisa, visando contribuir para o entendimento da ação de outra droga imunossupressora, o Micofenolato, comumente utilizado por pacientes receptores de enxerto.

2.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do micofenolato de sódio nos mecanismos de defesa do aparelho mucociliar de ratos submetidos à cirurgia de secção e anastomose brônquica esquerda, por meio da avaliação da frequência do batimento ciliar (FBC), da velocidade de transporte mucociliar *in vivo* (VTMC) e *in vitro* (PLT).

3.

REVISÃO DA LITERATURA

3.1 REVISÕES DA LITERATURA

3.1 Transplante pulmonar

3.1.1 Histórico

O primeiro transplante de pulmão data de 1963, e o receptor sobreviveu por um período de 18 dias, evoluindo a óbito devido à insuficiência renal aguda (IRA) e desnutrição grave. Este desfecho confirmou a viabilidade do transplante pulmonar, porém deve- se observar rigorosamente os cuidados em relação à rejeição, infecção e utilização de agentes imunossupressores (Hardy et al., 1963; Ramsay et al., 2009).

Em 1981, houve o primeiro transplante duplo, coração-pulmão, por hipertensão pulmonar, que obteve sucesso. Em 1983, ocorreu o primeiro transplante pulmonar unilateral com sucesso, por fibrose pulmonar idiopática. Finalmente em 1986, o primeiro transplante bilateral por enfisema pulmonar se realizou com resultados satisfatórios (Cooper, 1989).

Nos últimos vinte e cinco anos, o transplante pulmonar tem se tornado uma opção de tratamento para os pacientes com doenças pulmonares terminais, porém as indicações de transplante, a seleção dos receptores, a escolha dos doadores, o manejo pós operatório e as complicações oriundas do procedimento cirúrgico, sempre serão dificuldades encontradas em todos os transplantados (Ramsay et al., 2009).

Este sucesso foi atribuído inicialmente à melhora técnica da equipe cirúrgica na realização do procedimento e ao advento de imunossupressores, como a ciclosporina (Ramsay et al., 2009).

No período compreendido entre 1988 e 1993, o número de transplantes

pulmonares cresceu de 83 para 1089 casos anuais.

O transplante pulmonar unilateral era mais frequente em relação ao bilateral, dado sobre o qual se nota mudança nas estatísticas anuais mais recentes. O Registro da Sociedade Internacional de Transplante Coração-pulmão em adultos tem catalogado cerca de 3.342 transplantes de pulmão-coração, desde de 1984. Aproximadamente 25.950 transplantes pulmonares desde 1989 a 2008, em vários centros ao redor do mundo. Até o ano de 1996, os transplantes unilaterais pulmonares ainda eram a maioria, sendo que a partir desta data houve um aumento dos transplantes pulmonares bilaterais que persiste até os dias de hoje, representando cerca de 70% das cirurgias (Christie et al., 2008).

O Registro da Sociedade Internacional de Transplante catalogou em 2008 cerca de 1.155 transplantes pulmonares e 533 transplantes coração-pulmão em crianças, no período de 1984 a junho de 2007. Fazem parte deste registro vinte e oito centros de referência em transplante pediátrico, a maioria responsável por cerca de quatro a cinco transplantes anuais, com a grande maioria ainda de doadores cadáveres, porém mantendo cerca de 10% de doadores vivos. As principais causas de doenças pulmonares são: fibrose cística, hipertensão pulmonar primária, doença cardíaca congênita, fibrose pulmonar idiopática, entre outras (Aurora et al., 2008).

No Brasil, segundo registro da RBT (Registro Brasileiro de Transplante) em 2009 foram catalogados cinqüenta e nove transplantes pulmonares, desses vinte e dois foram bilaterais, a maior parte realizada no estado de São Paulo.

As doenças pulmonares mais comumente observadas nos candidatos a transplante são em ordem de frequência: doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose

pulmonar idiopática, fibrose cística, deficiência de alfa-1 antitripsina e hipertensão pulmonar idiopática (Christie et al., 2008; Ramsay et al., 2009).

Os resultados do transplante pulmonar podem ser avaliados baseados em diferentes critérios: sobrevida, qualidade de vida, mudanças fisiológicas e custo-benefício. Os casos de sobrevida, que geralmente são os que apresentam os resultados mais diretos, podem ser facilmente acessados através dos registros hospitalares. Porém essa sobrevida não significa qualidade de vida, que deveria ser o principal benefício do transplante pulmonar (Ramsay et al., 2009).

A morbidade e mortalidade associadas ao transplante pulmonar devem ser divididas em dois períodos: o primeiro compreende o primeiro ano após a cirurgia, o qual é um reflexo obrigatório do uso de imunossupressores, com risco de infecções e rejeição aguda; e os meses subsequentes, em que a Síndrome da Bronquiolite Obliterante (SBO) é a maior causa de óbito, seguida pelas infecções (Studer et al., 2004).

A mortalidade e morbidade encontradas no primeiro ano estão relacionados a eventos que ocorreram durante o transplante pulmonar ou do pós operatório recente (trinta dias iniciais), e refletem o uso obrigatório de imunossupressores em altos níveis para evitar a rejeição aguda, a SBO, e as complicações a longo tempo associado à imunossupressão, como o risco de infecção (Studer et al., 2004).

As principais causas de mortalidade no primeiro mês após o transplante são principalmente a falha do enxerto, responsável por 30,5% de mortalidade precoce, que compreende processo de captação do órgão, implantação e reperfusão (Studer et al., 2004). As complicações decorrentes da anastomose brônquica também são

importantes neste momento (Samano et al, 2009), juntamente com o risco de infecção, principalmente causadas por bactérias e Cândida (Snydman, 2001). A rejeição aguda está presente em apenas 4,9 % dos casos de óbito precoce, o que demonstra que não é uma causa importante de mortalidade neste período (Studer et al., 2004).

No primeiro ano pós transplante pulmonar, a principal causa de óbito é a infecção. Nos primeiros seis meses após o transplante, as infecções ainda estão associadas ao procedimento cirúrgico. Depois deste período, as infecções por patógenos adquiridos na comunidade, são mais freqüentes (Studer et al., 2004; Snydman, 2001). A importância das infecções no pós operatório, foi avaliada em um grupo de 239 pulmões transplantados, havendo uma incidência de 542 episódios de infecção no seguimento de seis a setenta e um meses pós- transplante. Este risco foi considerado alto nos primeiros cem dias de seguimento (Trulock, 2009).

Após o primeiro ano, a principal causa de mortalidade é a SOB (Síndrome da Bronquiolite Obliterante), que geralmente está acompanhada por bronquiectasias, podendo alterar os microorganismos presentes na infecção associada, como as bactérias gram negativas, por exemplo: *Pseudomonas,* micobacteria não tuberculosa e o *Aspergillus.* (Studer et al., 2004; Snydman, 2001).

Com o aumento da sobrevida, existe um risco aumentado de desenvolver malignidade associado ao tempo de imunossupressão. Além disso, acrescenta-se a idade e as doenças de base, como: tabagismo, DPOC e fibrose cística. Porém o número de casos de malignidade em transplantados pulmonares ainda é muito baixo (Studer et al., 2004).

3.2. Sistema respiratório e mecanismo de defesa

O sistema respiratório dos mamíferos é formado pelas vias aéreas e pelos pulmões, responsáveis pela condução e troca gasosa.

Como o sistema respiratório esta constantemente exposto, ele necessita de um complexo sistema de proteção: o aparelho mucociliar, responsável pela proteção mecânica, formado pelos cílios, o muco, a interação dos dois, e a manutenção da permeabilidade brônquica e sua inervação; bem como o sistema imunológico, formado por macrófagos e polimorfonucleares neutrófilos (Sibili et al., 1990; Trindade et al., 2007; Zhang et al., 2000).

A via aérea superior e inferior é formada por um epitélio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, entremeado por glândulas submucosas e células caliciformes, responsáveis pela produção de secreção e transporte de substâncias, como o muco (Figura 1). Os cílios são responsáveis pela remoção de partículas ou substâncias potencialmente agressivas (Trindade et al., 2007).

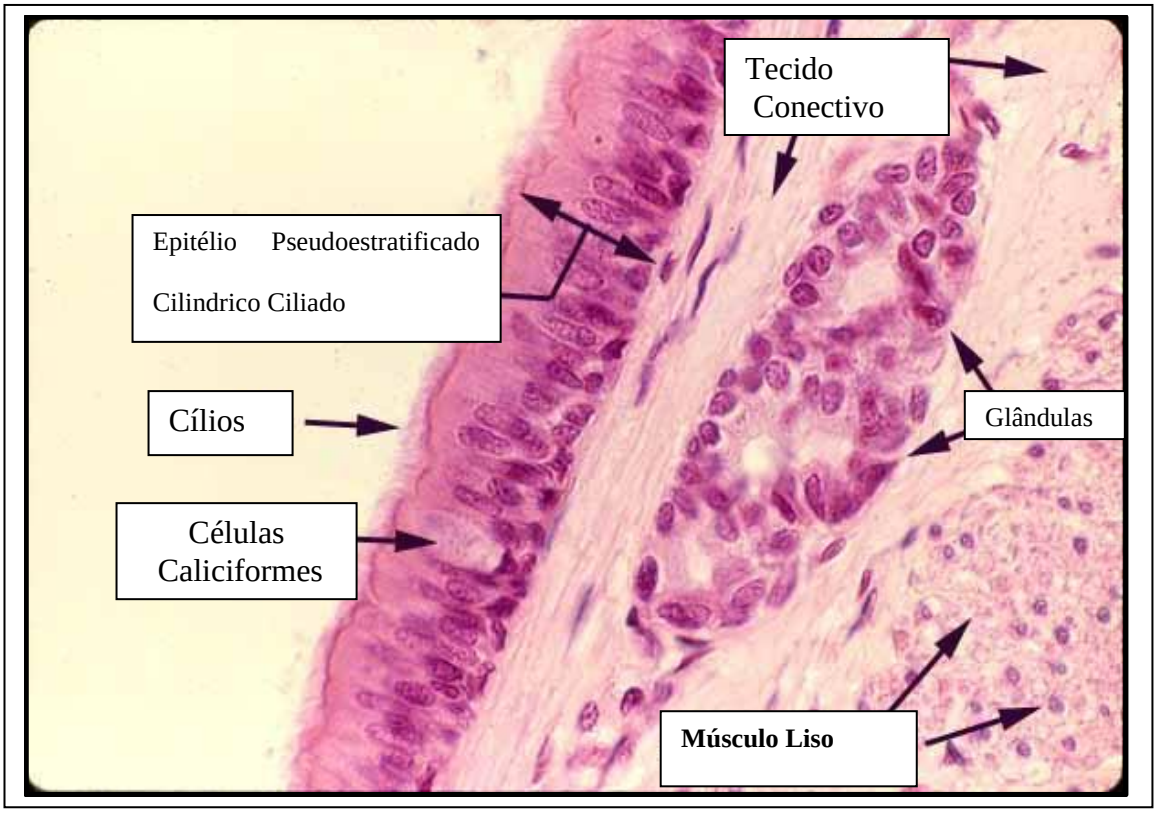


Figura 1. Foto de microscopia óptica do epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado que compõe o aparelho respiratório, entremeado pelas glândulas submucosas e células caliciformes (Histology Study Guide, 2008)

3.2.1. Aparelho Mucociliar

O aparelho mucociliar é formado por células ciliadas, células secretoras, células inflamatórias e muco.

Os cílios das células apresentam dois movimentos, o de propulsão e o de recuperação. O movimento de propulsão desloca partículas no sentido distal-proximal na via aérea, enquanto que o de recuperação funciona no sentido contrário. O número de cílios varia por célula, de cinquenta a cem, dependendo da idade e da localização no trato respiratório. São compostos por um axonema clássico de nove pares de microtúbulos periféricos, denominados de A; e um central, chamado B. A conexão entre eles ocorre por dois braços de dineína e proteínas contráteis. São mediadas pela hidrólise do ATP, a qual promove o deslocamento dos cílios e consequentemente o batimento ciliar (Trindade et al., 2007).

O batimento ciliar apresenta uma sequência coordenada, produzindo uma onda metacrômica, cujo mecanismo de controle permanece desconhecido. A frequência de batimento ciliar normal tem valores entre 10 e 20 Hz (Pazetti et al., 2007; Trindade et al., 2007).

A alteração dos cílios, como ausência de braços de dineína, deleção ou transposição de pares de microtúbulos centrais ou periféricos, produz alteração do padrão do batimento ciliar.

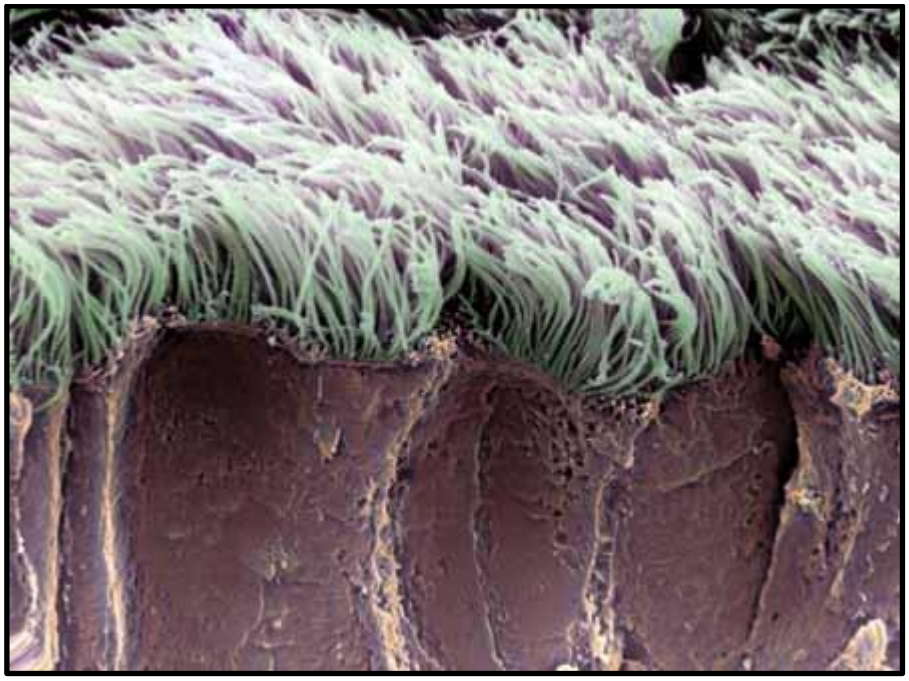


Figura 2. Microscopia eletrônica de células epiteliais e seus cílios em movimento (Fonte disponível em: http://www.cigarro.med.br. Acessado em 12/04/2010)

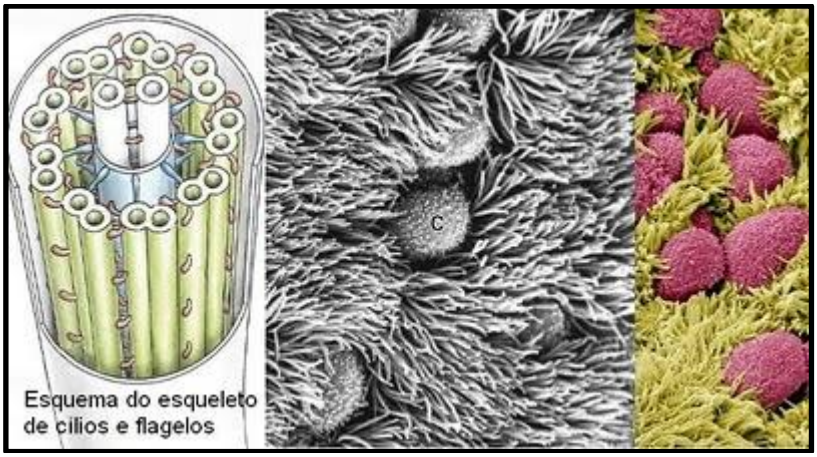


Figura 3. Desenho esquemático e microscopia eletrônica do esqueleto dos cílios (Fonte disponível em: http://www.teliga.net. Acessado em 12/04/2010)

As células secretoras são de três tipos: serosas, mucosas e claras. São compostas por um pequeno núcleo na região basal da célula, sistema golgiense e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidos na região perinuclear, e numerosos grânulos de secreção na sua porção apical.

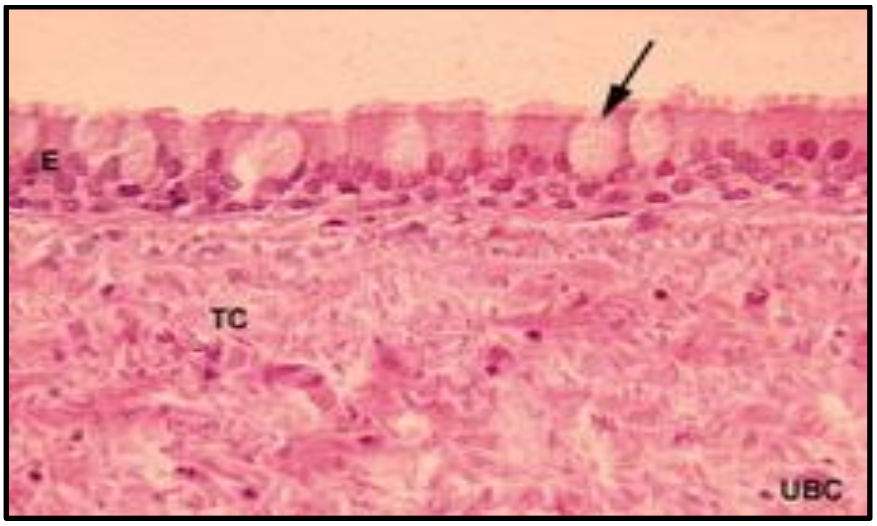


Figura 4. Microscopia óptica do epitélio pseudoestratificado da traquéia. E= epitélio; TC= Tecido celular Subcutâneo; UBC= Tecido traqueal. A seta esta posicionada na célula secretora (Fonte disponível em: http://www.luciana.correa.nom.br. Acessado em 12/04/2010)

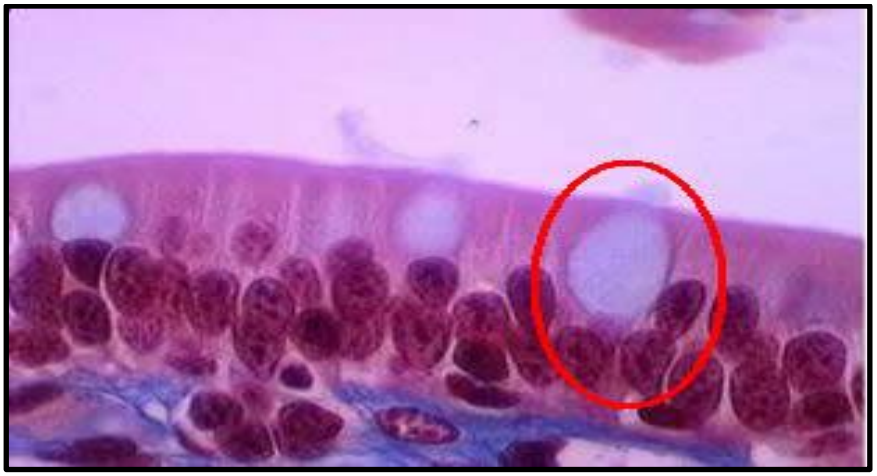


Figura 5. Microscopia óptica do epitélio pseudoestratificado traqueal. Marcada uma célula secretora (Fonte disponível em: http://www.mundoeducacao.com.br. Acessado em 12/04/2010)

As células mucosas produzem diferentes tipos de glicoproteínas e são responsáveis pela parte mais viscosa do muco, enquanto que as células serosas produzem uma secreção mais fluida (Saldiva, 1990). Já as células claras produzem líquido surfactante presente nos brônquiolos e alvéolos. Além da função secretora, suas enzimas oxidativas tomam parte na inativação de substâncias inaladas, e sua finalidade no transporte transepitelial de eletrólitos não é totalmente conhecida (Welsh, 1987).

Presentes no epitélio e na camada submucosa, estão as células inflamatórias, dentre as quais os linfócitos B e T, formando o Sistema BALT (do inglês "Bronchial Associated Lymphoid Tissue"), responsável pela secreção de IgA nos segmentos proximais e IgG nos distais (Saldiva, 1990).

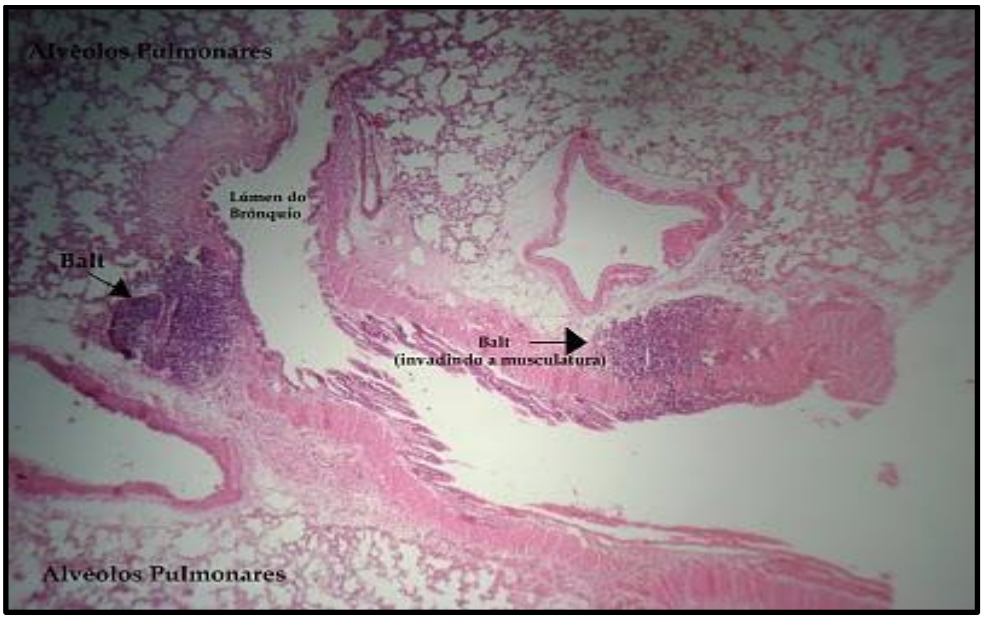


Figura 6. Microscopia óptica mostrando a distribuição do sistema BALT no epitélio e submucosa traqueal (Fonte disponível em: http://histologiaufgd.blogspot.com. Acessado em 12/04/2010)

O muco produzido nas vias aéreas é responsável por lubrificar e umedecer a superfície das vias condutoras, diminuindo a tensão superficial nos bronquíolos e protegendo o epitélio contra agressores exógenos.

