

MARCELO MANZANO SAID

**EFEITOS DA AZATIOPRINA E DA
TRANSECÇÃO BRÔNQUICA NO
APARELHO MUCOCILIAR:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM
RATOS**

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

**Área de concentração: Cirurgia Torácica e
Cardiovascular**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO MANUEL PÊGO
FERNANDES**

SÃO PAULO

2005

MARCELO MANZANO SAID

**EFEITOS DA AZATIOPRINA E DA
TRANSECÇÃO BRÔNQUICA NO
APARELHO MUCOCILIAR:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM
RATOS**

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

**Área de concentração: Cirurgia Torácica e
Cardiovascular**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO MANUEL PÊGO
FERNANDES**

**SÃO PAULO
2005**

“Você não pode ensinar nada a um homem; você pode apenas ajudá-lo a encontrar a resposta dentro dele mesmo.”

Galileu Galilei

DEDICATÓRIA

A minha esposa Giovanna e aos meus filhos Maria Clara, João Marcelo e Mariana pela compreensão e amor dispensados.

**Aos meus pais, Faíçal e Carmem
(*in memorian*), agradeço pela
educação e pelas oportunidades
recebidas.**

AGRADECIMENTOS

**Ao Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes
pela orientação e ensinamentos transmitidos e
principalmente pela amizade e paciência durante o
desenvolvimento deste trabalho.**

**Ao Prof. Dr. Fábio Biscegli Jatene pela
oportunidade oferecida e por seu exemplo de
liderança na Instituição.**

**Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira pela
disponibilidade, paciência e tempo dedicados ao
precioso auxílio na elaboração deste material.**

**Ao Prof. Dr. José Luis Braga de Aquino, da
PUC Campinas, meu mentor, amigo e companheiro,
pelo estímulo e apoio recebidos para a
concretização deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos biólogos Rogério Pazetti e Dolores Helena R Rivero, pelos ensinamentos e apoio recebidos durante a elaboração deste trabalho, em todas as suas etapas.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Investigação Médica – LIM 61 – e do departamento de Cirurgia Torácica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

**À Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo, ao Instituto do Coração e aos
funcionários da Pós-Graduação pelo meu
aprendizado e desenvolvimento científico.**

Resumo

Said MM. Efeitos da azatioprina e da transecção brônquica no aparelho mucociliar: estudo experimental em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

No laboratório de investigação médica da disciplina de Cirurgia Torácica do Departamento de Cardio-pneumologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo vem sendo desenvolvida uma linha de pesquisa experimental sobre transplante pulmonar, visando elucidar os efeitos que a cirurgia sobre o brônquio e o uso de drogas imunossupressoras têm sobre o aparelho mucociliar. O presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da azatioprina e da transecção brônquica sobre o aparelho mucociliar em ratos. Utilizamos 36 ratos machos da raça Wistar, não isogênicos, pesando de 200 a 250g, obtidos no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os animais foram submetidos à anestesia geral, intubação orotraqueal e ventilação mecânica. Em seguida foi realizada uma toracotomia esquerda com transecção e reanastomose do brônquio principal esquerdo. Por fim síntese do tórax e drenagem fechada, que era retirada quando o animal acordava. Os animais foram divididos em dois grupos: com administração de azatioprina e com administração de solução de salina. Eles foram sacrificados aos 7, 15 e 30 dias para retirada dos pulmões e árvore brônquica. O muco foi coletado do brônquio direito e esquerdo. Foi realizada a medida da velocidade do transporte mucociliar à direita e esquerda dos dois grupos e posterior análise das propriedades dos mucos através da medida da velocidade de transporte relativa no palato de rã e da medida do ângulo de contato. As medidas das variáveis dos brônquios direito e esquerdo com e sem azatioprina nos três tempos de avaliação foram submetidas ao teste de Análise de Variância de Duplo Fator. Nos resultados a velocidade do transporte à esquerda foi significativamente reduzida pela transecção

brônquica quando comparada entre os grupos: mostrando-se pior aos 30 dias. A velocidade relativa e o ângulo de contato dos mucos coletados à esquerda mostraram com significado estatístico uma piora nas propriedades do muco pela transecção, principalmente aos 30 dias. Com a azatioprina e a transecção observamos piora na velocidade do transporte mucociliar significativa ao longo do tempo, maior aos sete dias e com uma progressiva melhora até os 30 dias. O estudo mostrou que a azatioprina não acarretou piora quando associada à transecção. Na presença de azatioprina houve melhora das propriedades do muco, tendo a velocidade do transporte relativo e o ângulo de contato melhora significativa ao longo do tempo. A azatioprina previne uma piora da qualidade do muco. Concluimos que a transecção brônquica piora o transporte mucociliar; a azatioprina preserva as propriedades do muco; a azatioprina piora o transporte até os sete dias; a azatioprina não interage com a transecção para a redução da velocidade do transporte mucociliar e para a piora do muco.

Summary

Said MM. Effects of azathioprine on the mucociliary system in a model of bronchial transection and reanastomosis in rats [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2005.

At the Experimental Thoracic Surgery Laboratory, Department of Cardio-Pneumology , Department of Pathology, Experimental Air Pollution Laboratory, in the Medical School, São Paulo University, research in lung transplantation, administration of immunosuppression drugs and their effects on the mucociliary system are carried out. We develop models of bronchial transection and reanastomosis, unilateral lung transplantation, mucociliary transport velocity and mucus transportability in rats, which allow us to observe the resulting alterations. The mechanisms involved in the impairment of the mucociliary function after lung transplantation and immunosuppression therapy are not yet completely understood. The purpose of the present study was to evaluate the effects of azathioprine on the mucociliary system in a model of bronchial transection and reanastomosis in rats. We used 36 rats, submitted to general anesthesia, tracheal tube, mechanical ventilation and left thoracotomy, followed by a left main stem bronchus transection and reanastomosis. The animals were separated into 2 groups that received or not azathioprine (AZA), and being sacrificed at 7, 15 and 30 days after the surgical procedure. *In situ* bronchial mucociliary transport (MCT) was determined distal to the anastomosis of the left main stem transected bronchus (LTB) and in the right intact bronchus (RIB). We also studied the surface properties of mucus by using *in vitro* mucus transportability with a frog palate preparation and mucus contact angle (mucus adhesively) collecting mucus from LTB and RIB. The measures obtained were submitted to statistical analysis. The results showed that the MCT velocity (mm/min) was significantly lower ($p<0.01$) in the LTB without the AZA administration

compared with the RIB with or without AZA. At the LTB with AZA administration there was significant difference ($p < 0.05$) at 7 days compared with the RIB with and without AZA and no significant difference at 15 and 30 days ($p > 0.05$). Mucus *in vitro* transportability and adhesiveness showed the worst result at the LTB without AZA ($p < 0.05$). In the group that received AZA on 30 days of LTB there was no significantly difference in mucus properties ($p > 0.05$) compared with the RIB groups (with and without AZA). We concluded that AZA led to a temporary marked impairment of MCT, while this occurrence was maintained up to 30 days in the transected bronchus. In addition, AZA contributes to preventing alterations in the mucus surface properties.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O Aparelho Mucociliar.....	1
1.2. Aspectos específicos da literatura sobre transplante pulmonar e imunossupressão.....	15
2. OBJETIVO.....	22
3. MATERIAL E MÉTODO.....	23
3.1. Desenho Experimental.....	23
3.2. Técnica Cirúrgica da Transecção Brônquica.....	23
3.3. Técnica da Diluição e Administração da Azatioprina.....	28
3.4. Coleta do Muco.....	29
3.5. Medida da Velocidade de Transporte Mucociliar.....	29
3.6. Avaliação das características do muco:	31
3.6.1. Transportabilidade mucociliar no palato de rã.....	31
3.6.2. Obtenção do ângulo de contato.....	34
3.7. Análise estatística.....	36
3.8. Anatomia patológica.....	37

4. RESULTADOS.....	38
4.1. Velocidade de Transporte Mucociliar – <i>in situ</i>	38
4.2. Transporte mucociliar <i>in vitro</i> – palato de rã.....	44
4.3. Ângulo de contato.....	46
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
Apêndices.....	81

1. INTRODUÇÃO

1.1.O Aparelho Mucociliar

O aparelho mucociliar do trato respiratório atua como mecanismo de defesa primário contra agentes inalados em condições fisiológicas normais.

Outras importantes funções por ele desempenhadas são: regulação da umidade do ar inspirado, participação no ajuste da temperatura corpórea e da relação entre ventilação e perfusão nos pulmões.

Todas estas funções são obtidas através do delicado equilíbrio em que atuam os elementos do sistema respiratório e suas ações mecânica, bioquímica, inflamatória e imunológica. Uma alteração de qualquer um desses elementos pode acarretar prejuízo para o próprio órgão e para o indivíduo.

As unidades respiratórias, sua ventilação e perfusão, precisam ser mantidas sem variações consideráveis, o que requer regulação ativa dos calibres dos elementos da árvore respiratória e dos vasos por células musculares lisas, integradas a elementos capazes de distribuir estas informações, por via neural ou humoral, ao restante dos pulmões, para o funcionamento integrado de todo o sistema com o objetivo da

manutenção da função primordial dos pulmões: trocas gasosas entre o ar atmosférico e o sangue⁴⁷.

A manutenção da estabilidade de todo o sistema de regulação depende diretamente do bom funcionamento dos mecanismos de proteção que revestem as superfícies do espaço aéreo. Sendo os pulmões órgãos que têm contato direto com o meio atmosférico e suas substâncias particuladas e microorganismos em suspensão, barreiras com permeabilidade e atividade adequadas devem atuar para manterem estes espaços limpos.

A remoção de partículas depositadas nas vias aéreas, denominada transporte mucociliar, consiste no acoplamento de um componente viscoelástico a outro mecânico, o muco respiratório e o epitélio ciliado respectivamente. Esta atividade associada resulta na capacidade de promover um fluxo de fluido em direção à orofaringe. Este fluxo sistemático e organizado de um meio com propriedades reológicas muito particulares tem como consequência a depuração de substâncias e partículas depositadas ao longo do trato respiratório, e constitui-se no mais importante mecanismo de defesa dos pulmões frente a microorganismos ou outros agentes agressores inalados^{48,49}.

O entendimento da fisiologia deste transporte e de suas aplicações clínicas requer a revisão dos conceitos da morfologia do epitélio respiratório, da regulação do fluido ao longo das vias

aéreas, da composição bioquímica e reológica dos produtos de secreção brônquica e da mecânica da interação entre o cílio e o muco^{56,58}.

As vias aéreas são divididas em vias de condução e de trocas gasosas. As vias de condução iniciam-se na traquéia e vão até os bronquíolos terminais, aumentando sua dicotomização à medida que se aproximam das vias de trocas gasosas, ramificando-se e tornando-se mais estreitas e numerosas com 23 níveis de gerações desde a traquéia até os alvéolos pulmonares. Essas subdivisões permitem aumentar a superfície total de troca gasosa fazendo também com que o fluxo aéreo se torne mais lento, passando de turbulento para laminar, facilitando o processo de troca que se inicia nos bronquíolos respiratórios^{14,26}.

Esta anatomia das vias de condução facilita a deposição das partículas inaladas através de três mecanismos: do choque destas com a parede, principalmente nas regiões de bifurcação; da sedimentação de partículas com tamanho entre 0,5 e 5,0 μm (incluindo a maioria dos patógenos) principalmente nos locais onde o fluxo é mais lento (laminar); e do “bombardeio” das partículas com superfícies menores que 0,5 μm pelas moléculas de gás das vias aéreas menores onde o fluxo está reduzido ao máximo. Estes três mecanismos descritos denominam-se:

impactação inercial, sedimentação gravitacional e movimentos “brownianos”^{71,122}.

Se o particulado retido por estes mecanismos não fosse removido pelo aparelho mucociliar, em algum tempo obstruiria as vias aéreas^{66,67,74}.

De um modo esquemático, os brônquios que compõem as vias aéreas possuem na sua parede três porções: a mucosa, a submucosa e a camada muscular⁷. A mucosa é composta de epitélio pseudoestratificado ciliado sustentado por uma membrana basal. Abaixo se encontra a lâmina própria da mucosa composta por colágeno e fibras elásticas, por onde passam os vasos sanguíneos, canais linfáticos e nervos eferentes (motores) e aferentes (sensoriais). Sem uma divisão nítida segue mais profundamente a submucosa com fibras elásticas que lhe dão uma construção frouxa. Nela se localizam as glândulas secretoras (mucosas, serosas) que através de seus dutos vão eliminar suas secreções na superfície epitelial. A camada muscular, a mais profunda, oferece sustentação e protege as demais e sua capacidade contrátil permite mobilidade para a via aérea.

