

Ângela da Silva Battochio

**Efeito do paclitaxel associado a nanoemulsões lipídicas sobre o processo
inflamatório peribrônquico e perivascular após transplante pulmonar
unilateral esquerdo em ratos**

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

Programa de: Cirurgia Torácica e
Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Rogerio Pazetti

SÃO PAULO

2022

Ângela da Silva Battochio

**Efeito do paclitaxel associado a nanoemulsões lipídicas sobre o processo
inflamatório peribrônquico e perivascular após transplante pulmonar
unilateral esquerdo em ratos**

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

Programa de: Cirurgia Torácica e
Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Rogerio Pazetti

SÃO PAULO

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Battochio, Ângela da Silva
Efeito do paclitaxel associado a nanoemulsões
lipídicas sobre o processo
inflamatório peribrônquico e perivascular após
transplante pulmonar unilateral esquerdo em ratos /
Ângela da Silva Battocchio. -- São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientador: Rogerio Pazetti.

Descritores: 1.Transplante de pulmão 2.Lesão de
isquemia e reperfusão 3.Bronquiolite obliterante
4.Nanopartículas 5.Paclitaxel 6.Metotrexato
7.Inflamação

USP/FM/DBD-145/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Sirlene Battochio, que não só me deu a vida, como sempre lutou pela minha educação e me proporcionou, com muito esforço, a oportunidade de começar e terminar a faculdade de Ciências Biológicas. Sempre esteve presente nas horas difíceis para me apoiar e me acalmar em meus surtos de ansiedade.

Ao meu irmão, Giancarlo Battochio, que me ajudou em tudo o que podia, principalmente com meu computador, que deu problemas diversas vezes.

Ao meu noivo, Fernando Gatera, que esteve presente comigo nas apresentações, me ouviu quando precisei, e sempre me deu apoio e coragem para seguir em frente. E que entendeu quando precisei me afastar para me dedicar aos estudos.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Rogério Pazetti, que me deu oportunidade de começar uma iniciação científica e prosseguir com a pós-graduação, estando presente durante todo esse período. Sua experiência foi imprescindível para que o trabalho fosse concluído.

Aos meus amigos, Francine e Aristides, que me ajudaram não só na minha iniciação científica, mas também a passar por essa nova etapa da minha vida, tirando minhas dúvidas e me dando sugestões.

Às minhas amigas de faculdade, Elizabete e Cecília, que me apresentaram ao Rogério, dando uma ajuda ao meu ingresso na iniciação científica.

Às funcionárias do INCOR, Elaine, Priscila e Carol, que me ajudaram a preparar as lâminas histológicas e os testes de Western Blot e PCR.

Às funcionárias do LIM 03 – Laboratório de Medicina Laboratorial, Caroline e Alcione, que me ajudaram com os testes de gasometria, hemograma e bioquímica.

Aos professores Paulo Cardoso e Sônia Soto, pelas orientações e sugestões.

Às minhas amigas, Liliane e Vanessa, que me acompanharam nas aulas e pudemos tirar dúvidas e estudar juntas, além de me cederem espaço para corar as lâminas.

Ao Luiz Afonso e Davi, pela ajuda com os animais no biotério, e por me socorrerem sempre que alguma coisa dava errada.

Ao professor Henrique Moriya, que me auxiliou com o ventilador mecânico dos animais, quando o mesmo começou a dar problemas e a atrasar o trabalho.

Aos meus amigos que me apoiaram, acreditaram e sempre estiveram dispostos a me oferecer uma mão amiga.

Agradeço o apoio financeiro da FAPESP, do CNPQ, da CAPES e do HCFMUSP para a realização deste trabalho.

Esta dissertação ou 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. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| LISTA DE FIGURAS | 0 |
| LISTA DE GRÁFICOS | 0 |
| LISTA DE TABELAS | 0 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | 0 |
| RESUMO | 2 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUÇÃO | 2 |
| 1.1 Transplantes | 2 |
| 1.2 Lesão de isquemia e reperfusão | 4 |
| 1.3 Bronquiolite obliterante pós transplante pulmonar..... | 5 |
| 1.4 Estudos realizados | 7 |
| 1.5 Paclitaxel | 8 |
| 1.6 Metotrexato | 11 |
| 1.7 Nanopartículas ricas em colesterol..... | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 Principal..... | 17 |
| 2.2 Secundário | 17 |
| 3. MÉTODOS | 19 |
| 3.1 Delineamento experimental | 19 |
| 3.2 Animais e dieta..... | 20 |
| 3.3 Preparo da nanoemulsão lipídica LDE e incorporação do paclitaxel | 21 |
| 3.4 Preparo da nanoemulsão lipídica LDE e incorporação do metotrexato | 21 |
| 3.5 Procedimento cirúrgico..... | 22 |
| 3.5.1 Doadores..... | 22 |
| 3.5.2 Receptores | 25 |
| 3.6 Avaliação da mecânica pulmonar | 26 |
| 3.7 Gasometria | 26 |
| 3.8 Parâmetros bioquímicos | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 3.9 Eutanásia..... | 27 |
| 3.10 Histologia | 27 |
| 3.11 Expressão gênica | 28 |
| 3.12 Expressão proteica por Western Blot (WB)..... | 31 |
| 3.13 Análise estatística..... | 32 |
| 4. RESULTADOS | 34 |
| 4.1 Gasometria | 34 |
| 4.2 Bioquímica | 34 |
| 4.3 Hemograma | 36 |
| 4.4 Mecânica ventilatória..... | 37 |
| 4.5 Histologia | 38 |
| 4.6 Expressão gênica | 39 |
| 4.7 Expressão proteica..... | 40 |
| 5. DISCUSSÃO | 43 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 50 |
| 7. REFERÊNCIAS | 52 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Diagrama dos grupos | 20 |
| Figura 2 - Linha do tempo da metodologia. | 20 |
| Figura 3 – Esternotomia para exposição do bloco cardiopulmonar. C: coração; PD: pulmão direito; PE: pulmão esquerdo; VC: veia cava. | 23 |
| Figura 4 – Preservação dos pulmões com Perfadex por meio de cânula introduzida no tronco pulmonar (ABREU, 2013). C: coração; PD: pulmão direito; PE: pulmão esquerdo. | 24 |
| Figura 5 – Visão ao estereomicroscópio (8x) da etapa finalizada de implante do enxerto (ABREU, 2013)..... | 25 |
| Figura 6 – Representação da visualização de uma lâmina histológica de pulmão de rato com uso de uma ocular reticulada (50 retas e 100 pontos). | 28 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|-----------------------------------|----|
| Gráfico 1: Gasometria..... | 35 |
| Gráfico 2: Bioquímica..... | 36 |
| Gráfico 3: Hemograma..... | 37 |
| Gráfico 4: Histología..... | 39 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Receptores celulares e mediadores inflamatórios e proliferativos a serem analisados por qRT-PCR, e suas respectivas identificações dos ensaios TacMan. | 30 |
| Tabela 2 - Receptores celulares e mediadores inflamatórios, apoptóticos e proliferativos analisados por WB. | 32 |
| Tabela 3 - Parâmetros gasométricos. Valores expressos em média \pm DP. | 34 |
| Tabela 4 - Parâmetros bioquímicos. Valores expressos em média \pm DP. | 35 |
| Tabela 5 - Parâmetros hematológicos. Valores expressos em Média \pm DP. ... | 36 |
| Tabela 6 - Mecânica ventilatória imediata. Valores expressos em Média \pm DP. | 38 |
| Tabela 7 - Mecânica ventilatória 1h. Valores expressos em Média \pm DP. | 38 |
| Tabela 8 - Histologia. Valores expressos em média \pm DP. | 38 |
| Tabela 9 - Expressão gênica. Valores expressos em média \pm DP. | 39 |
| Tabela 10 - Expressão proteica. Valores expressos em média \pm DP. | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|-------------------|---------------------------------------|
| ACTB | Beta actina |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BCL2 | <i>B-cell lymphoma 2</i> |
| BO | Bronquiolite obliterante |
| CASP | Caspase |
| cCa ²⁺ | Concentração de cálcio ionizado |
| cCl ⁻ | Concentração de cloreto |
| CD3 | <i>Cluster of differentiation 3</i> |
| CD68 | <i>Cluster of differentiation 68</i> |
| cGlu | Concentração de glicose |
| cK ⁺ | Concentração de potássio |
| cLac | Concentração de lactato |
| cNa ⁺ | Concentração de sódio |
| Cre | Creatinina |
| Ct | <i>Cycle threshold</i> |
| DDP4 | Dipeptidil peptidase |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| ERNs | Espécies reativas de nitrogênio |
| FEF 25-75% | Fluxo Expiratório Forçado Médio |
| G | Gauge |
| GAPDH | Gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase |
| GGT | Glutamil transferase |
| Gtis | Resistência de tecido |
| Htis | Elastância de tecido |
| ICAM | Molécula de adesão intercelular |
| IL | Interleucina |
| IQ | Interquartil |

| | |
|--------------|---|
| LDL | Nanopartículas ricas em colesterol |
| LDE | Lipoproteína de baixa densidade |
| LDLr | Receptor da lipoproteína de baixa densidade |
| MCP1 | Proteína de quimioatração de monócitos 1 |
| MMP2 | Metaloproteinase 2 da matriz |
| MTX | Metotrexato |
| NF-K β | Fator nuclear kappa beta |
| PCNA | Antígeno nuclear de proliferação celular |
| pCO 2 | Pressão parcial de gás carbônico |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PEEP | Pressão positiva expiratória final |
| pH | Potencial de íons hidrogênio |
| pO 2 | Pressão parcial de oxigênio |
| PTX | Paclitaxel |
| Rn | Resistência das vias aéreas |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> |
| TNF α | Fator de necrose tumoral alfa |
| Tx | Transplante |
| uR | Uréia |
| VCAM | Molécula de adesão celular vascular |
| VEF1 | Volume expiratório forçado em 1 segundo |
| WB | Western blot |

RESUMO

RESUMO

Battochio AS. *Efeito do paclitaxel associado a nanoemulsões lipídicas sobre o processo inflamatório peribrônquico e perivascular após transplante pulmonar unilateral esquerdo em ratos*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022. 59P.

Introdução: O transplante é a única opção terapêutica para o tratamento de diversas doenças pulmonares em estado avançado. Uma barreira para seu sucesso é a lesão de isquemia e reperfusão, um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento da bronquiolite obliterante. O paclitaxel e o metotrexato são fármacos conhecidos por inibirem a proliferação celular e possuírem efeito anti-inflamatório, e a associação destes fármacos com nanopartículas ricas em colesterol (LDE) se mostrou benéfica no tratamento de outros órgãos transplantados. **Objetivo:** Avaliar se o paclitaxel e o metotrexato atenuam a lesão de isquemia e reperfusão em um modelo de transplante pulmonar em ratos. **Métodos:** Foram utilizados 53 ratos para a realização de 24 transplantes, sendo 4 no grupo Basal e 10 em cada um dos grupos Controle e Droga. O grupo Sham foi composto por 5 animais intactos. Vinte e quatro horas antes da cirurgia, os doadores e receptores foram tratados com LDE-paclitaxel e LDE-metotrexato, respectivamente. Doze horas antes do transplante, os pulmões doadores do grupo Droga foram perfundidos com solução de preservação com adição de LDE-paclitaxel. Após 12 horas de isquemia fria, os pulmões foram transplantados e reperfundidos por uma hora. Os animais do grupo Controle foram tratados da mesma forma, sendo administrada apenas a LDE. Foram analisados os dados de mecânica ventilatória, gasometria, hemograma, bioquímica, histologia e análise de expressão gênica e proteica de marcadores inflamatórios, apoptóticos e proliferativos. **Resultados:** Houve aumento de eritrócitos e diminuição de linfócitos no sangue dos animais receptores de todos os grupos submetidos ao transplante, os quais apresentaram aumento da oxigenação e do lactato e diminuição do gás carbônico. Houve aumento de ureia e creatinina nesses mesmos grupos. Os pulmões transplantados

apresentaram significativo edema perivascular e hemorragia, o que não resultou em diferença entre os grupos em relação aos parâmetros ventilatórios. Por fim, não houve diferença entre os grupos quanto aos marcadores avaliados, com exceção da expressão gênica diminuída de TLR4 no grupo Droga. Conclusão: As drogas testadas não foram eficazes em atenuar os efeitos da lesão de isquemia e reperfusão neste modelo animal.

Descritores: Transplante de pulmão; Lesão de isquemia e reperfusão; Bronquiolite obliterante; Nanopartículas; Paclitaxel; Metotrexato; Inflamação.

ABSTRACT

ABSTRACT

Battochio AS. *Effect of paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions on peribronchial and perivascular inflammatory process after unilateral lung transplantation on rats.* [Thesys]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022. 59P

Introduction: Transplantation is the only therapeutic option for the treatment of several advanced lung diseases. A barrier to its success is ischemia and reperfusion injury, one of the factors responsible for the development of bronchiolitis obliterans. Paclitaxel and methotrexate are drugs known to inhibit cell proliferation and have an anti-inflammatory effect, and the association of these drugs with cholesterol-rich nanoparticles (LDE) has been shown to be beneficial in the treatment of other transplanted organs. Objective: To assess whether paclitaxel and methotrexate attenuate ischemia-reperfusion injury in a rat lung transplant model. Methods: 53 rats were used to perform 24 transplants, 4 in the Basal group and 10 in each of the Control and Drug groups. The Sham group consisted of 5 intact animals. Twenty-four hours before surgery, donors and recipients were treated with LDE-paclitaxel and LDE-methotrexate, respectively. Twelve hours before transplantation, donor lungs from the Drug group were perfused with a preservation solution with the addition of LDE-paclitaxel. After 12 hours of cold ischemia, the lungs were transplanted and reperfused for one hour. The animals in the Control group were treated in the same way, with only LDE being administered. Data from ventilatory mechanics, blood gas analysis, blood count, biochemistry, histology and analysis of gene and protein expression of inflammatory, apoptotic and proliferative markers were analyzed. Results: There was an increase in erythrocytes and a decrease in lymphocytes in the blood of the recipient animals of all groups submitted to transplantation, which showed an increase in oxygenation and lactate and a decrease in carbon dioxide. There was an increase in urea and creatinine in these same groups. The transplanted lungs showed significant perivascular edema and hemorrhage, which did not result in

a difference between the groups in terms of ventilatory parameters. Finally, there was no difference between the groups regarding the markers evaluated, with the exception of the decreased gene expression of TLR4 in the Drug group. Conclusion: The tested drugs were not effective in attenuating the effects of ischemia and reperfusion injury in this animal model.

Keywords: Lung transplantation; Ischemia and reperfusion injury; bronchiolitis obliterans; nanoparticles; Paclitaxel; Methotrexate; Inflammation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transplantes

Foi no início do século XX que as técnicas de transplante (Tx) de órgãos, e que são utilizadas até hoje, começaram a surgir (JATENE et al., 2009). Alexis Carrel foi quem efetuou Tx de coração e pulmão ortotópicos em animais pequenos, visando demonstrar a viabilidade de anastomoses arteriais e venosas (JATENE et al., 2009). Na década de 1940, Demikhov conseguiu demonstrar, em um de seus Tx de pulmão e coração em cães, a viabilidade da técnica, além de ser o primeiro a realizar Tx intratorácicos de coração e pulmão (JATENE et al., 2009; MENDELOFF, 2002). Henri Metras, no início da década de 1950, foi o responsável por descrever técnicas cirúrgicas, algumas das quais são utilizadas ainda hoje (JATENE et al., 2009). Dez anos depois, um estudo da Universidade do Mississippi, que incluiu mais de 400 Tx em cães, conseguiu controlar a rejeição dos órgãos com o uso de drogas imunossupressoras (JATENE et al., 2009).