É produzido no complexo de Golgi e eliminado pelas vesículas na sua forma condensada que aumenta de volume após sua hidratação. É formado por água (95%), eletrólitos (Na^+, K^+, Mg^{+2}e Ca^{+2}) e substâncias orgânicas (carboidratos, lipídios e proteínas), citocinas, interferons, leucotrienos, histamina, substância P, e bradicinina. As principais proteínas do muco são albumina, lactoferrina, glicoproteínas, lisozimas, principalmente as imunoglobulinas. O arranjo de todas estas substâncias dá ao muco uma característica especial, sua propriedade viscoelástica (Macchione et al., 1998).

Formado por duas camadas: a primeira, chamada de sol, é mais fluida, responsável pelo carregamento das partículas aderidas; enquanto que a camada mais externa é chamada de fase gel, que é mais viscosa. Quando ocorre, por quaisquer motivos, uma alteração na relação entre estas duas camadas, podemos ter prejuízo na função de deslocamento e recuperação de partículas (Pazetti et al., 2007).

A limpeza eficiente da árvore respiratória através do transporte mucociliar depende de uma perfeita interação entre cílios e muco, condicionada à ação coordenada de três atividades celulares básicas: geração de força, função secretora e transporte de água e íons (Trindade et al., 2007; Pazetti et al., 2007, Zayas et al., 2004).

A interação entre o muco e os cílios é responsável pelo batimento ciliar

dividido em duas fases. A primeira é denominada de fase inicial ou de ação, em que o cílio passa pela fase sol com facilidade e posteriormente há uma interação da fase gel com a ponta do cílio, que proporciona o estímulo mecânico para o transporte da camada de muco. A segunda fase é chamada de recuperação, na qual o cílio volta a sua posição original na fase sol, a fim de reiniciar um novo ciclo. O tapete de muco renova-se entre cada vinte e trinta minutos, com velocidade média de 6 mm/min, porém estes valores são muito variáveis mesmo em indivíduos normais (Trindade et al., 2007).

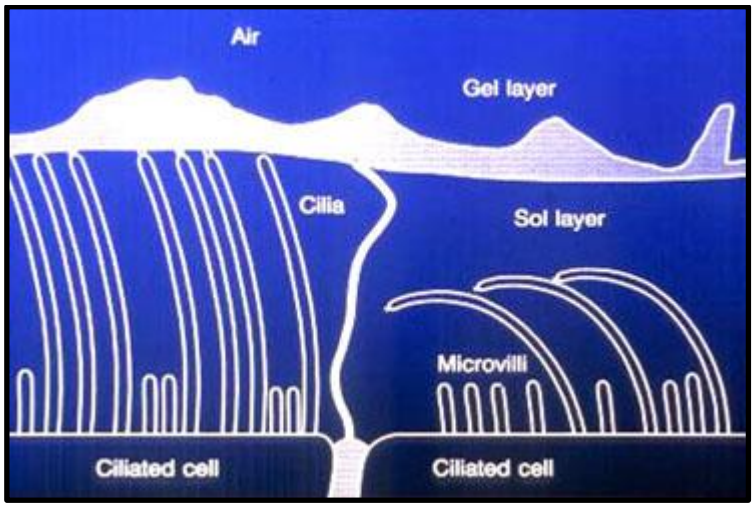


Figura 7. Desenho esquemático do muco em vias aéreas superiores na sua fase sol e gel. Air = vias aéreas; Gel layer = fase gel; Sol layer = fase sol; Cilia = cílios; Microvilli = microvilosidades; Ciliated cell = célula ciliada (Fonte disponível em: http:// www.sistemanervoso.com. Acessado em 04/02/2010)

A secção brônquica é um fator fundamental dentro do processo de transplante pulmonar, pois sua denervação e a perda da sua integridade acometem todo o processo de defesa pulmonar (Studer et al., 2004; Samano et al., 2009).

3.2.2 Resposta Imunológica

Os pulmões são responsáveis por muitas funções, entre elas a troca gasosa, e para isso apresentam uma grande área de superfície epitelial de contato com o ambiente externo. Assim como ocorre na respiração normal, as vias aéreas superiores e inferiores são repetidamente expostas às múltiplas partículas aéreas patogênicas e microorganismos. A partir do momento em que estes agentes são depositados na superfície do trato respiratório, uma série de mecanismos de defesa entra em ação para manter a esterilidade pulmonar (Zhang et al., 2000).

O mecanismo de defesa pulmonar compreende a defesa imunológica inata, inicialmente responsável pela eliminação da bactéria dos alvéolos. Este clearence precoce de bactérias é mediado por dois sistemas de fagocitose: um envolvendo os macrófagos e outro, os leucócitos polimorfonucleares. O recrutamento e a ativação das células inflamatórias no sítio da infecção envolvem uma expressão orquestrada de leucócitos e moléculas de adesão vascular, já bem estabelecido pela diferença no gradiente quimiotático, a via da degeneração das citocinas pro inflamatórias. Desta forma, acredita-se que a manipulação imunológica da imunidade inata pode servir, no futuro, como um importante fator na terapia adjuvante no tratamento dos pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes em infecções pulmonares graves (Sibile and Reynolds, 1990; Zhang et al., 2000).

Os macrófagos são morfologicamente e funcionalmente heterogêneos, e correspondem à maioria dos fagócitos encontrados em vias aéreas inferiores. Estão incluídos neste grupo: os macrófagos alveolares, intersticiais, intravascular e os aéreos propriamente ditos, cada um com uma característica morfofuncional

particular. Além disso, a presença de receptores de superfície para seus numerosos ligantes, quando acoplados, acarreta a liberação de um grande número de substâncias secretadas, quimiotáticas, responsáveis pela atração de macrófagos e de outras células envolvidas no processo inflamatório. Os macrófagos são também responsáveis pela produção e eliminação de substâncias importantes na inflamação, como os radicais livres e enzimas proteolíticas (Sibile and Reynolds, 1990).

A via aérea distal apresenta um pequeno número de polimorfonucleares, enquanto o leito vascular pulmonar apresenta uma reserva bem maior dos mesmos. Alguns estão em contato íntimo com o endotélio, formando a assim denominada piscina de polimorfonuclear neutrófilo. Esta aderência é importante tanto para inibir o mecanismo de resposta inflamatória, como para facilitar a migração destas células para o local da inflamação (Sibile and Reynolds, 1990).

O lavado broncoalveolar normal é formado por 85% de macrófagos, 7 a 12% de linfócitos e apenas 3% de neutrófilos. Agentes infecciosos sejam adquiridos por via inalatória, aspirativa ou hematogênica, alteram os componentes deste lavado (Duncan and Wilkes, 2005). Cultura de células respiratórias *in vitro* provenientes de lavado broncoalveolar em animais, como o macaco e o porco, demonstrou que quando estimuladas com Imunoglobulina G ou com zymosan, ocorre uma produção potente de substâncias quimiotáticas para polimorfonucleares neutrófilos, com início por volta de três a quatro horas após a exposição e pico às seis horas, enquanto a diminuição se dá após vinte e quatro horas do contato (Kazmierowski et al., 1976; Merril et al., 1980).

A contribuição dos fagócitos na defesa das reinfecções pulmonares e tumores

têm sido documentados *in vitro*. Além disso, os radicais livres, em particular os radicais hidroxi e proteases, funcionam como um importante fator bactericida (Sibile and Reynolds, 1990; Zhang et al., 2000).

A rejeição ao enxerto é mediada primariamente pelas células T, enquanto que as células B são responsáveis pela produção de novos anticorpos (Duncan and Wilkes, 2005).

3.3. Terapia Imunossupressora

Durante as duas últimas décadas o transplante pulmonar se tornou o tratamento para os pacientes portadores de doença pulmonar terminal. O sucesso do transplante esta relacionado à funcionalidade e, consequentemente, à qualidade de vida destes pacientes. Infelizmente a médio ou longo prazo estes dados são menos expressivos. Além disso, a sobrevida destes pacientes em cinco anos é de aproximadamente 50% (Knoop et al., 2004; Duncan and Wilkes, 2005). Duas causas principais estão associadas a estes índices, que são: o aparecimento da bronquiolite obliterante, que é uma complicação oriunda de uma imunossupressão inadequada, que se expressa por uma rejeição crônica dos brônquios e brônquiolos; e as infecções. Ambas as complicações ocorrem por imunossupressão inadequada. Desta forma, claramente, há necessidade de aperfeiçoar a estratégia de imunossupressão como um importante fator de bons resultados a médio e longo prazo (Knoop et al., 2004).

A terapia imunossupressora pode ser dividida em três categorias gerais: Indução, manutenção e tratamento da rejeição. A Indução refere-se ao regime de

imunossupressores que é utilizado nos primeiros cinco a sete dias após o transplante. As drogas de manutenção também podem ser administradas logo após o transplante, porém tem se mostrado deletérias para o paciente. O esquema de indução é formado por Ciclosporina, Azatioprina e corticosteróides (Trulock et al., 2009).

A fase de manutenção é algumas vezes postergada para um ou dois dias após a obtenção dos efeitos imunossupressores da fase de indução, devido aos seus efeitos colaterais, como a nefrotoxicidade. Em alguns pacientes, chega-se a diminuir a dose dos corticosteróides; e nos casos mais graves de insuficiência renal aguda, substitui-se a Ciclosporina por Tacrolimus e a Azatioprina por Micofenolato (Trulock et al., 2009).

Independente do tipo de terapia de imunossupressão utilizada, a maioria dos pacientes experimentou ao menos um episódio de rejeição aguda, mais comumente nos primeiros meses após o transplante. A presença de episódios de rejeição aguda esta diretamente relacionada à maior incidência de rejeição crônica nesta população, em alguns momentos com necessidade de aumento da dose das drogas imunossupressoras, algumas vezes substituição e até pulsoterapia com corticóide (Trulock et al., 2009).

A grande maioria dos transplantados pulmonares recebe um regime terapêutico composto por um esquema tríplice de drogas, que incluem um inibidor da calcioneurina, um inibidor do ciclo celular e um esteróide. Em igual proporção recebem Ciclosporina ou Tacrolimus, Micofenolato ou Azatioprina e corticosteróide, principalmente a prednisona (Knoop et al., 2004).

A adição de drogas imunossupressoras, como basiliximab, daclizumab e

sirolimus, afetou adversamente o tratamento, pelo aumento do custo benefício do mesmo (Woodroffe et al., 2005).

3.3.1. Drogas Imunossupressoras

Os regimes de imunossupressão pós-transplante são compostos de três drogas que incluem os esteróides, a Ciclosporina e a Azatioprina**.**

O esteróide é o primeiro medicamento imunossupressor usado na maioria dos casos (Duncan and Wilkes, 2005). O uso deste medicamento na fase precoce pós transplante pulmonar é controverso. Muitas equipes médicas têm adotado o uso de dose moderada de metilprednisolona intravenoso por alguns dias antes de iniciar a dose via oral de prednisona. A administração de esteróide é gradualmente reduzida para minimizar a longo prazo as complicações oriundas do seu uso. São utilizados pulsos de esteróides como forma de tratamento nos casos de rejeição aguda (Knoop et al., 2004).

Os glicocorticóides são agentes seletivos e afetam muitas linhas de multiplicação de leucócitos, incluindo as células B e T, macrófagos, granulócitos e monócitos. São altamente lipofílicos e atravessam rapidamente a membrana celular onde se ligam aos receptores celulares citoplasmáticos e influenciam a transcrição do ativador de proteínas e do fator nuclear β, de maneira positiva ou negativa (Duncan and Wilkes, 2005).

A sua utilização na forma inalatória pode ser benéfica em pacientes com SBO, porém neste momento não há dados que possam determinar este benefício,

sendo necessários novos estudos controlados com utilização de placebo para que se possa estabelecer o impacto deste caminho (Knoop et al., 2004).

A Ciclosporina A é um peptídeo cíclico derivado de um fungo, o *Tolypocladium inflatum*, que adquire a sua forma ativa quando entra em contato com as células e forma complexos com as proteínas citoplasmáticas. Este complexo inibe a calcineurina do citoplasma, inibindo assim a transcrição das citoquinas, nomeadas IL-2, IL-3, IL-4 e IL-5, interferon γ, fator de necrose tumoral α, e fator estimulador colônico de granulócitos e macrófagos. Além disso, apresenta presumivelmente um mecanismo distinto: a expressão de fatores de crescimento fator β, que inibe o braço do estímulo da IL-2 na proliferação celular e produção de linfócitos T citotóxicos, e em outro braço, o efeito pro-fibrogênese do enxerto (Duncan and Wilkes, 2005; Knoop et al., 2004).

A Ciclosporina A é uma molécula lipofílica com variação na absorção de paciente para paciente, com baixa bioavaliabilidade quando administrada por via oral. A sua utilização na forma inalatória necessita de investigação com o objetivo de imunossupressão em pacientes transplantados pulmonares (Knoop et al., 2004).

Tacrolimus é completamente metabolizado no fígado pelo citocromo P450 3A. Vários metabólitos têm sido caracterizados, sendo que suas atividades imunossupressoras ainda não estão completamente elucidadas. Acredita-se que tenha um mecanismo similar ao da Ciclosporina, atuando também na união intracelular das proteínas em linfócitos, inibidores da calcioneurina, levando a desfosforilação e consequente translocação nuclear do componente citoplasmático da transcrição do fator de ativação das células T (Knoop et al., 2004; Hausen et al., 1997).

O maior efeito do Tacrolimus *in vivo* é a inibição da imunidade celular mediada por células. As proliferações primárias e a citotoxidade ao antígeno estão reduzidas. Estudos em humanos têm demonstrado redução significativa na incidência de rejeição aguda, aguda refratária, e episódios de rejeição crônica. Baixas doses de esteróides são necessárias nestes pacientes. A incidência de infecção também é menor. As principais complicações associadas ao seu uso foram: insuficiência renal, distúrbios no metabolismo da glicose e complicações neurológicas. Quando comparado à Ciclosporina, os estudos não têm demonstrado diferença na sobrevida, porém o índice de rejeição aguda é menor no grupo tratado com Tacrolimus, ainda que mantendo similar índice de infecção e alta incidência de diabetes (Fung et al., 1996; Hausen et al., 1997; Reichenspurner et al., 1999; Webster et al., 2005; Woodroffe et al., 2005).

Em transplantados hepáticos, a comparação no uso de Tacrolimus ou Ciclosporina demonstrou que além do que já foi citado acima, não houve diferença estatística entre os dois no que diz respeito à manutenção adequada da função renal e hepática, baixa incidência de malignidade, de doenças linfoproliferativas e infecções graves (Wiesner, 1998).

A Azatioprina inibe tanto a síntese do ácido desoxirribonucléico quanto a do ácido ribonucléico, interferindo nos precursores da síntese da purina, sendo responsável pela supressão da mesma. Ele tem seu efeito na proliferação dos linfócitos T e B, mas não interfere na produção das citoquinas. Tem ação antiinflamatória e secundariamente na proliferação celular, porém sua toxicidade tem limitado seu uso (Knoop et al., 2004).

3.3.1.1. Micofenolato (M)

O Micofenolato é um agente imunossupressor usado em associação com outras drogas de ação semelhante, como a Ciclosporina ou Tacrolimus e corticosteróides. Utilizado com frequência na substituição da azatioprina em pacientes transplantados renais e cardíacos, em transplantados pulmonares seu uso data de 1999, sendo atualmente administrado a cerca de 40% dos mesmos (Knoop, 2004).

O Micofenolato é um ester, 2-morfolinoetil, é uma pré-droga. Derivado inicialmente do *Penicillium sp*, foi cultivado em 1896 e purificado por Alsberg e Black em 1913, tendo sua atividade antifúngica e bactericida reconhecida em 1968 (Gummert et al., 1999; Sievers et al., 1997). Foi administrado inicialmente em sua forma inativa, pré- droga de micofenolato ácido ou ácido micofenólico. Trata-se de um inibidor reversível, seletivo e não competitivo da adenosina monofosfato, enzima relacionada à síntese das purinas, especificamente do nucleotídeo guanina, relacionado à inibição da proliferação dos linfócitos T e B, responsável pelo acionamento, ativação e multiplicação das demais células de defesa do organismo (Sievers et al., 1997).

A adenosina monofosfato é uma enzima catalisadora da biossíntese da guanina, responsável pela produção de linfócitos T e B. Encontrada em duas isoformas, I e II, as quais são constituídas por RNAm e proteínas. O tipo I é encontrado principalmente em células mononucleares no sangue periférico e no timo, enquanto que a tipo II é encontrada também nas células mononucleares e no baço. A produção dos inibidores foi observada cerca de 12 horas após a estimulação mito-

gênica (Gummert et al., 1999; Jain et al., 2004). A adenosina tipo II esta também relacionada à regulação metabólica de células neoplásicas e de diferenciação celular, por isso a sua importância na concepção de medicamentos antitumorais e imunossupressores (Colby et al., 1999).

Existe relato de pacientes resistentes ao uso do Micofenolato explicado pela mutação dos receptores da adenosina de monofosfato. Foram detectados quatro genes familiares alterados associados a este receptor (Hyle et al., 2003).

A administração oral ou endovenosa do Micofenolato mostrou equivalência estatística da concentração plasmática terapêutica em indivíduos normais (Bullingham et al., 1998). A necessidade de monitoramento da concentração plasmática da droga ainda está em discussão, porém alguns estudos já demonstram a importância da concentração no sangue desta droga e o aparecimento de rejeição aguda, infecções severas e nas leucopenias, e no risco de eventos (Oellerich et al., 2000; Rangel et al., 2009; de Winter et al., 2008). Esta droga pode se apresentar na forma de Micofenolato de Mofetil (CellCept®) de 250mg e 500 mg, e Micofenolato de Sódio (Myfortic®) de 360 mg. A eficácia das duas drogas é considerada semelhante, inclusive no que diz respeito à perda de enxerto, sobrevida e rejeição aguda. Porém os pacientes que utilizam o Micofenolato de Mofetil apresentam mais efeitos adversos com necessidade de alteração da dose durante o tratamento (Kobashigawa et al., 2006; Rangel et al., 2009; Shehata et al., 2009; Woodroffe et al., 2005).

O Micofenolato é altamente solúvel em pH baixo, o que torna alta e rápida a sua absorção gastrointestinal, explicando os altos índices de intolerância gastro-

intestinal com episódios de vômitos, diarréia e perda ponderal (Gummert et al., 1999; Shehata et al., 2009).

O figado é o primeiro sítio de degradação do Micofenolato em inibidor da adenosina monofosfato (MPA), que cai no trato biliar e depois é reabsorvido na circulação sanguínea em cerca de 6 a 12 horas, com meia vida de cerca de 20 horas.

Apesar de sua excreção ser praticamente urinária, não é necessário o ajuste da dose da medicação em pacientes que fazem hemodiálise, não se descartando a possível necessidade de ajustes em casos de toxicidade ou eventos adversos (Bullingham et al., 1998).

O Micofenolato é utilizado com muita frequência na prevenção de rejeição aguda nos transplantados renais, quando combinados com Ciclosporina e esteróides. Vários estudos têm demonstrado tratar-se de um agente efetivo no tratamento da rejeição refratária, quando comparado à utilização de Azatioprina, associado à Ciclosporina e esteróide, em transplantados renais, cardíacos e hepáticos, e pode ser efetivo na rejeição crônica (Sievers et al., 1997; Sollinger, 1995).

O Micofenolato esta sendo amplamente utilizado em modelos animais com objetivo de avaliar seus efeitos na inibição de rejeição aguda e crônica. Micofenolato é utilizado associado à Ciclosporina e corticosteróides, substituindo a Azatioprina. Estes estudos têm demonstrado que existe o benefício da utilização do Micofenolato em relação à Azatioprina, ambos administrados nas doses rotineiras (Fulton et al., 1996; Sollinger, 1995).

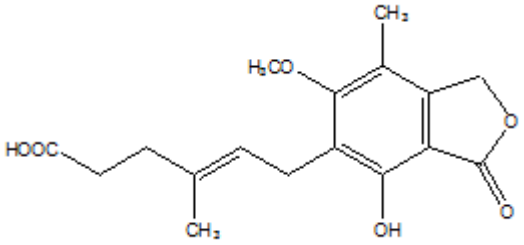


Figura 8. Representação da fórmula estrutural do Micofenolato Ácido

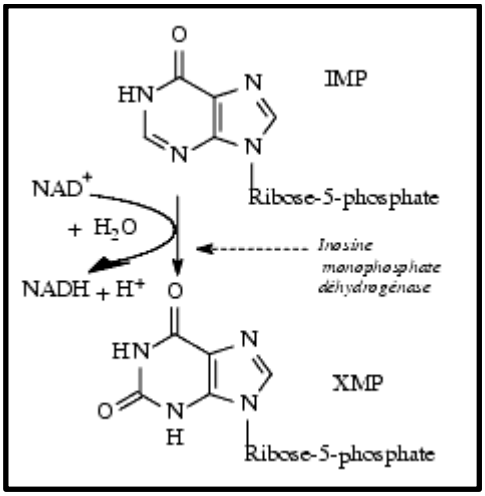


Figura 9. Representação da fórmula estrutural da Adenosina Monofosfato Desidrogenase

A dose de Micofenolato de Sódio recomendada para função imunossupresora é de 720 a 1440 mg por dia para adultos, enquanto a dose pediátrica corresponde a 400 mg por m² duas vezes ao dia, com dose máxima de 1 g por dia.

Em relação ao Micofenolato de Mofetil, a dose imunossupressora é de 1 g duas vezes ao dia em adultos, e de 600 mg por m² duas vezes ao dia em crianças.