No epitélio se encontram vários tipos celulares¹⁴. Sua distribuição é diferente nos vários níveis das subdivisões brônquicas e de acordo com a atividade protetora necessária. De um modo geral as células presentes são: basais e ciliadas, com

função mecânica de formação do fluxo ciliar; mucosas, com função de produção muco; neuroendócrinas, com função do transporte e estímulo humoral; indiferenciadas, com função de reposição epitelial. O tipo e a velocidade de sua diferenciação se darão com o estímulo humoral, decorrente da necessidade de reposição epitelial. E por fim, temos as células do sistema imunológico como linfócitos, mastócitos, polimorfonucleares e macrófagos, que podem estar em maior ou menor número pela sua capacidade de migrar para a superfície epitelial, de acordo com o estímulo patológico da via aérea³⁵.

Como o presente trabalho aborda as alterações no aparelho mucociliar, iremos descrever os principais mecanismos das células secretoras e ciliadas para a manutenção da eficiência do transporte mucociliar.

A característica especial do epitélio respiratório de ser recoberto por células ciliadas, desde os segmentos iniciais até as últimas gerações de bronquíolos, com composições variáveis ao longo de sua extensão, demonstra sua função essencial na manutenção da vitalidade dos pulmões. Junto com as células epiteliais ciliadas ocupam papel importante as células secretoras do muco respiratório, que estão distribuídas nas glândulas da mucosa e da submucosa. Sua quantidade e distribuição decrescem em direção às vias distais ou alveolares^{76,83,89}.

Nas porções proximais, vias aéreas cartilaginosas, as células secretoras compreendem células mucosas, serosas e células de Clara. As células mucosas, também chamadas de células caliciformes, possuem corpo colunar, têm o citoplasma repleto de grânulos mucosos e ribossomos, principalmente em sua porção apical. Possuem retículo endoplasmático granular e complexo de Golgi bem desenvolvidos. Elas produzem grande quantidade de glicoproteínas sulfatadas, que conferem o caráter viscoso de sua secreção. O muco por elas produzido compõe-se de glicoproteínas ácidas e neutras^{34,91,100}. Em situações de irritação crônica por poluentes, as células mucosas podem aparecer nos bronquíolos e nas vias aéreas terminais. Isto pode ocorrer por transformação das células serosas e de Clara em mucosas, como resposta ao irritante.

As células serosas têm secreção menos viscosa que a das células mucosas, e são responsáveis pela produção do fluido periciliar (fase sol) que fica abaixo da camada de muco secretando enzimas importantes para a ação antimicrobiana, como a lisozima. Elas são encontradas em várias porções do epitélio traqueobrônquico, sendo difusamente distribuídas, inclusive em bronquíolos³⁴.

As células de Clara são mais encontradas nos bronquíolos, sendo células secretoras principalmente de lipoproteínas que vão compor o surfactante alveolar⁴. Também

contribuem para formação do fluido periciliar nas porções mais distais. Possuem capacidade de metabolização oxidativa de substâncias irritantes participando assim do sistema de proteção contra partículas.

O muco produzido pelas células secretoras tem a função de servir de veículo para a absorção e o transporte das substâncias e lise de microorganismos. Seu principal componente é a mucina, um polímero hidrofílico e viscoelástico de alto peso molecular que tem a capacidade de interagir com microorganismos¹⁴¹.

Além da mucina, o muco contém 95% de água, eletrólitos: K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Na^+ , carboidratos, aminoácidos, proteínas, lipídeos, substâncias antioxidantes, tampões, imunoglobulinas (IgA secretora, IgG, IgM) e enzimas como a lisozima e lactoferrina, essa última com função de capturar íons ferro, que é o principal substrato para o desenvolvimento bacteriano⁴².

Esta mistura heterogênea de diferentes secreções no muco respiratório vai dar um aspecto final de um polímero-gel, formando um fluído bifásico sobre toda a superfície epitelial que se divide em fluído periciliar (fase sol) próximo à superfície ciliar, e a camada de muco (fase gel), sobre o anterior, mais próximo à luz da árvore respiratória¹⁴⁰.

A fase sol é contínua e recobre toda a superfície mucosa desde a traquéia até os bronquíolos. A fase gel é fragmentada

em diversos pontos pela ação do batimento ciliar. Para o funcionamento adequado de depuração das partículas os fluídos têm que manter o perfeito equilíbrio entre suas composições e níveis. Se o fluido periciliar aumenta sua espessura, o topo do cílio não atinge a camada de muco, ocasionando o desacoplamento do muco e do cílio com prejuízo no transporte mucociliar. De outro modo, se o nível de fluido periciliar diminui sua espessura, o muco aproxima-se da superfície ciliar e se adere a esta, ocasionando um bloqueio mecânico que impede sua propulsão¹⁴⁴.

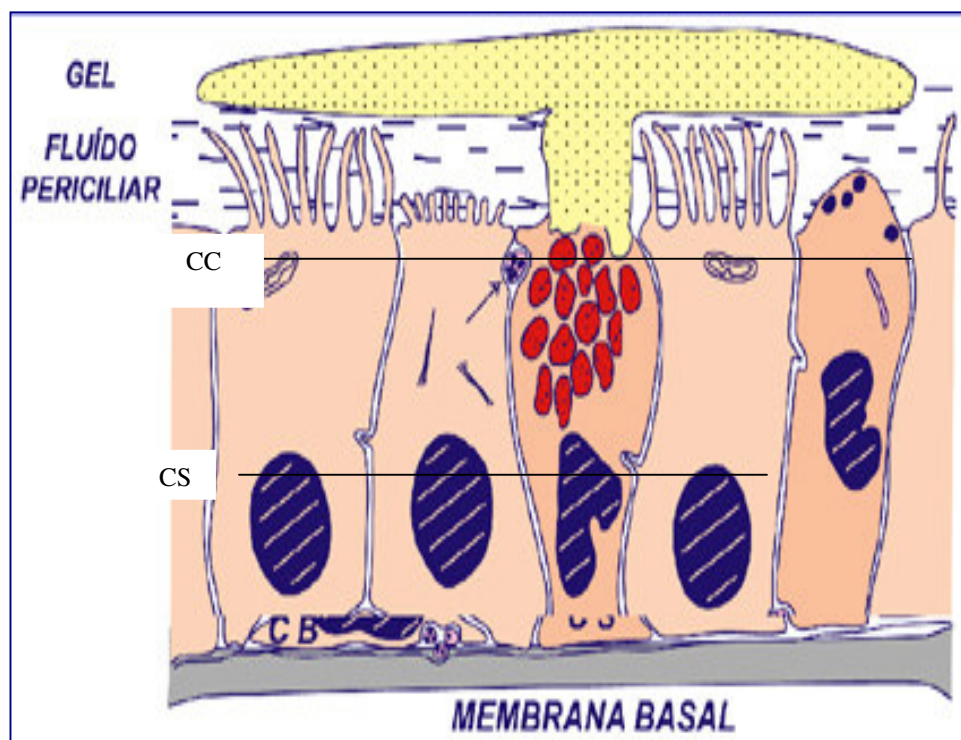


Figura 1: Esquematização do epitélio da via aérea: (CC) célula ciliada, (CS) célula secretora, (CB) célula basal.

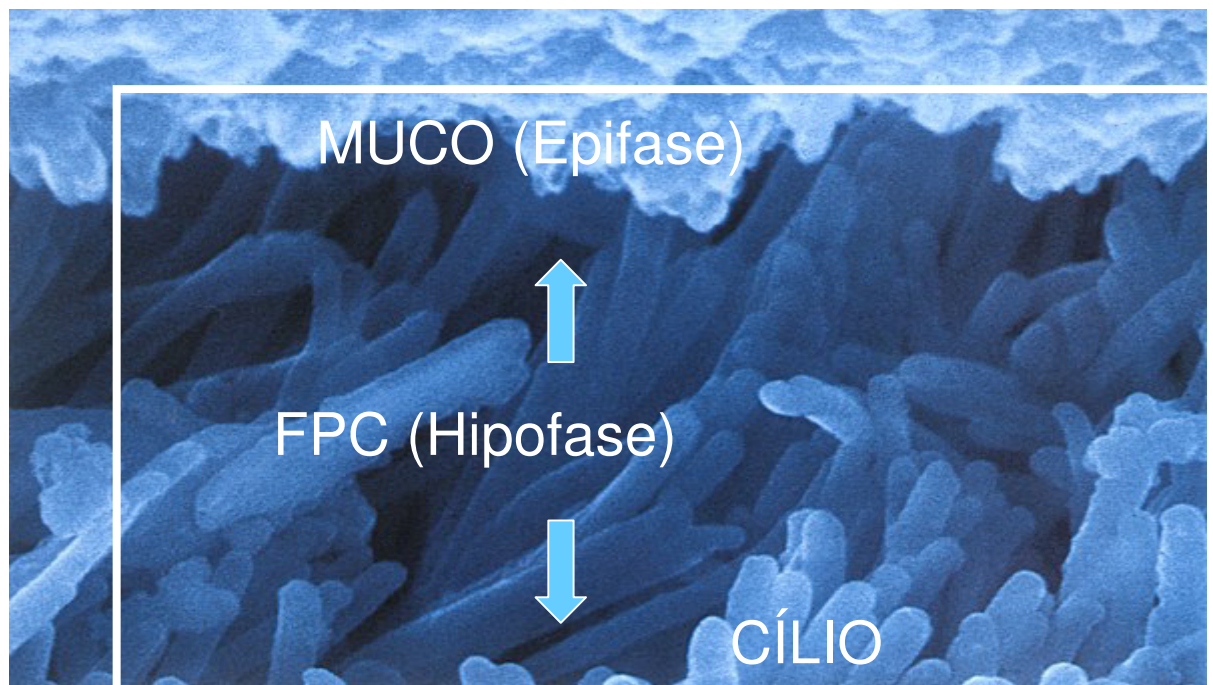
Cerca de 10 a 100 mililitros de líquido é transportado através da traquéia a cada dia em direção à orofaringe sendo comumente deglutido junto à saliva. A secreção do fluído periciliar tem também a função de hidratar a fase gel, podendo aumentar consideravelmente seu volume de acordo com os estímulos irritativos, como as infecções⁶⁵.

O fluído periciliar é controlado pelas células epiteliais através do transporte ativo de íons seguidos passivamente pela água, sendo ele hipoosmolar, com maior conteúdo de potássio e levemente ácido. Sua homeostase se dá através da ação de dois sistemas de transportes de íons presentes na célula epitelial, que são **ATP-dependentes**: um para a secreção do cloro e outro para absorção do sódio²⁸. Em condições normais, o fluxo predominante é o da absorção do sódio, o que explica a menor concentração desse íon no fluído periciliar¹².

O muco da fase gel se encontra na porção final das glândulas mucosas, condensado em grânulos no Complexo de Golgi dessas células. Em contato com a membrana celular, elimina grande quantidade dos íons Cálcio e Sódio, o que permite rápida hidratação do muco (descondensação) e sua expansão com aumento em centenas de vezes do seu volume em cerca de 3 segundos. Suas propriedades reológicas (viscosidade e elasticidade) são mantidas pela densidade do entrecruzamento de seus polímeros¹³⁸. Quando há maior hidratação do muco,

esse entrecruzamento se afrouxa e conseqüentemente a sua densidade diminui o que o torna mais solúvel ou pastoso, aumentando sua capacidade de ser transportado^{65,68,70}.

Sistema mucociliar



Microscopia eletrônica superfície ciliar respiratória
FPC – fluido periciliar
Movimento ciliar penetrando no muco respiratório

As células ciliadas constituem-se no “motor” do sistema de transporte mucociliar. Estas células possuem forma colunar, retículo endoplasmático rugoso desenvolvido, sistema de Golgi bastante evidente e numerosas mitocôndrias dispostas em maior número na porção do citoplasma próxima à face luminal da célula^{84,103}. Esta disposição preferencial das mitocôndrias é a expressão morfológica da capacidade dessas células de metabolizarem o oxigênio presente no ar que circula pelas vias aéreas e explica também por que situações de hipóxia perturbam o funcionamento adequado dos cílios²⁹.

Sobre a membrana celular da sua face luminal ficam dispostos cerca de 200 cílios, com 6 µm de comprimento e 0,25 µm de largura, cada. Para seu funcionamento perfeito é necessário que as células, dispostas lado a lado, formem uma unidade coesa que proporcione ao epitélio estabilidade mecânica. Isso é possível devido às complexas junções e interdigitações que ligam as células ciliadas às células adjacentes firmemente. Entre as células ciliadas, lateralmente e superiormente, existem as “tight junctions”, que bloqueiam o espaço intercelular auxiliando a função do transporte iônico; as junções intermediárias, no ápice, que propiciam força mecânica à célula; e os desmossomos, que as conectam inferiormente às células basais¹⁰⁵.

A frequência do movimento ciliar, o número de cílios por células, o comprimento dos cílios e o próprio número de células ciliadas diminuem à medida que se aproximam das vias aéreas mais periféricas. Isso é necessário porque a organização dicotômica das vias aéreas, multiplicando progressivamente a área epitelial, exige que o transporte de muco seja mais veloz nas vias proximais para que não ocorram acúmulos. Assim sendo, como temos uma velocidade de transporte ciliar tanto maior quanto mais proximal for a via aérea analisada, os produtos de secreção das vias aéreas mais distais podem escoar livremente pelas vias aéreas proximais por encontrarem nestas uma velocidade de transporte significativamente maior^{107,126}.