O primeiro Tx pulmonar humano foi realizado em 1963, em um paciente com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e carcinoma espinocelular do pulmão esquerdo (DALTON, 1995; JATENE et al., 2009). Apesar da melhora da função pulmonar do paciente, o mesmo faleceu após 18 dias por insuficiência renal progressiva (DALTON, 1995; JATENE et al., 2009). Após esse Tx, outros centros começaram a se interessar pelo procedimento, fazendo com que, nos 15 anos seguintes, outros 40 Tx de pulmão fossem realizados (JATENE et al., 2009).

Inicialmente obtendo resultados abaixo do esperado, os Tx tinham como obstáculo as altas doses de corticoides, utilizadas para imunossupressão, as quais geravam efeitos adversos na cicatrização da anastomose brônquica (JATENE & PEGO-FERNANDES, 2008; JATENE et al., 2009). Em 1970 foi isolado o extrato fúngico com propriedades imunossupressoras que levou à descoberta da ciclosporina, evento crucial para a mudança da realidade dos Tx na época (MENDELOFF, 2002). Após Tx

experimentais na década de 1980, foram descobertos os benefícios da ciclosporina, cujo uso aumentava extraordinariamente a sobrevida do enxerto, demonstrando-se mais eficiente que os corticoides, e tornando, assim, os Tx uma alternativa real (JATENE & PEGO-FERNANDES, 2008; JATENE et al., 2009; MENDELOFF, 2002.; PAZETTI, 2006).

Apesar de uma das mais antigas, a ciclosporina está ainda entre as substâncias anti-inflamatórias e imunossupressoras mais utilizadas, não só pelos centros de transplantação, como também nos testes com diferentes modelos animais de Tx, incluindo camundongos, ratos, coelhos, cães, porcos e primatas não humanos. A sua eficácia em prevenir ou atenuar as alterações teciduais relacionadas ao desenvolvimento da bronquiolite obliterante (BO) foi observada em diversos estudos, os quais relataram a redução da fibroproliferação e da perda de células epiteliais, além de menor grau de infiltrado de células mononucleares (KING et al., 1997; YONAN et al., 1998; ROPPONEN et al., 2011).

Contudo, estabelecer a dose de ciclosporina é um desafio, visto que a mesma deve ser eficaz, mas se for muito alta pode causar danos tóxicos nos tecidos. Devido a isso, surge a necessidade de buscar outras substâncias que não causem efeitos tóxicos aos tecidos, mas que consigam interferir nos mecanismos que desencadeiam a BO e impedir que ocorra a fibroproliferação, tanto no interior dos bronquíolos respiratórios, quanto nas veias e artérias pulmonares. Trabalhos anteriores envolvendo problemas similares em outros órgãos podem ajudar nessa busca.

Nas últimas décadas, os avanços nas técnicas cirúrgicas, regimes imunossupressores, cuidados com a preservação do enxerto, dentre outros, fizeram com que os índices de sobrevida dos pacientes transplantados atingissem, atualmente, cerca de 80% no primeiro ano após a cirurgia (CHRISTIE et al., 2012).

Hoje em dia, o Tx de pulmão é a única alternativa no tratamento de diversas doenças em fase avançada de desenvolvimento (CHRISTIE et al., 2012). A fibrose pulmonar idiopática e fibrose cística são exemplos de doenças que levam o paciente ao Tx pulmonar (CHRISTIE et al., 2012). Contudo, o sucesso da cirurgia é prejudicado por diversos fatores no período pós-

operatório mais tardio, fazendo com que a sobrevida dos pacientes seja de apenas 53% e 30% após 5 e 10 anos, respectivamente (CHRISTIE et al., 2012).

Apesar dos avanços alcançados no Tx, ainda há barreiras que impedem seu sucesso, sendo a lesão de isquemia e reperfusão (IR), conhecida também como disfunção primária do enxerto (DPE) quando em sua forma clínica grave (ABREU, 2013), uma das principais. Sendo uma das causas significativas de morbidade e mortalidade precoce após o Tx, ela é um processo patológico multifacetado, caracterizada por causar danos alveolares, edema pulmonar e hipoxemia em pacientes submetidos a qualquer procedimento que perturbe a perfusão de órgãos (PERROT et al., 2003; WEYKER et al., 2013).

1.2 Lesão de isquemia e reperfusão

Quando o suprimento de oxigênio não atende à demanda metabólica, seja por fluxo sanguíneo limitado ou baixa ventilação, o órgão afetado pode sofrer a lesão de isquemia (WEYKER et al., 2013). Esse desequilíbrio metabólico pode ocorrer em dois casos. O primeiro é quando apenas o suprimento de sangue é interrompido, mas ainda há ventilação pulmonar, como no caso da hipertensão pulmonar primária (TEMPLETON & GARROT, 1967; WEYKER et al., 2013). O segundo caso envolve a interrupção do fluxo sanguíneo e ventilatório, conhecido como isquemia anóxica (WEYKER et al., 2013). Este último caso é o encontrado nos transplantes.

Com baixa oferta de oxigênio, ocorre uma diminuição na síntese e ressíntese de adenosina trifosfato (ATP) que leva a uma diminuição no transporte ativo do cálcio para o exterior das células, gerando um acúmulo de cálcio citoplasmático levando à ativação de uma protease que converte xantina desidrogenase em xantina oxidase (ABREU, 2013). Outro evento que ocorre simultaneamente é o acúmulo de adenosina monofosfato, o qual sofrerá degradação em substâncias como adenosina, inosina e hipoxantina (ABREU, 2013).

A reperfusão do órgão consiste em uma das etapas do Tx pulmonar, onde os fluxos sanguíneos e ventilatórios são reestabelecidos no órgão transplantado. Contudo, a reperfusão pode causar ainda mais danos, como edema pulmonar e hipoxemia (den HENGST et al., 2010). Isso se dá, pois a enzima xantina oxidase, que em situações normais seria degradada em ácido úrico, por ocasião da reperfusão do órgão, ao entrar em contato com o oxigênio, transforma a hipoxantina em espécies reativas de oxigênio (EROs), (ABREU, 2013; den HENGST et al., 2010).

A lesão de IR envolve alterações moleculares, celulares e bioquímicas (ABREU, 2013). Diversos mecanismos desencadeiam alterações morfofuncionais, caracterizadas por aumento da resistência vascular e permeabilidade capilar pulmonar, os quais levam ao edema, prejudicando a troca gasosa (ABREU, 2013; den HENGST et al., 2010).

Dentre as alterações fisiológicas, podemos destacar as EROs, que são geradas pelos macrófagos e células endoteliais durante o período de isquemia (den HENGST et al., 2010). As EROs induzem a produção de citocinas pró inflamatórias e das espécies reativas de nitrogênio (ERNs), radicais livres altamente tóxicos (den HENGST et al., 2010). Após a reperfusão, as EROs e as citocinas ativam neutrófilos, resultando em danos vasculares responsáveis pelo aumento da resistência vascular e permeabilidade microvascular citados acima (den HENGST et al., 2010). Além disso, pacientes com a lesão de IR perioperatória possuem um maior risco de desenvolver a síndrome de BO (FISER et al., 2002; PARADIS, 1998).

1.3 Bronquiolite obliterante pós transplante pulmonar

Surgindo como uma resposta de reparo a danos causados no endotélio e epitélio por células imunes e inflamatórias, a BO é a terceira (4,6%) principal causa de morte no primeiro ano após o Tx pulmonar, e a primeira (26%) após este período (CHRISTIE et al., 2012; PARADIS, 1998).

Embora seu diagnóstico seja baseado na histologia, sua comprovação por esse meio é difícil de se obter quando utilizadas biópsias

pulmonares transbrônquicas (ESTENNE & HERTZ, 2002). Devido a isso, em 1993, a *International Society for Heart and Lung Transplantation* patrocinou um comitê para que uma descrição mais eficaz da BO fosse estabelecida, baseada no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF 1) (COOPER JD et al., 1993; ESTENNE & HERTZ, 2002). Apesar de ser um descritor útil, sua capacidade de detectar pequenas alterações na função pulmonar levantou certa preocupação, o que levou a uma nova formulação do sistema de classificação da BO, definido como uma diminuição nas taxas de fluxo expiratório forçado médio (FEF 25-75) e/ou VEF1 (ESTENNE & HERTZ, 2002).

A BO pode ocorrer por diversos fatores, entre eles tem-se o dano direto ou indireto ao enxerto por isquemia ou agentes infecciosos, como citomegalovírus (PARADIS, 1998). Entre todos os fatores que podem levar à BO, a rejeição aguda é o mais significativo; contudo, pacientes com essa rejeição podem não desenvolver BO, assim como pacientes que nunca a tiveram possam desenvolver a síndrome (ESTENNE & HERTZ, 2002; PARADIS, 1998).

Clinicamente, as características da BO são a obstrução progressiva e irreversível das vias aéreas distais e o decréscimo acentuado do VEF1 (ESTENNE & HERTZ, 2002; NAKAJIMA et al., 2011). Histopatologicamente, em um quadro de BO é possível se observar um intenso infiltrado linfocitário peribronquiolar, aumento das células mesenquimais das vias aéreas, aumento da deposição de matriz extracelular, e uma densa cicatriz fibrosa na lâmina própria e no lúmen dos bronquíolos respiratórios (NAKAJIMA et al., 2011). Além disso, a BO também pode ser a responsável por causar esclerose vascular nas veias e artérias pulmonares (JARAMILLO et al., 2005).

O tratamento consiste, principalmente, no aumento das doses de medicamentos imunossupressores. No entanto, pacientes podem vir a sofrer uma carga cumulativa de imunossupressão intensa, ainda havendo a possibilidade comum da reativação da BO (ESTENNE & HERTZ, 2002). Apesar dos esforços, as terapias limitam-se em interromper a progressão da síndrome, não havendo maneiras de restauração da função pulmonar perdida, levando os receptores a desenvolverem uma limitação respiratória grave (ESTENNE & HERTZ, 2002). Embora o retransplante seja uma opção para

esses pacientes, a disponibilidade limitada de pulmões doados acaba sendo uma barreira (ESTENNE & HERTZ, 2002).

A fisiopatologia da BO é complexa e multifatorial, e esse é o motivo de sua prevenção ou tratamento se tornarem grandes desafios. Assim, sua resolução, ou amenização, aumentaria a taxa de sucesso do Tx pulmonar (TODDY & PALMER, 2011). Muitas evidências apontam que as respostas imunológicas celulares e humorais, agravadas por processos inflamatórios associados às infecções e à IR, têm um papel fundamental no desenvolvimento da BO (FISER et al., 2002; JARAMILLO et al., 2005; PARADIS, 1998).

1.4 Estudos realizados

Diversos modelos *in vivo* e *in vitro* têm sido utilizados com o fim de investigar a influência de substâncias anti-inflamatórias e imunossupressoras sobre o desenvolvimento da IR e da BO. Algumas drogas que vêm obtendo a curiosidade dos pesquisadores com relação a seus efeitos na inflamação são os inibidores de dipeptidil peptidase 4 (DPP4), uma enzima que, aparentemente, tem sua expressão influenciada pelo estado hipóxico de células e órgãos (MATHEEUSSEN, JUNGRAITHMAYR & de MEESTER, 2012). Parte da investigação acerca destes inibidores de DPP4 no cenário de IR deve-se ao uso no tratamento de diabetes tipo 2, já que os novos agentes antidiabéticos possuem como objetivo secundário o melhoramento do desfecho cardiovascular (MATHEEUSSEN, JUNGRAITHMAYR & de MEESTER, 2012). Devido ao quadro da lesão de IR se iniciar devido a hipóxia tecidual, gerou-se a curiosidade de monitorar essa enzima durante o estudo.

Os principais modelos de estudo da BO são o Tx pulmonar unilateral esquerdo e o Tx traqueal heterotópico, ambos realizados em ratos e em camundongos. Devido à sua facilidade de realização e menor índice de morbidade e mortalidade, o Tx traqueal é o mais utilizado; contudo, o modelo de Tx pulmonar unilateral em ratos é o que melhor se aproxima da prática clínica e cirúrgica em humanos (BEDI et al., 2010). Assim, optamos por escolher o modelo de Tx pulmonar unilateral.

Diversos fatores estão envolvidos em relação à severidade da IR, entre eles podemos destacar a preservação do órgão, a qual, se for feita de maneira correta, pode aumentar a qualidade do órgão e diminuir a IR (MENEZES et al., 2012). Dentre as soluções com baixo teor de potássio, classificadas como soluções do tipo extracelular, as mais comumente utilizadas em transplantes pulmonares são o Perfadex e o Celsior, embora a segunda solução de preservação tenha sido desenvolvida originalmente para coração (MENEZES et al., 2012). Devido ao nosso laboratório estar mais habituado a fazer transplantes utilizando o Perfadex como solução de preservação, e pelo fato desta ser originalmente feita para preservação de pulmão, optamos por utilizar o Perfadex neste estudo.

1.5 Paclitaxel

Sendo um dos primeiros taxanos utilizados em ensaios clínicos, o paclitaxel (PTX) é um derivado diterpenóide do *Taxus brevifolia*, descoberto durante um programa de larga escala, em que milhares de plantas foram analisadas com o intuito de testar suas atividades anticancerígenas (CONTRERAS, 2010; ROWINSKY & DONEHOWER, 1995). Um dos mais importantes agentes anticancerígenos provindos de produtos naturais, o PTX é o primeiro composto com um anel de taxano, que descobriu-se possuir atividade antineoplásica (ROWINSKY, CAZENAVE & DONEHOWER, 1990), cuja fórmula química é $C_{47}H_{51}NO_{14}$ (Figura 1).

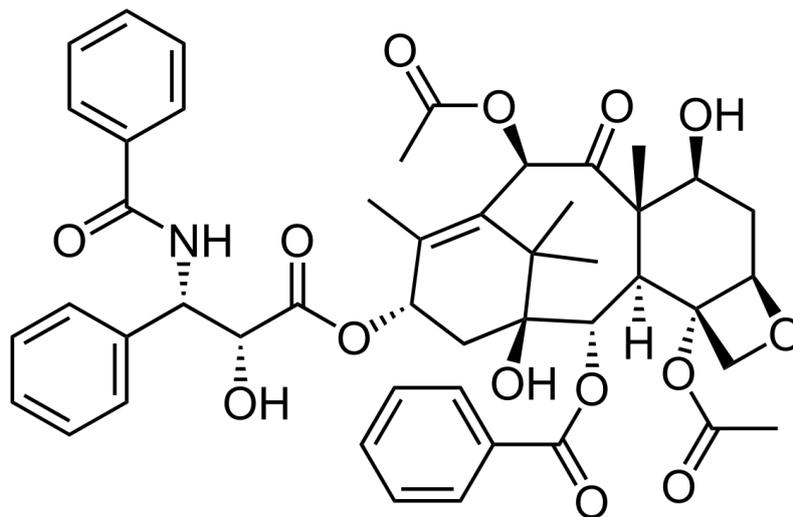


Figura 1 – Fórmula química do PTX

O desenvolvimento do PTX como agente antineoplásico foi lento e com baixo interesse devido à sua escassez, dificuldade de isolamento, extração e preparação em larga escala (ROWINSKY, CAZENAVE & DONEHOWER, 1990).