A utilização do Micofenolato tem reduzido a incidência de rejeição aguda em

transplantados renais e cardíacos, enquanto a incidência de SBO vem apresentando resultados semelhantes. Vários estudos multicêntricos comparando Micofenolato e Azatioprina em associação com Ciclosporina, corticosteróides, estão em andamento com resultados parciais que confirmam as informações acima citadas (Knoop et al., 2004; Ross et al., 1998; Zuckermann et al., 1999).

Trabalhos mostram que a associação Tacrolimus e Micofenolato diminuem a incidência de rejeição aguda (Gerbase et al., 2001; Woodroffe et al., 2005), enquanto que na rejeição crônica, os resultados têm mantido a ideia de que regimes de imunossupressão incluindo estas duas drogas, são capazes de afetar e alterar a história natural da SBO (Gerbase et al., 2001; Roman et al., 2005).

Em transplantados hepáticos, a comparação entre Micofenolato e Azatioprina, demonstrou que o primeiro apresenta menor índice de rejeição aguda, porém foram equivalentes na prevenção de perda de enxerto, sobrevida e índice de infecção (Wiesner et al., 2001).

3.4. Imunossupressão em Transplante Pulmonar

O transplante pulmonar nas últimas duas décadas tornou- se um tratamento viável para pacientes com doenças pulmonares em estágios finais. O sucesso do transplante resultou na recuperação da função pulmonar e na qualidade de vida destes pacientes. Entretanto, estes pacientes são mais sucetíveis à rejeição e necessitam de imunossupressão precoce, aumentando o risco de infecções associadas ou não ao regime imunossupressor (Hachem, 2009; Knoop et al., 2004; Reichenspurner et al., 1995).

O pulmão é um órgão transplantado que encontra-se exposto ao meio externo e consequentemente ao maior número de agentes causadores de doenças, que associado a um regime de imunossupressão aumenta o risco de infecções graves (Knoop et al., 2004).

A terapêutica imunossupressora é constituída de três drogas: esteróide, Ciclosporina e Azatioprina, as quais têm apresentado bons resultados na prática clínica em relação à rejeição (Hausen et al., 1997; Trulock et al., 2009; Wain et al., 1999).

Segundo a Sociedade Internacional de Transplante Coração-pulmão cerca de 95% dos transplantados recebem esteróide, mais de 95% recebem Ciclosporina e aproximadamente 80% recebem Azatioprina (Knoop et al., 2004).

Nos pacientes que apresentam rejeição aguda, a Azatioprina é substituída pelo Micofenolato, com melhora dos sintomas (Knoop et al., 2004; Duncan and Wilks, 2005; Ross et al., 1998), porém existem poucos trabalhos confirmando estes resultados.

Para o futuro, acredita-se que novos imunossupressores ainda em teste, como o Micofenolato, Sirolimus, Everolimus, FTY720, poderão resolver ou pelo menos minimizar os efeitos adversos e diminuir a ocorrência de infecções associadas aos imunossupressores utilizados atualmente, influenciando na qualidade de vida e sobrevida (Knoop et al., 2004).

4.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Grupos Experimentais:

Foram utilizados sessenta ratos machos da raça Wistar, pesando entre 250 e 300 g no dia de entrada no estudo. Os ratos foram obtidos no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade do Estado de São Paulo, onde receberam água à vontade e ração balanceada *ad libitum*, e foram tratados durante todas as etapas do experimento segundo as normas internacionais vigentes que regem sua utilização na pesquisa científica (Guide, 1996).

Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de secção e anastomose do brônquio principal esquerdo, no laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica da FMUSP. Após a cirurgia, os animais foram designados, por meio de sorteio, para compor dois grupos baseados na administração ou não da droga, Micofenolato ou solução salina (placebo) e em três subgrupos cada, de acordo com o tempo de sacrifício: 7, 15 e 30 dias.

Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais no biotério do mesmo laboratório, sendo pesados e avaliados diariamente até a data do sacrifício.

4.2 Desenho Experimental:

Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grandes grupos após o procedimento cirúrgico de transsecção e anastomose do brônquio fonte esquerdo, conforme a administração da droga imunossupressora, sendo posteriormente subdivididos cada um em três subgrupos conforme o dia do sacrifício (Figura 10).

Os pulmões do lado direito não operados foram considerados os controles.

Grupo 1 (n=30): Animais que foram submetidos à administração de solução salina, sendo sacrificados após 7, 15 ou 30 dias (10 animais em cada tempo).

Grupo 2 (n=30): Animais que foram submetidos à administração de Micofenolato de Sódio, sendo sacrificados após 7, 15 ou 30 dias (10 animais em cada tempo).

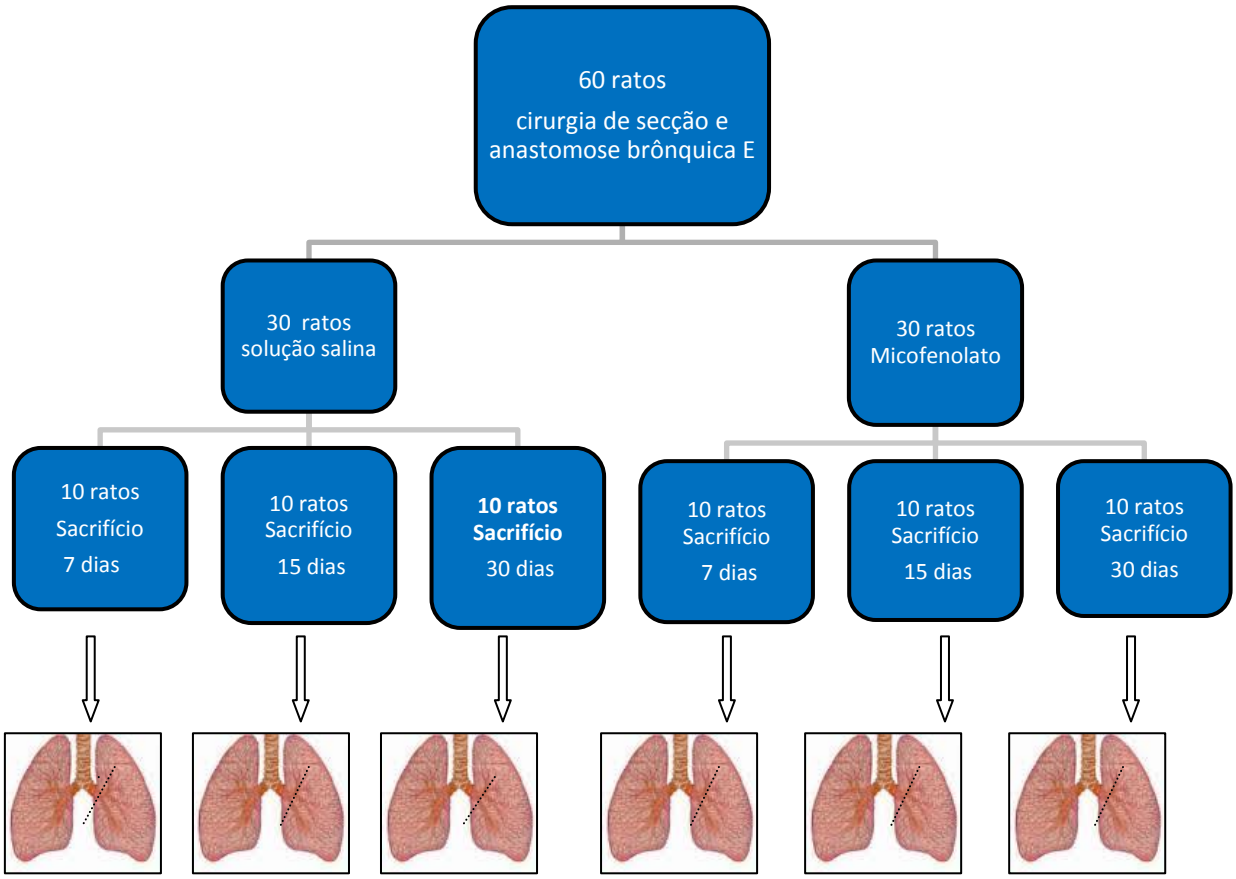


Figura 10- Fluxograma mostrando a composição dos grupos de acordo com o tratamento cirúrgico e a terapia a que foram submetidos

4.3 Secção e Anastomose brônquica esquerda

Os animais foram sedados em câmara contendo anestésico inalatório isoflurano (Isothane, Baxter), e intubados com cateter de polietileno 14-G de 7,0 cm de comprimento. A intubação orotraqueal foi realizada com auxílio de laringoscópio pediátrico com lâmina adaptada para o uso em pequenos animais.

A seguir, o cateter foi conectado a um ventilador mecânico para pequenos animais (Harvard Apparatus, modelo 683), com volume corrente de 10 ml/Kg de peso corporal e frequência de setenta ciclos por minuto.

A anestesia geral inalatória foi mantida com gás isoflurano a 2%, administrado juntamente com gás oxigênio puro, com fluxo de 0,5 l/min.

Com o animal posicionado em decúbito lateral direito, foi feita a assepsia e a tricotomia da região torácica esquerda e abertura da caixa torácica através de toracotomia esquerda de aproximadamente 3,0 cm no quinto espaço intercostal (figura 11).

Figura 11. Animal em decúbito lateral direito pode-se visualizar a porção superior do pulmão esquerdo após a realização da toracotomia esquerda

Estando o pulmão esquerdo visível, o brônquio esquerdo foi isolado da artéria e veia pulmonares através de dissecação e ligado na extremidade proximal, próximo à carina, utilizando-se fio de algodão 2-0.

Em seguida, o brônquio foi seccionado no seu diâmetro total, próximo à ligadura, e a anastomose brônquica realizada com sínteses contínuas, com o uso de fio de polipropileno 8-0, tanto na porção cartilaginosa quanto na membranosa (figura 12).

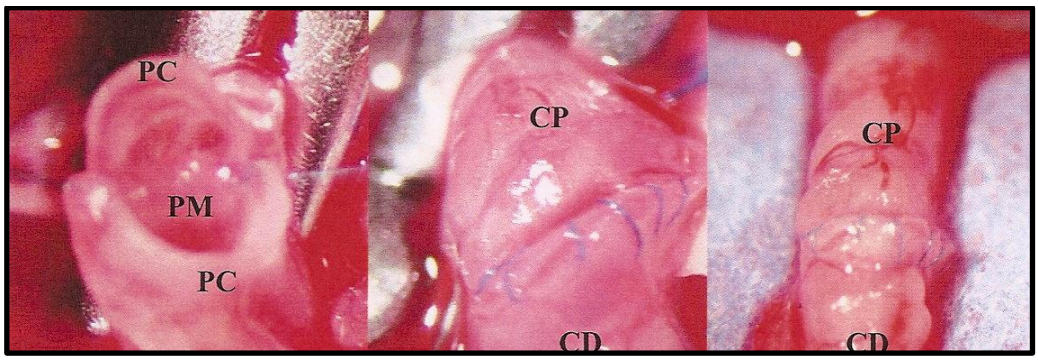


Figura 12. Visibilização da anastomose brônquica esquerda realizada com fio de polipropileno 8-0. Aumento de 8x. CD = Coto Distal; CP = Coto Proximal; PM = Porção Membranosa; PC = Porção Cartilaginosa

Finalizada a anastomose, a ligadura brônquica foi retirada, restabelecendo-se o suprimento de ar para o pulmão esquerdo e a ferida cirúrgica foi submetida à síntese em três planos: intercostal, muscular e cutâneo. A drenagem do tórax foi realizada por meio de um cateter 19-G, mantido até a retirada total das secreções resultantes do ato cirúrgico.

Por fim, o aporte anestésico foi interrompido e o animal mantido sob ventilação mecânica, com administração de oxigênio puro, até apresentar sinais de movimento respiratório espontâneo, sendo, então, retirado o tubo traqueal.

A técnica cirúrgica foi sempre realizada com técnica limpa, não-estéril, e com o auxílio de um estereomicroscópio (ZEISS, mod. Stemi DRC) com aumento de até 16x.

4.4 Administração do Micofenolato

Foi utilizado Micofenolato de sódio (400mg/m²/dia) administrado por via orogástrica duas vezes ao dia, da mesma forma que é realizada na prática clínica.

Os comprimidos de 360 mg de Micofenolato de sódio foram diluídos em 50 ml de solução salina a 0,9% homogeneizada em centrifugador, obtendo-se então 7,2 mg/ml de Micofenolato de Sódio.

Todos os animais foram medidos diariamente e sedados em câmara com gás anestésico (isoflurano) por 2 minutos. Em seguida, os animais foram colocados em posição de intubação e foi introduzida uma sonda de Levine nº 4 por via orogástrica sob visibilização direta na qual foi administrada a droga com seringa de graduação milesimal. Este procedimento foi realizado diariamente até o sacrifício.

Aos animais do grupo 1 foram administrados solução salina 0,9% no mesmo volume da solução do Micofenolato de Sódio para o peso do animal; e aos animais do grupo 2, foram administrados o volume da solução do Micofenolato de Sódio correspondente ao peso do dia.

4.5 Sacrifício

Após o período de estudo, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (THIOPENTAX, 0,5g, CRISTÁLIA) e sacrificados pelo método de exsanguinação, através da secção da artéria aorta abdominal.

4.6 Coleta do Muco

Os ratos, no dia do sacrifício, foram submetidos à toracotomia mediana por esternotomia e os pulmões foram retirados em bloco com dissecção minuciosa de toda a árvore traqueobrônquica sob visão direta do microscópio óptico.

O bloco da peça foi então colocado sobre uma gaze embebida com solução salina de 0,9%. Foi realizada uma pequena incisão na parede cartilaginosa do brônquio esquerdo inicialmente, e posteriormente, no direito, próximo à carina, por onde foi inserido um pincel fino com cerdas macias (pincel tipo tigre nº2) para a coleta de muco. O muco coletado foi imerso em óleo mineral, para prevenir sua desidratação, colocado em tubos tipo eppendorf, contendo a mesma substância, e armazenados em freezer a -70º C até a sua análise da transportabilidade *in vitro*.

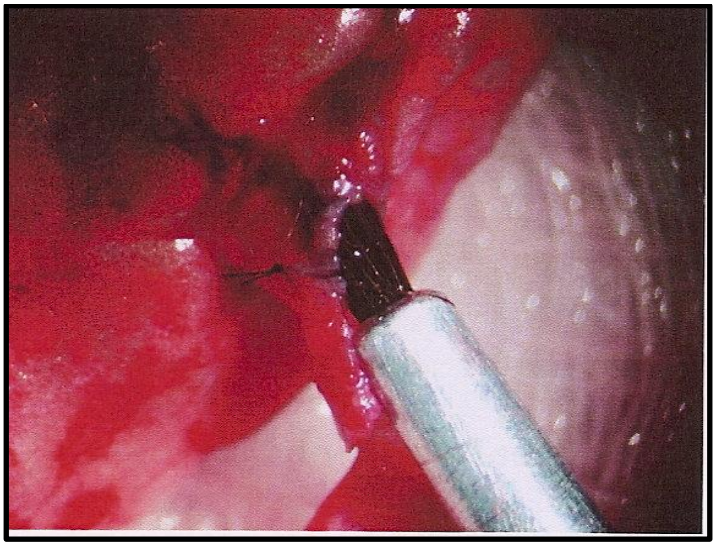


Figura 13. Coleta de amostra de muco do brônquio esquerdo com o auxílio de pincel de pelos finos

4.7 Medidas da Freqüência do Batimento Ciliar (FBC)

O mecanismo de defesa do epitélio traqueobrônquico realizado pela transportabilidade do muco depende das características do muco e do ciclo de batimento mucociliar presente nas células epiteliais. O funcionamento eficiente depende da frequência e da coordenação dos batimentos. A avaliação da função ciliar das células epiteliais é realizada através de: (1) Medidas da frequência do batimento ciliar, conforme técnica aperfeiçoada pelo Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; (2) A avaliação da velocidade do transporte mucociliar *in vivo;* e (3) O transporte do muco no palato de rã, ou seja, a medida da velocidade de transporte mucociliar *in vitro.*

Após o sacrifício, a traqueia do rato é retirada cirurgicamente. Um fragmento da mesma é seccionado e sua mucosa exposta. O movimento do epitélio ciliar é analisado com o auxílio de uma câmera filmadora (Sony, mod. Stemi DRC) acoplada ao microscópio, que capta as imagens do movimento de partículas e do próprio epitélio ciliar e as envia para um monitor (Sony Trinitron). Um estroboscópio (Machine Vision Scrobe, mod. 5000 U.S.A.) colocado em frente ao epitélio ciliar emite “flashes” em determinada frequência. Ao observar o epitélio ciliar batendo na mesma frequência da lâmpada estroboscópica, determinava-se a frequência do batimento ciliar. Todas as medidas foram feitas por um pesquisador que desconhecia o grupo estudado (figura 14).

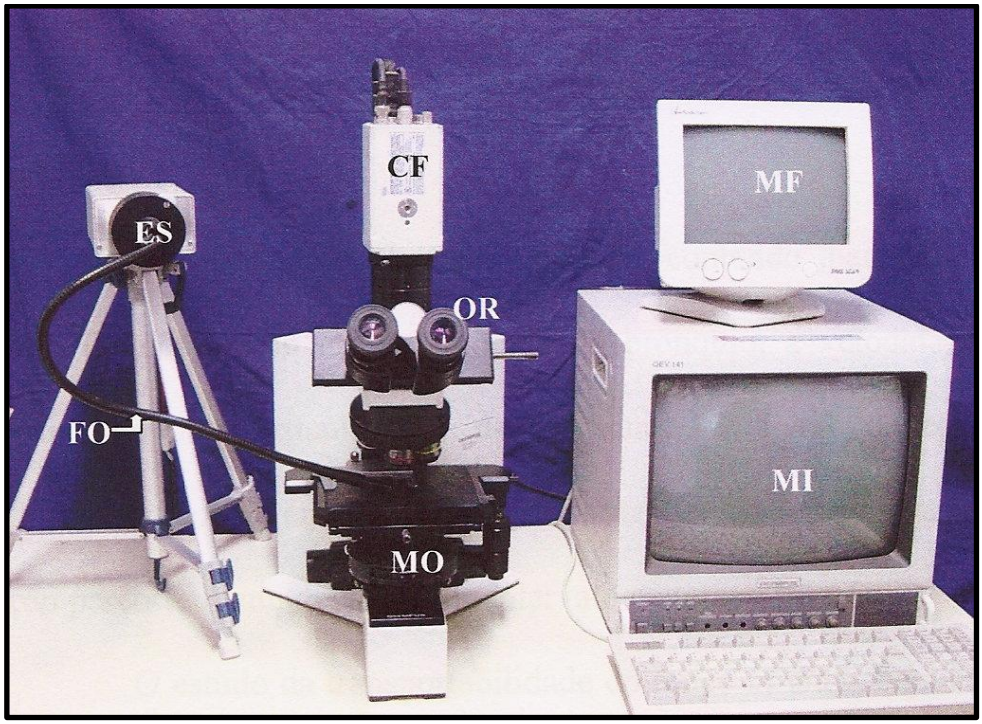


Figura 14. Equipamentos utilizados para medida da freqüência do batimento ciliar e da velocidade de transporte mucociliar. CF = Câmara Filmadora; ES = Estroboscópio; FO= Fibra óptica; MF = Monitor de Freqüência; MI = Monitor de Imagem; MO = Microscópio Óptico; OR= Óptica Reticulada

4.8. Análise da Velocidade de Transporte Mucociliar *in situ* (VTMC)

A Velocidade de Transporte Mucociliar (VTMC) e a Frequência do Batimento Mucociliar (FBC) mostram a capacidade do epitélio de remover partículas. Quanto maior é a velocidade do transporte e a frequência dos batimentos do epitélio, melhor é esta capacidade.

Após o rato ser sacrificado, sua traquéia ser retirada e a mucosa exposta, a árvore traqueobrônquica é preparada para a realização da medida da velocidade. A parede cartilaginosa dos brônquios direito e esquerdo é retirado em forma de "tampa", expondo a parede membranosa.

O bloco da peça preparada é colocado para observação sob um microscópio óptico (Olympus BX50) com aumento de 100 vezes, equipado com objetiva ocular reticulada. Ao microscópio é acoplada uma câmera (Sony 3CCD) conectada ao monitor e ao videocassete.

Na parede membranosa dos brônquios é aplicado aproximadamente um microlitro de solução de carbono coloidal (tinta nanquim filtrada em papel de filtro comum), depositada na extremidade do brônquio; o transporte das partículas coradas pela solução coloidal (nanquin) ao longo dos brônquios direito e esquerdo é cronometrado de acordo com a distância percorrida medida pela objetiva reticulada e expresso como velocidade em milímetros por minuto (mm/min=distância percorrida/tempo).

São obtidas três medidas e transformadas em número absoluto de unidades de minuto. A média destas três medidas é tomada como valor principal para a análise estatística.

4.9. Avaliação das Características do Muco

4.9.1. Transportabilidade no palato de rã (PLT)

As amostras do muco, retiradas após o sacrifício do rato e ressecção cirúrgica da traquéia, foram analisadas em relação ao transporte, através de um preparo *in vitro* com a utilização do palato de rã (*Rana catesbeiana)* (Rubin et al., 1990).

O palato de rã possui um epitélio pseudoestratificado com células secretoras e numerosas células ciliadas, cobertas por uma camada contínua de muco, com 4 a 8 micrômetros de espessura, semelhante ao epitélio das vias respiratórias dos mamíferos. Por apresentar uma superfície plana, o palato de rã permite a observação direta do deslocamento de uma amostra de muco colocada sobre seu epitélio.

A rã é anestesiada através de hipotermia induzida em câmara contendo gelo triturado, e após a verificação de ausência de reflexos, é separada a cabeça da rã do resto do corpo com o uso de uma guilhotina, e então dissecada a parte do palato. O palato é colocado em repouso por 48 horas em câmara fria a 4º C para ter seu muco esgotado pela ação de seu epitélio. O muco da rã é coletado para servir de controle durante as medidas de transporte do muco dos ratos.