Os cílios são umas extensões da superfície livre da célula. Eles possuem nove pares periféricos de fibrilas tubulares, interligados por pontes protéicas que se dispõem ao redor de um par central. Esse tipo de arranjo forma um axonema central com estrutura tipo 9-2, sendo importante para o controle de seus movimentos¹⁴³. Esse axonema está ligado a um corpúsculo basal constituído por centríolos com componente ortogonal. Todo o conjunto cílio-corpúsculo basal é denominado complexo ciliar e, a partir de uma saída da célula, é envolvido pela membrana celular de uma forma contínua¹¹¹. Entre as pontes protéicas está presente uma proteína globular denominada dineína¹⁰. A dineína mantém estáveis as ligações protéicas e, portanto os cílios sem

movimentos. Quando ocorre hidrólise do ATP pela dineína ATPase, a energia fornecida provoca a ruptura das ligações das pontes protéicas com a dineína e o deslizamento dos cílios na direção seqüencial da hidrólise desta, fazendo com que a estrutura ciliar se mova no mesmo sentido^{117,125}.

Esta seqüência de movimento ciliar vai determinar o ciclo do batimento ciliar e a eficiência do transporte mucociliar. A propulsão do fluido brônquico pelos cílios é resultante do batimento ciliar assimétrico³⁹.

O ciclo completo do batimento ciliar pode ser composto de duas fases: uma fase de batimento efetivo, na qual os cílios alcançam a sua extensão máxima, penetram a sua extremidade na epifase gel e executam um movimento em arco em um plano perpendicular à superfície da célula ciliada; e uma fase de batimento de recuperação, na qual o cílio se dobra em direção à superfície celular, ficando paralelo a esta, retornando à posição inicial do ciclo através da fase de menor impedância, a hipofase sol, a uma velocidade duas vezes menor do que a de batimento efetivo.

Sendo assim, a epífase gel, por estar mais distante da parede brônquica e por receber uma força maior por parte do cílio, é propelido predominantemente em uma direção¹²⁴. Por outro lado, a hipófase sol está sob influência mais importante do batimento de recuperação e das forças inerciais da parede

brônquica, ocorrendo predominantemente um fluxo oscilatório nesta região¹¹⁹.

Todos os fatores relacionados à transmissão de energia cinética do cílio para o muco são influenciados pela propriedade reológica do muco. Esta determina a relação entre viscosidade e elasticidade da secreção brônquica, e representa um papel fundamental na determinação da eficiência do transporte ciliar¹³¹.

Fica claro com essa revisão que qualquer mudança no volume e distribuição do muco e de suas fases acarretará em uma redução na velocidade do transporte mucociliar¹²¹. Essas mudanças são observadas em uma série de doenças pulmonares como bronquite crônica, fibrose cística e bronquiectasias.

Nos processos infecciosos (pneumonias) as mudanças são mais agudas, assim como após grandes cirurgias de secção brônquica com anastomose (broncoplastias) para ressecção pulmonar e nos transplantes de pulmão. Nesses casos, os mecanismos envolvidos no prejuízo do transporte mucociliar não estão bem esclarecidos.

Especificamente no transplante de pulmão, a piora do transporte mucociliar não está bem dimensionada e as justificativas talvez estejam relacionadas a uma variedade de fatores tais como o trauma cirúrgico da transecção brônquica, a anastomose brônquica, a desnervação brônquica, a

desvascularização brônquica e a utilização de drogas imunossupressoras^{30,128}.

Um melhor entendimento das alterações que ocorrem pode levar a atitudes terapêuticas que diminuam a prevalência de complicações e infecções pulmonares em pacientes receptores de transplantes de pulmão e coração-pulmão. Dentro dessa proposta, este estudo foi desenhado para avaliar o aparelho mucociliar utilizando-se dois fatores presentes na prática clínica dos transplantes pulmonares e possivelmente envolvidos no prejuízo do transporte mucociliar: a secção brônquica e uso de droga imunossupressora.

Desse modo, para este trabalho, o uso de animais de experimentação é adequado e justificável¹⁵⁰.

1.2. Aspectos específicos da literatura sobre transplante pulmonar e imunossupressão.

O esclarecimento das bases da rejeição nos enxertos de órgãos pelo inglês Peter Medewar, no início da década de 1940, levou ao aumento das pesquisas para o transplante de órgãos.

Em 1947, o fisiologista russo Demikhov realizou com sucesso enxertos de lobos pulmonares em cães. Em 1950, Metras⁸⁶, na França, publicou o primeiro trabalho sobre a técnica de transplante pulmonar em cães e estabeleceu o princípio

técnico da anastomose da veia pulmonar realizada com o átrio esquerdo, o que é adotado até hoje.

No ano de 1954, nos Estados Unidos, Webb and Hardy⁴⁶, utilizando modelos experimentais de transplante pulmonar em cães, documentaram que a deterioração funcional do enxerto levava à morte do animal receptor em aproximadamente sete dias. Esse resultado foi atribuído à rejeição. Em seguida, Hardy observou que a sobrevida dos animais submetidos ao transplante pulmonar unilateral praticamente dobrava com o uso de metotrexate, e relatou ainda que o uso de azatioprina aumentava a sobrevida em até 30 dias.

Após extensa investigação e experimentação laboratorial, Hardy, em 1963, na Universidade do Mississippi, realizou o primeiro transplante de pulmão em humanos⁴⁶. O paciente receptor sobreviveu por 18 dias e sua morte foi atribuída à insuficiência renal e desnutrição.

Aproximadamente 40 transplantes de pulmão foram realizados em diferentes centros médicos nos 15 anos subseqüentes. Nenhum deles obteve sucesso pós-operatório com sobrevida aceitável. O melhor resultado desse período, no qual um jovem paciente obteve alta hospitalar após oito meses de internação, foi relatado por Derom²⁷ em 1971. No entanto, ele sobreviveu por um curto período após sair do hospital e sua morte foi atribuída à infecção e complicações brônquicas.

Até 1980, as tentativas de transplante pulmonar na maioria dos centros pesquisadores sucumbiam devido a sérias complicações cirúrgicas e infecciosas.

Nesse período, a imunossupressão utilizada consistia em altas doses de prednisona e azatioprina^{113,137}. Os pesquisadores admitiam que o uso de corticosteróides em altas doses certamente prejudicava a cicatrização, mas postulavam quais seriam os outros fatores preponderantes, tais como: isquemia, secção da artéria brônquica, rejeição e os efeitos da imunossupressão^{16,17}, e suas combinações que afetariam a função do pulmão enxertado.

As principais causas de insucesso observadas eram as rejeições, as infecções, principalmente pneumonia⁸ e a isquemia do brônquio do pulmão implantado.

Mesmo com o desenvolvimento da técnica da preservação do pulmão doado, das técnicas de anastomose brônquica⁶ com o uso de enxertos com epiplon²² e de reanastomoses do suprimento das artérias brônquicas, foi somente a partir de 1981, com a introdução da ciclosporina como novo agente imunossupressor potente, que se deu um maior desenvolvimento nesse método terapêutico⁸⁵, tornando-o amplamente indicado no tratamento de pacientes com doenças pulmonares em estágio avançado, dito terminais, sendo algumas vezes a sua única opção.

Entretanto, apesar de toda a experiência acumulada por vários centros mundiais nos últimos 15 anos⁸⁷, da melhora nos métodos de preservação do pulmão do doador, do melhor controle das infecções com uso de antibióticos de maior espectro de ação e do surgimento de outras drogas imunossupressoras, a mortalidade e a morbidade decorrentes das complicações brônquicas, infecciosas e relacionadas à rejeição do enxerto continuam altas^{5,20,21}.

A principal causa de morte no primeiro mês pós transplante de pulmão é a infecciosa^{3,23}, o que coincide com o mesmo período de maior disfunção do aparelho mucociliar⁸⁸. Esse fato nos leva a inferir que as alterações agudas provocadas pelo procedimento impedem o funcionamento adequado do Aparelho Mucociliar que, por sua incapacidade de proteger e depurar a via aérea, aumenta a possibilidade do desenvolvimento de infecções⁵⁰.

Desde o início dos transplantes até hoje, a busca de um protocolo de imunossupressão ideal é contínua. É consenso que a imunossupressão precisa conter drogas e regimes de administração que possam promover:

- tolerância específica contra os antígenos do doador por tempo prolongado, reduzindo a rejeição tardia;
- o mínimo de efeitos adversos;

- aperfeiçoamento precoce da função do enxerto evitando assim a rejeição aguda;
- baixo índice de indução à hipersensibilidade;
- tempo mínimo de hospitalização;
- um bom equilíbrio, impedindo o risco de “alta imunossupressão” (aparecimento de tumores e infecções) ou de “baixa imunossupressão” (aparecimento de rejeição e perda do enxerto).

Com esses objetivos, estabeleceu-se por quase dez anos o uso de terapia de imunossupressão tri modal consistindo na administração de azatioprina pré-operatória, ciclosporina per - operatória e esteróides duas semanas após a implantação do enxerto¹¹⁰.

Apesar do uso rotineiro dessas drogas, difundido por todos os centros transplantadores, seus mecanismos de ação sobre o aparelho mucociliar pulmonar nunca foram bem esclarecidos^{148,149}.

Com o advento de novas drogas na terapia imunossupressora, desenvolvimento técnico e dos cuidados de pós-operatório, o número de transplantes de pulmão realizados na última década vem aumentando. Porém, não houve proporcional redução das taxas de morbidade e mortalidade, ao contrário do que ocorreu com os transplantes de rins, fígado e coração^{142,92}.

A utilização de drogas imunossupressoras é o fator sistêmico comum em todos os transplantados de pulmão. As ações dessas drogas sobre o retardo na cicatrização brônquica vêm sendo estudadas, porém pouco se sabe quanto às suas ações sobre o aparelho mucociliar e suas interações locais^{45,51,148}.

Desse modo, se pode especular que os agentes imunossupressores, fundamentais para modular o equilíbrio da resposta inflamatória e imunológica, podem influenciar os mecanismos do transporte mucociliar, ou ainda somar-se à ação do trauma da secção e anastomose brônquica, levando a um maior risco de infecção nesses pacientes.

Conforme já descrito na prática clínica, os agentes imunossupressores mais empregados e com maior tempo de utilização são a Ciclosporina A, a Azatioprina e os Corticosteróides. Para o desenho deste estudo optamos pela utilização da azatioprina.

A Azatioprina, sintetizada no início dos anos 50, é utilizada extensivamente há mais de 30 anos nos transplantes de órgãos maciços. Entretanto, o mecanismo de sua citotoxicidade não está completamente definido¹⁴⁸.

A Azatioprina é uma pró-droga inativa que faz parte do grupo das Tiopurinas. Sua metabolização formará a 6-mercaptopurina e a 6-tioguanina, que são os compostos ativos

com capacidade de incorporação no RNA e DNA celular, diminuindo progressivamente a produção de ATP até que os níveis atingidos levem à disfunção celular e citólise^{1,2}.

Essas modificações na formação do ATP celular com a conseqüente diminuição da atividade celular caracteriza o mecanismo de ação de imunossupressão dessa droga.

Existem poucos estudos na literatura a respeito da ação da azatioprina sobre o aparelho mucociliar, isoladamente ou associada à desnervação e desvascularização do brônquio presentes nos transplantes de pulmão.

O progresso no entendimento dessas alterações, sua intensidade e através de quais mecanismos elas ocorrem, poderá melhorar as ações terapêuticas que prevenirão as complicações infecciosas nos pacientes transplantados de pulmão.

Nesse contexto, o desenvolvimento deste estudo experimental avaliou o transporte mucociliar quando submetido à ação de fatores presentes após o transplante de pulmão, localmente sobre a estrutura brônquica e sistemicamente através da ação de droga imunossupressora (Azatioprina).

2. OBJETIVO

Avaliar a ação da Azatioprina e da Transecção brônquica sobre o muco e o transporte mucociliar em ratos, isolada e associadamente.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Desenho Experimental

Utilizamos trinta e seis (36) ratos machos da raça Wistar, não isogênicos, pesando de 200 a 250 g no dia de entrada no estudo. Foram obtidos do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, tendo recebido dieta balanceada e água à vontade durante todas as etapas do experimento.

Os animais foram divididos em dois grupos e seis subgrupos baseados na administração da droga e no tempo de sacrifício após a realização da cirurgia de transecção brônquica: Grupo 1 – animais submetidos à transecção brônquica e administração de solução salina; estudados após 7, 15 e 30 dias; Grupo 2 – animais submetidos à transecção brônquica e administração da azatioprina; estudados após 7, 15 e 30 dias.