Mesmo com atividades antiproliferativas promissoras, ainda havia o problema de sua baixa solubilidade aquosa, o que dificultava o desenvolvimento de uma fórmula clínica (ROWINSKY, CAZENAVE & DONEHOWER, 1990). Foram dois fatores que incentivaram o retorno das pesquisas envolvendo o PTX: estudos que descobriram os efeitos da droga nos microtúbulos; e o levantamento de suprimentos adequados, por parte do *National Cancer Institute*, para triagem pré-clínica convencional, estudos toxicológicos e ensaios clínicos preliminares (ROWINSKY, CAZENAVE & DONEHOWER, 1990; SCHIFF, FANT & HORWITZ, 1979; SCHIFF & HORWITZ, 1980).

Acredita-se que os microtúbulos apenas desempenhem função importante durante a mitose; contudo, eles também têm funções como manutenção da forma celular, motilidade e ligação celular, e no transporte intracelular (ROWINSKY, CAZENAVE & DONEHOWER, 1990).

A ação antiproliferativa do PTX se dá através de seus efeitos farmacológicos. Ao contrário de outros agentes que atuam nos microtúbulos,

como colchicina e alcaloides da vinca, cuja ação induz a desmontagem dos mesmos, o PTX promove sua montagem (ROWINSKY, CAZENAVE & DONEHOWER, 1990; SCHIFF, FANT & HORWITZ, 1979; SCHIFF & HORWITZ, 1980). Uma vez ligada aos microtúbulos, a droga induzirá a polimerização das tubulinas, tornando-os extremamente estáveis e disfuncionais, bloqueando, então, a divisão celular nas fases G₂/M, e, por fim, ocasionando a morte das células devido à quebra da dinâmica normal. (CONTRERAS, 2010, ROWINSKY & DONEHOWER, 1995).

Apesar de ser muito utilizada como uma droga antineoplásica, já foi observado que o PTX pode ser promissor para o tratamento de doenças tais como fibrose renal e hepática, inflamação e doenças de pele, entre outras (ZHANG et al. 2014). Um estudo realizado em camundongos observou que o PTX foi capaz de aliviar a lesão pulmonar causada por sepse, através da supressão da via TLR-4 / NF- κ B por meio da ativação da mucina 1, além de reduzir citocinas inflamatórias (WANG et al. 2019). Apesar desses trabalhos serem promissores, Zhang et al. (2014) apontam que a dose do PTX é muito importante para casos envolvendo inflamação, já que doses mais elevadas induzem inflamação e fibrose.

Um estudo recente menciona o fato de a isquemia fria ocasionar a perda da integridade da barreira endotelial, o que é gerada, em parte, por mudanças no citoesqueleto, incluindo os microtúbulos (SUZUKI et al., 2004). Este mesmo estudo mostrou em seus resultados que a estabilização dos microtúbulos, gerada pelo PTX, foi benéfica para proteção da barreira endotelial, e que, por isso, o uso do PTX juntamente com a solução de preservação poderia ser benéfico em transplantes de pulmão (SUZUKI et al., 2004).

Um dos problemas envolvendo o PTX são seus efeitos tóxicos. Como efeito tóxico principal, pode-se destacar a neutropenia; contudo, a mesma não é cumulativa, o que sugere que as células hematopoiéticas imaturas não são afetadas permanentemente pelo PTX (MCGUIRE et al., 1989; ROWINSKY, CAZENAVE & DONEHOWER, 1990; ROWINSKY & DONEHOWER, 1995). Outros efeitos tóxicos hematológicos encontrados foram

trombocitopenia grave e anemia, embora raramente causados em monoterapia (ROWINSKY & DONEHOWER, 1995).

O PTX também tem efeitos neurotóxicos, como neuropatia periférica, disfunção motora e mialgia transitória, embora a maioria destes sintomas sejam dependentes da dose e tempo de administração da droga, ou da combinação da mesma com outro fármaco (ROWINSKY & DONEHOWER, 1995). Efeitos cardíacos também foram observados, tendo como mais comum a bradicardia transitória assintomática, podendo também ser observados infarto do miocárdio, arritmias atriais e taquicardia ventricular (MCGUIRE et al., 1989; ROWINSKY & DONEHOWER, 1995).

1.6 Metotrexato

O metotrexato (MTX) é uma droga citotóxica, antiproliferativa, imunossupressora e anti-inflamatória, cuja utilização foi introduzida na década de 1940, e sendo amplamente utilizada até os dias de hoje na prática clínica, para o tratamento de tumores, leucemias, artrite reumatoide, entre outras doenças auto imunes (FIORELLI et al., 2017; MOURA et al., 2011; RUBINO, 2001). Sua fórmula química é $C_{20}H_{22}N_8O_5$ (Figura 2).

Desenvolvido por volta da década de 40, ele foi projetado para ser um antagonista ao ácido fólico, tendo ação de inibição na enzima diidrofolato redutase, podendo também inibir a timidilato sintase e a aminoimidazol carboxamiida ribonucleotídeo formil transferase (LIMA, 2017; MOURA et al., 2011). Essas inibições geram uma diminuição da síntese de purina e pirimidina, que são utilizadas durante a síntese e replicação do DNA, e também promove a liberação de adenosina, que inibe a ativação de leucócitos, plaquetas e diminui a produção de citocinas. (BARBIERI, 2016; LIMA, 2017; MARANHÃO et al., 2017; MOURA et al., 2011).

Além disso, a diidrofolato redutase é responsável por atuar nos cofatores do folato reduzido, o que faz com que estudiosos acreditem que as células expostas a essas condições, geradas pelo MTX, morram devido à depleção de folato reduzido (BARBIERI, 2016; CHABNER et al., 1985).

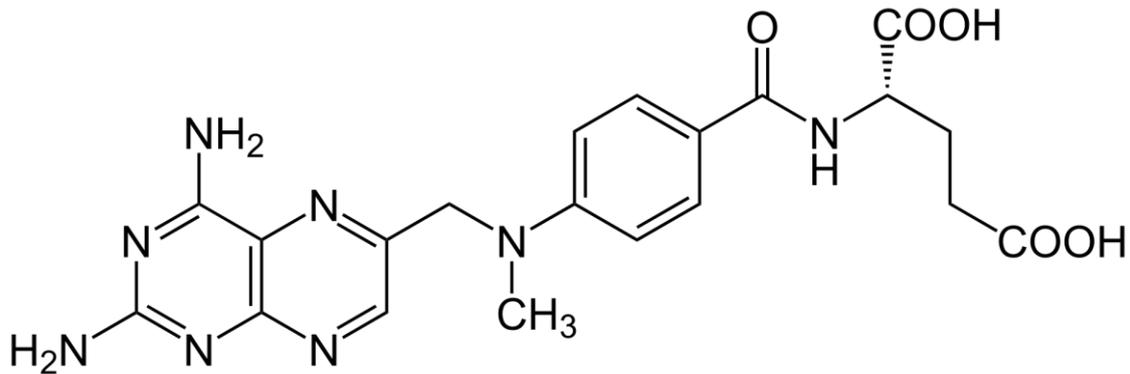


Figura 2 – Fórmula química do MTX

O MTX é transportado para as células por um sistema específico de alta afinidade, devido à sua alta polaridade, que gera dificuldade para atravessar a membrana celular (RUBINO, 2001). Uma vez no organismo, o MTX é distribuído para os órgãos, tendo uma fase de distribuição de 2 horas e uma fase de eliminação de 8 horas (RUBINO, 2001). Contudo, é possível que o receptor de folato celular, o qual internaliza o MTX, possa ser inibido devido a uma defesa natural de resistência a medicamentos (MOURA et al., 2011). Uma das estratégias utilizadas para tentar contornar essa resistência é a modificação química do MTX para melhorar a lipofilicidade; já outros sistemas tentam fazer isso através de carregadores de droga, como nanopartículas de ouro e magnéticas, nanotubos de carbono e nanopartículas lipídicas (MELLO et al., 2016; MOURA et al., 2011).

Outro problema encontrado no uso do MTX é sua toxicidade. Apesar de ser relativamente mais baixa em comparação com outras drogas quimioterápicas, é comprovado também que o MTX gera uma série de efeitos tóxicos ao organismo, podendo levar o paciente a desenvolver urticária, angioedema, hepatite, insuficiência renal, entre outras reações (LIMA, 2017;

MOURA et al., 2011). Devido a esses efeitos, que são gerados pela falta de especificidade do MTX, estudos vêm utilizando veículos que direcionem a droga para a célula alvo, aumentando assim sua eficácia e diminuindo suas reações tóxicas (FIORELLI et al., 2017; LIMA, 2017)

1.7 Nanopartículas ricas em colesterol

Com objetivo de minimizar os efeitos tóxicos dessas drogas, Maranhão et al. (1994) demonstraram que após injeção endovenosa de nanopartículas ricas em colesterol (LDE), estas concentram-se nos tumores malignos. Isto se dá porque a LDE, apesar de ser feita sem proteína, ela adquire no plasma a apo E, captada pelos receptores de LDL (do inglês, *low density lipoprotein*), que estão muito elevados nas células neoplásicas (ADES et al., 2001; GRAZIANI et al., 2002; MARANHÃO et al., 1994; MARANHÃO et al., 2008). Dessa forma, se quimioterápicos de ação antitumoral forem associados à LDE, torna-se possível uma ação quase que exclusiva do fármaco no tecido-alvo, evitando órgãos e tecidos normais.

Devido a isso, estudos pré-clínicos utilizando a LDE demonstraram que não só é possível diminuir drasticamente a toxicidade, como ainda aumentar o efeito farmacológico de quimioterápicos, como a carmustina (MARANHÃO et al., 2002), o etoposídeo (AZEVEDO et al., 2005) e o PTX (RODRIGUES et al., 2005). Em estudos clínicos, mostrou-se uma acentuada redução da toxicidade da carmustina, do etoposídeo e do PTX associados à LDE (MARANHÃO et al., 2002; PINHEIRO et al., 2006; PIRES et al., 2009).

Um estudo envolvendo artrite induzida por antígeno comparou o MTX associado à LDE com o MTX comercial. Neste estudo, o uso de LDE-MTX levou à diminuição do número de leucócitos, quando comparado ao MTX comercial, o que indica que a LDE melhora o efeito farmacológico, havendo a possibilidade de que ela possa interromper os mecanismos de resistência a medicamentos (MELLO et al., 2016).

Uma das descobertas importantes envolvendo a LDE foi de que a mesma pode se concentrar também em lesões ateroscleróticas. Este estudo foi

realizado em coelhos alimentados por uma dieta rica em colesterol, induzindo a aterosclerose. O tratamento dos animais foi feito com o PTX associado à LDE, apresentando uma redução de cerca de 60% no processo de aterogênese, além de não apresentar toxicidade (MARANHÃO et al., 2008). O MTX também foi associado à LDE em outro estudo, resultando em redução das lesões em 65%, proporção equivalente ao estudo anterior (BULGARELLI et al., 2009; VITORIO et al., 2009).

Em outro estudo experimental, foi avaliado se o tratamento com LDE-PTX influenciaria o desenvolvimento da doença vascular coronária do Tx. Neste trabalho, o modelo utilizado foi o de Tx cardíaco heterotópico em coelhos. A LDE foi captada pelo coração exógeno 4 vezes mais que pelo coração nativo, provando sua eficiência em se direcionar ao tecido-alvo (LOURENÇO-FILHO et al., 2011). Os animais tratados com o LDE-PTX apresentaram lúmen arterial 3 vezes mais amplo, infiltração de macrófagos 7 vezes menor, e uma redução de 50% da estenose que afetou os corações transplantados quando comparados aos não tratados. O tratamento foi capaz também de inibir a destruição da camada média e de reduzir a espessura da íntima, além de não apresentar toxicidade, e os corações nativos não apresentaram modificações (LOURENÇO-FILHO et al., 2011).

Em outro estudo, envolvendo também o transplante de coração em coelhos, foi possível notar que o tratamento com o LDE-MTX atenuou a expressão de fatores pró inflamatórios, como TNF- α , VCAM1 e MCP1, e estimulou a expressão de anti-inflamatórios como a IL-10 (FIORELLI et al., 2017). Devido aos resultados destas pesquisas, é esperado que o tratamento com MTX atenuo o processo da lesão de IR tendo uma ação anti-inflamatória através da inibição de fatores pró inflamatórios e estímulo da IL-10. Além disso, é esperado que a droga aja em conjunto com o PTX, e seus efeitos anti proliferativos impeçam, ou reduzam, a obstrução de vias aéreas, causada pela BO.

Gomes et al. (2018) testaram ambas as drogas (MTX e PTX) combinando-as em um tratamento para lesões ateroscleróticas em coelhos. Seus resultados mostram que as drogas agindo simultaneamente, comparadas com o tratamento utilizando apenas PTX, acelerou em 17% a regressão da

lesão, sendo que, a administração apenas do PTX foi capaz de reduzir a área da lesão, mas não alterou a largura da íntima, e o tratamento com MTX e PTX produziu ambos os efeitos. Neste mesmo estudo, foi utilizada também a associação das drogas com o LDE.

Tendo em vista a dificuldade em se encontrar uma solução para o tratamento da BO até o momento, novas alternativas terapêuticas devem ser procuradas no manejo pós-cirúrgico do Tx pulmonar. Neste sentido, baseados na demonstração anterior de que o PTX incorporado à LDE atua de forma potente na regressão da doença vascular do coração transplantado (LOURENÇO-FILHO et al., 2011), julgamos que possa ter o mesmo efeito sobre o tecido pulmonar, impedindo ou atenuando o desenvolvimento da BO após o Tx pulmonar, pela redução do processo inflamatório peribrônquico e perivascular.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Principal

Verificar o efeito do PTX e do MTX associados à LDE sobre o processo inflamatório peribrônquico e perivascular de pulmões de ratos submetidos ao transplante unilateral esquerdo.

2.2 Secundário

- Avaliar a toxicidade da associação de LDE-PTX e LDE-MTX.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

Foram utilizados 53 ratos machos Sprague Dawley, pesando entre 350 e 400g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Este estudo obteve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da FMUSP (085/15).

3.1 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos (Figura 3):

- Grupo Droga (n=10 Tx): 24h antes da cirurgia, os animais doadores receberam 4mg/kg de LDE-PTX por via intraperitoneal, e os receptores receberam 1mg/kg de LDE-MTX da mesma forma. Os pulmões dos doadores foram lavados com 20mL da solução de preservação (Perfadex®, Vitrolife) com adição de 0,5mL de LDE-PTX (SUZUKI et al., 2004).

- Grupo Controle (n=10 Tx): 24h antes da cirurgia, os animais doadores e receptores receberam o mesmo tratamento do grupo Droga, mas a solução administrada foi apenas LDE. Os pulmões dos doadores foram lavados com a solução de preservação com adição apenas da LDE, na mesma proporção do grupo Droga.

- Grupo Basal (n=4 Tx): os animais doadores e receptores não receberam tratamento com drogas, e a solução de preservação não continha nenhuma alteração em sua composição. O procedimento cirúrgico foi igual aos demais.

- Grupo Sham (n=5): os animais não receberam qualquer tratamento nem foram submetidos à cirurgia, sendo apenas anestesiados para coleta de sangue arterial e venoso.

A figura 4 mostra as principais etapas do estudo ao longo do tempo.