Durante as medidas, o palato é mantido em câmara de acrílico com 100% de umidade através de nebulização de solução de Ringer em água destilada (1:1) (73,8 mEq/l Na^+, 2 mEq/ l K^+, 2,3 mEq/ l Ca^{+2} e 78 mEq/ l Cl^-), produzido por um nebulizador ultrassônico (mod. US- 800, ICEL®). É colocado sobre a câmara de acrílico um microscópio estereoscópico em aumento de oito vezes com objetiva reticulada, através da qual é possível visibilizar o deslocamento do muco sobre a

superfície do palato.

Antes de iniciar as medidas, uma pequena alíquota (cerca de 5 micrômetros) da amostra do muco estocada em óleo mineral é isolada e mergulhada rapidamente em um recipiente contendo óleo de petróleo, com o objetivo de remover o óleo a ela aderido. Rubin et al. (1990) demonstraram que este procedimento não altera a transportabilidade e as características reológicas do muco.

É então iniciada a análise com cinco medidas iniciais do tempo de deslocamento do muco de rã sobre o palato (controle), compreendendo um deslocamento de 6 mm. Em seguida o tempo de deslocamento do muco do rato é cronometrado, obtendo-se também cinco medidas. Após a realização das cinco medidas, são obtidas mais cinco medidas finais de muco da rã (controle). Para fins estatísticos são utilizadas as médias aritméticas dos valores obtidos. A Velocidade do Transporte Mucociliar em palato de rã é expressa como velocidade relativa. Assim temos Velocidade = Velocidade média do muco de rato/velocidade média do muco da rã.

A Velocidade é calculada através da razão entre o espaço de 6mm de deslocamento no período de tempo em segundos decorridos durante o seu transporte no palato de rã, observado por uma lente reticulada (Zeiss), posicionada sobre a tampa da câmara de acrílico. (figuras 15 e 16).

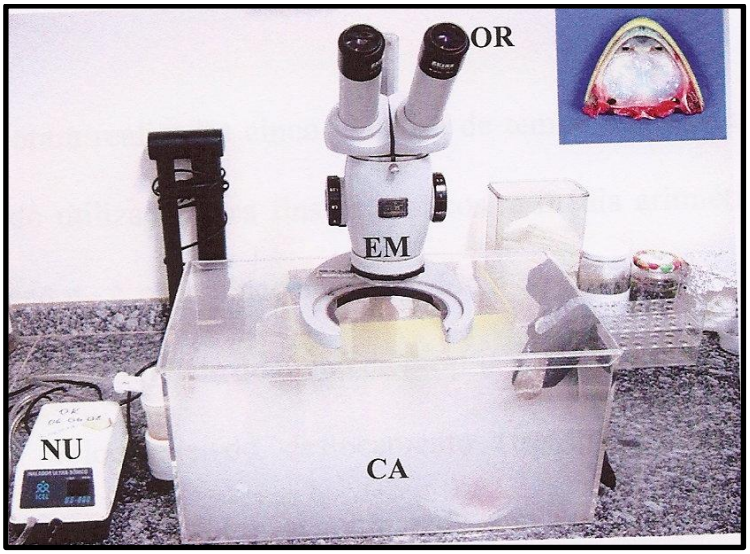


Figura 15. Equipamentos usados para a medida da transportabilidade das amostras de muco em palato de rã. NU = Nebulizador Ultrassônico; CA= Câmara Acrílica; EM = Estereomicroscópio; OR = Ocular Reticulada

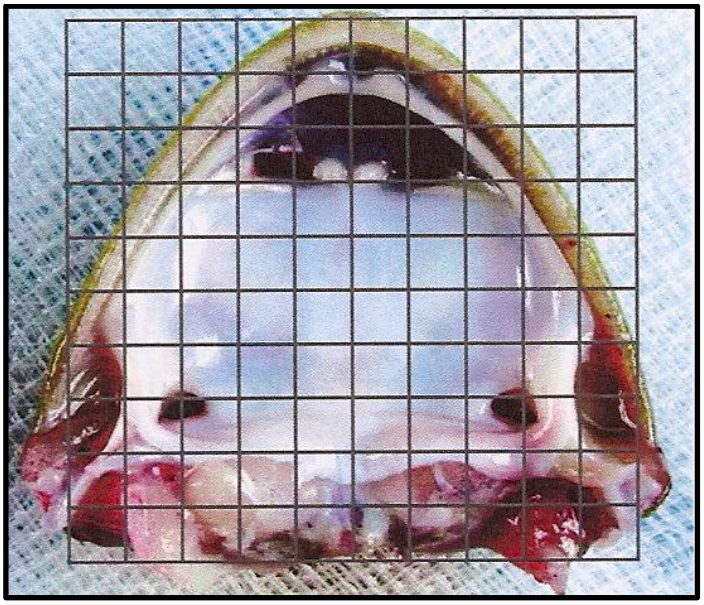


Figura 16. Representação do palato de rã sendo visibilizado através da ocular reticulada

4.10. Análise Estatística

Realizada a análise descritiva das variáveis. Os dois grupos foram avaliados em relação a quatro variáveis: o uso da associação das drogas, o uso do placebo, o procedimento cirúrgico de transecção brônquica esquerda e o lado oposto controle, não operado. Cada uma das variáveis foi analisada em três tempos diferentes conforme o dia do sacrifício: com sete, quinze e trinta dias após o procedimento cirúrgico. As análises descritivas foram realizadas apresentado médias acompanhadas dos respectivos intervalos de confiança de 95% (desvios padrão (±dp)). Recorremos a ANOVA de medidas repetidas mistas. Utilizada análise de variância para verificar se houve diferença entre os grupos e tempos estudados, e, em caso positivo, o teste post hoc de correção de Bonferroni para estabelecer em quais grupos a diferença foi significativa. Nas variáveis não paramétricas foi utilizado o Teste Mann-Whitney comparando dois grupos e Teste de Kruskal-Wallis comparando três grupos. Os pressupostos da distribuição normal em cada grupo e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliados, respectivamente, com o teste de Shapiro-Wilk e com o teste de Levene. Foi considerada uma probabilidade de erro do tipo I (α) de 0,05 em todas as análises inferenciais. As análises estatísticas descritivas e inferenciais foram executadas com o software SPSS versão 13 (SPSS 13.0 for Windows).

5.

RESULTADOS

5. Resultados

Os parâmetros avaliados - FBC, VTMC e PLT - estão representados nas figuras 17 e 18; 19 e 20; e 21, respectivamente.

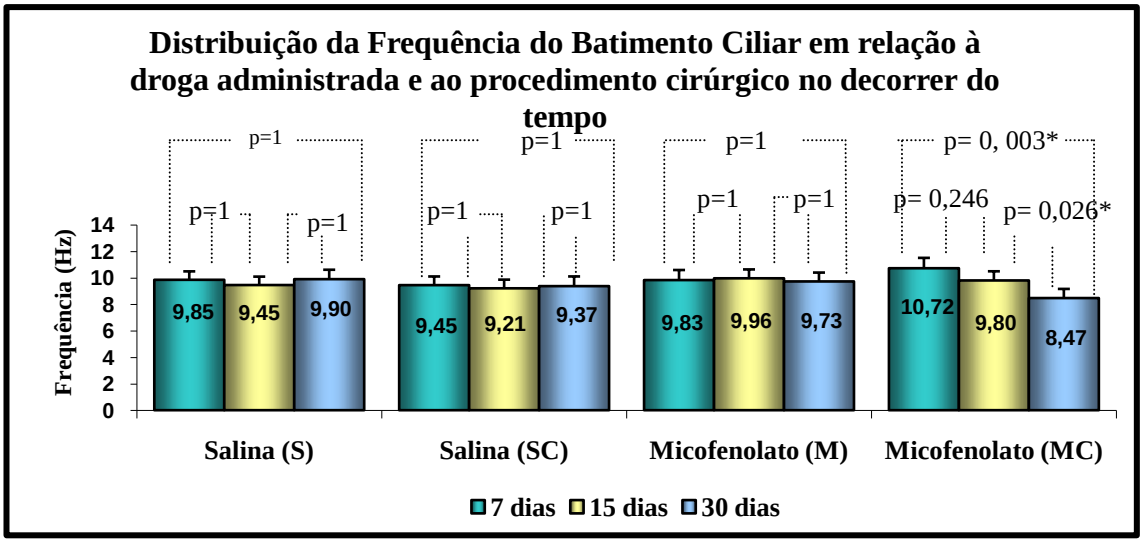


Figura 17. Distribuição da Freqüência do Batimento Ciliar em relação ao tempo, à droga administrada e ao procedimento cirúrgico. Houve diferença estatística significativa no grupo MC no período de 7 e 30 dias (* vs MC 7 d e 30 dias; p= 0,003) e 15 dias e 30 dias (*vs MC 15d e 30 d; p= 0, 026)

No gráfico acima avaliamos a distribuição da frequência de batimento ciliar (FBC) em relação à droga administrada e ao procedimento cirúrgico de acordo com o tempo de sacrifício. Observamos que o grupo que recebeu micofenolato e foi submetido à secção e anastomose brônquica, apresenta diferença estatística ao compararmos o dia de sacrifício sete e trinta (p= 0, 003) e quinze e trinta dias (p= 0, 026), isto significa que a FBC diminui em relação ao tempo no grupo que recebeu a droga e foi operado, demonstrando o efeito deletério da droga associado à operação.

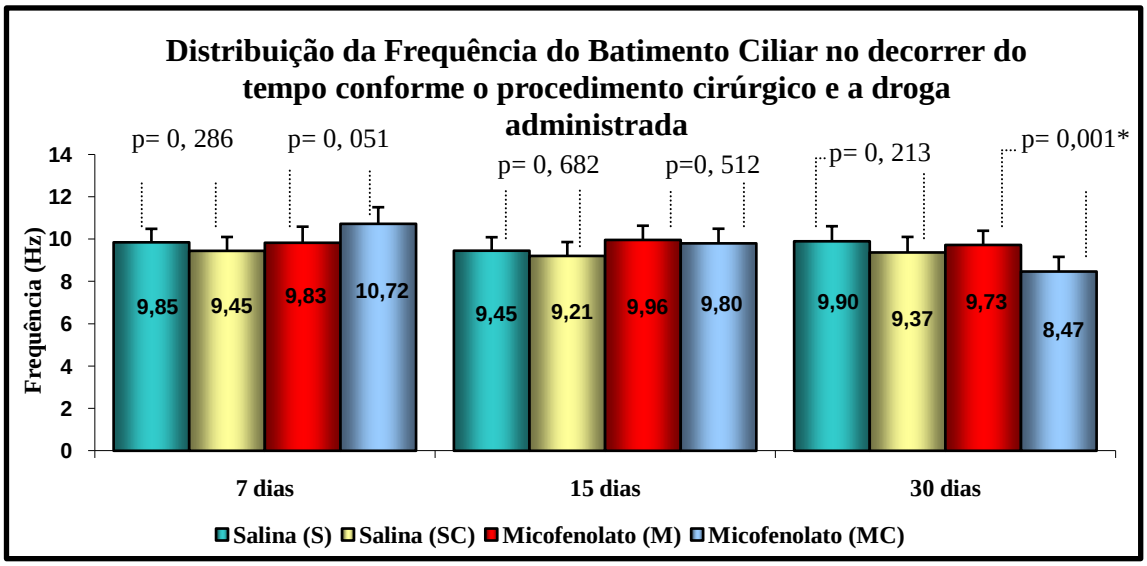


Figura 18. Distribuição da Freqüência do Batimento Ciliar em relação ao tempo, à droga administrada e ao procedimento cirúrgico. Houve diferença estatística significativa no grupo M e MC no período 30 dias (*vs M e MC 30 dias; p = 0, 001)

No gráfico acima observamos outra forma de distribuição da FBC, onde as variáveis se distribuem conforme o tempo de sacrifício. A diferença estatística nesta figura é observada no período de trinta dias entre o grupo micofenolato (M) e o grupo micofenolato submetido ao procedimento cirúrgico (MC) com p = 0, 001. Isto significa que no período de trinta dias a FBC é menor no grupo que recebeu a droga e foi submetido à secção e anastomose brônquica, ratificando o efeito nocivo da associação destes dois fatores.

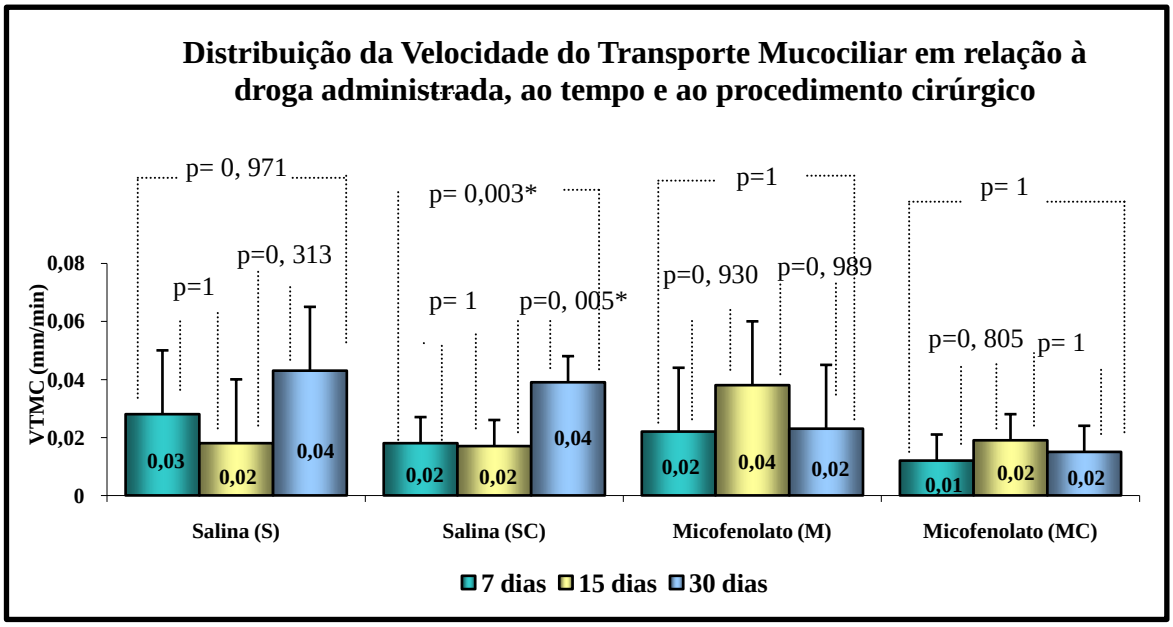


Figura 19. Distribuição da Freqüência da Velocidade do Transporte Mucociliar em relação ao tempo, à droga administrada e ao procedimento cirúrgico. Houve diferença estatística no grupo SC, que aumentou a VTMC no período 7 dias e 30 dias(*vs SC 7 e 30 dias; p= 0, 003) e 15 e 30 dias (*vs SC 15 e 30 dias; p= 0, 005)

No gráfico acima é feita a distribuição da Velocidade de Transporte Mucociliar *in situ* (VTMC) de acordo com a droga administrada e o procedimento cirúrgico conforme a data de sacrifício. Observamos diferença estatística no grupo que recebeu solução salina e foi submetido à secção e anastomose brônquica esquerda, no período entre sete e trinta dias (p= 0, 003) e quinze e trinta dias (p= 0, 005), o que demonstra que neste grupo o procedimento cirúrgico tem um efeito prejudicial inicial sobre a VTMC, e que há uma recuperação com o passar do tempo.

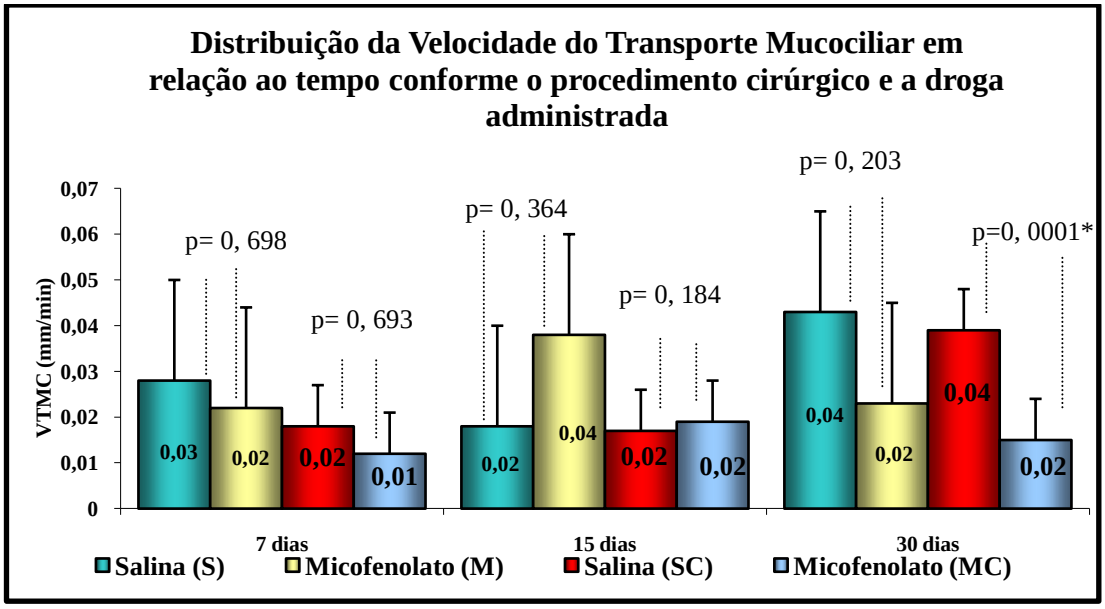


Figura 20. Distribuição da Freqüência da Velocidade do Transporte Mucociliar em relação ao tempo, à droga administrada e ao procedimento cirúrgico. Houve diferença estatística no período 30 dias, com aumento da VTMC no grupo SC em relação ao MC (*vs SC e MC em 30 dias; p=0, 0001)

No gráfico acima é feita a distribuição da Velocidade de Transporte Mucociliar *in situ* (VTMC) de acordo com a droga administrada e o procedimento cirúrgico conforme a data de sacrifício. Observamos diferença estatística no grupo que recebeu solução salina e foi submetido à secção e anastomose brônquica esquerda (SC) com o grupo que foi operado e recebeu micofenolato (MC), no período de trinta dias (p=0, 0001), o que demonstra que nestes grupos o procedimento cirúrgico tem um efeito prejudicial inicial sobre a VTMC, e que há uma recuperação com o passar do tempo. O mesmo não ocorre com o grupo que recebeu o imunossupressor, Micofenolato.

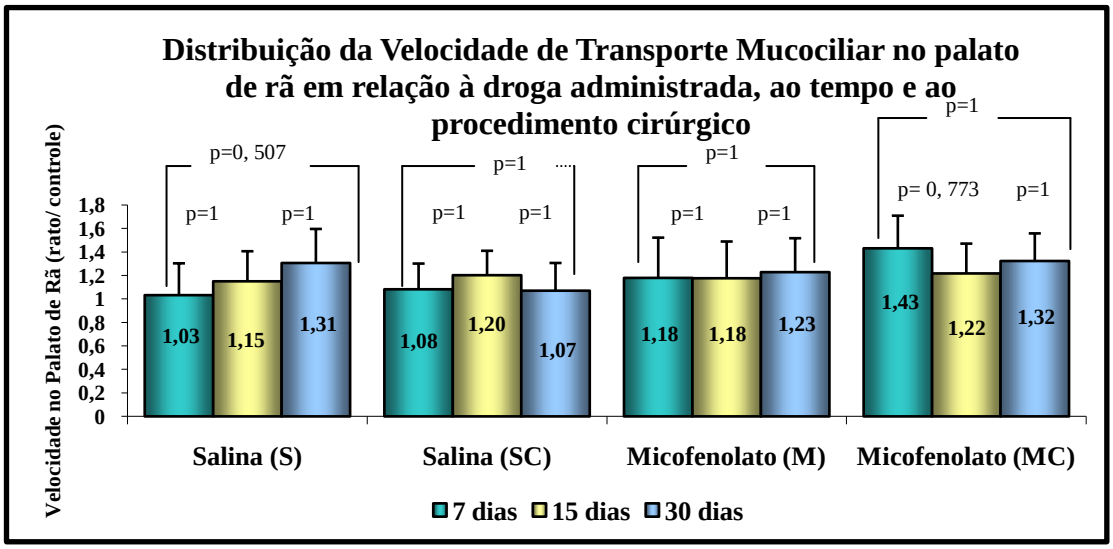


Figura 21. Distribuição da Velocidade de Transporte do Muco no palato de rã em relação ao tempo, à droga administrada e ao procedimento cirúrgico. Não houve diferença estatística nesta amostra

Neste gráfico é feita a avaliação da Velocidade de Transporte do Muco no palato de rã (PLT) conforme a droga administrada, o procedimento cirúrgico e o tempo de sacrifício. Desta maneira pode – se observar que não existem diferenças estatísticas entre os grupos estudados, ou seja, não há diferença entre os grupos no que diz respeito às características do muco.

Os valores individuais da Frequência do Batimento Ciliar, registradas no brônquio fonte direito e esquerdo dos animais de cada grupo, encontram-se nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Os valores individuais da Velocidade de Transporte Mucociliar *in situ*, registradas no brônquio fonte direito e esquerdo dos animais de cada grupo, encontram-se nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Os valores individuais da Velocidade de Transporte do Muco no palato de rã, registradas no brônquio fonte direito e esquerdo dos animais de cada grupo, encontram-se nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

6.

DISCUSSÃO

6. Discussão

O transplante pulmonar representa atualmente uma forma consolidada de tratamento para diversas doenças pulmonares em estágio avançado, representando para este grupo de pacientes não só uma melhora substancial na qualidade de vida como também ganho em tempo de sobrevida (Studen et al; 2004).

A principal dificuldade no manejo destes pacientes pós- transplante esta relacionado com o equilíbrio entre rejeição e infecção. O pulmão transplantado faz parte do sistema respiratório que esta constantemente exposto, e por isso ele necessita de um sistema de proteção complexo: o aparelho mucociliar, responsável pela proteção mecânica, formado pelos cílios, o muco, a interação dos dois, e a manutenção da permeabilidade brônquica e sua inervação; e o sistema imunológico inato, formado por macrófagos e polimorfonucleares neutrófilos (Sibili and Reynolds, 1990; Trindade et al., 2007; Zhang et al., 2000).