3.2. Transecção brônquica – técnica

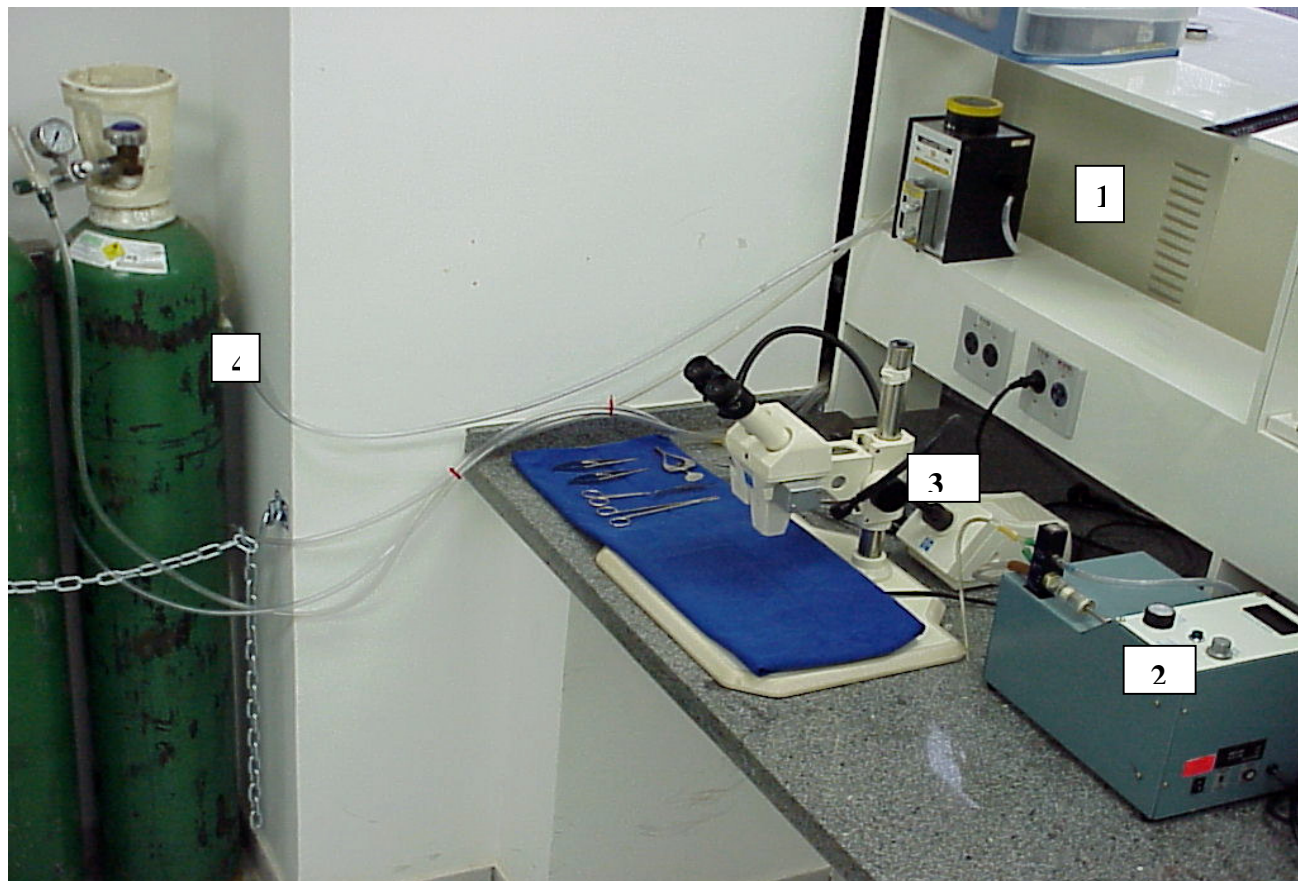
O aprendizado da técnica foi obtido através de treinamento no laboratório com o modelo em questão, tendo sido desenvolvido a partir dos estudos de transplantes de pulmão em ratos^{90,102}, modificado e estabelecido em trabalho realizado no laboratório de Cirurgia Torácica¹¹⁵. A proposta de utilização de

ratos se deu pela uniformidade da raça, economia e facilidade de procriação em biotério. Para que não ocorressem diferenças na elaboração da anastomose que pudessem interferir nos resultados, todos os animais foram operados pelo mesmo pesquisador após treinamento⁸⁰.

O procedimento iniciou-se com os animais anestesiados em câmara com gás anestésico (isoflurano); em seguida, procedeu-se a entubação orotraqueal com auxílio de laringoscópio pediátrico adaptado para pequenos animais e catéter de polietileno de 7,0 cm de comprimento por 1,6 cm de diâmetro externo.

A ventilação mecânica foi realizada através de ventilador de roedores (modelo 683; Harvard Apparatus) e a manutenção da anestesia por via inalatória com gás anestésico isoflurano nebulizado com oxigênio puro (100%) através de nebulizador de gases Enflovapor modelo 1223 K.Takaoka com um fluxo de 0,5 litros/minuto, mantidos com um volume corrente de 10 ml/Kg (volume médio na prática de 2,5 ml) e frequência respiratória de 60 ciclos por minuto.

Sistema para anestesia e ventilação mecânica

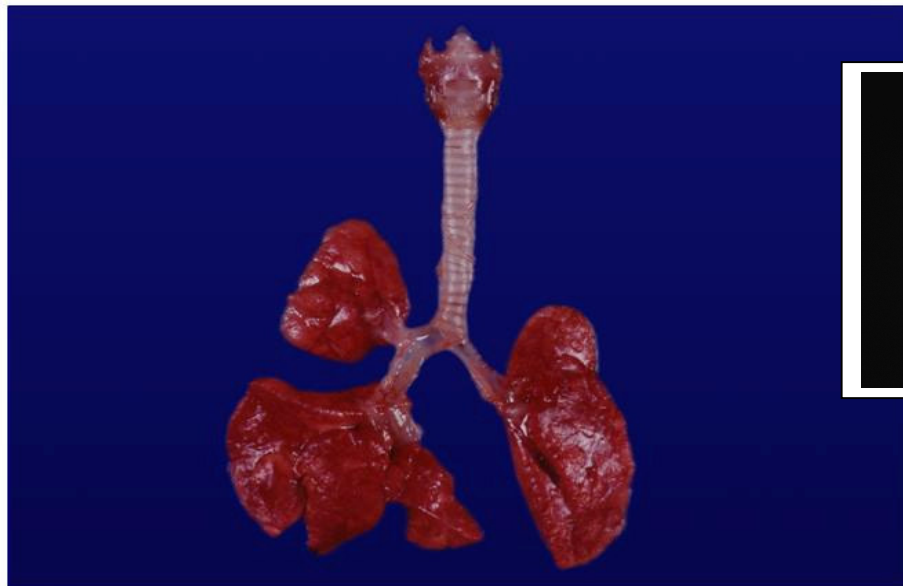


1. nebulizador de gases
2. ventilador de pequenos animais
3. lupa
4. cilindro de oxigênio

Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito sobre uma manta térmica. Procedemos à tricotomia do hemitórax esquerdo, e à toracotomia lateral com abertura no 5º ou 6º espaço intercostal.

Com o uso de um microscópio estereoscópico (Zeiss, modelo Stemi DRC, Germany) e aumentos de oito e 16 vezes e com auxílio de um foco de luz fria foi realizada a divulsão cuidadosa do ligamento pulmonar inferior, dissecação do hilo com isolamento do brônquio principal esquerdo em toda a sua extensão e clampeamento deste com fio de algodão pré-cortado 2-0 próximo à carina principal.

O brônquio principal esquerdo foi seccionado na sua porção média em todo o seu diâmetro. Em seguida procedeu-se a reanastomose das porções distal e proximal utilizando-se fio polipropileno 8-0, através de sutura contínua interrompida na transição da porção membranosa para a porção cartilaginosa. Ao final, o fio do clampeamento brônquico foi retirado havendo o restabelecimento da ventilação do pulmão esquerdo. A integridade da anastomose foi averiguada através de manobra de hiperinsuflação do pulmão esquerdo, submerso em soro fisiológico.



**Peça dissecada p
Transporte e col**

Foi realizada a instalação de cateter de Levine nº 14 três espaços inferiormente à toracotomia para drenagem torácica. O fechamento foi feito em três planos - aproximação das costelas com nylon 2-0 sutura simples separada, sutura contínua do músculo e da pele com nylon 2-0. Seguindo-se à hiperexpansão pulmonar e a retirada do ar e de secreções através do dreno torácico. Os animais foram mantidos sob ventilação com oxigênio até sua completa recuperação.

3.3. Diluição e Administração da Azatioprina

Foi utilizada a Azatioprina (Imuran®) em comprimidos, na dose de 3,0 mg/kg, a mesma dose de administração na prática clínica. Os comprimidos de 50 mg foram diluídos em 50 ml de solução salina a 0,9% homogeneizada em centrifugador, obtendo-se então 1,0 mg de Azatioprina por ml dessa solução.

Todos os animais foram pesados diariamente e sedados em câmara com gás anestésico (isoflurano) por 2 minutos. Em seguida, os animais foram colocados em posição para entubação e foi introduzida sonda de Levine nº 4 por via orogástrica sob visualização direta através da qual se administrou a droga com seringa de graduação milesimal. Este procedimento foi realizado diariamente até o sacrifício.

Nos animais do grupo SEM Azatioprina administrou-se solução salina a 0,9% no mesmo volume da solução da Azatioprina para o peso do animal; e nos animais COM Azatioprina administrou-se o volume da solução correspondente ao peso do dia (na prática do experimento administrou-se de 0,6 a 0,9 ml/dia).

3.4. Coleta do Muco

Após o período de estudo, os animais foram anestesiados através da mesma técnica e sacrificados por exsanguinação através da secção da aorta abdominal.

O tórax foi aberto pelo esterno e os pulmões retirados em bloco com dissecação minuciosa e cuidadosa de toda a árvore traqueobrônquica com auxílio do microscópio.

O bloco da peça foi colocado sobre uma gase embebida com solução aquecida de salina a 0,9%, e se realizou uma pequena incisão na parede cartilaginosa dos brônquios direito e esquerdo próxima da Carina por onde se inseriu um pincel fino com cerdas macias para a coleta do muco (pincel tipo Tigre n° 2). O muco coletado foi imerso em óleo mineral e colocado em tubos eppendorf e armazenados em freezer a $-70^{\circ}\text{C}^{100}$.

3.5. Medida da Velocidade de Transporte Mucociliar – *IN SITU*

O transporte mucociliar mostra a capacidade do epitélio de remover partículas; quanto maior é a velocidade do transporte melhor é esta capacidade.

Logo após a coleta do muco, a árvore traqueobrônquica foi preparada para a medida da velocidade. A parede

cartilaginosa dos brônquios direito e esquerdo foi retirada como uma “tampa” para exposição da parede membranosa que, por sua vez, foi submetida à nebulização com solução salina para restabelecer a umidade do epitélio.

Na parede membranosa dos brônquios foi aplicado aproximadamente um micro litro de solução de carbono coloidal. A solução de carbono coloidal (tinta nanquim filtrada em papel de filtro comum) foi preparada com adição de talco comum para aumentar a viscosidade da solução e facilitar a observação do transporte das partículas pelo epitélio brônquico. Todas as medidas no brônquio esquerdo foram distais à anastomose.

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

O transporte das partículas coradas pela solução coloidal (nanquim) ao longo dos brônquios direito e esquerdo foi cronometrado de acordo com a distância percorrida medida pela objetiva reticulada e expresso como velocidade em milímetros por minuto ($\text{mm/min} = \text{distância percorrida/tempo}$). Foram obtidas três medidas, transformadas em número absoluto de unidades de minuto. A média dessas três medidas foi tomada como valor principal para a análise estatística¹⁰⁴.

3.6. Avaliação das Características do Muco

3.6.1. Transportabilidade no palato de rã

O modelo experimental do estudo do muco respiratório no palato de rã está bem estabelecido e tem sido muito utilizado¹³. O palato da rã é uma superfície plana que possibilita a observação em microscópio e o seu epitélio pseudoestratificado com células ciliadas e secretoras que promovem uma camada contínua de muco, semelhante ao epitélio das vias respiratórias de mamíferos.