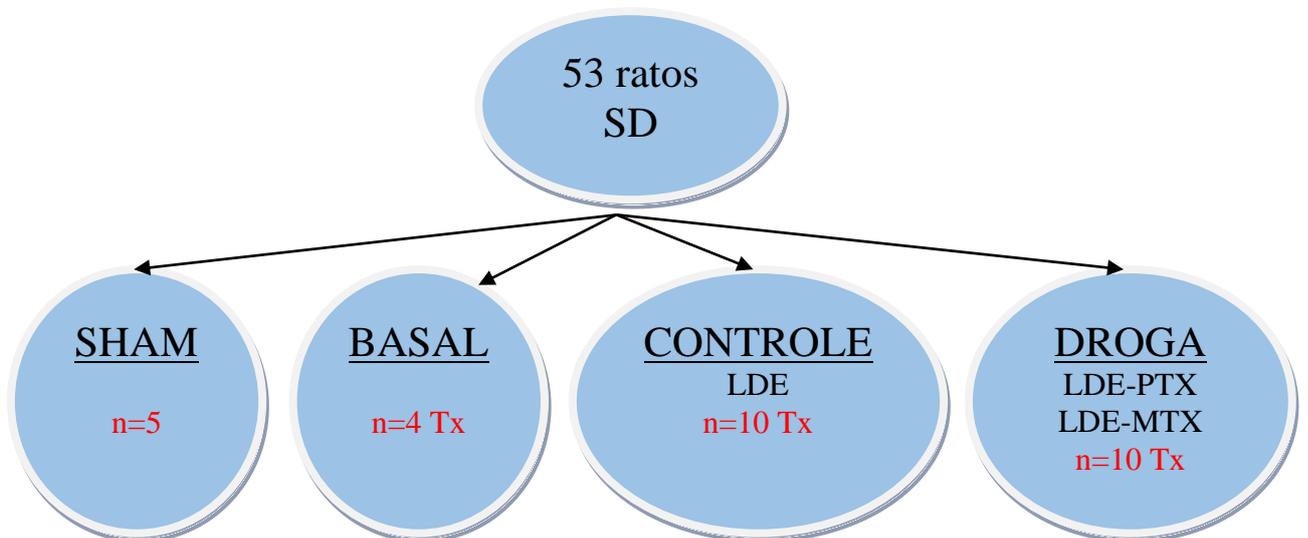


Figura 1 - Diagrama dos grupos

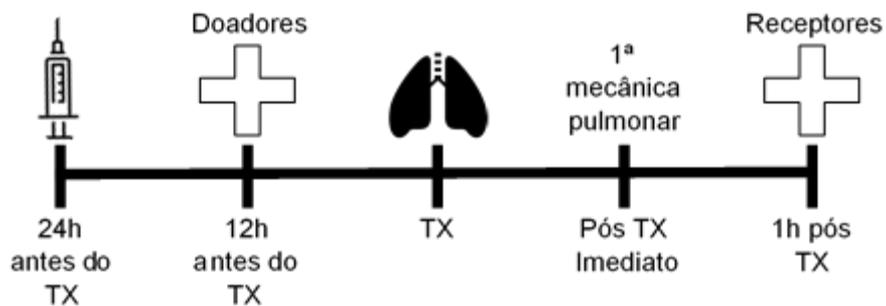


Figura 2 - Linha do tempo da metodologia.

3.2 Animais e dieta

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério do LIM61 até o dia da cirurgia, com ciclo claro:escuro de 12:12 h, e tiveram livre acesso à água filtrada e à ração balanceada (Purina Inc.).

3.3 Preparo da nanoemulsão lipídica LDE e incorporação do paclitaxel

A emulsificação dos lípides foi iniciada adicionando-se solução tampão Tris-HCl (0,001 M e pH 8,05) e o agente tenso ativo Tween80 (Merck, Alemanha) em homogeneizador de alta pressão (Microfluidizer-M110S, Microfluidics™, EUA).

A homogeneização ocorreu entre 30 e 40 minutos à temperatura constante (55-60°C), e o diâmetro das partículas lipídicas foi monitorado pelo equipamento ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern, Reino Unido) durante toda a produção. Para o preparo da LDE associada ao PTX, o fármaco foi adicionado à mistura de lípides na razão de 10:1 de massa de lípides:fármaco.

As preparações foram esterilizadas em filtro Milipore 0,22 µm e armazenadas a 4°C. A quantificação do fármaco associado à LDE foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography) (Shimadzu LC10A, Shimadzu, Japão).

3.4 Preparo da nanoemulsão lipídica LDE e incorporação do metotrexato

Sal sódico de metotrexato (2g, 4,1mmol) foi diluído em 120mL de dimetilsulfóxido, e adicionados carbonato de cério (1,43g, 4,4mmol) e brometo de dodecil (2,5g, 10mmol). A mistura foi agitada por 24 horas em temperatura ambiente, e foram adicionados 100 mL de água para extinguir a reação. O produto foi extraído com clorofórmio (5 x 50mL). A fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de cloreto de sódio (3 x 100mL), seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada. O produto foi purificado com cromatografia líquida em gel de sílica (malha de 230-400) com metanol/clorofórmio, de 2,5% a 100% de metanol. O ponto de fusão foi de 122°C a 124°C. O rendimento foi de 98% (MOURA et al., 2011).

LDE-MTX foi preparado de uma mistura lipídica composta de 100mg de colesteril-oleato, 200mg de fosfatidilcolina de ovo (Lipoid GMBH,

Ludwigshafen, Alemanha), 10mg de triglicérides, 12mg de colesterol, e 60mg de MTX (MELLO et al., 2013). A fase aquosa, que consiste em 100mg de polissorbato 80 (Tween 80, Merck, Hohenbrum, Alemanha) e 10mL de tampão Tris-HCl pH 8,05, foi mantida em temperatura ambiente. A pré-emulsão foi obtida adicionando a fase hidrofílica à fase oleosa por radiação ultrassônica até a dissolução completa do fármaco. A emulsificação de todos os lipídios, MTX e fase aquosa foi obtida por homogeneização a alta pressão, utilizando um homogeneizador Emulsiflex C5 (Avestin Inc, Ottawa, Canada). Após 30-40 minutos de homogeneização sob temperatura constante, a nanoemulsão foi centrifugada a 1800 x g por 15 minutos para separar o MTX não ligado, que se precipita após a centrifugação.

A nanoemulsão foi esterilizada através de passagem por filtro de policarbonato com poros de 0,22 µm (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e mantida a 4°C até ser utilizada. A incorporação do MTX à LDE foi medida antes de sua administração nos animais por cromatografia líquida de alta eficiência. A carga média do medicamento foi de 4mg/mL. Preparado como descrito anteriormente, o diâmetro médio da partícula LDE-MTX foi de 60 nanômetros, medido pelo método de espalhamento de luz laser, utilizando um analisador de potencial zeta (ZetaPALS, Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, Nova Iorque, EUA) (BULGARELLI et al., 2013).

3.5 Procedimento cirúrgico

3.5.1 Doadores

Os animais doadores foram anestesiados em uma câmara com isoflurano 5% (Isothane, Baxter) e entubados orotraquealmente com cânula de polietileno com auxílio de um laringoscópio pediátrico adaptado para roedores. A seguir, a cânula foi conectada a um respirador para pequenos animais (FlexiVent, SCIREQ, Montreal, CA) e a anestesia foi mantida a 2%. Os animais foram mantidos em decúbito dorsal e ventilados com volume corrente de 10 mL/kg, frequência respiratória de 80 ciclos/min e pressão positiva expiratória final (PEEP) de 2 cmH₂O. O pico máximo de pressão traqueal foi mantido em

12 cmH₂O. A anestesia geral foi mantida com isoflurano (2%) distribuído através de um vaporizador de gases (K. Takaoka, mod. 1223).

Após laparotomia mediana, os animais receberam heparina sódica (50 IU) diluída em solução salina (volume total 500 µL) e injetada diretamente na veia cava inferior. A seguir, procedeu-se a abertura da caixa torácica através de esternotomia mediana (Figura 5). Imediatamente antes da perfusão dos pulmões com a solução de preservação (Perfadex®, Vitrolife) com ou sem a adição do PTX, a veia cava inferior foi seccionada para diminuir o retorno venoso, e a aurícula esquerda foi amputada para facilitar a drenagem da solução de preservação. Ambos os procedimentos levaram o animal a óbito. Em seguida, foi realizada uma pequena incisão na parede anterior do ventrículo direito, próximo à emergência do tronco da artéria pulmonar, através da qual foi introduzida uma sonda plástica conectada ao reservatório da solução de preservação. Teve início, então, a perfusão anterógrada dos pulmões com 20 mL de solução a 4°C, sob pressão de 20 cm H₂O (Figura 6).

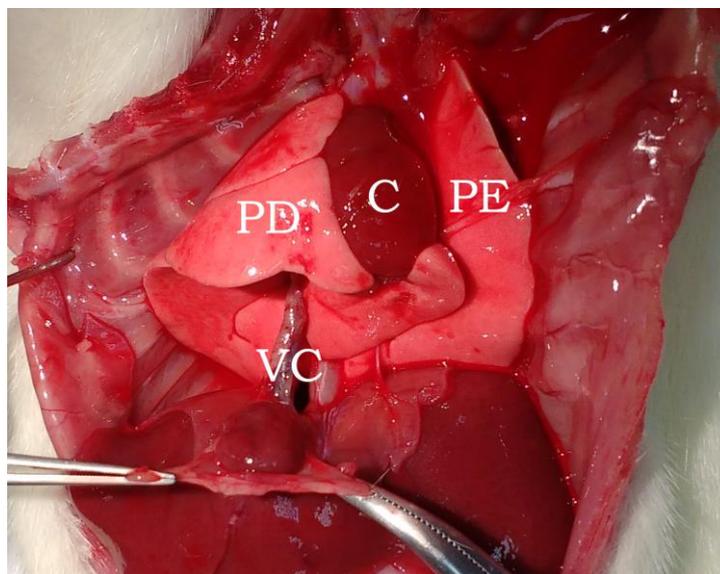


Figura 3 – Esternotomia para exposição do bloco cardiopulmonar. C: coração; PD: pulmão direito; PE: pulmão esquerdo; VC: veia cava.

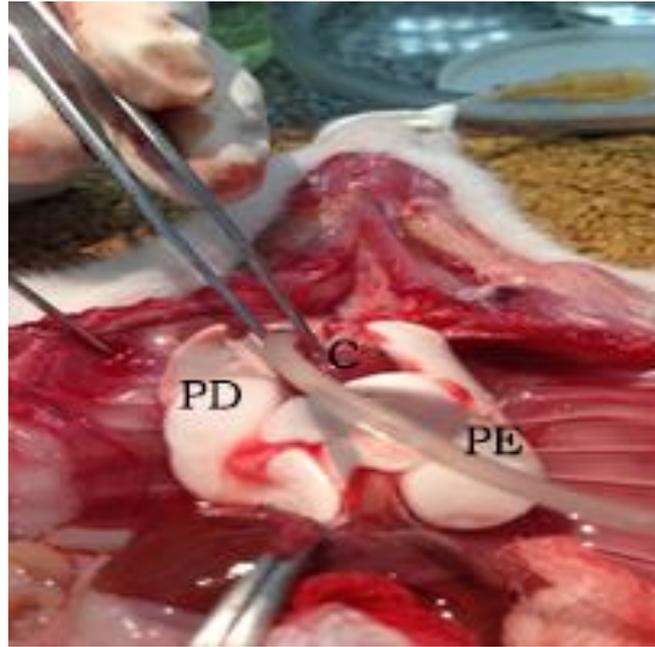


Figura 4 – Preservação dos pulmões com Perfadex por meio de cânula introduzida no tronco pulmonar (ABREU, 2013). C: coração; PD: pulmão direito; PE: pulmão esquerdo.

Após a perfusão, foi feita a retirada do bloco cardiopulmonar com os pulmões mantidos insuflados por meio da oclusão da traqueia ao final da inspiração. O bloco cardiopulmonar foi colocado em placa de Petri contendo gaze umedecida com a mesma solução de preservação a 4°C. O pulmão esquerdo foi coberto com parte dessa gaze para manter a umidade e a temperatura do órgão, bem como para facilitar a dissecação do hilo pulmonar e colocação dos manguitos na artéria, veia e brônquio, conforme técnica descrita previamente (MIZUTA et al., 1989). Os manguitos foram confeccionados a partir de dispositivos para acesso venoso periférico número 16 Gauge (G). Após a colocação dos manguitos, os enxertos foram mantidos em solução de preservação em recipientes fechados e acondicionados em geladeira a 4°C por 12 horas.

3.5.2 Receptores

Os animais foram anestesiados, entubados e ventilados conforme descrito anteriormente para os animais doadores. A seguir, foram posicionados em decúbito lateral direito e submetidos à toracotomia esquerda através de incisão no 5º espaço intercostal. O ligamento inferior foi cuidadosamente rompido para facilitar a exposição do hilo pulmonar através da tração do pulmão. Após a dissecação e clampeamento das estruturas hilares com o auxílio de microscópio estereoscópico (Olympus, mod. SZ61), a ventilação mecânica foi ajustada para 8mL/kg, para amenizar lesões no pulmão direito durante o Tx. O enxerto foi posicionado sobre o pulmão nativo e o implante foi iniciado com uma secção parcial da parede da artéria pulmonar esquerda, progredindo-se o manguito da artéria do doador para o interior da receptora, seguido por fixação das estruturas com fio monofilamentar 7.0. O mesmo procedimento foi realizado para veia e brônquio (Figura 7).

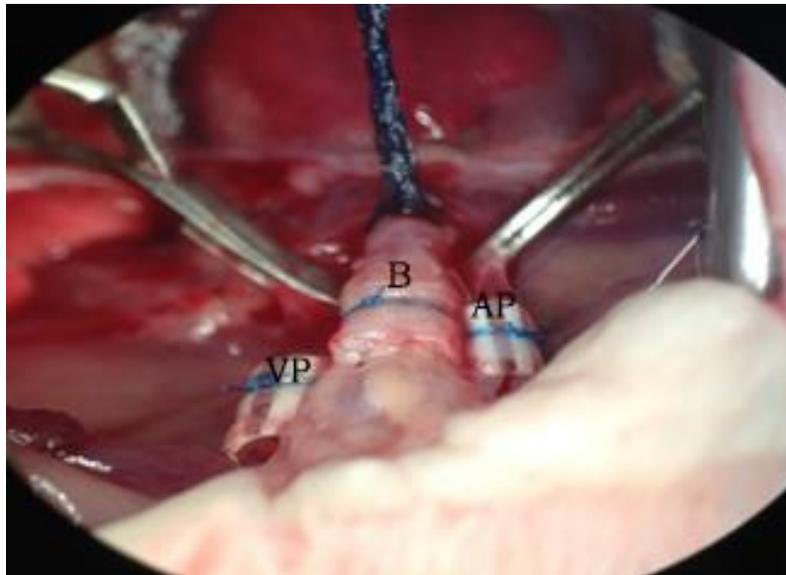


Figura 5 – Visão ao estereomicroscópio (8x) da etapa finalizada de implante do enxerto (ABREU, 2013).

AP: artéria pulmonar; B: brônquio; VP: veia pulmonar.

Após a colocação e fixação dos manguitos, a ligadura do brônquio foi removida e a ventilação foi lentamente restabelecida, desfazendo-se as atelectasias. A seguir, o clamp da veia pulmonar foi aberto, permitindo a circulação retrógrada e, por fim, o clamp da artéria foi aberto, restabelecendo a circulação anterógrada e a perfusão do enxerto. Nesse momento, também foi reajustada a ventilação mecânica para o volume inicial de 10mL/kg.

A ferida cirúrgica foi coberta com gaze e os animais permaneceram anestesiados e ventilados durante o período de 1h de reperfusão.

3.6 Avaliação da mecânica pulmonar

Estando os animais receptores anestesiados e conectados ao FlexiVent, a mecânica pulmonar foi avaliada em 2 momentos distintos: pós-Tx inicial (imediatamente após o implante e reperfusão do enxerto) e pós-Tx final (após 1h de reperfusão). Foram medidos os dados de resistência das vias aéreas (R_n), elastância de tecido (H_{tis}) e resistência de tecido (G_{tis}), pelo modelo de oscilação forçada (HANTOS et al., 1992).