O sistema imunológico inato ainda é um mundo obscuro, com muita deficiência de conhecimento e que necessita de muitos estudos no futuro para melhor entendimento. O sistema mucociliar, com função de depuração, é um importante mecanismo de defesa através do qual as células ciliadas empurram o muco produzido pelas glândulas mistas e células caliciformes deslocando-o ao longo da superfície epitelial das vias aéreas em direção à faringe carregando consigo substâncias aderidas. Fragmentos celulares, agentes infecciosos, partículas tóxicas inaladas e depositadas no muco são, desta forma, eliminadas do aparelho respiratório (Trindade et al., 2007).

Vários fatores isoladamente ou em conjunto podem atuar e alterar estes mecanismos de defesa, como: fatores decorrentes do procedimento cirúrgico de transplante pulmonar, doenças que alteram a funcionalidade dos cílios, alteração da consistência e conteúdo do muco, processos imunossupressores. Desta forma, há a necessidade de conhecimento a respeito de novas técnicas operatórias ou o uso de uma droga específica imunossupressora, que alterem pouco a depuração mucociliar e que possam levar a uma terapia mais adequada, com menos prejuízos.

Por isso, dentro de uma linha de pesquisa já bem definida dentro do Laboratório de Cirurgia Torácica da USP, optamos por estudar a influência do Micofenolato de sódio na depuração mucociliar. O Micofenolato de sódio foi a droga escolhida para este estudo por se tratar de uma droga de utilização recente em pacientes transplantados com bons efeitos terapêuticos e poucos efeitos colaterais, quando comparados à administração da Azatioprina, principalmente em relação às rejeições agudas (Ross et al., 1998; Wiesner et al., 2001).

O aparelho de depuração mucociliar é diferente em várias espécies de animais e nas diferentes localizações do trato respiratório, comprovado através do estudo de Saano (1994) que desenvolveu um trabalho baseado na avaliação da frequência de batimento ciliar. Dentro deste estudo foram avaliadas vacas, cães, porcos, porquinhos da índia, coelhos e ratos. Seis regiões do trato respiratório foram analisadas: trato respiratório inferior (porção medial da traquéia), nasofaringe, parte alta da traquéia (1º e 2º cartilagens), parte baixa da traquéia, brônquio principal e brônquio segmentar. A traquéia obtida após o sacrifício dos animais era submersa em solução de ringer lactato por um período de uma hora e trinta minutos no caso de vaca, cão e

porco; e por um período de trinta minutos para o porquinho da índia, coelho e ratos. A peça posteriormente era colocada em uma caixa nebulizada em uma temperatura de 37º C. Utilizou- se microscópio óptico acoplado a um tubo com fotodetector, que converteu as mudanças na intensidade de luz (causada pelo movimento ciliar) em sinal elétrico, que eram classificados em alta atividade ou baixa atividade.

Nesta tese foram utilizados apenas ratos Wistar, o fragmento de traquéia estudado foi o brônquio fonte esquerdo, acima do local da anastomose, ou o brônquio fonte direito, lado não operado; e a avaliação foi imediatamente realizada após o sacrifício do animal, utilizando- se um microscópio acoplado a um estroboscópio e um computador que emite “flashes” que coincidem com o observado na amostra.

Saano (1994) observou que não havia diferença estatística na frequência de batimento ciliar entre a vaca, o cão e o porco em quaisquer segmentos de traquéia estudados, os quais apresentavam uma FBC de 11,3 – 16,9 Hz. Verificou que a maior frequência de batimento ciliar foi encontrada no segmento superior do trato respiratório, exceção aos porquinhos da índia, que apresentam valores elevados em todos os segmentos. Os menores valores da FBC foram encontrados nos ratos, especialmente no brônquio segmentar (6,8 Hz). Os valores de FBC encontrados por Saano em seu estudo em ratos foi de 12,7 ± 1,1 Hz no trato respiratório inferior, nasofaringe 15,0 ± 1,9 Hz, traquéia superior 10,5 ± 0,6 Hz, traquéia inferior 12,5 ± 1,9 Hz, brônquio principal 10,5 ± 2,9 Hz e brônquio segmentar 6,8 ± 1,1 Hz. Em nosso estudo encontramos valores semelhantes, a FBC média do brônquio fonte direito (controle) foi 9,6 Hz e o esquerdo (operado) foi de 9,7 Hz.

Outra forma de avaliarmos a função do aparelho mucociliar é após

procedimento cirúrgico sobre o trato respiratório. Podemos observar diferenças importantes na depuração mucociliar, após o transplante de pulmão, pois os suprimentos nervosos e circulatórios brônquicos são completamente interrompidos e posteriormente reconectados, podendo assim, causar distúrbios no sistema mucociliar (Gade et al., 2001; Paul et al., 1989). Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos objetivando avaliar os efeitos do procedimento cirúrgico sobre o aparelho mucociliar.

Rivero et al (2001) avaliaram os efeitos da transecção brônquica e reanastomose no aparelho mucociliar de ratos. Este estudo foi realizado em duas etapas. A primeira etapa consistiu em dividir 48 ratos machos Wistar em dois grupos, um que não foi operado (intacto), formado por oito ratos e os quarenta restantes foram submetidos à secção e reanastomose brônquica à esquerda. Este grupo foi numa segunda etapa, subdividido em cinco grupos de oito ratos de acordo com o tempo de sacrifício, em um, dois, sete, quinze e trinta dias.

No estudo de Rivero et al (2001) foram avaliados a velocidade de transporte mucociliar *in vivo* (VTMC), o transporte mucociliar *in vitro* (no palato de rã) e o ângulo de contato do muco. O método de estudo em relação à obtenção e preparo do material para a avaliação dos fatores acima citados é semelhante ao utilizado nesta tese; porém Rivero et al avaliaram estas variáveis no aparelho mucociliar proximal e distal à anastomose, lado direito não operado e o lado esquerdo, submetido ao procedimento cirúrgico.

No grupo de ratos intactos não houve diferença estatística entre os lados, direito e esquerdo em relação à VTMC, ou PLT, semelhante ao encontrado nesta tese no grupo de ratos que recebeu apenas solução salina (S). No grupo submetido à

secção e anastomose brônquica esquerda, Rivero et al. (2001) notaram uma redução importante da VTMC quando comparado o lado direito, não operado, com o lado esquerdo, submetido à operação, em todos os subgrupos estudados ($p < 0,0001$) sem recuperação do mesmo no final do trabalho. Nesta tese observamos que o grupo que foi submetido ao procedimento cirúrgico e recebeu solução salina, apresentou uma diminuição inicial da VTMC que se recuperou no final dos trinta dias após a cirurgia (entre 7 e 30 dias $p = 0, 003$; e entre 15 e 30 dias $p = 0,005$).

Rivero et al. (2001) avaliaram a velocidade de transporte mucociliar *in vitro* (PLT) e o ângulo de contato nos grupos operados apenas no 7º dia de sacrifício e não observaram diferença estatística entre eles. Nesta tese, avaliamos a velocidade de transporte PLT nos quatro grupos estudados: o grupo que recebeu apenas solução salina (S), o grupo submetido à secção e anastomose brônquica e que recebeu solução salina (SC), o grupo que recebeu Micofenolato de sódio (M) e o grupo que foi submetido ao procedimento cirúrgico de secção e anastomose brônquica que recebeu Micofenolato de sódio (MC) e assim como Rivero et al (2001) não observamos diferença estatística entre os grupos.

Ainda dentro de estudos que avaliam apenas o procedimento cirúrgico e sua implicação dentro do aparelho mucociliar, citamos Marelli et al. (1991) que também constataram que há uma recuperação da função mucociliar após o transplante pulmonar, o que pode ser atribuída à revascularização local.

Marelli et al. (1991) submeteram cinco cães a lobectomia superior esquerda e outros cinco cães foram submetidos ao autotransplante pulmonar à esquerda e após três semanas foi realizada uma avaliação comparativa do transporte mucociliar

através de broncoscopia e análise do deslocamento de partículas marcadas com carbono em diferentes localizações na traquéia. Os cães submetidos ao autotransplante apresentavam uma redução considerável do clearance bronquial e uma rigidez do muco (p = 0, 005). Estas alterações podem estar justamente relacionadas com a interrupção nervosa e circulatória brônquica do pós - operatório.

Estas mesmas alterações foram encontradas neste trabalho. Observamos que a VTMC no grupo que recebeu solução salina apresentou valores baixos no período inicial de 7 dias de após o procedimento cirúrgico, mas que se recuperou ao final de 30 dias de acompanhamento.

Brody et al. (1972) também observaram que o transporte mucociliar retorna a valores normais em cães submetidos a denervação do pulmão esquerdo devido a secção e anastomose do brônquio fonte esquerdo já na primeira semana de pós–operatório. O controle foi realizado em animais não operados e no pulmão direito (não operado). No quinto dia de pós - operatório já observaram uma recuperação no clearance de partículas do aparelho mucociliar, porém mantendo sempre valores abaixo dos observados em cães não operados e próximos aos valores encontrados no pulmão direito. Estes achados podem ser ocasionados pela obstrução local no sítio da anastomose, pela alteração dos componentes do aparelho mucociliar nesta região, ou pela diminuição do número de glândulas secretoras da mucosa e submucosa encontrada nesses cães.

Quando analisamos o aparelho mucociliar após procedimento cirúrgico ou não e administração de drogas ou não, podemos observar novos valores de depuração mucociliar e consequentemente novas possibilidades e explicações de tratamentos

para pacientes transplantados e imunossuprimidos. Dentro deste tipo de estudo, podemos destacar o realizado por Pazetti et al. (2008) que estudaram os efeitos da Ciclosporina A associado a secção e anastomose brônquica esquerda no aparelho mucociliar em ratos.

Pazetti et al (2008) utilizaram setenta e dois ratos machos Wistar, pesando cerca de 300 gramas, divididos em cinco grupos. O primeiro grupo formado por oito ratos não operados (intactos) sacrificados após 90 dias de acompanhamento; dezesseis ratos que foram submetidos à toracotomia esquerda e receberam solução salina, sacrificados após 30 e 60 dias; dezesseis ratos que foram submetidos à toracotomia esquerda e que receberam Ciclosporina, sacrificados após 30 e 60 dias; dezesseis ratos submetidos ao procedimento cirúrgico de toracotomia esquerda, secção e anastomose brônquica esquerda, que receberam solução salina e foram sacrificados em 30 e 90 dias de acompanhamento; dezesseis ratos submetidos ao procedimento de toracotomia esquerda, secção e anastomose brônquica esquerda receberam Ciclosporina e foram sacrificados em 30 e 90 dias. Foram avaliados em relação a frequência de batimento ciliar (FBC), velocidade de transporte mucociliar *in vivo* (VTMC), transporte mucociliar *in vitro* (PLT), com metodologia e preparo de material semelhante ao realizado nesta tese.

Pazetti et al. (2008) observaram que a Ciclosporina diminui a frequência do batimento ciliar em todos os grupos estudados. No grupo submetido apenas ao procedimento de toracotomia esquerda houve redução da FBC no período de 30 e 90 dias ($p < 0, 001$); e no grupo submetido à secção e anastomose brônquica esquerda no período de 30 e 90 dias ($p < 0, 001$ e $p = 0, 005$, respectivamente) quando

comparado aos grupos que receberam solução salina.

Nesta tese observamos que a administração isolada do Micofenolato de sódio não alterou de forma significativa a FBC, porém quando associado ao procedimento cirúrgico de secção e anastomose brônquica esquerda houve uma diminuição da FBC no período de 30 dias (p = 0, 0001). No grupo operado e que recebeu o Micofenolato (MC) observou- se uma diminuição da FBC no período de sete e trinta dias (p = 0, 003), o que confirma a ação nociva da droga Micofenolato associado ao procedimento cirúrgico.

Em relação à velocidade de transporte *in vivo* (VTMC), Pazetti et al. (2008) apresentaram diferença estatística no grupo submetido somente `a toracotomia esquerda que recebeu solução salina, pois este grupo apresentou uma melhora da VTMC no período de 30 a 90 dias (p < 0, 001), demonstrando uma recuperação do aparelho mucociliar provocado pelo procedimento cirúrgico, o mesmo observado no grupo desta tese que foi submetido ao procedimento cirúrgico e recebeu solução salina no período entre 7 e 30 dias (p = 0, 003) e 15 e 30 dias (p = 0, 005), ou seja houve uma recuperação do aparelho mucociliar de ratos submetidos ao procedimento cirúrgico e que receberam solução salina.

Pazetti et al. (2008) observaram que no grupo submetido apenas à toracotomia esquerda e que recebeu Ciclosporina não houve diferença estatística em relação a VTMC no período de 30 e 90 dias, o mesmo foi observado no grupo que recebeu Ciclosporina e foi submetido à secção e anastomose brônquica esquerda neste mesmo período. Apresentamos resultados semelhantes nesta tese, onde o grupo

que recebeu o Micofenolato (M) e o grupo submetido ao procedimento cirúrgico e que recebeu Micofenolato (MC) não apresentou diferença estatística entre si, no período de 7, 15 e 30 dias, o que pode corresponder a um efeito protetor inicial do imunossupressor.

Não foi observada diferença estatística nos grupos em relação à análise da velocidade de transporte mucociliar *in vitro* no estudo de Pazetti et al. (2008); o mesmo resultado foi observado nesta tese. Pode- se então entender que o procedimento cirúrgico ou a ação de imunossupressor não altera as características do muco.

Podemos citar outros trabalhos associando procedimento cirúrgico e uso de drogas imunossupressoras como o caso de Pêgo- Fernandes et al. (2005) que realizaram um estudo para avaliar os efeitos da Azatioprina e da transecção brônquica esquerda no aparelho mucociliar de ratos. Utilizou 36 ratos machos Wistar, de peso médio de 300 g, todos os ratos foram submetidos ao procedimento cirúrgico de secção e anastomose brônquica esquerda, o lado direito, não operado, foi considerado o controle, dezoito ratos receberam solução salina e foram sacrificados no 7º, 15º e 30º dias após o procedimento cirúrgico; outros dezesseis ratos receberam Azatioprina por gavagem e foram sacrificados no 7º, 15º e 30º dia após a cirurgia. Foram avaliados a VTMC, PLT e o ângulo de contato. Metodologia, preparo do material e análise semelhante ao que foi feito nesta tese.

Pêgo- Fernandes et al. (2005) observaram que a VTMC no grupo que recebeu solução salina e foi submetido ao procedimento cirúrgico apresentou valores menores que o

grupo que recebeu apenas solução salina (controle contra lateral) em todos os tempos estudados (p < 0, 05). O mesmo não foi observado nesta tese, pois não encontramos diferença estatística entre os grupos que receberam solução salina, independente do lado submetido ao procedimento cirúrgico.

Pêgo- Fernandes et al. (2005) verificaram que nos grupos que receberam Azatioprina houve uma grande diferença estatística entre eles, com diminuição da VTMC no grupo que recebeu a droga e foi submetido ao procedimento cirúrgico (p < 0, 001) no período de 7 dias, mas que apresentou uma recuperação no final do estudo. Em relação a esta tese não houve diferença estatística entre os dois grupos que receberam apenas o Micofenolato de sódio.

Ao avaliarmos os grupos que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico, e que receberam solução salina e Azatioprina, Pêgo- Fernandes et al. (2005) verificaram redução da VTMC neste segundo grupo no período de 7 dias (p < 0, 05), que apresentou uma recuperação aos 15 e 30 dias. Nesta tese não observamos diferença estatística entre os grupos que receberam solução salina e Micofenolato de sódio.

Na avaliação do lado esquerdo submetido à secção e anastomose brônquica e que recebeu solução salina e Azatioprina, Pêgo- Fernandes et al. (2005) notaram também piora da VTMC no segundo grupo. Nesta tese, observamos que há uma piora inicial da VTMC no grupo que recebeu solução salina entre 7 e 30 dias (p=0, 003) e entre 15 e 30 dias (p= 0, 005), com recuperação ao longo do tempo. No período de 30 dias já podemos observar uma melhora da VTMC em relação ao grupo

salina e em relação

ao grupo que recebeu Micofenolato de sódio (p= 0, 0001), o que pode ser explicado pelo efeito antiinflamatório do imunossupressor na sua fase inicial, no pós-operatório e depois funcionando realmente como uma droga deletéria ao aparelho mucociliar.

Pêgo- Fernandes et al. (2005) observaram que em todos os grupos a qualidade do muco apresentou tendência a piorar. No grupo que recebeu Azatioprina esta piora foi menor (p< 0, 05) no período de 15 dias. Quando comparamos os grupos não operados que receberam solução salina e azatioprina, observou – se maior velocidade de transporte *in situ* (PLT) no grupo que recebeu azatioprina (p< 0, 05) no período de 30 dias.

Em relação a esta tese não observamos diferença estatística entre os grupos no que diz respeito à velocidade de transporte *in situ* no período estudado.

Os valores iniciais ruins de FBC e VTMC podem ser explicados por alguns fatores principais que estão relacionados com o procedimento cirúrgico na secção e anastomose brônquica que leva a denervação do pulmão no receptor, diminuindo o reflexo da tosse; a injúria isquêmica da mucosa brônquica com comprometimento da depuração mucociliar, e a interrupção da drenagem linfática; associada à utilização de medicações imunossupressoras que alteram as características e as funções de defesa das células encontradas normalmente no lavado broncoalveolar (Snydnan et al., 2001; Zhang et al., 2000).

Os resultados mostram que os grupos submetidos a procedimento cirúrgico e administração de droga imunossupressora apresentam um efeito protetor inicial com

piora dos parâmetros avaliados no decorrer do tempo, enquanto que o grupo que recebeu placebo (solução salina) apresenta uma melhora gradativa dos parâmetros

avaliados, o que confirma a ação nociva do imunossupressor sobre o aparelho mucociliar.

7.

CONCLUSÃO

7. Conclusão:

A administração do Micofenolato de Sódio isoladamente não interferiu nos mecanismos de defesa do aparelho mucociliar nesta amostra. O procedimento cirúrgico prejudicou a velocidade de transporte mucociliar *in situ* em um momento inicial (após 7 dias) com plena recuperação ao final do estudo (em 30 dias). A associação Micofenolato e procedimento cirúrgico foi deletério à depuração mucociliar.

8.

ANEXOS

Tabela 1. Valores individuais da distribuição da freqüência do batimento ciliar em ratos submetidos à administração de solução salina (S) e que foram operados e receberam solução salina (SC) conforme o sacrifício

Ratos	FBC D (S)	FBC E (SC)
R1 (7 dias)	10,45	9,93
R2 (7 dias)	9,44	9,09
R3 (7 dias)	9,40	7,86
R4 (7 dias)	9,35	8,82
R5 (7 dias)	11,98	10,61
R6 (7 dias)	8,76	8,58
R7 (7 dias)	9,40	9,81
R8 (7 dias)	9,29	8,68
R9 (7 dias)	10,57	10,11
R10 (7 dias)	9,86	10,98
R11 (15 dias)	9,00	7,78
R12 (15 dias)	8,40	9,12
R13 (15 dias)	10,14	10,21
R14 (15 dias)	9,00	8,67
R15 (15 dias)	8,44	9,81
R16 (15 dias)	10,04	10,02
R17 (15 dias)	10,12	8,97
R18 (15 dias)	8,40	8,91
R19 (15 dias)	10,55	8,65
R20 (15 dias)	10,45	9,93
R21 (30 dias)	10,44	10,08
R22 (30 dias)	8,80	9,62
R23 (30 dias)	NV	13,42
R24 (30 dias)	7,52	7,93
R25 (30 dias)	8,61	8,42
R26 (30 dias)	9,74	8,68
R27 (30 dias)	NV	10,64
R28 (30 dias)	12,62	10,68
R29 (30 dias)	10,99	10,03
R30 (30 dias)	10,47	9,53

NV: Não visualizado

Tabela 2. Valores individuais da distribuição da freqüência do batimento ciliar em ratos submetidos à administração de Micofenolato de Sódio(M) e que foram operados e receberam Micofenolato de Sódio (MC) conforme o sacrifício

Ratos	FBC D (M)	FBC E (MC)
R1 (7 dias)	10,73	13,33
R2 (7 dias)	9,02	10,44
R3 (7 dias)	9,39	10,16
R4 (7 dias)	NV	NV
R5 (7 dias)	10,01	10,74
R6 (7 dias)	10.81	9,78
R7 (7 dias)	10,42	NV
R8 (7 dias)	10,08	10,69
R9 (7 dias)	9,46	9,76
R10 (7 dias)	10,11	9,95
R11 (15 dias)	11,50	7,87
R12 (15 dias)	9,73	10,40
R13 (15 dias)	8,94	10,88
R14 (15 dias)	10,07	8,88
R15 (15 dias)	9,86	9,33
R16 (15 dias)	NV	NV
R17 (15 dias)	9,57	8,99
R18 (15 dias)	10,07	10,54
R19 (15 dias)	9,16	9,71
R20 (15 dias)	10,77	11,61
R21 (30 dias)	10,92	8,40
R22 (30 dias)	10,20	8,90
R23 (30 dias)	NV	9,30
R24 (30 dias)	9,45	8,41
R25 (30 dias)	9,52	8,35
R26 (30 dias)	10,80	6,66
R27 (30 dias)	10,69	9,41
R28 (30 dias)	8,41	7,02
R29 (30 dias)	9,10	8,74
R30 (30 dias)	8,44	10,34

NV: não visualizado

Tabela 3. Valores individuais da distribuição da velocidade de transporte mucociliar em ratos submetidos à administração de solução salina (S) e que foram operados e receberam solução salina (SC) conforme o sacrifício