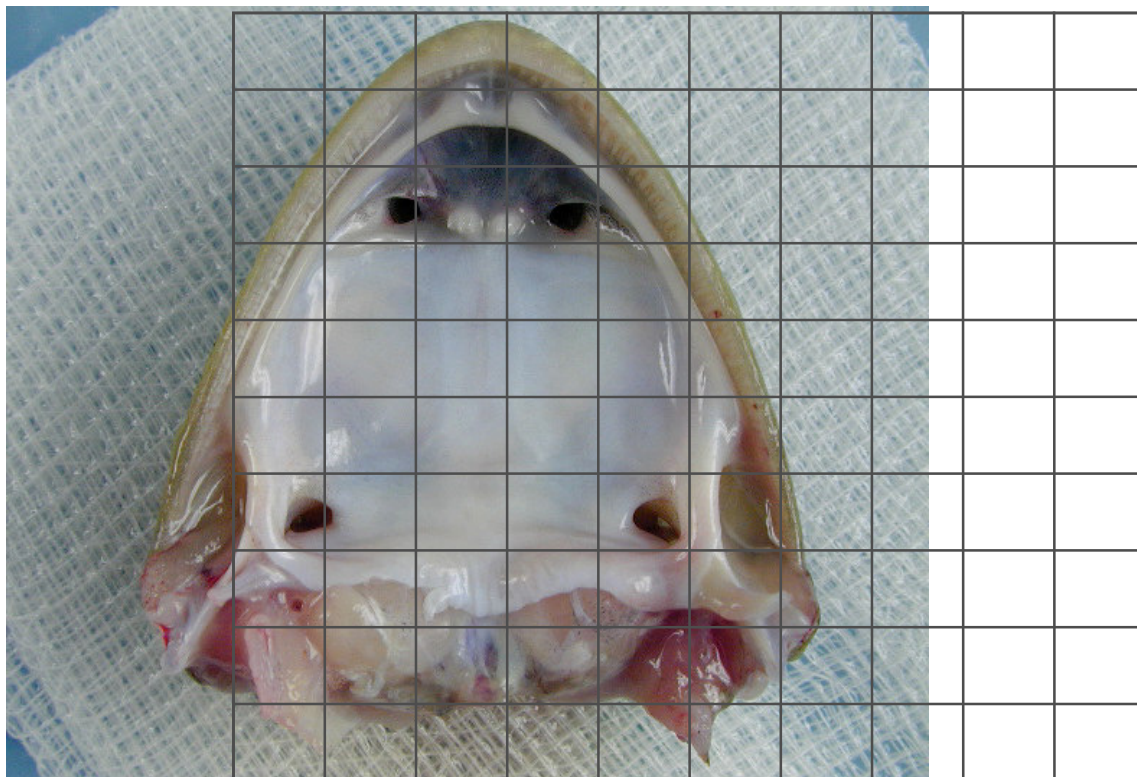
É um método clássico^{40,79,106,118}, e de fácil aplicabilidade. Através dele, observamos a transportabilidade do muco em estudo (muco do rato) chamado de muco teste sobre um epitélio “ideal”. A velocidade de transporte do muco teste medida foi comparada à velocidade de transporte de um “muco ideal” (o muco da rã), chamado de muco controle, sobre o epitélio do palato. Desse modo, o valor obtido retratou a relação entre a velocidade do muco teste sobre a velocidade do muco controle, ou seja, a velocidade relativa do muco teste. Quanto maior for o seu valor, pior será a qualidade do muco para ser transportado (sua adesividade e viscosidade são maiores)¹⁰⁸.

Com o uso de uma guilhotina, se separou a cabeça da rã e se dissecou a parte do palato. O palato ficou em repouso por 24 horas em câmara fria a 4°. C para ter seu muco esgotado pela

ação do seu epitélio. O muco da rã foi coletado para servir de controle durante as medidas do muco coletado dos brônquios dos ratos.

Durante as medidas, o palato foi mantido em câmara de acrílico com 100% de umidade através de nebulização contínua, a partir de um nebulizador ultrasônico com solução salina a 2/3 diluída em água (0,61% de NaCl)²⁴. Foi colocado sobre a câmara de acrílico um microscópio estereoscópico em aumento de oito vezes com objetiva reticulada através da qual se visualizava o deslocamento do muco sobre a superfície do palato.

Iniciou-se a análise com cinco medidas iniciais do tempo de deslocamento do muco da rã sobre o palato. Em seguida, o tempo de deslocamento do muco do rato sobre o palato foi cronometrado obtendo-se cinco medidas (milímetros/minuto) de três amostras de muco teste. Em seguida, obtiveram-se novamente mais cinco medidas finais do muco da rã (controle).



Palato de rã sob a visão da objetiva reticulada

A média dos valores médios das cinco medidas das rãs iniciais e finais para cada três medidas do muco teste foi comparada com a média das cinco medidas de cada amostra do muco teste e assim expressos em termos relativos comparando-se a velocidade do muco dos brônquios (teste) sobre o muco da rã (controle). Os valores obtidos a partir desses dados foram utilizados para a análise estatística¹¹⁶.

3.6.2. Obtenção do ângulo de contato

A capacidade de um fluído biológico de manter sua tensão estática sobre uma superfície plana pode ser medida pelo ângulo de contato⁴². Suas alterações influenciam a interface ar-líquido sobre uma superfície sólida e modificam a interação que existe entre o muco e o epitélio. A desproporção das porções líquidas e sólidas do muco leva a maior ou menor adesividade e fluidez sobre a superfície epitelial.

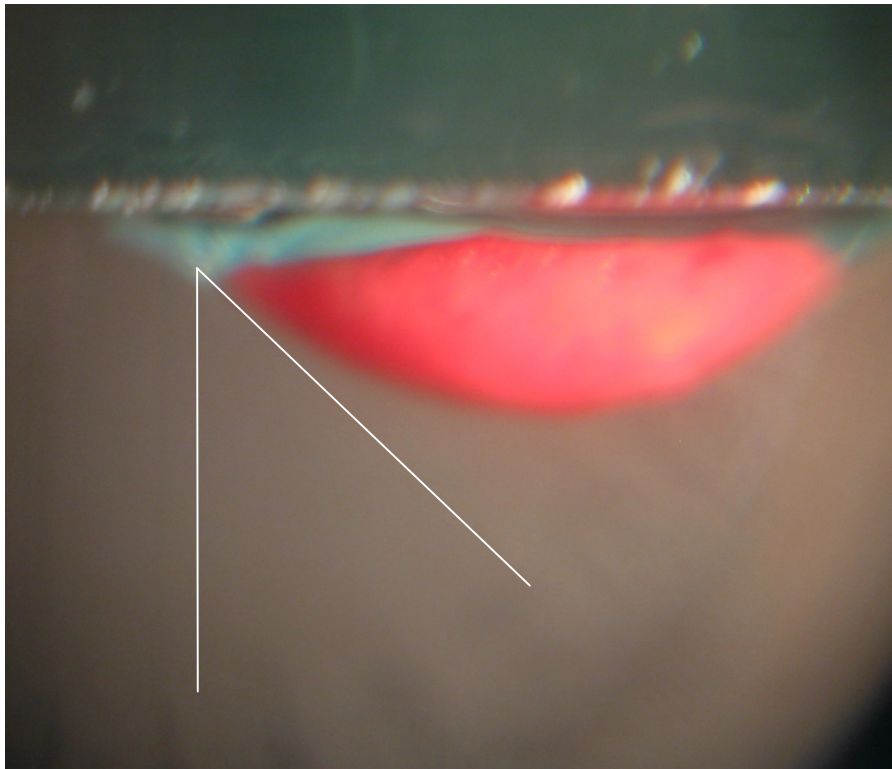
A técnica consistiu na colocação da amostra de muco obtida a partir dos brônquios sobre uma lâmina. A lâmina foi deionizada (retirada todas as cargas elétricas que poderiam interferir) através de submersão em solução sulfocrômica e posterior lavagem com água destilada.

A medida foi obtida em um e cinco minutos após a colocação da amostra. A amostra de muco foi mantida em banho-maria à 37°. C através de um suporte de ferro multiperfurado para impedir o seu ressecamento⁷⁹.

A observação foi feita através de lupa com ocular de aumento de 25 vezes presa por braços que permitem os movimentos de um lado para o outro e de frente para trás. No interior da ocular fica instalado um goniômetro com escala de zero a 180° através do qual se mede o ângulo pela tangente entre a amostra e a perpendicular da superfície da lâmina.

Quanto mais “rígido” for o muco, maior será seu ângulo de contato. Quanto maior for a viscosidade do muco, maior será a sua capacidade de “se espalhar” e, portanto, menor será seu ângulo de contato.

Assim, quando o muco apresenta um ângulo de contato menor tem suas propriedades reológicas mais preservadas e maior transportabilidade.



Medida do ângulo de contato entre o muco e a lâmina, com o goniômetro ao fundo (desfocado).

3.7. Análise Estatística

A análise descritiva das variáveis foi realizada inicialmente. Dos dois grupos de animais, analisou-se quatro grupos de variáveis: lado direito sem transecção, lado esquerdo com transecção, lado direito sem transecção e com azatioprina e lado esquerdo com transecção e com azatioprina. Cada uma dessas variáveis foi estudada em três tempos diferentes: 7 dias, 15 dias e 30 dias.

Nas variáveis contínuas, analisou-se o valor mínimo e máximo com posterior cálculo de médias e desvios-padrão.

Os valores obtidos a partir de cada grupo nos diversos tempos foram submetidos ao teste estatístico de Análise de Variância de Duplo Fator (grupo X tempo), obtendo-se o seu comportamento nas condições estudadas.

A existência de interação entre os fatores determinantes - transecção e azatioprina, foi estudada com o Teste de Bonferroni.

O nível de significância utilizado foi de 0,05. Os cálculos foram obtidos a partir do programa Graph Pad Prism 4.0.

3.8. Anatomia Patológica

Todas as peças cirúrgicas foram submetidas à análise da anatomia patológica no local da anastomose brônquica do lado esquerdo.

Foram analisadas por um único patologista que não sabia de qual grupo era cada uma das peças (estudo cego).

Avaliou-se o grau do processo inflamatório nessa localização do ponto de vista qualitativo, sendo expresso em leve, moderado e grave.

Posteriormente, os dados foram submetidos à análise estatística.

4. RESULTADOS

Foram avaliados os resultados de cada item estudado. Inicialmente apresentamos os resultados da velocidade do transporte mucociliar com a tabela de dados e o gráfico correspondente. A seguir os resultados obtidos da velocidade relativa no palato de rã e por fim os resultados obtidos da medida do ângulo de contato com os respectivos gráficos.

4.1. Velocidade de transporte mucociliar – *in situ*

Os valores das medidas de transporte mucociliar foram expressos em milímetros/minuto.

Na Tabela 1 estão relacionados os valores da velocidade do transporte mucociliar do brônquio direito e esquerdo nos três tempos de estudo dos animais submetidos à transecção brônquica e administração de solução salina, seguidos das médias e desvios - padrão.

TABELA 1 (Transecção + solução salina - TR)

animais	Grupo	VTr D	VTr E	Grupo	VTr D	VTr E	Grupo	VTr D	VTr E
1	TR7	0,42	0,27	TR15	0,32	0,21	TR30	0,14	0,11
2	TR7	0,34	0,15	TR15	0,19	0,15	TR30	0,42	0,11
3	TR7	0,43	0,08	TR15	0,19	0,06	TR30	0,14	0,09
4	TR7	0,35	0,18	TR15	0,18	0,05	TR30	0,36	0,07
5	TR7	0,11	0,04	TR15	0,36	0,08	TR30	0,26	0,19
6	TR7	0,21	0,06	TR15	0,18	0,06	TR30	0,34	0,24
Média		0,310	0,130		0,237	0,102		0,277	0,135
Desvio		0,126	0,087		0,081	0,064		0,118	0,066

TR7 – transecção brônquica e sacrifício em 7 dias;
TR15 – transecção brônquica e sacrifício em 15 dias;
TR30 – transecção brônquica e sacrifício em 30 dias;
VTr D – velocidade do transporte mucociliar no brônquio direito;
VTr E – velocidade do transporte mucociliar no brônquio esquerdo.

Na tabela 2, estão relacionados os valores da velocidade do transporte mucociliar do brônquio direito e esquerdo nos três tempos de estudo dos animais submetidos à transecção brônquica e administração de azatioprina, seguidos das médias e desvios - padrão.

TABELA 2 (Transecção + Azatioprina - TRAZA)

animais	Grupo	VTr D	VTr E	Grupo	VTr D	VTr E	Grupo	VTr D	VTr E
1	TRAZA7	0,02	0,02	TRAZA15	0,09	0,05	TRAZA30	0,29	0,08
2	TRAZA7	0,04	0,02	TRAZA15	0,09	0,02	TRAZA30	0,31	0,14
3	TRAZA7	0,21	0,05	TRAZA15	0,05	0,1	TRAZA30	0,27	0,11
4	TRAZA7	0,09	0,16	TRAZA15	0,54	0,13	TRAZA30	0,27	0,16
5	TRAZA7	0,14	0,05	TRAZA15	0,19	0,15	TRAZA30	0,12	0,07
6	TRAZA7	0,13	0,06	TRAZA15	---	--	TRAZA30	0,23	0,16
média		0,105	0,060		0,192	0,090		0,248	0,120
desvio		0,070	0,052		0,201	0,054		0,068	0,039

TRAZA7 – transecção mais administração de azatioprina e sacrifício em 7 dias;

TRAZA15 – transecção mais administração de azatioprina e sacrifício em 15 dias;

TRAZA30 – transecção mais administração de azatioprina e sacrifício em 30 dias;

VTr D – velocidade do transporte mucociliar no brônquio direito;

VTr E – velocidade do transporte mucociliar no brônquio esquerdo.