O grupo Sham não foi submetido à ventilação mecânica.

3.7 Gasometria

Após a última coleta dos dados da mecânica, amostra do sangue arterial dos animais (0,5 mL) foi coletado diretamente da artéria aorta abdominal para análise de dados de gasometria.

3.8 Parâmetros bioquímicos

A seguir, 5,0 mL de sangue da veia cava inferior foram coletados para testar o grau de toxicidade das drogas por meio do perfil hematológico e das dosagens plasmáticas de creatinina e das enzimas ALT e AST, também

conhecidas como transaminase glutâmica pirúvica (TGP) e transaminase glutâmica oxalacética (TGO), respectivamente. O perfil hematológico foi avaliado por meio da contagem do número total de hemácias e leucócitos, e da porcentagem do número de linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos.

3.9 Eutanásia

Após a coleta de sangue venoso, os animais foram devidamente eutanasiados por exsanguinação, pela secção total da artéria aorta abdominal. Então, o bloco cardiopulmonar foi extraído da caixa torácica.

As carcaças dos animais doadores e receptores foram descartadas conforme as normas da FMUSP, sendo colocadas em sacos brancos, devidamente identificados com a etiqueta própria, lacrados e acondicionados em freezer no laboratório. O descarte final da carcaça é de responsabilidade da empresa limpadora contratada pela FMUSP.

3.10 Histologia

Após a retirada do bloco cardiopulmonar, cinco a sete cortes diferentes do tecido do pulmão transplantado foram fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina e corados com hematoxilina-eosina.

Para a análise das lâminas foi utilizada a técnica de *point counting*, com uso de uma ocular reticulada com 100 pontos e 50 retas (Figura 8). Por meio dessa técnica, obtivemos o índice de edema nos vasos e nos alvéolos e de hemorragia no parênquima pulmonar.

Além disso, foi feita a contagem de células mono e polimorfonucleares no parênquima pulmonar.

O pulmão direito dos doadores do grupo Basal foi usado como um órgão “referência” para comparação com o enxerto dos demais grupos.

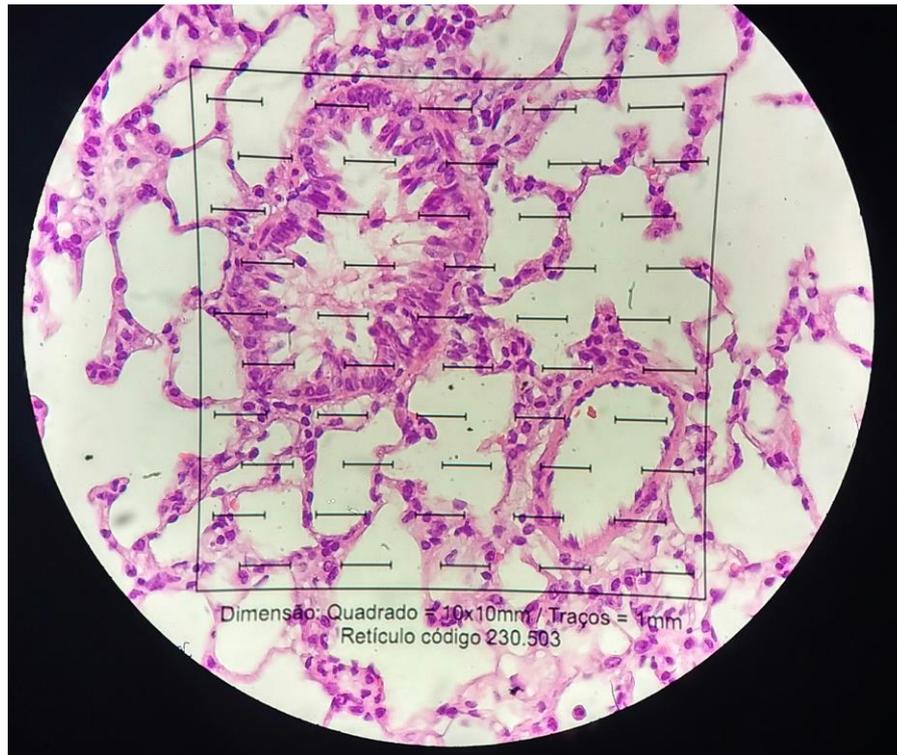


Figura 6 – Representação da visualização de uma lâmina histológica de pulmão de rato com uso de uma ocular reticulada (50 retas e 100 pontos).

3.11 Expressão gênica

No momento da eutanásia dos animais, fragmentos dos pulmões transplantados foram retirados e conservados em solução de RNA^{later}® (Ambion, Thermo Fisher Scientific, EUA). O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme instruções do fabricante. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese e sua concentração determinada por leitura em espectrofotômetro com densidade óptica de 260nm, no aparelho *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA). O RNA isolado foi armazenado a -80°C e uma alíquota de 2µg de RNA foi utilizada para a transcrição reversa.

Para cada 16µL contendo 1µg de RNA a ser reversamente transcrito foram adicionados 4µL do *mix* de reação SuperScript® VILO™ 5x (SuperScript® VILO™ MasterMix, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, EUA).

Cada amostra foi levemente homogeneizada e incubada por 10 minutos a 25°C, por 60 minutos a 42°C e, por fim, por 5 minutos a 85°C.

No final, os 20uL de cada amostra de cDNA sintetizado foram diluídos 1:20 em tampão Tris-EDTA e armazenados a -20°C para serem utilizados na reação de PCR quantitativo em tempo real.

A expressão gênica dos receptores celulares, apoptóticos, mediadores inflamatórios e proliferativos (Tabela 1) foi quantificada pela técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). O sistema de emissão de luz selecionado para o estudo foi o sistema TaqMan, que utiliza, além dos *primers*, sondas fluorescentes para a detecção e quantificação do produto de PCR. Essa detecção é altamente específica, não sendo necessária a padronização da reação.

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, EUA), que contém um programa que gera um gráfico de intensidade de fluorescência em função do número de ciclos de amplificação. Um limiar (*threshold*) é definido automaticamente, onde a intensidade de fluorescência é estatisticamente diferente da fluorescência de fundo (*background*) e a curva apresenta a fluorescência da amplificação aumentando exponencialmente. O número do ciclo cuja fluorescência da amostra intercepta o *threshold* é chamado Ct (*cycle threshold*).

Todas as reações foram realizadas em duplicata e consideradas aceitáveis quando apresentaram desvio padrão menor que 0,4 ou quando apresentaram diferença de Ct < 1. Em cada reação foi pipetado um volume final de 12uL, constituídos de 6uL do reagente *TaqMan Gene Expression Master Mix 2x* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, EUA); 2,4uL de água MilliQ; 0,6uL do sistema *TaqMan Gene Expression Assays 20x* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, EUA) específico para cada gene alvo a ser analisado, e para o gene normalizador. No final, foram adicionados 3uL do cDNA diluído (1:20). As condições de termociclagem da reação seguiram os parâmetros de fábrica do aparelho ajustados para um pré-aquecimento a 50°C por 2 minutos, denaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos

a 95°C por 15 segundos de denaturação e 60°C por 1 minuto de anelamento dos *primers* e extensão.

Tabela 1: Receptores celulares e mediadores inflamatórios e proliferativos a serem analisados por qRT-PCR, e suas respectivas identificações dos ensaios TacMan.

| | | |
|----------------|--|---------------|
| CD68 | <i>Cluster of differentiation-68</i> | Rn01495634_g1 |
| CASP 3 | Caspase-3 | Rn00563902_m1 |
| DDP4 | Dipeptidil peptidase-4 | Rn00562910_m1 |
| ICAM1 | Molécula de adesão intercelular-1 (CD54) | Rn00564227_m1 |
| IL-1 β | Interleucina-1 beta | Rn00580432_m1 |
| IL-6 | Interleucina-6 | Rn01410330_m1 |
| IL-10 | Interleucina-10 | Rn00563409_m1 |
| NF- κ B | Fator nuclear kappa beta | Rn01399572_m1 |
| TLR-4 | Toll-like receptor 4 | Rn00569848_m1 |
| TLR-8 | Toll-like receptor 8 | Rn04224332_u1 |
| TNF α | Fator de necrose tumoral-alfa | Rn01525859_g1 |
| VCAM1 | Molécula de adesão celular vascular-1 | Rn00563627_m1 |

A quantificação da expressão gênica relativa foi calculada através da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrita por Livak e Schmittgen (2001). O valor de Ct equivale à diferença entre o Ct do gene de interesse e o Ct do gene normalizador. Neste protocolo, utilizamos 2 genes normalizadores, o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) e o gene da beta-actina (*Actb*), em que foi calculada a média dos Cts de ambos, para utilização no cálculo de normalização. O resultado representa o número de vezes que o gene analisado tem a sua expressão aumentada ou diminuída no tecido estudado.

3.12 Expressão proteica por Western Blot (WB)

Fragmentos de 1mg de tecido dos pulmões transplantados dos receptores foram colocados em 1mL de tampão RIPA (tris base pH 8,0, NaCl, NP-40 e glicerol) com os inibidores de proteases (aprotinina 1µg/ml, leupetina 1 µg/ml e fenil-metil-sulfonil 10 mM) e em seguida foram homogeneizados em Polytron. As amostras foram agitadas por 2 horas, centrifugadas a 12.000 rpm, por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado. A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Pierce 660nm (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, EUA). Após a obtenção das concentrações das amostras, foi calculado o volume necessário das amostras para obter uma concentração proteica de 50µg. Após esse cálculo, foi acrescentado 1/3 do volume de tampão de amostra (sample buffer, Tris HCl pH 6, 8,2-mercaptoetanol, SDS, bromofenol e glicerol).

Para separação proteica (eletroforese), utilizamos gel de acrilamida. Após polimerização do gel, as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e aplicadas no gel. Após a corrida, foi realizada a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose. Com o término da transferência a membrana foi corada com Ponceau S (ácido acético 5% e Ponceau S 0,1%) para verificar a transferência das proteínas para a membrana. O bloqueio das proteínas transferidas para a membrana foi em 5% de leite desnatado diluído em tampão TBS-T (pH 7,6, tris base, NaCl e Tween 1x) por no mínimo 60 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário, diluído em tampão TBS-T, sob agitação, overnight a 4°C. A concentração do anticorpo foi determinada conforme a bula do fabricante do anticorpo utilizado. Após incubação do anticorpo primário, a membrana foi incubada com anticorpo secundário, também diluído em tampão TBS-T por 120 minutos em temperatura ambiente. Para a revelação por quimioluminescência, utilizamos revelador quimioluminescente (*Thermo Fisher Scientific Inc*, EUA) por 5 minutos. As bandas foram identificadas em fotodocumentador Amersham Imager 600 (*GE Health Care Bio-Sciences*, Björkgatan, Suécia). Utilizamos

como normalizador a beta-actina, e para a análise dos resultados obtidos utilizamos o programa Image J (National Institutes of Health, Maryland, EUA).

Foi analisada a expressão proteica para receptores celulares, apoptóticos, mediadores inflamatórios e proliferativos (Tabela 2).

Tabela 2: Receptores celulares e mediadores inflamatórios, apoptóticos e proliferativos analisados por WB.

| Anticorpo | Empresa | Código | Diluição |
|------------------|----------------|---------------|-----------------|
| Caspase 3 | Abcam | Ab13847 | 1:1000 |
| Bcl-2 | Abcam | Ab59348 | 1:2000 |
| CD68 | Abcam | Ab201340 | 1:1000 |
| TNF- α | Abcam | Ab1793 | 1:1000 |
| IL-6 | Abcam | Ab25072 | 1:1000 |
| IL-10 | Sigma-Aldrich | I3019 | 1:1000 |
| ICAM-1 | Abcam | Ab171123 | 1:1000 |
| VCAM-1 | Abcam | Ab134047 | 1:2000 |
| MMP2 | Abcam | Ab37150 | 1:1000 |
| MMP9 | Abcam | Ab38898 | 1:1000 |
| TLR4 | Abcam | Ab83444 | 1:500 |
| LDLr | Abcam | Ab30532 | 1:1000 |

3.13 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk e a comparação entre os grupos realizada por meio do teste ANOVA com correção do teste de Bonferroni. O teste t de *Student* foi usado para comparação de dois grupos. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas significantes para um valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Gasometria

Na tabela 3 estão expressos os resultados dos dados analisados na gasometria. Não houve diferença entre os grupos submetidos ao Tx em nenhum dos parâmetros analisados. Porém, todos os grupos foram diferentes do grupo Sham (Gráfico 1).

Tabela 3: Parâmetros gasométricos. Valores expressos em média \pm DP.

| | Sham | Basal | Controle | Droga | p (ANOVA) |
|----------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| cLac (mmol/L) | 18,60 \pm 4,39 | 83,50 \pm 23,82 | 74,20 \pm 22,93 | 68,67 \pm 13,94 | <0,001 |
| pCO ² (mmHg) | 40,22 \pm 7,04 | 16,43 \pm 3,59 | 16,86 \pm 6,63 | 19,31 \pm 7,89 | <0,001 |
| pH | 7,38 \pm 0,37 | 7,50 \pm 0,65 | 7,48 \pm 0,59 | 7,46 \pm 0,66 | 0,012 |
| pO ² (mmHg) | 52,78 \pm 11,42 | 82,58 \pm 23,23 | 131,34 \pm 35,37 | 176,67 \pm 56,36 | 0,001 |

cLac: concentração de Lactato; pCO²: pressão parcial de gás carbônico; pH: potencial de íons hidrogênio; pO²: pressão parcial de oxigênio.

4.2 Bioquímica

Na tabela 4 constam os resultados da análise bioquímica realizada nos animais. Houve diferença significativa entre o grupo Sham e os demais em relação aos valores de creatinina e ureia (Gráfico 2).

Tabela 4: Parâmetros bioquímicos. Valores expressos em média \pm DP.

| | Sham | Basal | Controle | Droga | p (ANOVA) |
|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| ALT (U/L) | 72,20 \pm 5,40 | 93,25 \pm 9,00 | 84,70 \pm 36,86 | 73,00 \pm 18,52 | 0,449 |
| AST (U/L) | 129,40 \pm 39,20 | 130,25 \pm 14,80 | 137,40 \pm 55,87 | 136,20 \pm 46,71 | 0,986 |
| Cre (mg/dL) | 0,23 \pm 0,41 | 0,85 \pm 0,049 | 0,66 \pm 0,11 | 0,73 \pm 0,15 | <0,001 |
| GGT (U/L) | 3,26 \pm 1,51 | 2,33 \pm 1,54 | 2,66 \pm 0,97 | 3,22 \pm 1,20 | 0,513 |
| Ur (mg/dL) | 36,00 \pm 5,14 | 102,60 \pm 16,03 | 85,84 \pm 10,58 | 86,82 \pm 12,38 | <0,001 |

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; Cre: creatinina; GGT: gama glutamil transferase; Ur: ureia.