Ratos	Trans. D mm/min (S)	Trans. E mm/min (SC)
R1 (7 dias)	0,0517	0,0242
R2 (7 dias)	0,0152	0,0126
R3 (7 dias)	0,0120	0,0123
R4 (7 dias)	0,0068	0,0132
R5 (7 dias)	0,0309	0,0406
R6 (7 dias)	0,0309	0,0209
R7 (7 dias)	0,0361	0,0306
R8 (7 dias)	0,0046	0,0060
R9 (7 dias)	0,0800	0,0168
R10 (7 dias)	0,0110	0,0036
R11 (15 dias)	0,0042	0,0174
R12 (15 dias)	0,0106	0,0089
R13 (15 dias)	0,0361	0,0265
R14 (15 dias)	0,0122	0,0097
R15 (15 dias)	0,0082	0,0129
R16 (15 dias)	0,0089	0,0062
R17 (15 dias)	0,0099	0,0192
R18 (15 dias)	0,0528	0,0493
R19 (15 dias)	0,0293	0,0135
R20 (15 dias)	0,0059	0,0049
R21 (30 dias)	NV	0,0475
R22 (30 dias)	0,0086	0,0277
R23 (30 dias)	0,0342	0,0422
R24 (30 dias)	0,0070	0,0215
R25 (30 dias)	0,0491	0,0540
R26 (30 dias)	0,0045	0,0042
R27 (30 dias)	0,2542	0,0224
R28 (30 dias)	0,0467	0,0806
R29 (30 dias)	0,0062	0,0521
R30 (30 dias)	0,0232	0,0361

NV: Não visualizado

Tabela 4. Valores individuais da distribuição da velocidade de transporte mucociliar em ratos submetidos à administração de Micofenolato de Sódio(M) e que foram operados e receberam Micofenolato de Sódio (MC) conforme o sacrifício

Ratos	Trans. D mm/min (M)	Trans. E mm/min (MC)
R1 (7 dias)	0,0085	NV
R2 (7 dias)	0,0200	0,0219
R3 (7 dias)	0,0185	NV
R4 (7 dias)	0,0224	NV
R5 (7 dias)	0,0215	0,0120
R6 (7 dias)	0,0263	0,0314
R7 (7 dias)	0,0375	NV
R8 (7 dias)	NV	0,0218
R9 (7 dias)	0,0242	NV
R10 (7 dias)	0,0400	0,0367
R11 (15 dias)	0,0302	0,0120
R12 (15 dias)	0,0610	0,0138
R13 (15 dias)	0,0242	0,0174
R14 (15 dias)	0,0188	0,0183
R15 (15 dias)	0,0197	0,0168
R16 (15 dias)	0,0267	0,0066
R17 (15 dias)	0,0478	0,0229
R18 (15 dias)	0,0518	0,0280
R19 (15 dias)	0,0339	0,0255
R20 (15 dias)	0,0634	0,0322
R21 (30 dias)	0,0385	0,0237
R22 (30 dias)	0,0139	NV
R23 (30 dias)	0,0258	NV
R24 (30 dias)	0,0244	0,0150
R25 (30 dias)	0,0377	0,0367
R26 (30 dias)	0,0262	0,0237
R27 (30 dias)	0,0316	0,0251
R28 (30 dias)	NV	0,0079
R29 (30 dias)	0,0142	0,0101
R30 (30 dias)	0,0130	0,0105

NV: Não visualizado

Tabela 5. Valores individuais da distribuição da velocidade de transporte mucociliar em palato de rã de ratos submetidos à administração de solução salina (S) e que foram operados e receberam solução salina (SC) conforme o sacrifício

Ratos	Palato D (S)	Palato E (SC)
R1 (7 dias)	0,93	1,03
R2 (7 dias)	0,81	1,11
R3 (7 dias)	NV	NV
R4 (7 dias)	1,15	0,83
R5 (7 dias)	1,26	0,90
R6 (7 dias)	0,93	0,95
R7 (7 dias)	NV	1,05
R8 (7 dias)	1,06	1,42
R9 (7 dias)	1,21	1,57
R10 (7 dias)	0,91	0,85
R11 (15 dias)	1,31	1,19
R12 (15 dias)	1,81	1,64
R13 (15 dias)	0,79	1,69
R14 (15 dias)	0,93	1,09
R15 (15 dias)	1,11	0,77
R16 (15 dias)	1,48	1,14
R17 (15 dias)	0,99	1,13
R18 (15 dias)	NV	NV
R19 (15 dias)	1,34	0,97
R20 (15 dias)	0,60	1,21
R21 (30 dias)	NV	1,04
R22 (30 dias)	0,94	1,10
R23 (30 dias)	1,61	0,89
R24 (30 dias)	NV	1,23
R25 (30 dias)	1,51	1,26
R26 (30 dias)	2,12	0,98
R27 (30 dias)	1,34	1,57
R28 (30 dias)	0,58	0,72
R29 (30 dias)	NV	1,31
R30 (30 dias)	1,05	0,98

NV: Não visualizado

Tabela 6. Valores individuais da distribuição da velocidade de transporte mucociliar em palato de rã em ratos submetidos à administração de Micofenolato de Sódio(M) e que foram operados e receberam Micofenolato de Sódio (MC) conforme o sacrifício

Ratos	Palato D (M)	Palato E (MC)
R1 (7 dias)	0,80	NV
R2 (7 dias)	1,72	1,32
R3 (7 dias)	NV	1,21
R4 (7 dias)	1,33	1,00
R5 (7 dias)	0,96	1,23
R6 (7 dias)	NV	1,39
R7 (7 dias)	1,24	NV
R8 (7 dias)	1,20	1,95
R9 (7 dias)	NV	1,00
R10 (7 dias)	0,69	1,66
R11 (15 dias)	NV	1,2
R12 (15 dias)	NV	0,81
R13 (15 dias)	NV	NV
R14 (15 dias)	1,19	0,85
R15 (15 dias)	1,61	1,10
R16 (15 dias)	0,96	1,42
R17 (15 dias)	0,74	0,93
R18 (15 dias)	1,37	1,35
R19 (15 dias)	NV	1,59
R20 (15 dias)	1,19	1,66
R21 (30 dias)	0,87	1,30
R22 (30 dias)	0,83	NV
R23 (30 dias)	NV	1,33
R24 (30 dias)	0,68	1,16
R25 (30 dias)	1,37	1,04
R26 (30 dias)	NV	1,35
R27 (30 dias)	1,24	1,95
R28 (30 dias)	1,22	1,13
R29 (30 dias)	1,10	1,09
R30 (30 dias)	2,12	1,60

NV: Não visualizado

Tabela 7. Distribuição da frequência do batimento ciliar em relação à droga administrada

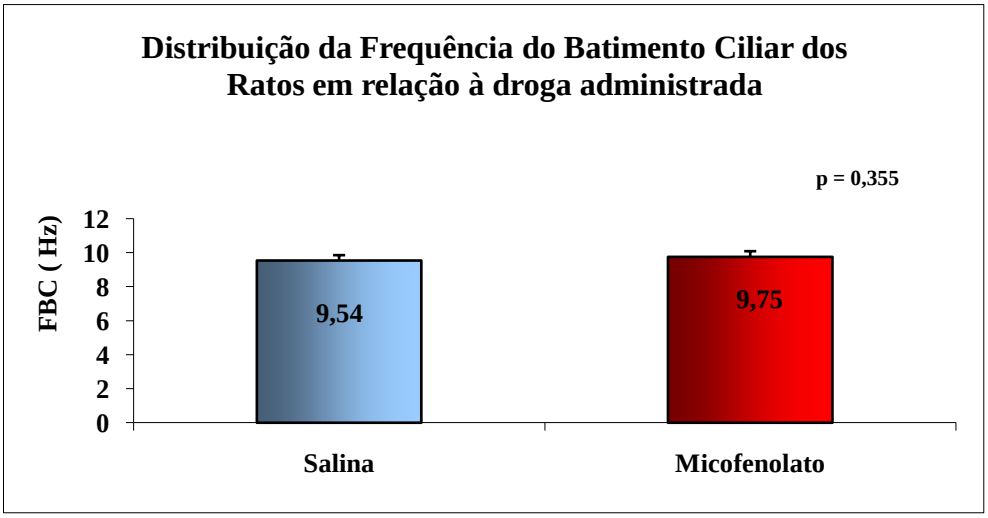


Tabela 8. Distribuição da frequência do batimento ciliar em relação ao tempo do sacrifício

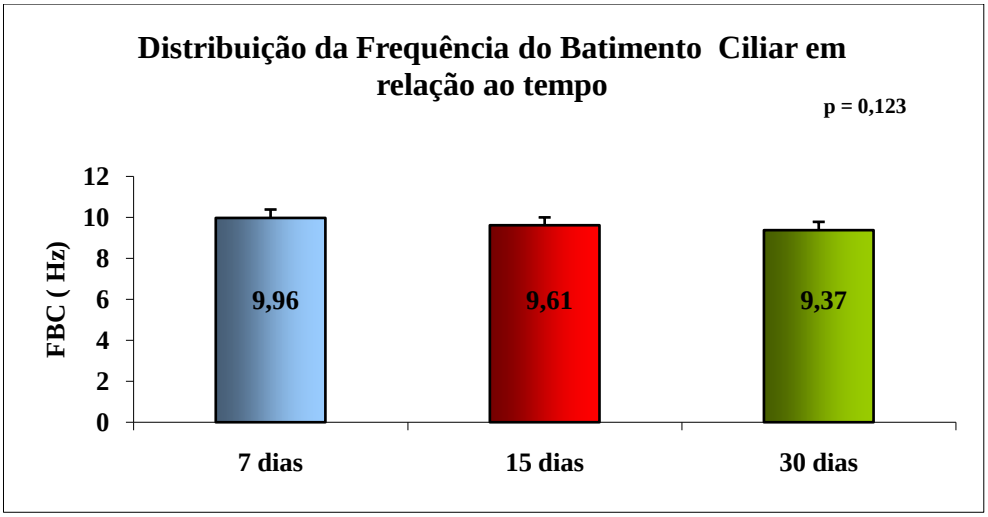


Tabela 9. Distribuição da frequência do batimento ciliar conforme o procedimento cirúrgico ou não

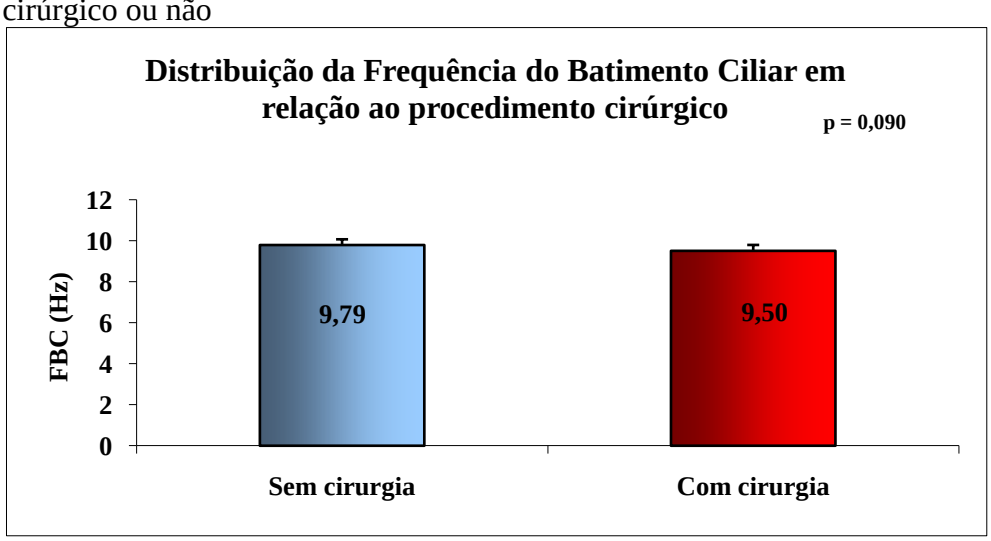


Tabela 10. Distribuição da frequência do batimento ciliar em relação ao tempo e à droga administrada

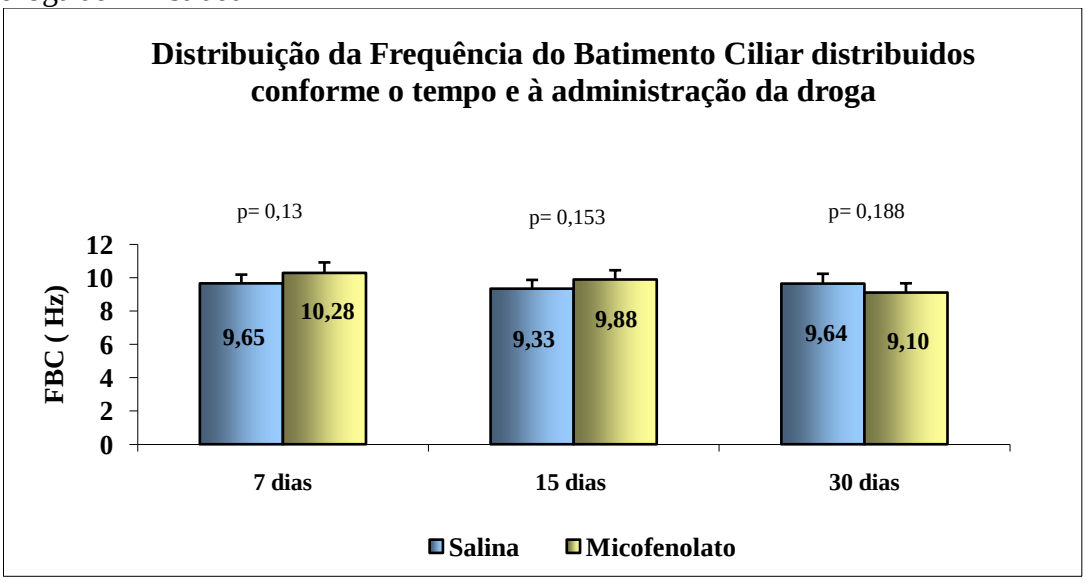


Tabela 11. Distribuição da frequência do batimento ciliar em relação ao procedimento cirúrgico e à droga administrada

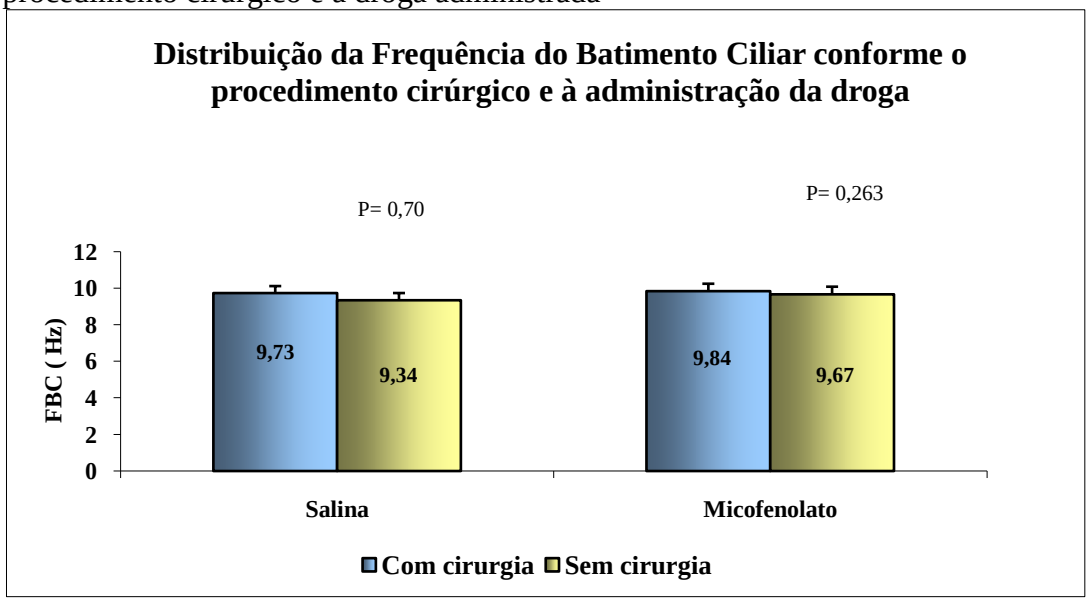


Tabela 12. Distribuição da frequência do batimento ciliar em relação ao tempo e ao procedimento cirúrgico

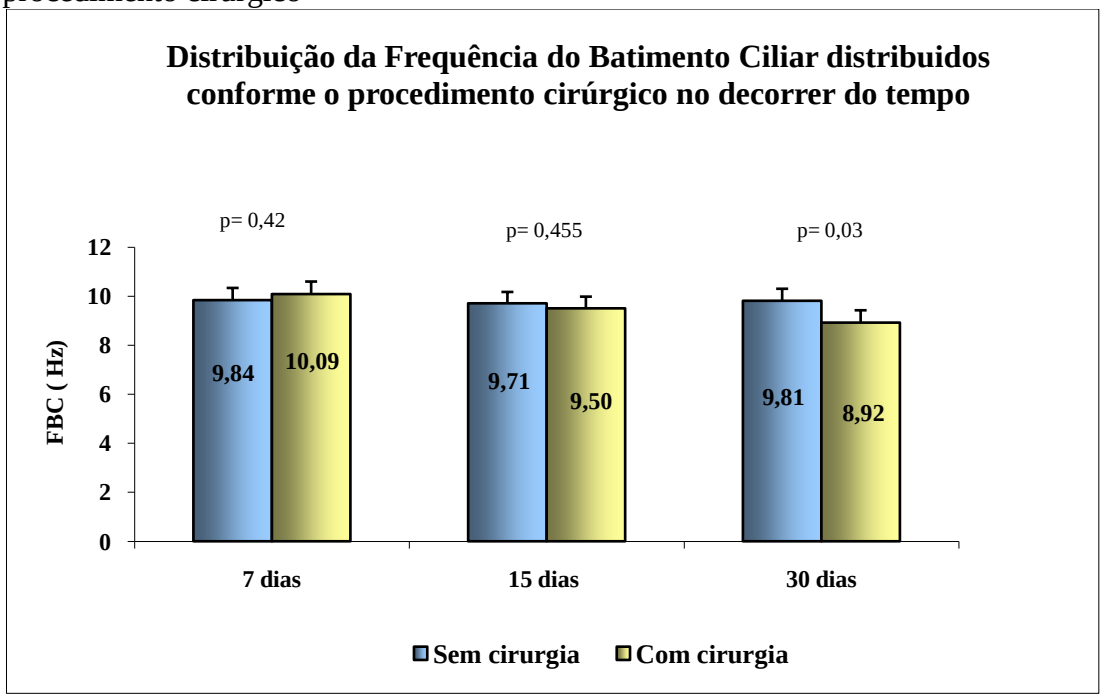


Tabela 13. Distribuição da frequência do batimento ciliar em decorrência do tempo, do procedimento cirúrgico e da droga administrada

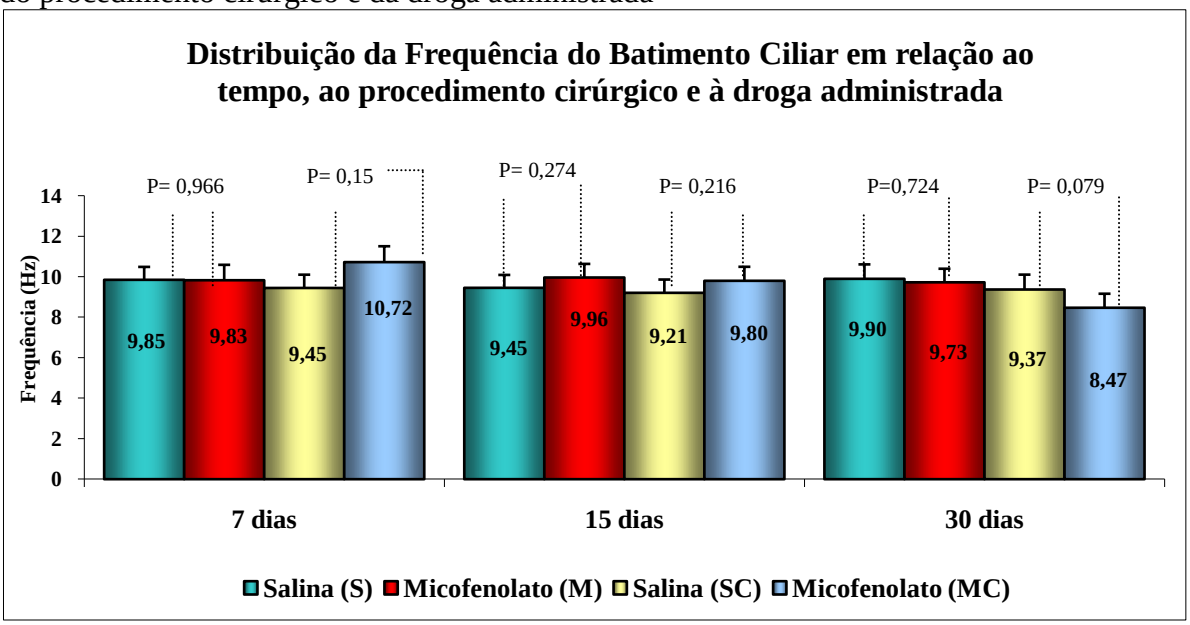


Tabela 14. Distribuição da velocidade de transporte mucociliar em relação à droga administrada

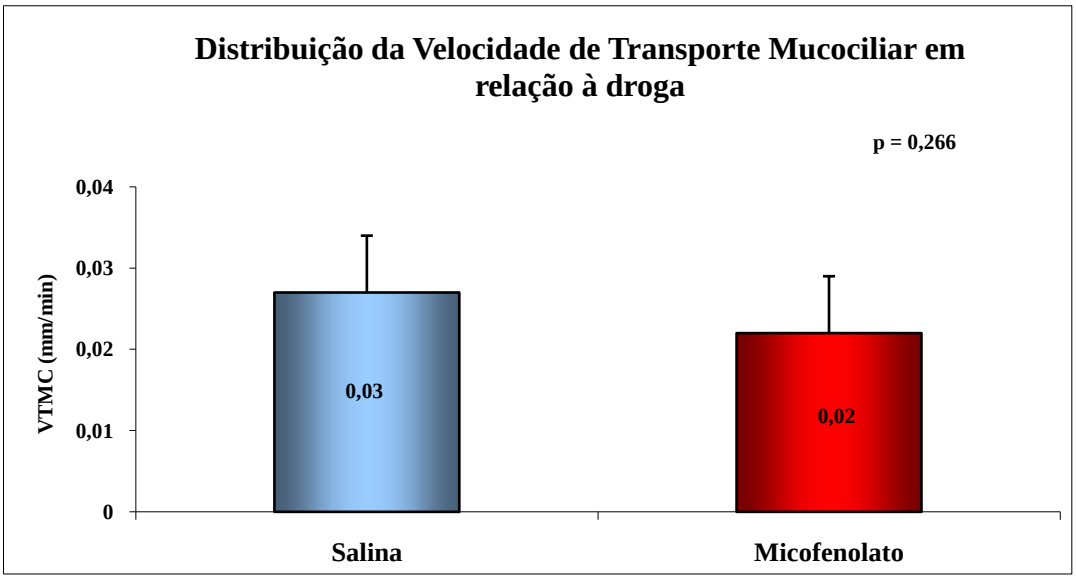


Tabela 15. Distribuição da velocidade de transporte mucociliar em relação ao tempo