A análise estatística geral mostrou que houve diferença na velocidade do transporte mucociliar estatisticamente significativa entre os grupos com $p < 0,001$. Porém, não houve diferença em relação aos tempos e, portanto inexistiu interação entre os determinantes.

Os resultados mostraram que a velocidade do transporte mucociliar nos animais que receberam solução de salina ficou prejudicada no lado esquerdo submetido a transecção em relação ao lado direito com diferença estatística ($p < 0,05$) nos três períodos da análise: 7 dias, 15 dias e 30 dias.

Observou-se que quando comparados lados direito e esquerdo nos animais que receberam a azatioprina houve evidente piora na velocidade do transporte mucociliar aos 7 dias ($p < 0,001$) com uma recuperação aos 15 e 30 dias.

A análise do brônquio direito dos grupos que receberam solução de salina em relação aos que receberam azatioprina mostrou redução da velocidade do transporte mucociliar aos 7 dias ($p < 0,05$). Aos 15 e 30 dias houve uma recuperação sem diferença significativa.

A avaliação do lado esquerdo submetido à transecção nos animais que receberam solução de salina em relação aos que receberam azatioprina mostrou uma redução da velocidade do transporte mucociliar com diferença estatística aos 7 dias. Os valores aos 15 e 30 dias são muito semelhantes nos dois grupos.

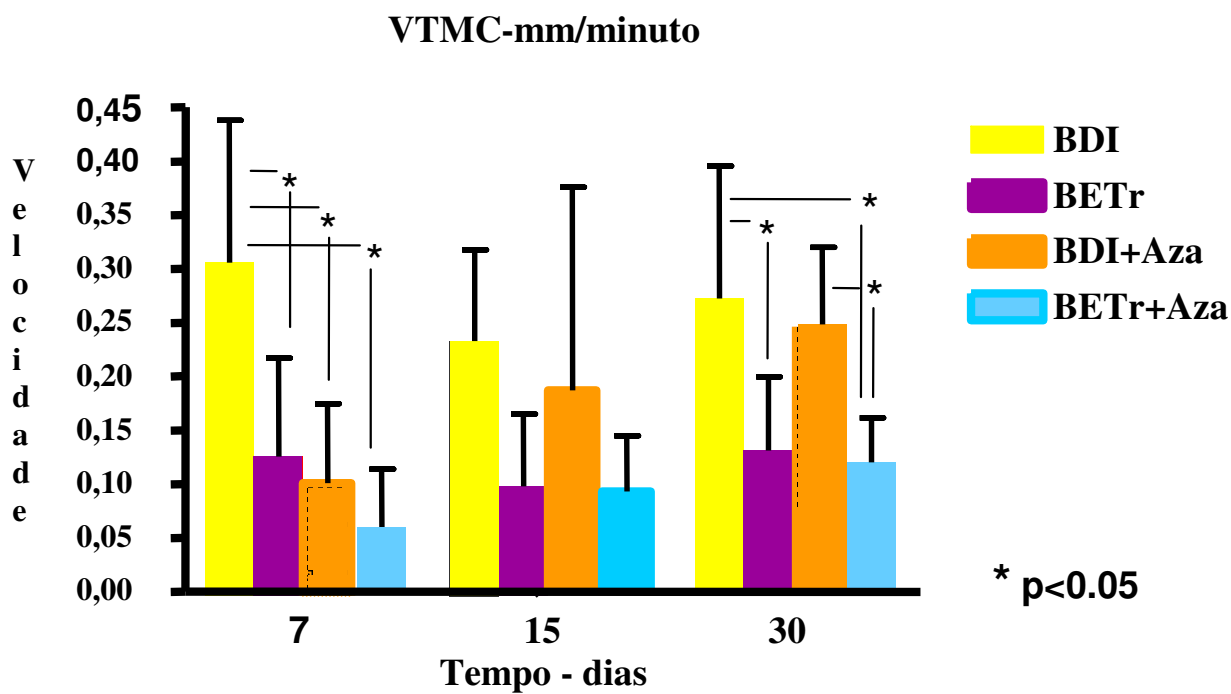
A comparação do lado direito dos animais que receberam solução de salina com o lado esquerdo daqueles que receberam azatioprina mostra diferença significativa em todos os tempos.

É muito interessante a análise comparativa do brônquio esquerdo dos animais que receberam solução salina com o

brônquio direito (intacto) dos que receberam azatioprina. Aos 7 dias, a velocidade do transporte foi menor no brônquio intacto dos que receberam a droga, sem significado estatístico ($p > 0,05$). Aos 15 e 30 dias, essa relação se inverteu ficando menor a velocidade no brônquio operado ($p < 0,05$).

O Gráfico 1 representa a análise de todos esses valores nos tempos estudados.

Gráfico 1 – Velocidade de Transporte Mucociliar *in situ*



VTMC – velocidade do transporte mucociliar – em milímetros por minuto;

BDI – brônquio direito intacto;

BETr – brônquio esquerdo com transecção;

BDI+Aza – brônquio direito intacto mais azatioprina;

BETr+Aza – brônquio esquerdo com transecção mais azatioprina.

Esses resultados mostraram que a velocidade do transporte mucociliar foi afetada pela transecção brônquica e pela administração da azatioprina. Enquanto o efeito de redução da velocidade do transporte mucociliar com a transecção permaneceu por um período de 30 dias, o mesmo efeito com a administração da azatioprina deixou de existir ao longo do tempo.

4.2. Transporte mucociliar *in vitro* – palato de rã

Na avaliação geral, houve diferença estatística entre os grupos ($p < 0,02$), que foi progressivamente maior quanto maior o tempo até o sacrifício ($p < 0,001$). Observou-se que em todos os grupos a qualidade do muco apresentou tendência a piorar, ou seja, quanto maior o tempo, maior o efeito do fator grupo sobre a velocidade do transporte mucociliar.

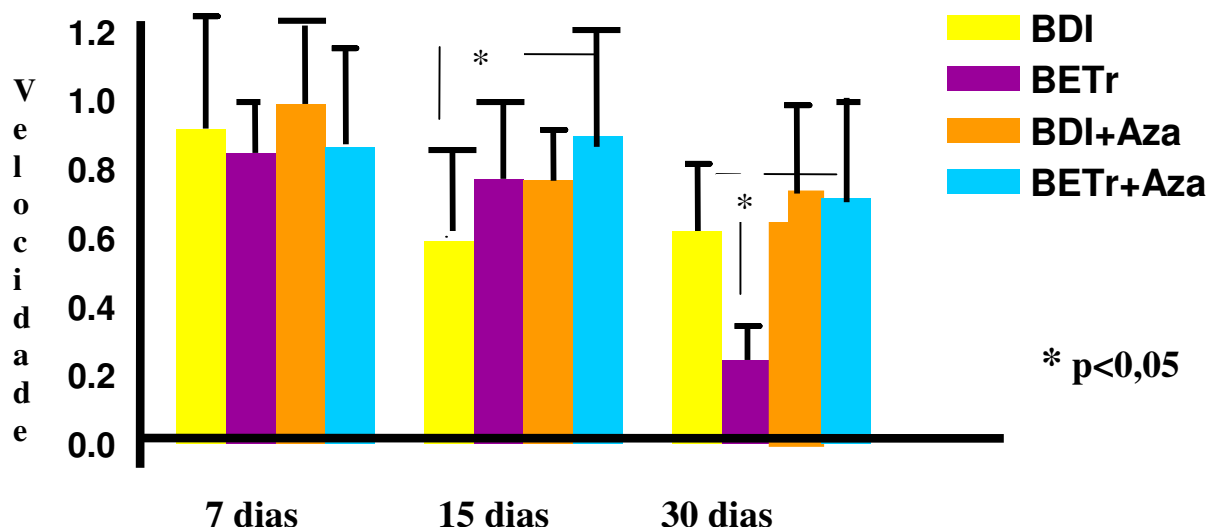
O muco foi piorando ao longo do tempo, sendo que no grupo com a azatioprina esta piora foi menor ($p < 0,05$).

Uma avaliação do muco do brônquio direito entre os grupos – o que recebeu solução de salina com o que recebeu azatioprina, mostrou uma velocidade do transporte mucociliar maior naquele que recebeu azatioprina ($p < 0,05$).

O Gráfico 2 mostra a análise dos resultados da transportabilidade mucociliar *in vitro* nos diferentes dias do estudo.

Gráfico 2 – Transportabilidade *in vitro* – palato de rã

VTMR – Palato de rã – mm/min.



VTMR - velocidade do Transporte Mucociliar Relativa - milímetros por minuto;

BDI – brônquio direito intacto;

BETr - brônquio esquerdo com transecção;

BDI+Aza – brônquio direito intacto mais azatioprina;

BETr+Aza – brônquio esquerdo com transecção mais azatioprina.

4.3. Ângulo de Contato

As análises das medidas dos ângulos de contato nas variáveis dos grupos sem e com azatioprina mostraram aumento no seu valor, com significado estatístico ($p < 0,0001$).

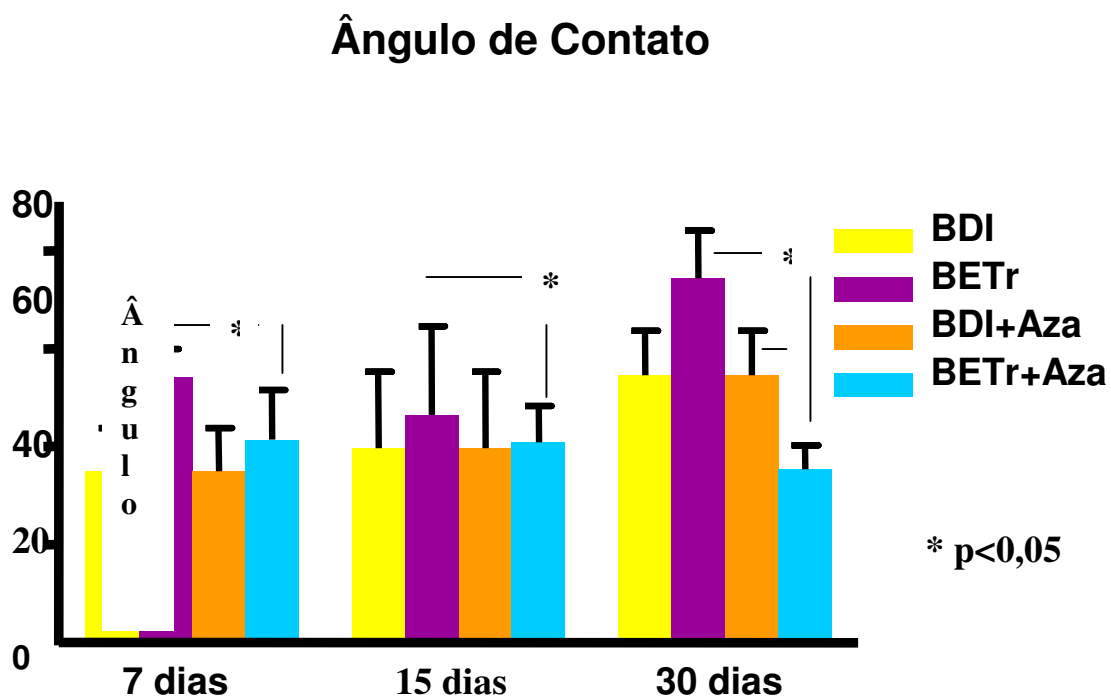
Conforme descrito anteriormente, esse aumento do ângulo de contato demonstrou menor capacidade do muco “de relaxar” sobre uma superfície plana, caracterizando-o como mais rígido e, portanto, mais difícil de ser transportado.

Essa piora na qualidade do muco teve diferença em relação ao tempo, sendo mais representativa aos 30 dias.

A diferença em relação ao tempo, com aumento no valor do ângulo de contato, indicou uma tendência de piora da qualidade do muco com interação positiva entre os fatores determinantes. A azatioprina preveniu a piora do muco nos diversos grupos ao longo do tempo.

O Gráfico 3 mostra a análise das medidas do ângulo de contato dos diversos grupos ao longo do tempo.

Gráfico 3 – Análise do Ângulo de Contato



BDI – brônquio direito intacto;
 BETr - brônquio esquerdo com transecção;
 BDI+Aza – brônquio direito intacto mais azatioprina;
 BETr+Aza – brônquio esquerdo com transecção mais azatioprina.

5. DISCUSSÃO

Conforme exposto anteriormente o aparelho mucociliar faz parte de um complexo sistema em atividade contínua de defesa das vias respiratórias que depura as partículas inaladas através da ação do muco e do transporte mucociliar. Para sua efetividade, o equilíbrio entre a função de todas as células e suas secreções é fundamental.

Alterações em sua função por agentes agressores crônicos, ação de drogas e manipulação cirúrgica já foram estudadas através de vários desenhos de estudos, experimentais e clínicos. Nas cirurgias pulmonares com manipulação dos brônquios, demonstrou-se que a complicação mais freqüente é a infecção, decorrente do mau funcionamento do aparelho mucociliar⁹⁵.