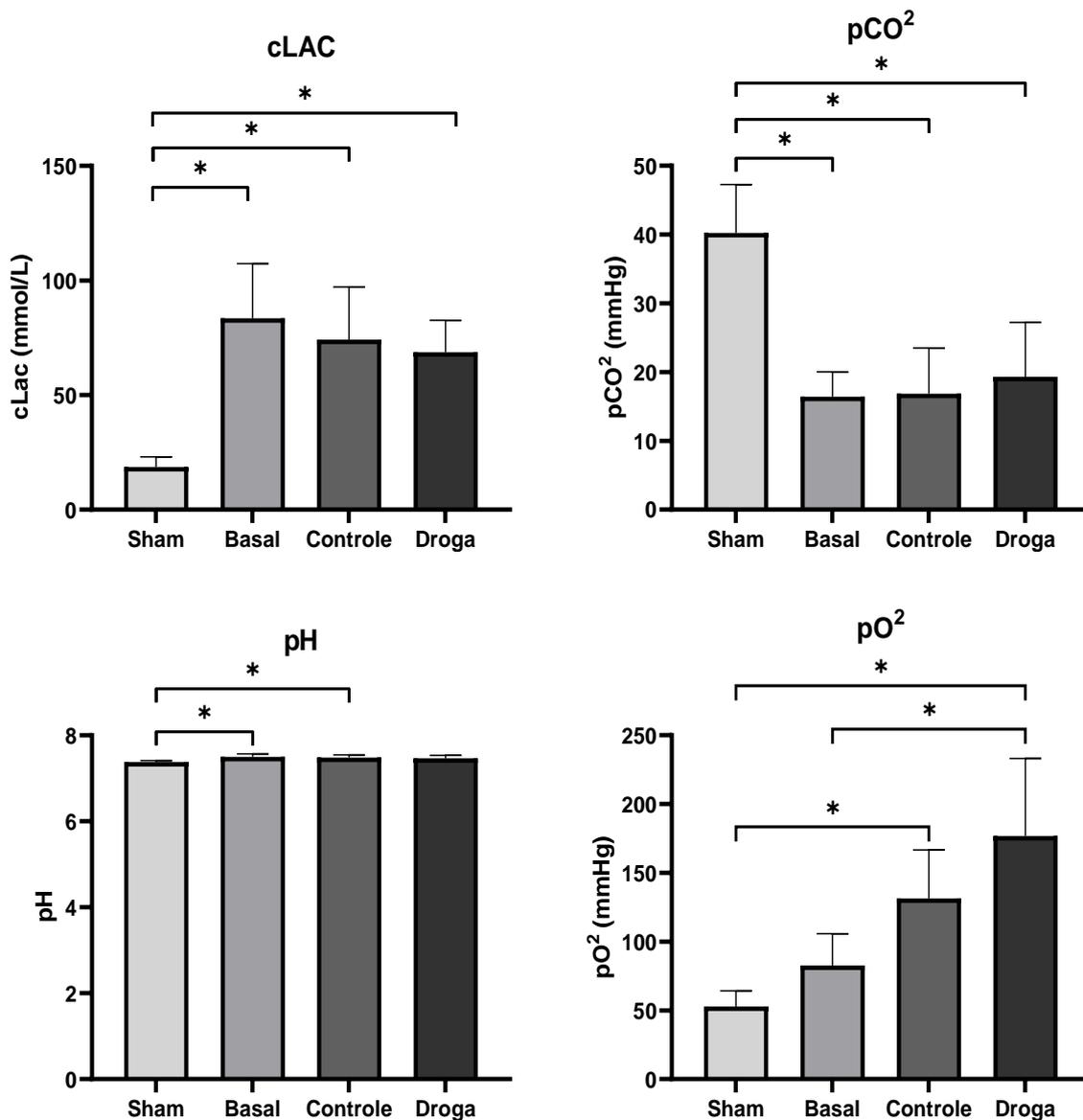
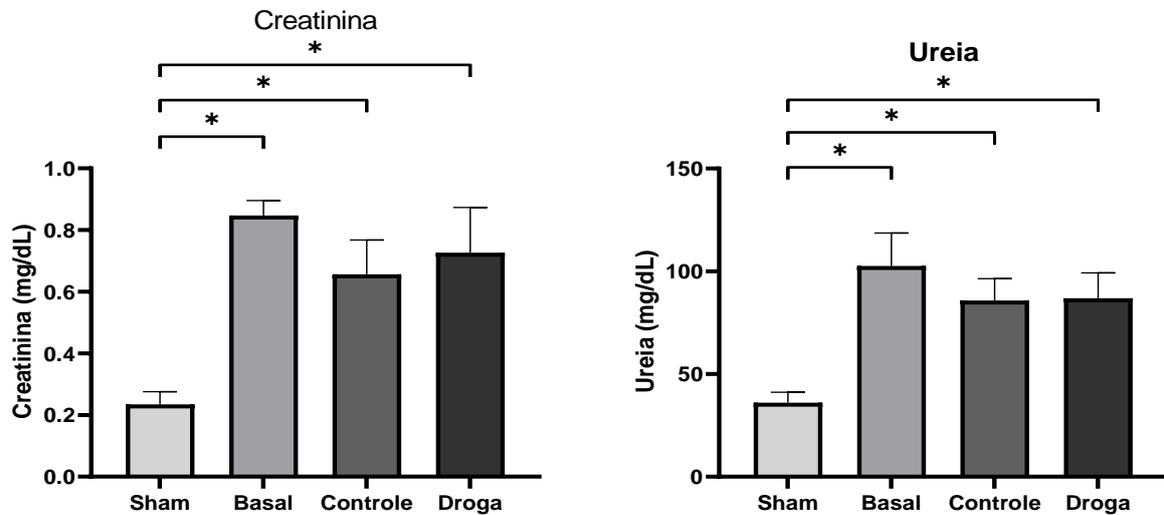
Gráfico 1 Gasometria. cLac: * $p < 0,001$; pCO_2 : * $p < 0,001$; pH: *Sham vs Basal $p = 0,027$, Sham vs Controle $p = 0,018$; pO_2 : * $p = 0,014$ 

Gráfico 2: Bioquímica. Creatinina: *p<0,001; Ureia: *p<0,001.

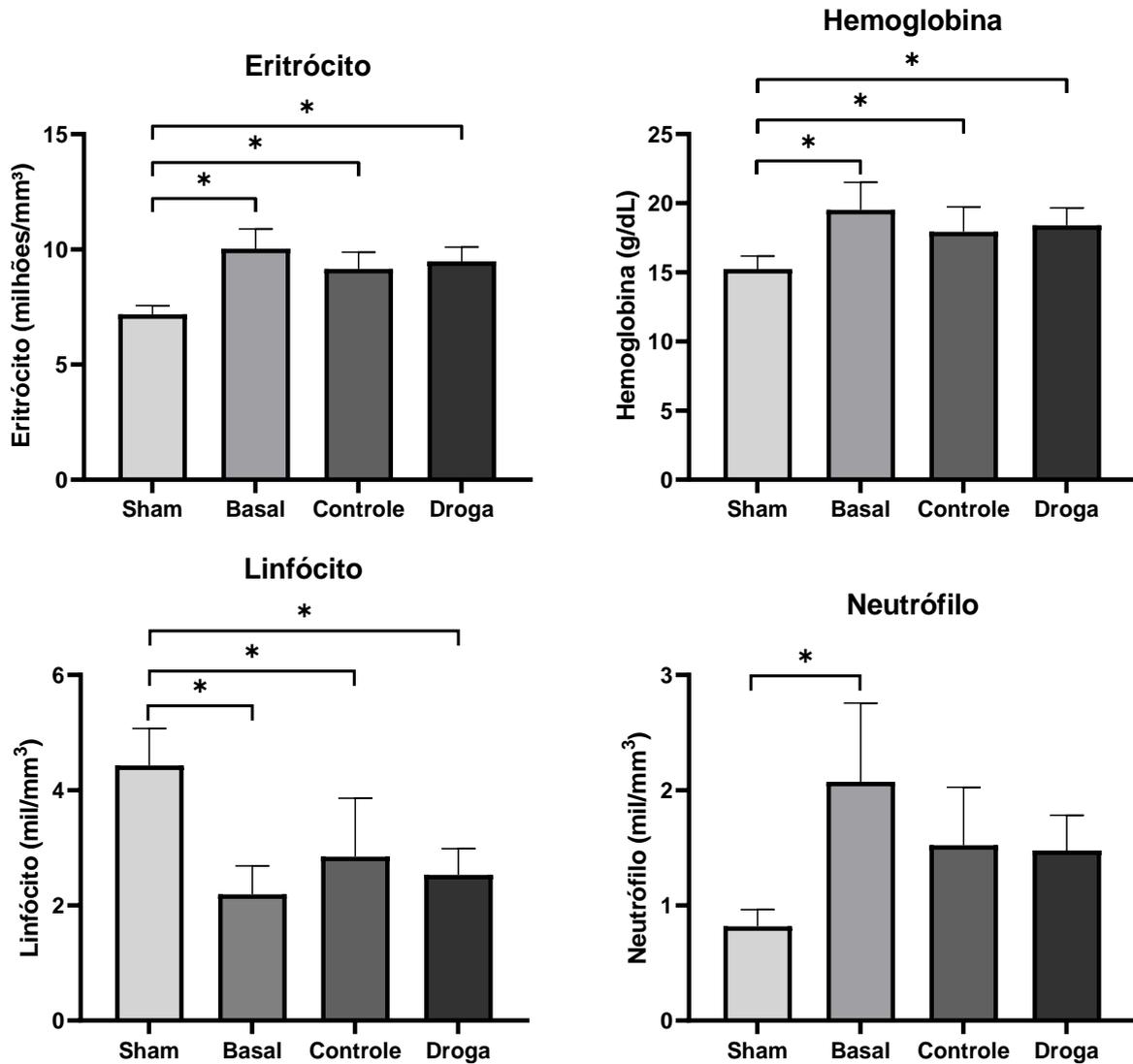
4.3 Hemograma

A tabela 5 apresenta os dados obtidos através do hemograma completo. Houve diferença significativa entre o grupo Sham e os demais em relação aos valores de eritrócitos, hemoglobina, linfócitos e neutrófilos (Gráfico 3).

Tabela 5: Parâmetros hematológicos. Valores expressos em Média \pm DP.

| | Sham | Basal | Controle | Droga | p (ANOVA) |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|
| Eritrócitos (milhões/mm³) | 7,18 \pm 0,38 | 10,03 \pm 0,86 | 9,15 \pm 0,73 | 9,47 \pm 0,62 | <0,001 |
| Hemoglobina (g/dL) | 15,24 \pm 0,94 | 19,53 \pm 1,99 | 17,93 \pm 1,80 | 18,39 \pm 1,27 | 0,002 |
| Leucócitos (mil/mm³) | 5,38 \pm 0,81 | 4,43 \pm 1,20 | 4,51 \pm 1,45 | 4,18 \pm 0,66 | 0,277 |
| Linfócitos (mil/mm³) | 4,43 \pm 0,64 | 2,19 \pm 0,49 | 2,85 \pm 1,01 | 2,53 \pm 0,46 | <0,001 |
| Monócitos (mil/mm³) | 0,07 \pm 0,02 | 0,16 \pm 0,14 | 0,14 \pm 0,07 | 0,17 \pm 0,08 | 0,171 |
| Neutrófilos (mil/mm³) | 0,82 \pm 0,15 | 2,07 \pm 0,68 | 1,52 \pm 0,50 | 1,48 \pm 0,31 | 0,004 |

Gráfico 3: Hemograma. Eritrócito: * $p < 0,001$; Hemoglobina: * $p < 0,05$; Linfócito: * $p < 0,003$; Neutrófilo: * $p = 0,003$.



4.4 Mecânica ventilatória

Os dados da mecânica ventilatória foram analisados em dois momentos: imediatamente após o Tx (Tabela 6) e após 1h de reperfusão (Tabela 7). Em ambos os casos, não houve diferenças significativas.

Tabela 6: Mecânica ventilatória imediata. Valores expressos em Média \pm DP.

| (cmH ₂ O.s/mL) | Basal | Controle | Droga | p |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|
| Rn | 0,15 \pm 0,02 | 0,08 \pm 0,04 | 0,12 \pm 0,04 | 0,100 |
| Gtis | 0,44 \pm 0,03 | 0,40 \pm 0,04 | 0,39 \pm 0,04 | 0,102 |
| Htis | 1,58 \pm 0,31 | 1,65 \pm 0,20 | 1,70 \pm 0,31 | 0,796 |

Rn: resistência das vias aéreas; Gtis: resistência de tecido; Htis: elastância de tecido.

Tabela 7: Mecânica ventilatória 1h. Valores expressos em Média \pm DP.

| (cmH ₂ O.s/mL) | Basal | Controle | Droga | p |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|
| Rn | 0,17 \pm 0,03 | 0,11 \pm 0,05 | 0,12 \pm 0,04 | 0,143 |
| Gtis | 0,44 \pm 0,07 | 0,49 \pm 0,16 | 0,45 \pm 0,13 | 0,782 |
| Htis | 1,76 \pm 0,13 | 1,84 \pm 0,15 | 1,98 \pm 0,36 | 0,391 |

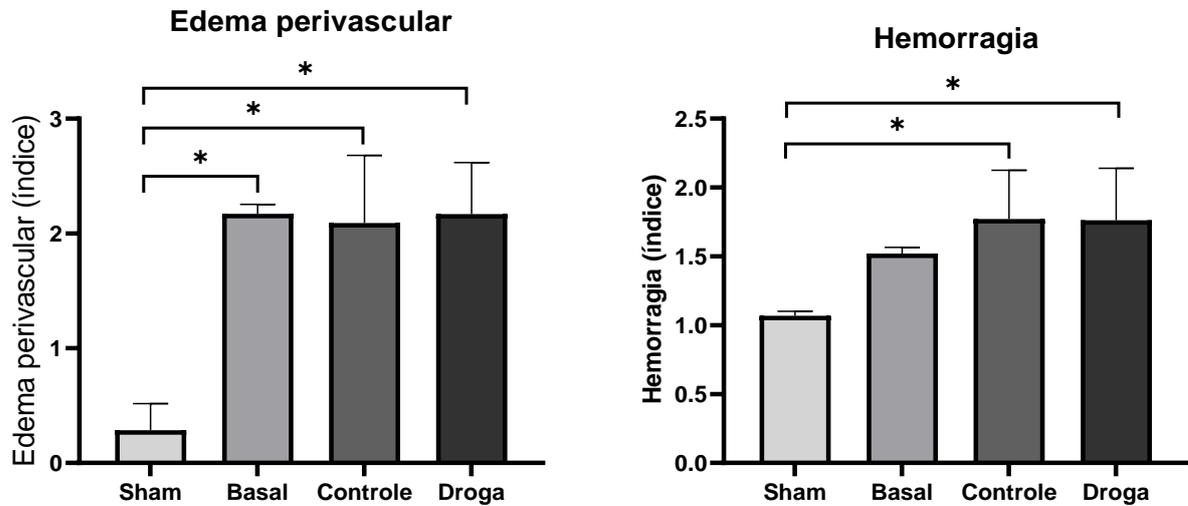
Rn: resistência das vias aéreas; Gtis: resistência de tecido; Htis: elastância de tecido.

4.5 Histologia

Para a histologia, foram coletadas amostras de tecido pulmonar esquerdo do receptor (pulmão TX). Para todos os resultados obtidos não houve diferenças significativas (Tabela 8).

Tabela 8: Histologia. Valores expressos em média \pm DP.

| | Sham | Basal | Controle | Droga | p (ANOVA) |
|--|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------|--------------|
| Edema alveolar (%) | 21,02 \pm 5,39 | 17,88 \pm 11,77 | 16,11 \pm 9,17 | 19,04 \pm 9,96 | 0,819 |
| Edema perivascular (índice) | 0,28 \pm 0,23 | 2,17 \pm 0,08 | 2,09 \pm 0,59 | 2,17 \pm 0,45 | <0,001 |
| Hemorragia (índice) | 1,07 \pm 0,03 | 1,52 \pm 0,45 | 1,77 \pm 0,35 | 1,76 \pm 0,38 | 0,005 |
| Polimorfonucleares (mm²) | 88,71 \pm 25,28 | 55,81 \pm 36,94 | 59,55 \pm 9,82 | 43,31 \pm 19,78 | 0,068 |
| Mononucleares (mm²) | 121,24 \pm 42,28 | 139,81 \pm 100,90 | 104,74 \pm 56,50 | 84,86 \pm 44,71 | 0,537 |

Gráfico 4: Histologia. Edema perivascular: *p<0,001; Hemorragia: *p=0,007

4.6 Expressão gênica

Na tabela 9 constam os resultados da expressão gênica nos pulmões transplantados. Não houve diferença entre os grupos para os genes analisados, com exceção do gene do TLR4, cuja expressão foi diminuída nos animais tratados com LDE-PTX e LDE-MTX.