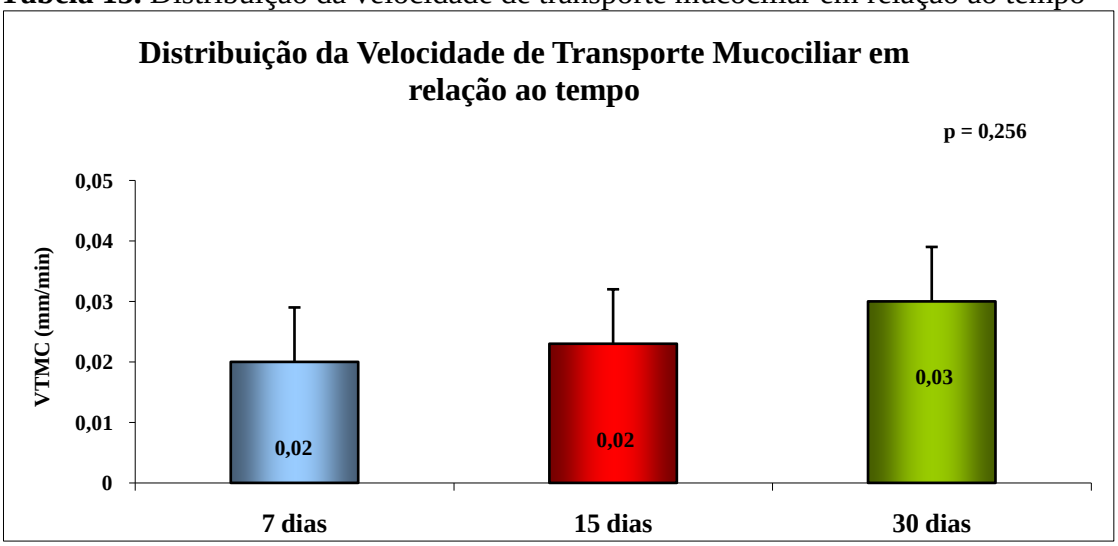


Tabela 16. Distribuição da velocidade de transporte mucociliar em relação ao procedimento cirúrgico

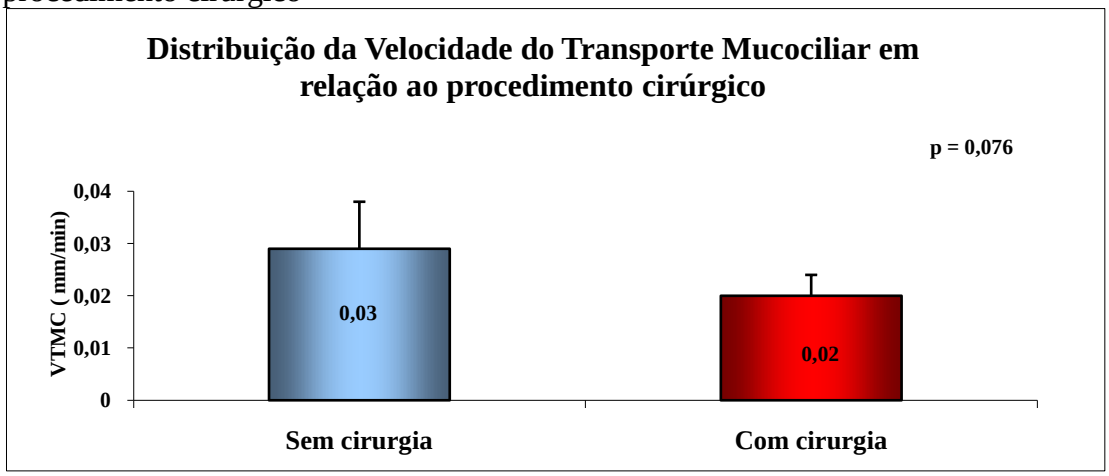


Tabela 17. Distribuição da velocidade de transporte mucociliar em relação ao tempo e à droga administrada

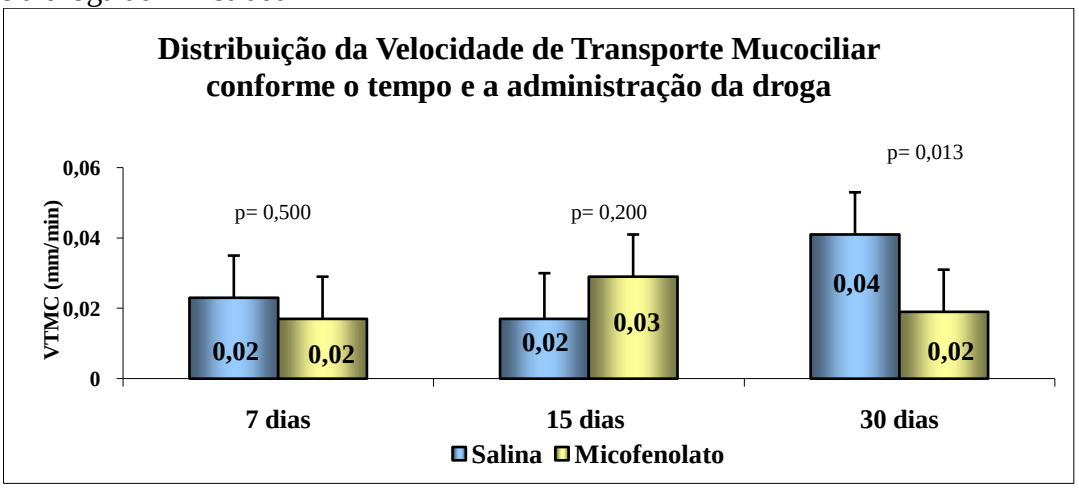


Tabela 18. Distribuição da velocidade de transporte mucociliar em relação ao procedimento cirúrgico e à droga administrada

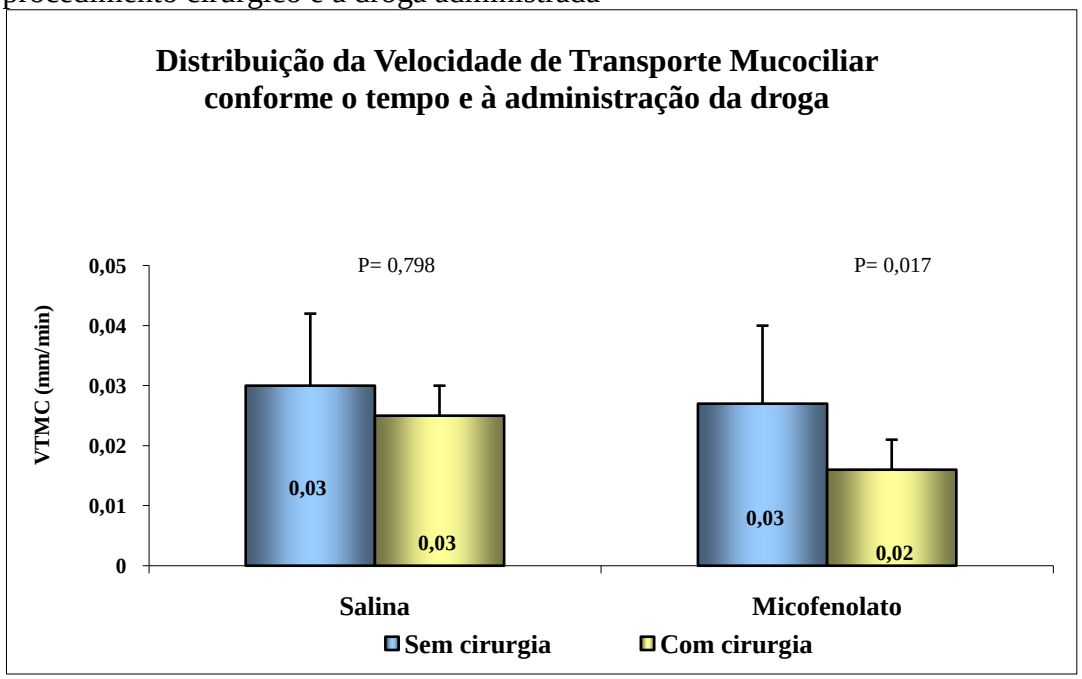


Tabela 19. Distribuição da velocidade de transporte mucociliar em relação ao tempo e ao procedimento cirúrgico

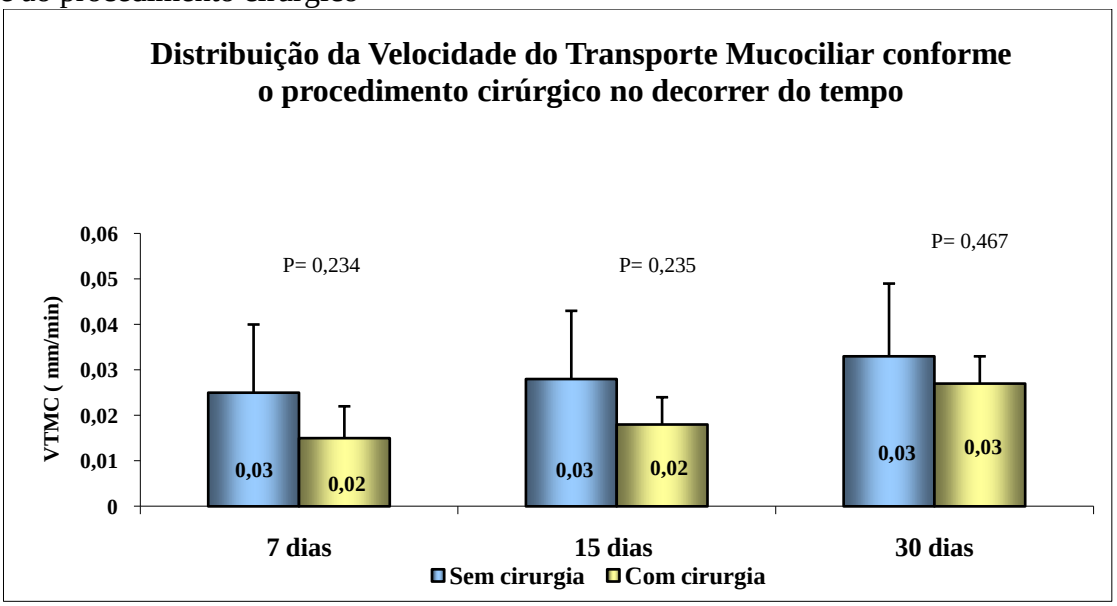


Tabela 20. Distribuição da velocidade de transporte mucociliar em relação à droga administrada, ao procedimento cirúrgico e ao tempo

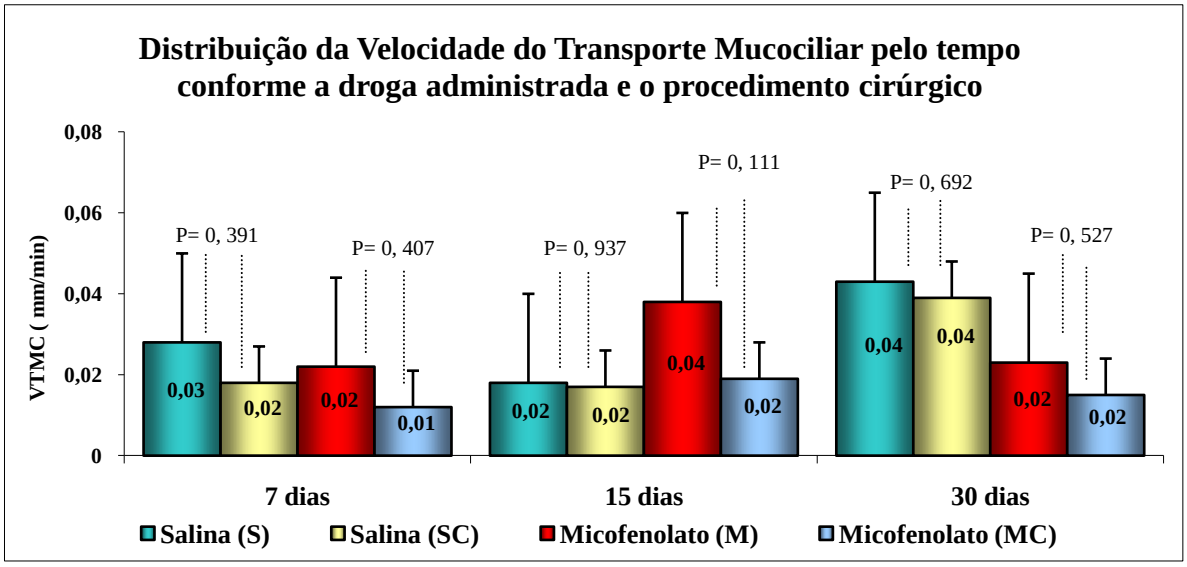


Tabela 21. Distribuição da velocidade do transporte mucociliar no palato de rã em relação à droga administrada

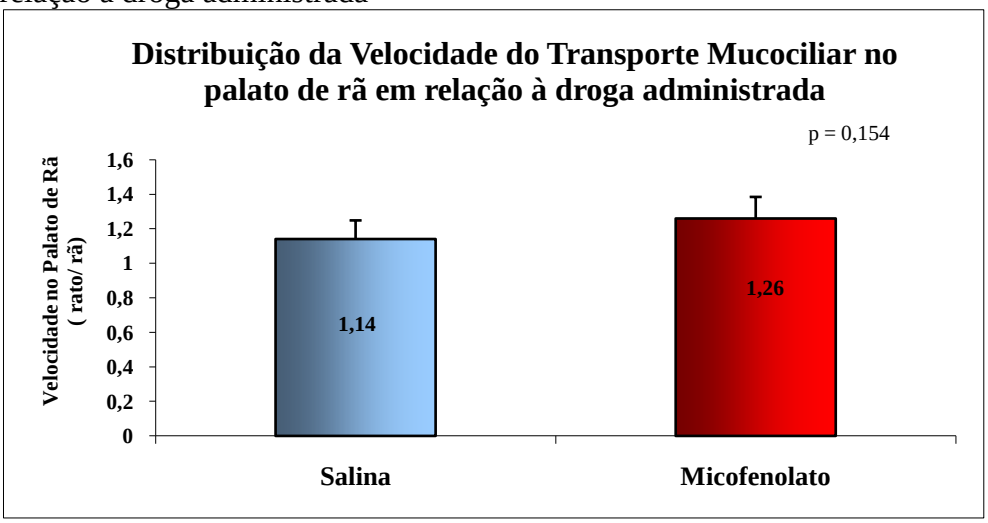


Tabela 22. Distribuição da velocidade do transporte mucociliar no palato de rã em relação ao tempo

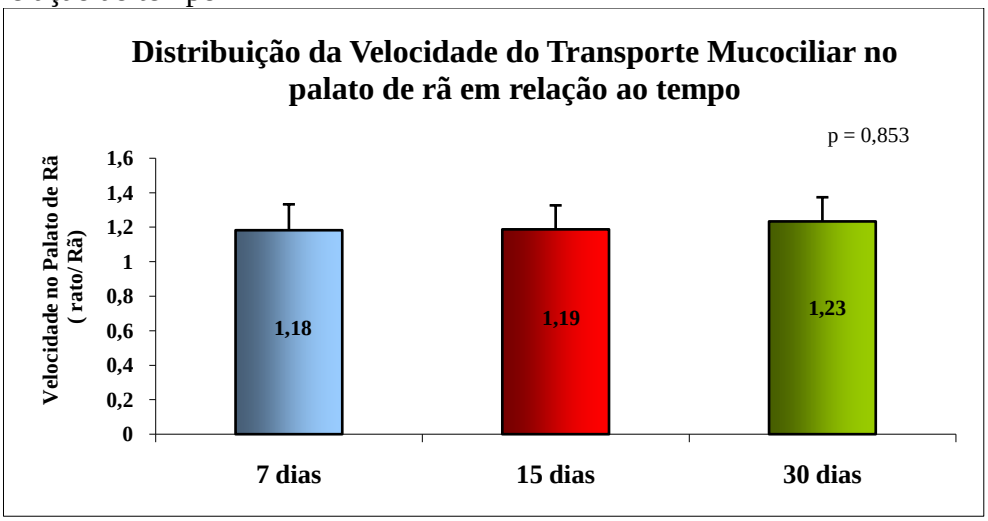


Tabela 23. Distribuição da velocidade do transporte mucociliar no palato de rã em relação ao procedimento cirúrgico

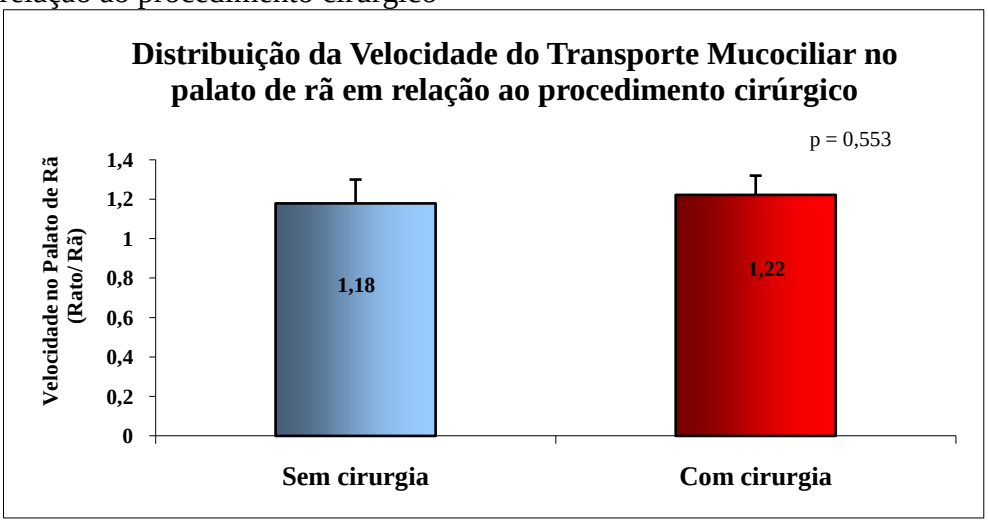


Tabela 24. Distribuição da velocidade do transporte mucociliar no palato de rã em relação ao tempo e à droga administrada

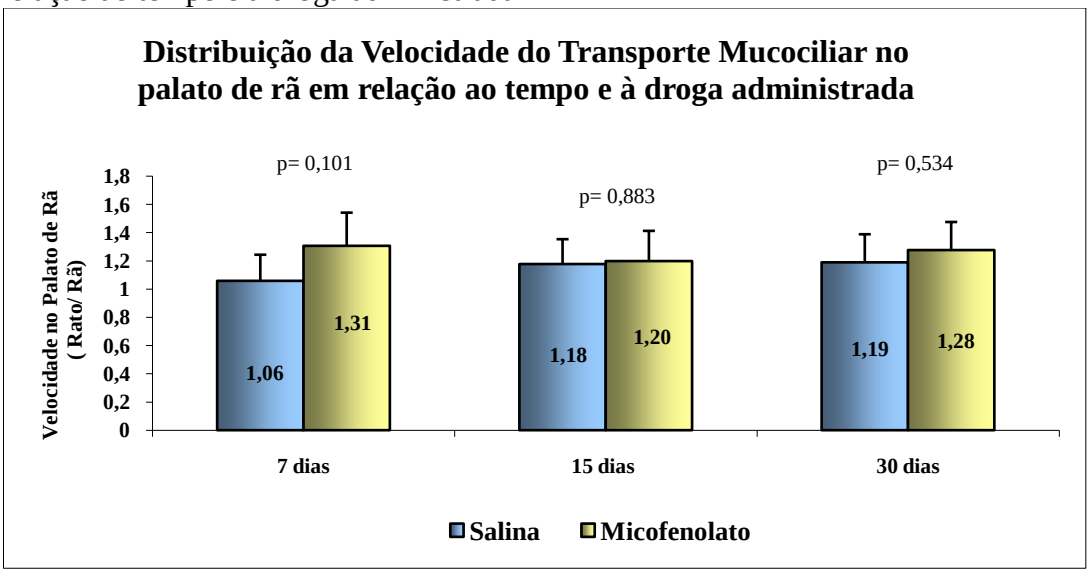


Tabela 25. Distribuição da velocidade do transporte mucociliar no palato de rã em relação à droga administrada e ao procedimento cirúrgico