O propósito deste trabalho foi associar dois fatores possivelmente envolvidos no decréscimo da função do aparelho mucociliar em transplantados. Com isso, desenvolvemos um modelo de análise do transporte mucociliar no brônquio de ratos após os procedimentos de transecção e administração de uma droga

imunossupressora, a azatioprina, utilizada na prática clínica, excluindo-se o fator rejeição.

Adicionalmente à análise da velocidade do transporte mucociliar *in vivo*, estudamos a transportabilidade do muco no palato de rã – *in vitro* e a adesividade estimada do muco pelo método do ângulo de contato. O conhecimento dos resultados obtidos pode acrescentar informações importantes para a compreensão da disfunção do transporte mucociliar observado após o transplante pulmonar e também para o conhecimento das atitudes terapêuticas que mais rápido levam à recuperação do sistema⁹⁸.

No transplante pulmonar a infecção também é a maior complicação pós-operatória, mesmo após os avanços relacionados à imunossupressão, desenvolvimento de antibióticoterapia para controle de infecções e cuidados pós-operatórios intensivos. O efeito imunossupressor do agente anti-rejeição é facilmente identificado como um fator de risco e constitui um grande impedimento ao sucesso do transplante pulmonar¹⁶. Entretanto, somente o efeito da imunossupressão induzida por drogas não explica a prevalência significativa de infecções pulmonares quando comparados com transplantes de outros órgãos que sofrem

imunossupressão semelhante¹⁵. Quais seriam então os mecanismos pelos quais ocorre essa prevalência para as infecções?

A ação das drogas imunossupressoras e da hipóxia no processo cicatricial foram extensivamente estudados sendo os corticosteróides os mais testados; havendo na literatura poucos relatos de outras drogas de imunossupressão^{37,64}.

No transplante de pulmão se realiza a transecção brônquica a qual interrompe o fluxo arterial brônquico e ocasiona desnervação sensorial distal à linha de sutura, interferindo no reflexo da tosse e conseqüentemente torna os pacientes mais dependentes do transporte mucociliar. Esse fato aliado à administração de drogas imunossupressoras nos permite especular que ambos levem às alterações do transporte mucociliar e do muco contribuindo para a maior suscetibilidade de infecção respiratória nesses pacientes no período pós-operatório de transplante de pulmão.

Os efeitos da inervação autonômica nas propriedades mucociliares são bem conhecidos no campo clínico, especialmente pelos anestesiólogistas que frequentemente utilizam a atropina em pacientes hipersecretores para evitar rigidez do muco e obstrução

das vias aéreas^{11,18}. O sistema nervoso autônomo, com seus mediadores, tem a capacidade de afetar a secreção das vias aéreas através do volume de sua produção, de suas propriedades reológicas, do transporte iônico transepitelial e da taxa de transporte mucociliar^{19,36,38,63,93,109,130,136,139,146,147}.

O trato respiratório dos humanos é innervado por fibras sensoriais e autonômicas, que consistem de um suprimento parassimpático originado do nervo vago e de um suprimento simpático originado do tronco simpático^{114,134}. Quando comparada a innervação pulmonar de outras espécies, nota-se uma variabilidade com relação ao tipo e quantidade de fibras nervosas^{96,101,114}.

Nos ratos a microvasculatura da árvore traqueobrônquica exibe muitas características dos vasos sanguíneos de outras espécies^{55,82}. A innervação possui fibras colinérgicas e adrenérgicas em troncos separados presentes em feixes da região extracondrial, perivascular e submucosa^{31,57,78,97,114;145}.

Assim, o aparelho mucociliar do rato é como de outros mamíferos⁶¹, innervado predominantemente pelo sistema nervoso parassimpático que regula também o músculo liso brônquico¹¹². A atividade ciliar é aumentada

pela estimulação de agonistas colinérgicos e beta (β) adrenérgicos^{9,11,18,25,39,57,72,99,120,123,132,144,146}.

O transplante pulmonar resulta na desnervação extrínseca total do órgão transplantado, onde os nervos pulmonares, suprimento arterial brônquico e outras estruturas são inevitavelmente rompidos e não são reconectados, com alterações da inervação no número de nervos e no seu fenótipo, sendo que os mecanismos que envolvem a regeneração neural não estão completamente definidos^{59,63,127,132,133}.

As alterações no transporte mucociliar e nas propriedades do muco sob estas condições têm relatos na literatura quando submetidos à transecção brônquica enquanto que a ação das drogas de imunossupressão e seus efeitos, isolados ou somados ao procedimento cirúrgico, não foram estudados em toda sua extensão.

Observamos que vários esquemas de imunossupressão têm sido testados na prática clínica, com uma avaliação retrospectiva dos resultados obtidos^{75,135}. Esse fato está mais freqüente desde a introdução de novas drogas imunossupressoras na tentativa de substituir as que vêm sendo utilizadas há mais de 30 anos, como a Azatioprina. Essa “competição” do novo com o antigo não tem até o momento definição

científica para indicar ou contra-indicar quais as drogas imunossupressoras que devem ser utilizadas no transplante pulmonar, pois não estão definidas todas as suas ações⁹⁴.

Frente a essas constatações, procuramos desenvolver neste trabalho a idéia de um modelo experimental que possa ser reproduzido, que esclareça as ações das drogas imunossupressoras e da transecção brônquica e anastomose sobre o aparelho mucociliar, e que possa ser transposto para a prática clínica⁵⁴.

Nele avaliamos os efeitos da transecção brônquica associada à administração de solução de salina e à administração de azatioprina. Em nosso modelo, a velocidade do transporte mucociliar foi determinada pela observação direta da solução de nanquim depositada na região distal à anastomose do epitélio brônquico esquerdo (transeccionado) e direito (intacto).

Os nossos resultados demonstraram que há prejuízo na velocidade do transporte mucociliar e na qualidade do muco do lado esquerdo operado, sendo que o mesmo não acontece do lado direito intacto, suportando o conceito que a desnervação brônquica é responsável pelo efeito de decréscimo da velocidade do transporte mucociliar. O uso da azatioprina minimizou esses efeitos

através de mecanismo de melhora na qualidade do muco, contrário à nossa idéia inicial de que sendo uma droga que reduz o metabolismo celular, prejudicaria mais ainda a velocidade do transporte mucociliar.

No brônquio esquerdo de todos os grupos estudados houve redução da velocidade do transporte e piora da qualidade do muco. Com a evolução do processo cicatricial, constatada pela anatomia patológica, observamos que há uma tendência de restabelecimento do transporte após trinta dias, entretanto o muco continua espesso, endurecido e muito aderente. Esse fato decorre da transecção levar à ineficiência do transporte mucociliar na fase aguda pós-cirúrgica, o que acarreta seu acúmulo e conseqüentes alterações nas suas propriedades.

Desse modo, a transecção não tem ação direta sobre a formação do muco nem sobre as suas propriedades, mas sim uma ação indireta na qual a ineficiência do transporte mucociliar leva à piora da qualidade do muco.

A transecção não afetou o transporte ou a qualidade do muco no lado direito. Esse fato demonstrou que a cirurgia tem apenas ação local e não tem nenhum tipo de ação sistêmica. Indiretamente, um muco alterado

propicia o aparecimento de infecções e por este mecanismo ocorrerão as complicações sistêmicas.

Assim, deve ser enfatizada a terapêutica sobre o muco e sua manutenção com fluidificação do muco por um período mais longo durante o pós-operatório. Antibióticos de amplo espectro e com ação protetora sobre a mucosa trarão maiores benefícios.

Alguns trabalhos na literatura relacionam os transplantes pulmonares com um prejuízo na atividade do surfactante pulmonar^{32,53}. Com isso o surfactante poderia representar importante papel para uma interação mucociliar normal, se aplicado na superfície brônquica como opção terapêutica em pacientes transplantados.

A azatioprina não tem efeito direto sobre o surfactante pulmonar, sua produção e qualidade^{33,41,52}.

Outros autores estudaram em outras espécies animais os efeitos da desnervação brônquica sobre o aparelho mucociliar^{15,81} e puderam observar redução na velocidade do transporte mucociliar.

A desvascularização brônquica talvez tenha um efeito adicional relacionado ao prejuízo agudo da velocidade do transporte mucociliar. Neoformação vascular com revascularização da árvore brônquica é a principal hipótese da reversibilidade do prejuízo do

transporte mucociliar, levando-se em conta ainda que não seja observado o restabelecimento dos nervos através da anastomose brônquica^{129,133}. Assim pensávamos que esse efeito poderia se somar à ação da azatioprina na redução da atividade celular e da atividade inflamatória com conseqüente extensão do tempo de revascularização brônquica¹⁵¹.

Nos animais em que foi administrada a azatioprina, constatou-se que ela reduziu a velocidade do transporte mucociliar nos grupos iniciais de 7 dias, tanto no lado direito intacto quanto no lado esquerdo operado. Ao longo do tempo há evidente recuperação na velocidade do transporte no lado direito e esquerdo, o que nos leva a dizer que a velocidade do transporte mucociliar é afetada pela azatioprina apenas no período inicial até sete dias.

Não foram estudados os efeitos da azatioprina até sete dias e podemos apenas inferir que ela tem um efeito de redução da velocidade do transporte mucociliar na fase aguda. Esse mecanismo deve decorrer do fato de seu efeito diminuir a atividade celular e atingir as células ciliadas, alterando sua função.

Com o tempo, a recuperação da função das células ciliadas no grupo no qual foi administrada azatioprina se dá provavelmente por dois motivos: a cicatrização

brônquica e melhora na formação do muco e nas suas propriedades, que levam ao aumento da velocidade do transporte mucociliar.

Muitos protocolos de imunossupressão incluem a azatioprina como droga de administração pré-operatória^{43,44,60}. Com base nos resultados do presente trabalho, sugerimos que essa indicação, assim como seu tempo de manutenção pós-transplante, seja revista na prática clínica, abrindo um campo para pesquisa.

Em relação ao muco, sua piora ao longo do tempo foi menor com o uso da azatioprina, o que preveniu mudanças nas suas propriedades.

A ação antiinflamatória da azatioprina, descrita por vários autores^{62,69,73,77}, nos pareceu ser a explicação para esse fato. Agindo sobre as células secretoras, ela teve efeito regulador na produção do muco e do fluído periciliar. Na busca por essa resposta, realizamos o estudo anátomo patológico das peças nas quais foi realizada a anastomose brônquica.

Constatamos que nos grupos em que utilizamos a azatioprina houve menos inflamação, porém a análise estatística não foi significativa. A tendência observada de haver menos processo inflamatório nos grupos em que se

administrou a azatioprina mostra que houve uma interação da droga no decorrer do tempo do estudo.

Esperávamos que a droga imunossupressora (azatioprina) levasse a uma piora tanto na velocidade do transporte quanto da qualidade do muco. Entretanto, esses parâmetros não pioraram com a administração da droga e ela não teve um pior efeito quando associada ao procedimento da transecção. Ficou claro que a velocidade do transporte foi afetada pela transecção com piora associada à azatioprina apenas no grupo de 7 dias.

O muco teve uma piora ao longo do tempo nos grupos com a cirurgia de transecção, sendo pior aos 30 dias. Constatamos assim que a transecção isolada piora a qualidade do muco ao longo do tempo, situação esta que é prevenida pela azatioprina.

Na prática clínica, a definição de protocolos de imunossupressão requer ainda maiores evidências científicas quanto às ações das drogas. Nossa discussão argumenta que esta linha de pesquisa tem muito com que contribuir para dar apoio científico à utilização desses protocolos.

6. CONCLUSÕES

A análise deste material nos permite chegar às seguintes conclusões:

1. A transecção brônquica reduz a velocidade do transporte mucociliar;
2. A azatioprina preserva as propriedades do muco;
3. A azatioprina reduz a velocidade do transporte mucociliar até sete dias;
4. A azatioprina não interage com a transecção para a redução da velocidade do transporte e para a piora da qualidade do muco.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AARBAKKE, J.; JANKA-SCHAUB, G.; ELION, G. B. Thiopurine biology and pharmacology. **Meeting report – TiPS**, v. 18, p. 3-7, 1997.
2. AARBAKKE, J.; Biology and pharmacology of thiopurines. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 12, p. 511-519, 1995.
3. AEBA, R.; STOUT, J. E.; FRANCALANCIA, N. A.; KEENAN, R. J.; DUNCAN, A. J.; YOUSEN, S. A.; BUCKART, G. J.; YU, V. L.; GRIFFITH, B. P. Aspects of lung transplantation that contribute to increased severity of pneumonia. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 106, p. 449-457, 1992b.
4. ALLEGRA, L.; BOSSI, R.; BRAGA, P. C. Influence of surfactant on mucociliary transport. **Prog. Respir. Dis.**, v. 19, p. 441-460, 1985.
5. AMERICAN THORACIC SOCIETY. Lung transplantation: report of the ATS workshop on lung transplantation. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 147, p. 772-776, 1993.
6. ANDERSON, M. B.; KRIETT, J. M.; HARRELL, J.; SMITH, C.; KAPELANSKI, D. P.; TARAZI, R. Y.; PERRICONE, A.; JAMIESON, S. W. Techniques for bronchial anastomosis. **J. Heart. Lung. Transplant.**, v. 14, p. 1090-1094, 1995.
7. AYERS, M. M.; JEFFERY, P. K. Proliferation and differentiation in mamalian airway epithelium. **Eur. Resp. J.**, v. 1, p. 58-80, 1988.