Tabela 9: Expressão gênica. Valores expressos em média \pm DP.

| | Droga | Controle | p |
|-------|-----------------|-----------------|----------|
| CASP3 | 1,09 \pm 0,20 | 1,33 \pm 0,32 | 0,236 |
| CD68 | 1,09 \pm 0,19 | 1,08 \pm 0,39 | 0,959 |
| DPP4 | 1,05 \pm 0,23 | 1,13 \pm 0,17 | 0,512 |
| ICAM | 1,35 \pm 0,53 | 1,19 \pm 0,23 | 0,539 |
| IL1B | 1,08 \pm 0,44 | 0,65 \pm 0,18 | 0,059 |
| IL6 | 1,91 \pm 1,76 | 0,81 \pm 0,33 | 0,226 |
| IL10 | 2,05 \pm 1,62 | 0,92 \pm 0,32 | 0,126 |
| MMP2 | 1,17 \pm 0,28 | 1,61 \pm 0,52 | 0,167 |
| NFKB | 1,09 \pm 0,19 | 1,15 \pm 0,17 | 0,576 |
| TLR4 | 0,93 \pm 0,12 | 1,32 \pm 0,29 | 0,037* |

| | | | |
|------|-------------|-------------|-------|
| TLR8 | 1,12 ± 0,27 | 0,90 ± 0,14 | 0,125 |
| TNF | 1,54 ± 0,40 | 1,05 ± 0,51 | 0,148 |
| VCAM | 1,17 ± 0,36 | 1,27 ± 0,36 | 0,684 |

CASP3: caspase 3; CD68: *cluster of differentiation-68*; DPP4: dipeptidil peptidase; ICAM: molécula de adesão intercelular-1; IL1B: interleucina 1 beta; IL6: interleucina 6; IL10: interleucina 10; MMP2: metaloproteinase 2 da matriz; NFkB: fator nuclear kappa beta; TLR4: *toll-like receptor 4*; TLR8: *toll-like receptor 8*; TNF: fator de necrose tumoral alfa; VCAM: molécula de adesão celular vascular-1.

4.7 Expressão proteica

A tabela 10 mostra os resultados obtidos para a expressão proteica nos pulmões transplantados dos animais. Em nenhum parâmetro foi possível observar diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 10: Expressão proteica. Valores expressos em média ± DP.

| | Droga | Controle | p |
|-------|----------------|-----------------|----------|
| Bcl2 | 168,55 ± 41,98 | 133,21 ± 59,76 | 0,339 |
| CASP3 | 104,04 ± 34,61 | 110,99 ± 44,30 | 0,799 |
| CD68 | 120,05 ± 43,13 | 102,43 ± 47,48 | 0,569 |
| ICAM | 90,97 ± 28,59 | 76,71 ± 23,14 | 0,408 |
| IL6 | 110,48 ± 58,30 | 84,36 ± 50,78 | 0,473 |
| IL10 | 53,47 ± 25,43 | 66,88 ± 44,71 | 0,605 |
| LDLr | 201,21 ± 83,18 | 211,66 ± 129,07 | 0,892 |
| MMP2 | 140,89 ± 40,87 | 140,82 ± 20,42 | 0,997 |
| TLR4 | 115,74 ± 59,27 | 106,43 ± 33,00 | 0,799 |
| TNF | 89,17 ± 20,59 | 81,02 ± 42,09 | 0,732 |
| VCAM | 179,83 ± 86,86 | 191,59 ± 110,81 | 0,863 |

Bcl2: *B-cell lymphoma 2*; CASP3: caspase 3; CD68: *cluster of differentiation-68*; ICAM: molécula de adesão intercelular-1; IL6: interleucina 6; IL10: interleucina 10; LDLr: receptor da lipoproteína de baixa densidade; MMP2: metaloproteinase 2 da matriz; TLR4: *toll-like receptor 4*; TNF: fator de necrose tumoral alfa; VCAM: molécula de adesão celular vascular-1.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo verificar a ação de duas drogas, PTX e MTX, associadas a nanopartículas de LDE, na lesão de IR. Para isso, utilizamos um modelo de transplante unilateral esquerdo em ratos, já bem estabelecido em nosso grupo (ABREU, 2013; ALMEIDA et al., 2020).

Assim também, a incorporação das drogas a nanopartículas lipídicas já é um modelo conhecido e utilizado em outros trabalhos da instituição (BARBIERI, 2016; GOMES et al., 2018). Por outro lado, o tempo de isquemia e a utilização do PTX com a solução de preservação foram baseados em um trabalho externo, que utilizou o modelo de TX pulmonar em ratos e também teve o PTX como droga de estudo (SUZUKI et al., 2004).

Estas drogas possuem efeitos benéficos comprovados quando utilizadas durante o tratamento do câncer. Contudo, um dos problemas apresentados por essas drogas são seus efeitos colaterais altamente tóxicos. Devido a isso, estudos diversificados tentaram associá-las com a LDE em busca de reduzir sua toxicidade e aumentar seus efeitos.

Um desses estudos, além da diminuição da toxicidade do PTX, notou que essa associação foi capaz de reduzir a aterosclerose em coelhos submetidos à alimentação com alto nível de colesterol (MARANHÃO et al., 2008). Outro estudo demonstrou que o oleato de PTX, um derivado mais lipofílico do que o PTX, associado à LDE, não se dissocia das partículas na circulação plasmática dos pacientes com câncer de mama; houve também uma melhora dos parâmetros farmacocinéticos e a droga ficou concentrada no tecido maligno (PIRES et al., 2009).

Os dados analisados na bioquímica tinham a finalidade de verificar se os animais sofreriam algum dano renal devido ao uso das drogas. Um aumento significativo no grupo Droga, com relação ao Controle, poderia indicar que a LDE não conseguiu reduzir os efeitos tóxicos das drogas nos rins.

Porém, no presente estudo, pudemos notar que o PTX e o MTX, associados à LDE, não causaram danos aos rins dos animais, já que o aumento nos valores de ureia e creatinina, que foi observado em todos os

grupos (Basal, Droga e Controle), com exceção do grupo Sham, pode ser atribuído ao procedimento cirúrgico.

Quando observamos os resultados do hemograma, podemos favorecer a interpretação sobre não haver danos tóxicos causados pelas drogas, tendo em vista que, não havendo diferenças entre os grupos, pode significar que não houve neutropenia e leucopenia, dois efeitos tóxicos relatados na literatura em relação às drogas do estudo.

Quanto à diminuição do número de linfócitos observada nos animais que foram submetidos ao transplante, podemos inferir que não seja devido à ação das drogas testadas, apesar da conhecida ação imunossupressora do MTX. Mas sim que se trata de uma condição relatada na literatura como disfunção imune cirurgicamente induzida. De fato, um estudo verificou que após uma lesão intestinal em modelo murino ocorreu linfocitopenia em relação aos animais que foram submetidos apenas à laparotomia (MENGES et al., 2012).

Por outro lado, observamos um aumento de eritrócitos e hemoglobina em todos os grupos submetidos ao transplante. Acreditamos que isso não tenha sido causado por um aumento efetivo na produção de hemácias, mas sim por um aumento na concentração dessas células como resultado da perda de água por evaporação durante o procedimento cirúrgico, já que a caixa torácica permaneceu aberta durante todo o transplante e mais uma hora de reperfusão do órgão, com exposição direta ao ambiente dos tecidos cutâneos e musculares adjacentes à toracotomia, além do próprio pulmão transplantado.

Entre os principais eventos envolvidos na IR estão a inflamação e a perda da função pulmonar. Seus mecanismos levam a alterações celulares, moleculares e bioquímicas, resultando em aumento da resistência vascular pulmonar, da permeabilidade capilar pulmonar e em edema. Esses eventos prejudicam a troca gasosa, elevando o gradiente alvéolo-arterial de oxigênio (ABREU, 2013).

Um dos principais fatores envolvidos no edema é o aumento da permeabilidade endotelial, que pode ser gerado através de 5 fatores: sobrecarga de cálcio celular, ativação da resposta imune, aprimoramento da

agregação plaquetária, formação de um espaço na camada endotelial e aumento na resistência da vascularização pulmonar (PAK et al., 2017). Esses fatores provocam uma má troca gasosa, ocasionando queda nos valores de pO_2 (ALMEIDA, 2016; JURMANN et al., 1990).

Um estudo envolvendo o PTX aplicou a droga em conjunto com a solução de preservação, em um transplante de pulmão unilateral em ratos. Neste estudo foi observado que o PTX teve um papel fundamental na atenuação na lesão pulmonar aguda, conseguindo diminuir significativamente o edema e melhorar o desempenho da oxigenação (SUZUKI et al., 2004).

Ao contrário, em nosso estudo, observamos o edema formado em torno dos vasos no parênquima pulmonar. Isso mostra que as drogas, associadas com a LDE, não foram capazes de impedir ou atenuar o edema nos pulmões transplantados. Apesar disso, a troca gasosa foi melhor nos grupos transplantados e tratados com LDE-PTX e LDE-MTX ou mesmo só com a LDE.

Caso a melhora da oxigenação tivesse ocorrido apenas no grupo tratado com as drogas, poderíamos levantar a hipótese de que seria em decorrência dos efeitos anti-inflamatórios do MTX. Isso se daria porque esta droga promove liberação de adenosina, o que pode ajudar a atenuar os fatores que provocam uma redução na eficiência da troca gasosa. Um estudo observou que, quando estimulados, receptores de adenosina A_{2A} conseguem promover relaxamento muscular e dilatação vascular (REECE et al., 2005). Outro estudo envolvendo infarto em cães observou que o MTX pode melhorar a IR através de sua ação relacionada à adenosina (Asanuma et al., 2004).

Seguindo na mesma linha, Maranhão et al. (2017) utilizaram um modelo de infarto do miocárdio em ratos, e observaram que o LDE-MTX conseguiu diminuir a hipóxia, a morte celular, o estresse oxidativo, o número de células inflamatórias, e aumentar as enzimas antioxidantes e a angiogênese.

No entanto, acreditamos que esse aumento da oxigenação observada em nosso estudo tenha sido em decorrência do maior número de hemácias e hemoglobina observados nos animais desses grupos, além da própria ventilação mecânica à qual estavam submetidos por ocasião da coleta das amostras de sangue, diferentemente dos animais do grupo Sham.

Outra análise utilizada para sabermos se houve alterações na função dos pulmões foi a mecânica ventilatória. Os dados de resistência das vias aéreas e de resistência e elastância do tecido pulmonar foram coletados em dois momentos distintos: imediatamente após o restabelecimento da circulação sanguínea e aérea no enxerto e 1h após a reperfusão. Em ambos os casos, não foram notadas diferenças significativas entre os grupos, indicando que as drogas não foram capazes de atenuar os danos causados na função pulmonar em períodos longos de isquemia fria no órgão em questão.

Considerando que a BO tem como característica marcante um aumento das células mesenquimais das vias aéreas e aumento da deposição de matriz extracelular no lúmen dos bronquíolos respiratórios (NAKAJIMA et al., 2011), especulou-se que as drogas utilizadas poderiam atenuar ou neutralizar estes efeitos característicos da BO, visto que ambas possuem efeitos anti proliferativos.

Lourenço et al. (2011) mostraram em seu estudo a eficácia do PTX associado à LDE, dado que em seus resultados é possível observar que o lúmen arterial dos corações transplantados e tratados foi 3 vezes mais amplo que o dos corações não tratados. Além disso, os macrófagos têm um importante papel no estágio inicial da inflamação, sendo responsáveis por iniciar o processo inflamatório. Neste mesmo trabalho de Lourenço et al. (2011), nota-se que o PTX reduziu a infiltração de macrófagos.

Outro teste realizado na histologia foi a contagem de células polimorfonucleares e mononucleares. Apesar do uso conjunto das drogas, não foi possível, histologicamente, notar diferenças significativas entre os grupos nos pulmões transplantados dos receptores.

Um dos fatores que poderia explicar esse resultado é o método do tratamento ser ineficaz devido ao período longo de isquemia. Suzuki et al. (2004) utilizaram o mesmo tempo de isquemia, mas a diferença entre os trabalhos foi que, durante esse período, o órgão permaneceu imerso em Perfadex com PTX. Já em nosso trabalho, mantivemos o órgão embebido em Perfadex, porém sem a adição de PTX. Suzuki et al. (2004) observaram que a reperfusão pode diluir a droga na circulação, diminuindo sua eficácia.

Em complemento ao estudo das células inflamatórias no sangue e no parênquima pulmonar, investigamos se as drogas tiveram algum efeito na expressão gênica e proteica de diversos marcadores relacionados à inflamação e à lesão tecidual.

Fiorelli et al. (2017) observaram que o MTX associado à LDE foi capaz de atenuar a expressão de TNF- α e VCAM1, além de estimular a expressão de moléculas anti-inflamatórias como a IL-10. Em contrapartida, Gomes et al. (2018) observaram que o tratamento envolvendo ambas as drogas não foi eficaz em aumentar os valores de IL-10. A expressão gênica de IL-18, IL-1 β , VCAM, MCP-1, MMP-9 e MMP-12 também não foi alterada. Contudo, foi observada uma redução nos valores de TNF- α .

O MTX é um antifolato que pode induzir uma tolerância a TNF- α e lipopolissacarídeos em macrófagos *in vitro*. Ratos tratados com MTX por 7 dias apresentaram também, em nível molecular, uma atenuação da sinalização de TLR4 (ROMERO, 2022). Além disso, ratos tratados com 20mg/kg de MTX via intraperitoneal mostraram uma redução na expressão de TLR4 na mucosa jejunal e ileal (SUKHOTNIK et al., 2014).

A TLR4 é amplamente reconhecida pelo seu papel na ativação da resposta imune inata. Estudos mostram que a TLR4 possui influência na IR em fígados de camundongos, além de contribuir para o desenvolvimento da BO em transplante de pulmão (SHEN et al., 2007; PALMER et al., 2003; WU et al., 2004).

Em nossos resultados de expressão gênica de amostras dos pulmões transplantados, houve uma diminuição na TLR4 no grupo Droga quando comparado ao Controle, o que nos leva a supor que isso pode ter sido resultado da ação do MTX.

Já quando observamos a expressão proteica, podemos notar que as drogas não só não foram capazes de atenuar os fatores pró inflamatórios, como os anti-inflamatórios também não tiveram maior expressão. Esta diferença de resultados entre os testes pode ser justificada com uma migração celular, ou até mesmo com o RNA não sendo traduzido.

Barbieri (2016) observou que ambas as drogas, quando combinadas, não causaram os efeitos positivos esperados na doença vascular

do enxerto. Em seu trabalho, Barbieri (2016) cita a possibilidade de as drogas estarem competindo pelos receptores de LDE. Em nosso trabalho, os animais doadores receberam o LDE-PTX, enquanto os receptores receberam LDE-MTX, o que poderia evitar uma possível competição pelos receptores. Contudo, os resultados finais também não mostraram melhoras no grupo Droga.