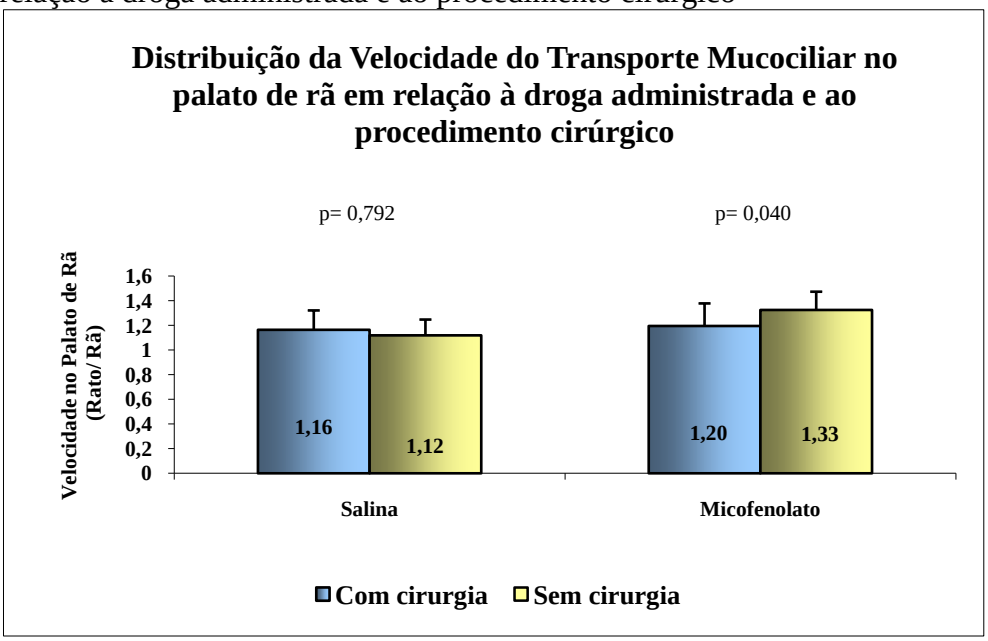


Tabela 26. Distribuição da velocidade do transporte mucociliar no palato de rã em relação ao procedimento cirúrgico e ao tempo

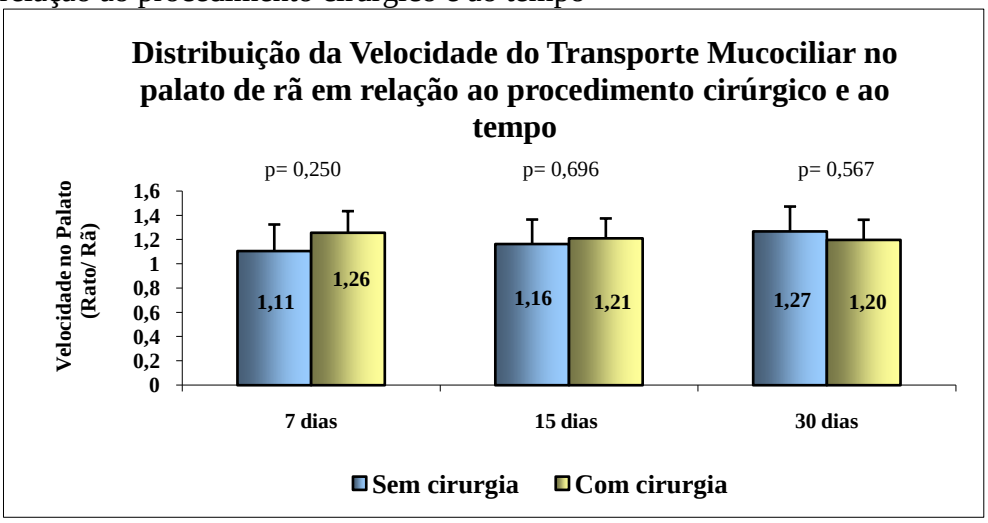


Tabela 27. Distribuição da velocidade do transporte mucociliar no palato de rã em relação à droga administrada, ao tempo e ao procedimento cirúrgico

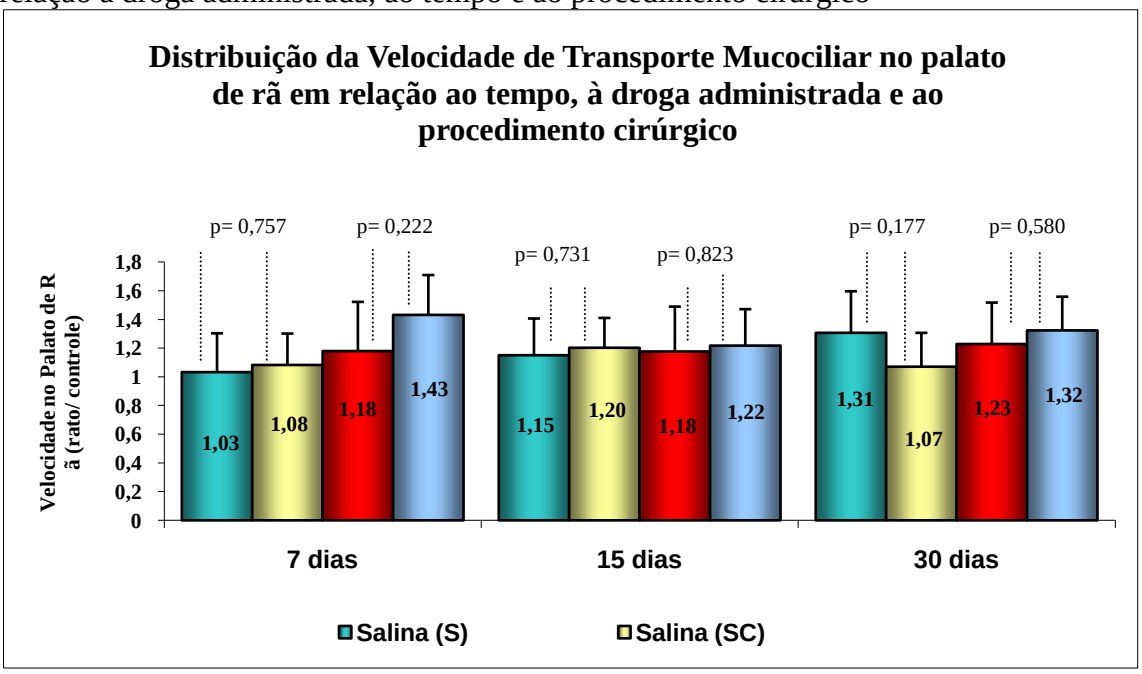
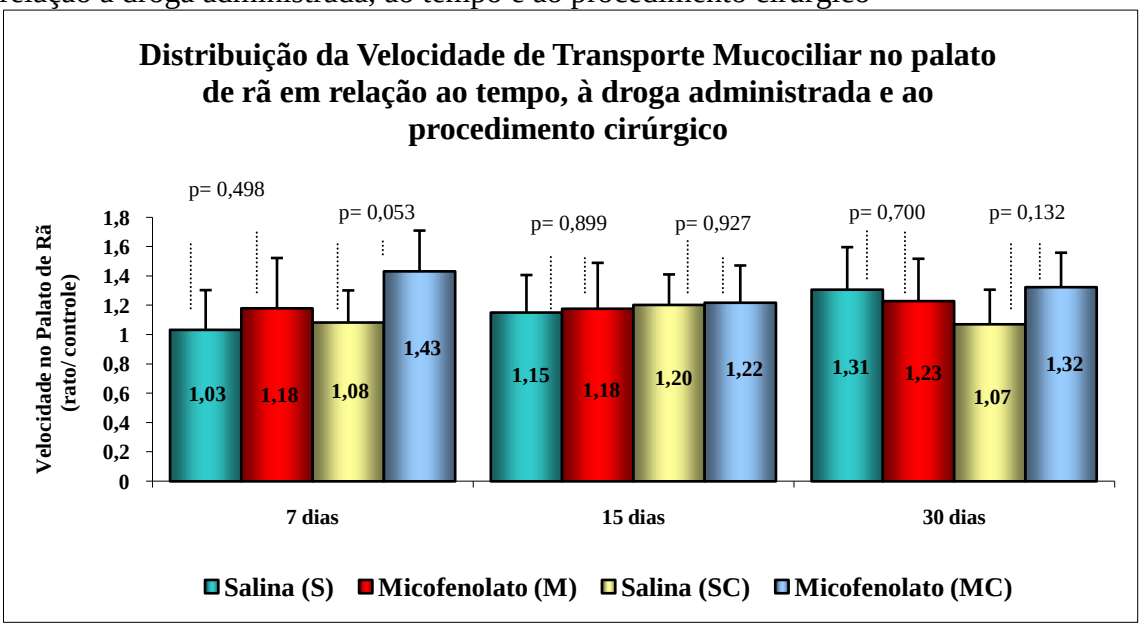


Tabela 28. Distribuição da velocidade do transporte mucociliar no palato de rã em relação à droga administrada, ao tempo e ao procedimento cirúrgico



9.

REFERÊNCIAS

9. Referências

Aeba R, Stout JE, Fracalancia NA, Keenan RJ, Duncan AJ, Yousen AS, Buckart GJ, Yu VL, Griffth BP. Aspects of lung transplantation that contribute to increased severity of pneumonia. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992; 106, 449-457.

Aurora P, Leah BE, Christie J, Dobbels F, Kirk R, Kucheryavaya AY, Rahmel AO, Taylor DO, Hertz MI. Regystry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Eleventh Official Pediatric Lung and Heart/ Lung Transplantation Report – 2008. Disponível em: http:// www. Ishlt.org/registries.

Briffa N, Morris RE. Immunosuppressive drugs after lung transplantation (editorial). *BMJ.* 1998; 316:719.

Brock MV, Borja MC, Ferber L, Orens JB. Induction therapy in lung transplantation: a prospective, controlled clinical trial comparing OKT3, anti-thymocyte globulin, and daclizumab. *J Heart Lung Transplant.* 2001; 20:1282.

Brody JS, Klempfner G, Staum MM, Vidyasagar D, Khul DE, Waldhausen JÁ. Mucociliary clearance after lung denervation and bronchial section. *J Appl Physiol*. 1972; 32 (2):160-4.

Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet.* 1998; 34(6):429-55.

Calhoen JH, Nichols L, Davis R, Bryant CL, Levine SM, Zamora CA, Anzueta A, Lum CT, Grover FL, Trinkle JK. Single lung transplantation. Factors in postoperative cytomegalovirus infection. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992 ; 103:21-5

Chen F, Nakamura T, Wada H. Development of New Organ preservation Solutions in Kyoto University. *Yonsei Medical J.* 2004; 45: 1107-1114.

Christie JD, Edwards LB, Aurora P. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty- fifth official adult lung and heart-lung transplantation report. 2008; 27:957. Disponível em: http:// www. Ishlt.org/registries.

Colby TD, Vanderveen K, Strickler MD, Markham GD, Goldstein BM. Crystal structure of human type II inosine monophosphate dehydrogenase: implications for ligand binding and drug design. *Proc Natl Acad Sci E.U. A.* 1999; 96 (7):3531-6.

Cooper JD, Patterson GA, Grossman R, Maurer J. Double-lung transplant for advanced chronic obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:303.

Duncan MD, Wilkes DS. A Review of Imunossupression and Pulmonary Infections. *Proc Am Thorac Soc*. 2005; 2 (5): 449-455.

Fulton B, Markham A. Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs.* 1996; 51(2):278-98.

Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ transplantation recipients. *N Engl J Med*. 1998; 338: 1741-1751.

Fung JJ, Eliasziw M, Todo S, Jain A, Demetris AJ, McMichael JP, Starzl TE, Meier P, Donner A. The Pittsburgh Randomized Trial of Tacrolimus Compared to Cyclosporine for Hepatic Transplantation . *J Am Coll Surg.* 1996 ; 183(2): 117–125.

Gade J, Qvortrup K, Andersen CB, Olsen PS. Bronchial section and reanastomosis in pigs. With and without bronchial arterial circulation. *Ann Thorac Surg*. 2001; 71 (1): 332-6.

Gerbase MW, Spiliopoulos M, Fathi M, Nicod LP. Low Doses of Mycophenolate Mofetil With Low Doses of Tacrolimus Prevent Acute Rejection and Long- Term Function Loss After Lung Transplantation. *Transplant Proc*. 2001; 33: 2146- 2147.

Guide for the Care and use of Laboratory Animals. National Academy of Sciences 1996. Disponível em: http://grants.nih.gov/grants/olaw/olaw.htm

Gummert JF, Ikonen T, Morris RE. Newer Imunossupressive Drugs: A Review. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10: 1366- 1380

Hachem RR. Lung Transplantation: A Review. *Up to date.* 2009. Disponível em: http// www.uptodateonline.com/utd/index.do

Halloran PF. Aspects of allograft rejection, IV: Evaluation of new pharmacologic agents for prevention of allograft rejection. *Transp Rev.* 1995; 9:138.

Hardy JD, Eraslan S, Dalton ML. Autotransplantation and homotransplantations of the lung: further studies. *J Thoracic Cardiovasc Surg*. 1963; 46: 606-15.

Hausen B, Morris RE. Review or Immunossupression for Lung Transplantation. *Clinics in Chest Medicine.* 1997;18,353-367.

Hyle JW, Shaw RJ, Reines D. Functional Distinctions between IMP Dehydrogenase Genes in Proving Mycophenolate Resistence and Guanine Prototropy to Yeast. *JBC*

Papers in Press. 2003; v. 278 (31): p.28470 -78.

Hystology Study Guide. Disponível em: http:// www. Sinmed.edu.2008.

Jain J, Almquist SJ, Ford PJ, Shlyakhter D, Wang Y, Nimmesgern E, Germann UA. Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol.* 2004; 67 (4):767-76.

Kaiser LR, Pasque MK, Truclock EP, Low DE, Dresler CM, Cooper JD. Bilateral sequential lung transplantation: the procedure of choice for double-lung replacement. *Ann Thorac Surg.* 1991; 52(3): 438-45.

Kazmierowski JA, Gallin JI, Reynolds H. Mechanism for the Inflammatory Response in Primate Lungs. *J Clin Invest*. 1977; 59: 273- 281.

Klintmalm G. A review of FK506: A new immunosuppressive agent for the prevention and rescue of graft rejection. *Transpl Rev*. 1994; 8:53.

Knoop C, Haverich A, Fisher S. Immunosuppressive therapy after human lung transplantation. *Eur Resp J.* 2004*;* v.23, p. 159-171.

Kobashigawa JA, Renlund DG, Gerosa G, Almenar L, Eisen HJ, Keogh AM, Lehmkuhl HB, Livi U, Ross H, Segovia J, Yonan N. Similar efficacy and safety of enteric-coated mycophenolate sodium (EC-MPS, myfortic) compared with mycophenolate mofetil (MMF) in de novo heart transplant recipients: results of a 12-month, single-blind, randomized, parallel-group, multicenter study. *Heart Lung Transplant*. 2006; 25(8):935-41.

Macchione M, Guimarães ET, Saldiva PHN, Lorenzi-filho G. Methods for studying respiratory mucus and mucus clearance. *Braz J Med Biol Res*. 1995; 28: 1347- 55.

Marelli D, Paul A, Nguyen DM, Sheinnib H, King M, Nai- San W, Wilson JA, Mulder DS, Chiu R. The reversibility of impaired mucociliary function after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1991; 102: 908- 12.

McGee C, Fox MD, Loyd JE. The feasibility of HLA matching for lung transplantation. *Clin Transplant*. 1996; 10:564.

Merril WW, Naegel GP, Matthay, RA, Reynolds HY. Alveolar Macrophage-derived Chemotactic Factor. *J Clin Invest*. 1998; 65: 268- 276.

Newhouse MI, Jordana M, Dolovich M. Evaluation of lung epithelial permeability. *Eur J Nucl Med.* 1987; v. 13 Suppl: S58-62.

Paul A, Marelli A, Shennib H, King M, Nai-San W, Wilson JAS, Mulder DS, Chiu RCJ. Mucociliary function in autotransplanted, allotransplanted and sleeve resected lung. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989; 98: 523-8.

Pazetti R, Pego-Fernandes PM, Ranzani OT, Parra ER, Lorenzi-Filho G, Jatene FB. Cyclosporin A reduces airway mucus secretion and mucociliary clearance in rats. *Clinics.* 2007; 62(3): 345-52.

Pazetti R, Pêgo-Fernandes PM, Lorenzi-Filho G, Saldiva PH, Moreira LF, Jatene FB. Effects of cyclosporine A and bronchial transection on mucociliary transport in rats. *Ann Thorac Surg*. 2008; 85(6):1925-9.

Pêgo- Fernandes MM, Pazetti R, Said MM, Moreira LF, Jatene, FB. Efeitos da azatioprina sobre a depuração mucociliar após secção e anastomose brônquica em um modelo experimental em ratos. *J bras pneumol*; 2008; v.34, p. 273- 279.

Oellerich M, Shipkova M, Schütz E, Wieland E, Weber L, Tönshoff B, Armstrong VW. Pharmacokinetic and metabolic investigations of mycophenolic acid in pediatric patients after renal transplantation: implications for therapeutic drug

monitoring. German Study Group on Mycophenolate Mofetil Therapy in Pediatric Renal Transplant Recipients. *Drug Monit.* 2000; 22(1):20-6.

RBT-2009. Registro Brasileiro de Transplantes. Disponível em :http// wwwabto.org.br

Rangel EB, Melaragno CS, Sá JR, Gonzalez AM, Linhares MM, Salzedas A, Medina-Pestana JO. Mycophenolate mofetil versus enteric-coated mycophenolate sodium after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2009; 41(10):4265-9.

Read RC, Shankar S, Rutman A, Feldman C, Yacoub M, Cole PJ, Wilson R. Ciliary beat frequency and structure of recipient and donor epithelia following lung transplantation. *Eur Resp J.* 1991 Jul; v.4, p. 796-801.

Reichenspurner H, Kur F, Treede H. Optimization of the immunosuppressive protocol after lung transplantation. *Transplantation*. 1999; 68:67.

Rivero DHRF, Lorenzi-Filho, G, Pazetti R, Jatene FB, Saldiva PHN. Effects of bronchial section and reanastomosis on mucociliary system. *Chest.* 2001;119:1510-5.

Roman A, Bravo C, Monforte V, Reyes L, Canela M, Morell F. Preliminary Results of Rescue Therapy With Tacrolimus and Mycophenolate Mofetil in Lung Transplantated Patients With Bronchiolitis Obliterans. *Transplant Proc*. 2002; 34: 146- 147.

Ross DJ, Waters PF, Levine M. Mycophenolate mofetil versus azathioprine immunosuppressive regimens after lung transplantation: Preliminary experience. *J Heart Lung Transplant.* 1998; 17:768.

Rubin BK, Ramirez, O, King M. Mucus- depleted frog palate as a model for the study of mucociliary clearence. *J Appl Physiol*. 1990; 69 (2): 424-9.

Saldiva PHN. Aparelho mucociliar: aspectos funcionais e métodos de estudo. *J Pneumol*. 1990; 16: 161- 70.

Samano MNH, Minamoto H, Junqueira JJM, Yamaçake KGR, Gomes HAP, MarianiAW, Pêgo-Fernandes PM, Jatene FB. Bronchial Complications Following Lung Transplantation. *Transplant Proc*. 2009; 41:921-926.

Shankar S, Fulshman L, Read RC, Theodoropoulos S, Cole PJ, Madden B, Yacoub M. Mucociliary function after lung transplantation. *Transplant Proc.* 1991 Feb; v.23:1222-3.

Shehata M, Bhandari S, Venkat-Raman G, Moore R, D'Souza R, Riad H, Bakran A, Baker R, Needham C, Andrews C. Effect of conversion from mycophenolate mofetil to enteric-coated mycophenolate sodium on maximum tolerated dose and gastrointestinal symptoms following kidney transplantation. *Transpl Int.* 2009; 22(8):821-30

Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 141(2):471-501.

Sievers TM, Rossi SJ, Ghobrial RM, Arriola E, Nishimura P, Kawano M, Holt CD. Mycophenolate mofetil. *Pharmacotherapy.* 1997; 17(6):1178-97.

Snydman DR. Epidemiology of infections after solid-organ transplantation. *Clin Infect Dis* .2001;33:S5–S8.

Sollinger, HW. Mycophenolate Mofetil for the Prevention of Acute Rejection in Primary Cadaveric Renal Allograft Recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation*. 1995; 60:225.

Studer SM, Levy RD, Mcneil K, Orens JB. Lung transplantation outcomes: a review of survival, graft function, heath-related quality of life and cost-effectiveness. *Eur Resp J*. 2004; 24: 674-85.

Trindade SHK, Mello-Junior JF, Mion OG, Lorenzi-Filho G, Machione M, Guimarães EL, Saldiva PHN. Métodos de estudo do transporte mucociliar. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007; 73(5):704-12.

Trulock EP. Imunossuppression following lung transplantation. *Up to date*. 13.11. 2009.

Xavier AM, Pêgo-Fernandes PM, Correia AT, Pazetti R, Monteiro R, Canzian M, Jatene FB. Influence of cyclosporine A on mucociliary system after lung transplantation in rats. *Acta Cir Bras* 2007; 22(6):465-9

Ware LB, Wang Y, Fang X. Assessment of lungs rejected for transplantation and implications for donor selection. *Lancet.* 2002; 360: 619.

Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ*. 2005; 331(7520): 810.

Wiesner RH. A long-term comparison of tacrolimus (FK506) versus cyclosporine in

liver transplantation: a report of the United States FK506 Study Group. *Transplantation*. 1998; 66(4):493-9.

Welsh MJ. Electrolyte transport by airway ephitelia. *Physiol Rev*. 1987; 67 (4): 1143-84.

Wiesner R, Rabkin J, Klintmalm G. A randomized double-blind comparative study of mycophenolate mofetil and azathioprine in combination with cyclosporine and corticosteroids in primary liver transplant recipients. *Liver Transpl* . 2001; 7:442.

Woodroffe R, Yao GL, Meads C, Bayliss S, Ready A, Raftery J, Taylor RS. Clinical and cost-effectiveness of newer immunosuppressive regimens in renal transplantation: a systematic review and modelling study. *Health Technol Assess.* 2005 ; 21: 179.

de Winter BC, van Gelder T, Glander P, Cattaneo D, Tedesco-Silva H, Neumann I, Hilbrands L, van Hest RM, Pescovitz MD, Budde K, Mathot RA. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid: a comparison between enteric-coated mycophenolate sodium and mycophenolate mofetil in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2008; 47(12):827-38.

Zayas JG, O´Brien DW, Tai S, Ding J, Lim L, King M. Adaptation of an amphibian

mucociliary clearance model to evaluate early effects of tobacco smoke exposure. *Resp Res*. 2004; 5:9.

Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev.* 2000;173:39–51.

Zuckermann A, Klepetko W, Birsan T. Comparison between mycophenolate mofetil- and azathioprine-based immunosuppressions in clinical lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1999; 18:432.