Um trabalho realizado por Yüceyar et al. (2005) mostrou que o PTX pode reduzir a hidroxiprolina e a formação de novos vasos em anastomoses intestinais, quando administrada por via intraperitoneal. Em contrapartida, o MTX, como mencionado anteriormente, aumentou a angiogênese em corações submetidos a infarto (MARANHÃO et al., 2017). Estudos adicionais são necessários para averiguar se este efeito permanece mesmo após associação LDE-PTX, se o MTX é capaz de reverter a situação, e se estes eventos podem causar problemas no sucesso dos transplantes pulmonares.

Outro ponto importante de ser ressaltado é que o veículo utilizado para tornar as drogas mais eficazes e menos tóxicas foi a LDE, que utiliza receptores de LDL para entrar nas células. Contudo, nosso estudo utilizou isquemia fria, diminuindo o metabolismo celular. Mesmo os receptores recebendo o PTX no dia anterior, e os pulmões sendo lavados com a droga antes da isquemia, pode-se levantar a hipótese que o tempo de exposição com a droga foi menor do que necessário. Talvez em estudos futuros seja interessante a administração de uma dose adicional de ambas as drogas, logo após o transplante, ou ainda testar outras alterações no protocolo para se confirmar essa hipótese.

Apesar dos pontos levantados anteriormente, acreditamos que os resultados obtidos são importantes para mostrar que as drogas não tiveram efeito relevante neste modelo, mesmo com as modificações testadas ao longo do experimento, e que a junção de dois modelos animais já bem estabelecidos nem sempre funciona exatamente como o observado em cada um separadamente. Assim, para que os testes prossigam visando uma futura aplicação clínica no Tx de pulmão, diversas alterações no protocolo de administração das drogas deverão ser consideradas e amplamente testadas.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, foi possível observar que:

- A administração de LDE-PTX e LDE-MTX não foi capaz de atenuar o processo inflamatório peribrônquico e perivascular em pulmões transplantados.
- A administração de LDE-PTX e LDE-MTX não teve efeito tóxico.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- Abreu MM. O papel do azul de metileno na prevenção da lesão de isquemia-reperfusão em transplante pulmonar de ratos: estudo experimental. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 80p.
- Ades A, Carvalho JP, Graziani SR, Amancio RF, Souen, JS, Pinotti JA, Maranhão RC. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol Oncol* 2001;82(1):84-7.
- Almeida FM, Battochio AS, Napoli JP, et al. Creatine Supply Attenuates Ischemia-Reperfusion Injury in Lung Transplantation in Rats. *Nutrients*. 2020;12(9):2765.
- Asanuma H, Sanada S, Ogai A, Minamino T, Takashima S, Asakura M, Ogita H, Shinozaki Y, Mori H, Node K, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Methotrexate and MX-68, a new derivative of methotrexate, limit infarct size via adenosine-dependent mechanisms in canine hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;43(4):574–579.
- Azevedo CHM, Carvalho JP, Valduga CJ, Maranhão RC. Plasma kinetics and uptake by the tumor of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) associated to etoposide oleate in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005;97:178-82.
- Barbieri LR. Uso de nanoemulsões lipídicas como veículos de paclitaxel e de metotrexato no tratamento da doença vascular do coração transplantado em coelhos. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016. 144p.
- Bedi DS, Riella LV, Tullius SG, Chandraker A. Animal models of chronic allograft injury: contributions and limitations to understanding the mechanism of long-term graft dysfunction. *Transplantation* 2010; 90: 935-44.
- Bulgarelli A, Almeida C, Valduga C, Higuchi M, Maranhão R. Methotrexate associated to lipid nanoemulsion reduces atherosclerosis induced in rabbits

- and has minimal side effects. *Atherosclerosis Supplement* 2009, Vol. 10, Issue 2 Abstract: P468.
- Bulgarelli A, Leite AC, Jr, Dias AA, Maranhão RC. Anti-atherogenic effects of methotrexate carried by a lipid nanoemulsion that binds to LDL receptors in cholesterol-fed rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013;27(6):531–539.
- Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, Drake JC, Jolivet J. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug?. *J Clin Invest* 1985;76(3):907-12.
- Contreras CAM. Efeito da nanoemulsão lipídica associada a paclitaxel na prevenção da doença vascular do coração transplantado. Estudo experimental em coelhos. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 143p.
- Cooper JD, Billingham M, Egan T, Hertz MI, Higenbottam T, Lynch J, Mauer J, Paradis I, Patterson GA, Smith C et al. The first lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1437–8.
- Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Stehlik J, Hertz MI. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th adult lung and heart-lung transplant report—2012. *J Heart Lung Transpl* 2012;31(10):1073–86.
- Dalton ML. The first lung transplantation. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1437–8.
- Fiorelli AI, Lourenço-Filho DD, Tavares ER, Carvalho PO, Marques AF, Gutierrez PS, Maranhão RC, Stolf NAG. Methotrexate associated to lipid core nanoparticles improves cardiac allograft vasculopathy and the inflammatory profile in a rabbit heart graft model. *Braz J Med Biol Res* 2017;50(10):e6225.
- Fiser SM, Tribble CG, Long SM, Kaza AK, Kern JA, Robbins MK, Kron IL. Ischemia-Reperfusion Injury After Lung Transplantation Increases Risk of Late Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1041-8.
- Estenne M, Hertz MI. Bronchiolitis obliterans after human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(4):440-4.

- Graziani SR, Igreja FA, Hegg R, Meneghetti C, Brandizzi LI, Barboza R, Amâncio RF, Pinotti JA, Maranhão RC. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol Oncol* 2002;85(3):493-7.
- Gomes FLT, Maranhão RC, Tavares ER, Carvalho PO, Higuchi ML, Mattos FR, Pitta FG, Hatab SA, Kalil-Filho R, Serrano CV Jr. Regression of Atherosclerotic Plaques of Cholesterol-Fed Rabbits by Combined Chemotherapy With Paclitaxel and Methotrexate Carried in Lipid Core Nanoparticles. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2018;23(6):561-569
- Hantos Z, Adamicza A, Govaerts E, Daroczy B. Mechanical impedances of lungs and chest wall in the cat. *J Appl Physiol* 1992;73:427-33.
- Den Hengst WA, Gielis JF, Van Schil PE, de Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H1283-99.
- Herdeg C, Oberhoff M, Baumbach A, Schroeder S, Leitritz M, Blattner A, Siegel-Axel DI, Meisner C, Karsch KR. Effects of local all-trans-retinoic acid delivery on experimental atherosclerosis in the rabbit carotid artery. *Cardiovasc Res* 2003;57:544–553.
- Jaramillo A, Fernández FG, Kuo EY, Trulock EP, Patterson GA, Mohanakumar T. Immune mechanisms in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Pediatr Transplant* 2005 Feb;9(1):84-93.
- Jatene FB, Pego-Fernandes PM. Desafios do transplante pulmonary [editorial]. *J Bras Pneumol*. 2008;34(5):249-50.
- Jatene FB, Pego-Fernandes PM, Medeiros IL. Transplante pulmonar. *Ver Med (São Paulo)*. 2009 jul.-set.;88(3) ed.especial:111-22.
- King MB, Jessurun J, Savik SK, Murray JJ, Hertz MI. Cyclosporine reduces development of obliterative bronchiolitis in a murine heterotopic airway model. *Transplantation* 1997;63(4): 528-32.

- Lima AD. Efeitos do tratamento crônico do metotrexato associado à nanoemulsão de LDE no remodelamento cardíaco por infarto do miocárdio em ratos Wistar. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017. 80p.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
- Lourenço-Filho D, Maranhão RC, Méndez-Contreras CA, Tavares ER, Freitas FR, Stolf NA. An Artificial Nanoemulsion Carrying Paclitaxel Decreases the Transplant Heart Vascular Disease. A Study in a Rabbit Graft Model. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 2011;141(6):1522-8.
- Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Dorlhiac-Llacer P, Cadena SM, Coelho IJ, Meneghetti JC, Pileggi FJ, Chamone DA. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res* 1994;54:4660-6.
- Maranhão RC, Graziani SR, Yamaguchi N, Melo RF, Latrilha MC, Rodrigues DG, Couto RD, Schreier S, Buzaid AC. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in câncer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;49(6):487-98.
- Maranhão RC, Guido MC, Lima AD, Tavares ER, Marques AF, Melo MDT, Nicolau JC, Salemi VMC, Kalil-Filho R. Methotrexate carried in lipid core nanoparticles reduces myocardial infarction size and improves cardiac function in rats. *Int J Nanomedicine* 2017;17:3767-84.
- Maranhão RC, Tavares ER, Padoveze AF, Valduga CJ, Rodrigues DG, Pereira MD. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis* 2008;197(2):959-66.
- Matheussen V, Jungraithmayr W, de Meester I. Dipeptidyl peptidase 4 as a therapeutic target in ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Ther* 2012;126(3):267-82.
- McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, Grumbine FC, Ettinger DS, Donehower RC. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity

- in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med* 1989;111(4):273-9.
- Mello SB, Tavares ER, Guido MC, Bonfá E, Maranhão RC. Anti-inflammatory effects of intravenous methotrexate associated with lipid nanoemulsions on antigen-induced arthritis. *Clinics* 2016;71(1):54-58.
- Mello SB, Tavares ER, Bulgarelli A, Bonfá E, Maranhão RC. Intra-articular methotrexate associated to lipid nanoemulsions: anti-inflammatory effect upon antigen-induced arthritis. *Int J Nanomedicine* 2013;8:443-9.
- Mendeloff EN. The history of pediatric heart and lung transplantation. *Pediatr Transplantation* 2002;6:270-79.
- Menezes AQ, Pêgo-Fernandes PM, Cardoso PFG, Braga KAO, Nepomuceno NA, Pazetti R, Correia AT, Canzian M, Santim JK, Jatene FB. Comparison of Celsior and Perfadex lung preservation solutions in rat lungs subjected to 6 and 12 hours of ischemia using an ex-vivo lung perfusion system. *Clinics* 2012;67(11):1309-14.
- Menges P, Kessler W, Kloecker C, Feuerherd M, Gaubert S, Diedrich S, van der Linde J, Hegenbart A, Busemann A, Traeger T, Cziupka K, Heidecke CD, Maier S. Surgical trauma and postoperative immune dysfunction. *Eur Surg Res* 2012;48:180-6.
- Mizuta T, Kawaguchi A, Nakahara K, Kawashima Y. Simplified rat lung transplantation using a cuff technique. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;97(4):581-7.
- Moura JA, Valduga CJ, Tavares ER, Kretzer IF, Maria DA, Maranhão RC. Novel formulation of a methotrexate derivative with a lipid nanoemulsion. *Int J Nanomedicine* 2011;6:2285-95.
- Nakajima T, Palchevsky V, Perkins DL, Belperio JA, Finn PW. Lung transplantation: infection, inflammation, and the microbiome. *Semin Immunopathol* 2011;33:135–56.
- Pak O, Sydykov A, Kosanovic D, Schermuly RT, Dietrich A, Schröder K, Brandes RP, Gudermann T, Sommer N, Weissman N. Lung Ischaemia-

- Reperfusion Injury: The Role of Reactive Oxygen Species. *Adv Exp Med Biol.* 2017;967:195-225.
- Palmer SM, Burch LH, Davis RD, Herczyk WF, Howell DN, Reinsmoen NL, Schwartz DA. The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(6):628-632.
- Paradis I. Bronchiolitis Obliterans: Pathogenesis, prevention, and management. *Am J Med Sci* 1998(3):161-178.
- Pazetti R. Efeitos da ciclosporina A e da secção brônquica sobre o Sistema mucociliar de ratos. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 110p.
- Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J respir Crit Care Med* 2003;167:490-511.
- Pinheiro KV, Hungria VT, Ficker ES, Valduga CJ, Mesquita CH, Maranhão RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;57(5):624-630.
- Pires LA, Hegg R, Valduga CJ, Graziani SR, Rodrigues DG, Maranhão RC. Use of cholesterol-rich nanoparticles that bind to lipoprotein receptors as a vehicle to paclitaxel in the treatment of breast cancer: pharmacokinetics, tumor uptake and a pilot clinical study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;63(2):281-7.
- Reece TB, Ellman PI, Maxey TS, et al. Adenosine A2A receptor activation reduces inflammation and preserves pulmonary function in an in vivo model of lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;129(5):1137-1143.
- Rodrigues DG, Maria DA, Fernandes DC, Valduga CJ, Couto RD, Ibañez OC, Maranhão RC. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. *Cancer Chemoter Pharmacol* 2005;55(6):565-76.

- Romero SF. Relevancia fisiopatológica de la reprogramación de macrófagos por antifolatos. [Tese]. Madrid: Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid; 2022. 215p.
- Ropponen JO, Syrjälä SO, Krebs R, Nykänen A, Tikkanen JM, Lemström KB. Innate and adaptive immune responses in obliterative airway disease in rat tracheal allografts. *J Heart Lung Transpl* 2011;30:707-16.
- Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst* 1990;82(15):1247-59.
- Rubino FM. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;764(1-2):217-54.
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979;277(5698):665-7.
- Schiff PB, Horwitz SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(3):1561-5.
- Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F, Tsuchihashi SI, Lassman CR, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in the donor organ reduces ischemia and reperfusion injury in a murine liver transplantation model. *Liver Transpl* 2007;13:1435-1443.
- Sukhotnik I, Pollak Y, Coran AG, Pilatov J, Bejar J, Mogilner JG, Berkowitz D. Glutamine attenuates the inhibitory effect of methotrexate on TLR signaling during intestinal chemotherapy-induced mucositis in a rat. *Nutr Metab* 2014;11:17.
- Suzuki S, Hao B, Sugawara T, Matsuda Y, Tabata T, Hoshikawa Y, Saijo Y, Kondo T. Paclitaxel prevents loss of pulmonary endothelial barrier integrity during cold preservation. *Transplantation* 2004;78:524-29.
- Templeton AW, Garrotto LJ. Acquired extracardiac causes of pulmonary ischemia. *Dis Chest* 1967;51:166-71.
- Todd JL, Palmer SM. Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *CHEST* 2011;140(2):502-508.

- Vitorio, T.; Higuchi, M.; Maranhão, R. Combined chemotherapy associated with lipidic nanoemulsions achieves marked atherosclerosis regression in the rabbit. *Atherosclerosis Supplement* 2009, Vol. 10, Issue 2 Abstract: P476
- Wang YM, Ji R, Chen WW, Huang SW, Zheng YJ, Yang ZT, Qu HP, Chen H, Mao EQ, Chen Y, Chen EZ. Paclitaxel alleviated sepsis-induced acute lung injury by activating MUC1 and suppressing TLR-4/ NF- κ B. *Drug Des Devel Ther* 2019;13:3391-3404.
- Wu HS, Zhang JX, Wang L, Tian Y, Wang H, Rotstein O. Toll-like receptor 4 involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2004;3(2):250-253.
- Weyker PD, Webb CA, Kiamanesh D, Flynn BC. Lung ischemia reperfusion injury: a bench-to-bedside review. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2013;17(1):28-43.
- Yonan NA, Bishop P, El-Gamel A, Hutchinson IV. Tracheal allograft transplantation in rats: the role of immunosuppressive agents in development of obliterative airway disease. *Transpl Proc* 1998;30:2207-9.
- Yüceyar S, Ertürk S, Temiz M, Doğusoy G, Gümüştas K, Ozgüroğlu M, Cengiz A, Kafadar Y. Role of the antiangiogenetic drug paclitaxel on healing of intestinal anastomosis: an experimental study. *Tech Coloproctol* 2005;9(3):201-5.
- Zhang D, Yang R, Wang S, Dong Z. Paclitaxel: new uses for an old drug. *Drug Des Devel Ther* 2014;8:279-284.