8. BANDO, K.; PARADIS, I. L.; KOMATSU, K.; KONISHI, H.; MATSUSHIMA, M.; KEENAN, R. J.; HARDESTY, R. L.; ARMITAGE, J. M.; GRIFFITH, B. P. Analysis of time-dependent risks for infection, rejection, and death after pulmonary transplantation. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 109, p. 49-59, 1995.

9. BERGER, J.; ALBERT, R. E.; SANBORN, K.; LIPPMAN, M. Effects of atropine and methacoline on deposition and clearance of inhaled particles in the donkey. **J. Toxicol. Environ. Health.**, v. 4, p. 1-18, 1978.

10. BARKALOW, K.; HAMASAKI, T.; SATIR, P. Regulation of 22S dynein by a 29-kD light chain. **J. Cell. Biol.**, v 126, p. 727-735, 1994.

11. BLEECKER, H. R. Cholinergic and neurogenic mechanisms in obstructive airways. **Am. J. Med.**, v. 81:5A, p. 93-102, 1986.

12. BOUCHER, R. C. Human airway ion transport. Part two. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, v. 150, p. 581-593, 1994.

13. BRAGA, P. Macrophotographic evidence of the activity of sobrerol on mucociliary transport in the frog's palate. **Clin. Trials. J.**, v. 18, p. 30-38, 1981.

14. BREEZE, R. G.; WHEELDON, E. B. The cells of the Pulmonary Airways. **State of the Art. Rev. Respir. Dis.**, v. 116, p. 705-777, 1977.

15. BRODY, J. S.; KLEMPFNER, G.; STAUM, M. M.; VIDYASAGAR, D.; KUHL, D. E.; WALGHAUSEN, J. A. Mucociliary clearance after lung

- denervation and bronchial transection. **J. Appl. Physiol.**, v. 32 (2), p. 160-164, 1972.
16. BROOKS, R. G.; HOFFLIN, J. M.; JAMIESON, S. W.; STINSON, E. B.; REMINGTON, J. S. Infectious complications in heart-lung transplant recipients. **Am. J. Med.**, v. 79, p. 412-422, 1985.
 17. CALHOON, J. H.; NICHOLS, L.; DAVIS, R. Single lung transplantation: factors in postoperative cytomegalovirus infection. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 103, p. 21-26, 1992.
 18. CAMNER, P.; STRANDBERG, K.; PHILIPSON, K. Increased mucociliary transport by cholinergic stimulation. **Arch. Environ. Health**, v. 29, p. 220-224, 1974.
 19. CEESAY, S. M.; MELVILLE, G. N.; MILLS, J. L.; WRAY, S. R. Comparative observations of mucus transport velocity in health and disease. **Respiration**, v. 44, p. 184-188, 1983.
 20. CHAPARRO, C.; MAURER, J. R.; CHAMBERLAIN, D.; DE HOYOS, A.; WINTON, T.; WESTNEY, G.; KESTEN, S. Causes of death in lung transplant recipients. **J. Heart. Lung Transplant.**, v. 13, p. 758-766, 1994.
 21. COOPER, J. D. Current status of lung transplants. **Transplant. Proc.**, v. 23. p. 21-14, 1991.
 22. COOPER, J. D. The evolution of techniques and indications for lung transplantation **Ann. Surg.**, v. 212, p. 249-256, 1990.

23. CRAWFORD, S. W. Respiratory infections following organ transplantation. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v. 1 (3), p. 209-215, 1995.
24. CUNNINGHAM, F. M.; MORLEY, J.; SANJAR, S. Effect of mucolytic agents on frog mucociliary transport. **Bull. J. Pharmac.**, v. 80, p. 693P, 1983.
25. DALHAMN, T.; RYLANDER, R. Frequency of ciliary beat measured with a photo-sensitive cell. **Nature**, v. 196, p. 592-593, 1962.
26. DANIEL, C. J. Morphological characteristics of human airway structures. **Environmental impact on the airways**. New York, Marcel Dekker, Inc, 1996, p. 19-41.
27. DEROM, F. Ten-month survival after lung homotransplantation in man. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 61, p. 835-846, 1971.
28. DI BENEDETTO, G.; MANARA-SHEDIAC, F. S.; MEHTA, A. Effect of cyclic AMP on ciliary activity of human respiratory epithelium. **Eur. Respir. J.**, v. 4, p. 789-795, 1991.
29. DIRKSEN, E. R.; SANDERSON, M. J. Regulation of ciliary activity in the mammalian respiratory tract. **Biorheology**, v. 27, p. 533-545, 1990.
30. DOLOVICH, M.; ROSSMAN, C.; CHAMBERS, C.; GROSSMAN, R. F.; NEWHOUSE, M.; MAURER, J. R. Mucociliary function in patients following single-lung or heart-lung transplantation. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 135, A363, 1987.

31. EL-BERMANI, A-Wi.; BLOOMQUIST, E. L. Acetylcholinesterase and norepinefrine containing nerves in developing rat lung. **J. Embryol. Exp. Morph.**, v. 58, p. 177-183, 1978.

32. ERASMUS, M. E.; PETERSEN, A. H.; OETOMO, S. B.; PROP, J. The function of surfactant is impaired during the reimplantation response in rat lung transplants. **J. Heart. Lung. Transplant.**, v. 13, p. 791-802, 1994.

33. ESCOUSSE, A.; GUEDON, F.; MOUNIE, J.; RIFLE, G.; MOUSSON, C.; D'ATHIS, P. 6-Mercaptopurine Pharmacokinetics after use of Azathioprine in renal transplant recipients with intermediate or high thiopurine methyl transferase activity phenotype. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.50, p. 1261-1266, 1998.

34. FAWCETT, D. W.; PORTER, K. R. Study of the fine structure of ciliated epithelia. **J. Morphol.**, v. 94, p. 221-281, 1954.

35. GAIL, D. B.; LENFANT, C. J. M. Cells of the lung: biology and clinical implication. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 127, p. 366-367, 1983.

36. GALLAGHER, J. T.; RICHARDSON, P. S. Respiratory mucus: Structure, metabolism and control of secretion. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 144, p. 335-339, 1982.

37. GARRIY JR, E.R.; VILLANUEVA, J.; BHORADE, S.M.; HUSAIN, A.N.; VIGNESWARAN, W.T. Low rate of acute lung allograft rejection after the use of daclizumab, and interleukin 2 receptor antibody. **Transplantation**, v. 71, p. 773-777, 2001.

38. GATTO, L. A.; HOUCK, B. M. Mucociliary transport and epithelial morphology with elongation and collapse in rat trachea. **Exp. Lung Res.**, v. 15, p. 239-251, 1989.
39. GOSSELIN, R. E. Physiological regulators of ciliary motion. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 93, p. 41-59, 1966.
40. GIORDANO, A.; SHIH, C. K.; HOLSCLAW Jr., D. S.; KHAN, M. A.; LITT, M. Mucus clearance: In vivo canine tracheal versus *in vitro* bullfrog palate studies. **J. Appl. Physiol.**, v. 42 (5), p. 761-766, 1977.
41. GIRGIS, R. E.; TU, I.; BERRY, G. J.; REICHENSPURNER, H.; VALENTINE, V. G.; CONTE, J. V.; TING, A.; JOHNSTONE, I.; MILLER, J.; ROBINS, R. C.; REITZ, B. A.; THEODORE, J. Risk factors for the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. **J. Heart. Lung Transplant.**, v. 15, p. 1200-1208, 1996.
42. GIROD, S.; ZAHM, J. M.; PLOTKOWSKI, C.; BECK, G.; PUCHELLE, E. Role of the physicochemical properties of mucus in the protection of the respiratory epithelium. **Eur. Respir. J.**, v. 5, p. 477-487, 1992.
43. GRIFFITH, B. P.; HARDESTY, R. L.; ARMITAGE, J. M.; HATTLER, B. G.; PHAM, S. M.; KEENAN, R. J. A decade of lung transplantation. **Ann. Surg.**, v. 218, p. 310-320, 1993.
44. GRIFFITH, B. P.; HARDESTY, R. L.; ARMITAGE, J. M.; KORMOS, R. L.; MARRONE, G. C.; DUNCAN, S.; PARADIS, I. DAUBER, J. H.; YOUSEM, S. A.; WILLIAMS, P. Acute rejection of lung allografts with various immunosuppressive protocols. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 54, p. 846-851, 1992.

45. HARD, R.; WEAVER, A. Newt lungs: a versatile system for the study of mucociliary transport. **Tissue & Cell.**, v. 15(2), p. 217-226, 1983.
46. HARDY, J. D.; WEBB, W. R.; DALTON, M. L.; WALKER, G. R. Lung homotransplantation in man; report of initial case. **J. A. M. A.**, v. 186, p. 1065-1074, 1963.
47. HARKEMA, J. R.; MARIASSY, A. T.; GEORGE, J. S.; HYDE, D. M.; PLOPPER, C. G. Epithelial cells of the conducting airways. A species comparison. In: Farmer, S. G. And Hay, D. W. P. Eds. **The airway epithelium. Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**. New York, Marcel Dekker, 1990, p. 1-39.
48. HARVEZ, R.; ROUSSEL, P. Bronchial mucus: physical and biochemical features. In: Weiss, E. B. And Segal, M. S. Eds. **Bronchial asthma: mechanisms and therapeutics**. Boston, Little, Brown, 1976, p. 409-422.
49. HASTIE, A.; COLIZZO, F.; EVANS, L.; KRANTZ, M.; FISH, J. Initial characterization of tektons in cilia of respiratory epithelial cells. **Chest**, v. 101, p. 475-485, 1992.
50. HERRERA, J.M.; MCNEIL, K.D.; HIGGINS, R.S.D.; COULDEN, R.; FLOWER, C.D.; NASCHEF, S.A.M.; WALLWORK, J. Airway complications after lung transplantation: treatment and long-term outcome. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 71, p. 989-993, 2001.
51. HERVE, P.; SILBERT, D.; CERRINA, J.; SIMONNEAU, G.; DARTEVELLE, P. Impairment of bronchial mucociliary clearance in long-term survivors of heart/lung and double-lung transplantation. **Chest**, v. 103, p. 59-63, 1993.

52. HOFFMEYER, F.; HOEPER, M.M.; SPIEKERKOTTER, E.; HARRINGER, W.; HAVERICH, A.; FABEL, H.; NIEDERMEYER, J. Azathioprine withdrawal in stable lung and heart/lung recipients receiving cyclosporine-based immunosuppression. **Transplantation**, v.70, p. 522-525, 2000.
53. HOHLFELD, J. M.; TIRYAKI, E.; HAMM, H.; HOYMAN, H. G.; KRUG, N.; HAVERICH, A.; FABEL, H. Pulmonary surfactant activity is impaired in lung transplant recipients. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, v. 158, p. 706-712, 1998.
54. HOYOS, A. L.; PATTERSON, G. A.; MAURER, J. R.; RAMIREZ, J. C.; MILLER, J. D.; WINTON, T. L. J. Pulmonary Transplant. Early and late results. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 103, p. 295-306, 1992.
55. HUGHES, T. Microcirculation of the tracheobronchial tree. **Nature**, v. 206, p. 425-426, 1965.
56. IRAVANI, J.; VAN AS, A. Mucus transport in the tracheobronchial tree of normal and bronchitics rats. **J. Path.**, v. 106, p. 81-93, 1971.
57. JEFFERY, P. K. Morphology features of airway epithelial cells and glands. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 128, p. 514-520, 1983.
58. JEFFERY, P. K. Structure and function of adult tracheobronchial epithelium. In: McDowell, E. M., ed. **Lung Carcinomas**. Edinburg, Churchill-Livingstone, 1987, p. 42-73.

59. JEFFERY, P.; REID, L. Intraepithelial nerves in normal rats airways: a quantitative electron microscopic study. **J. Anat.**, v. 114(1), p. 35-45, 1973.
60. JOHNSON, C.A.; PORTER, W.A. Compatibility of azathioprine sodium with intravenous fluids. **Am. J. Hosp. Pharm.**, v. 38, p. 871-875, 1981.
61. JOHNSON, N. F.; HUBBS, A. F. Epithelial progenitor cells in the rat respiratory tract. In: Thomassen, D. G. And Netteshein, P. Eds. **Biology, toxicology and carcinogenesis of respiratort epithelium.** Washington, D. C., Hemisphere, 1990, p. 88-98.
62. KAPLOWITZ, N.; Interaction of azathioprine and glutathione in the liver of the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 200, p. 479-486, 1977.
63. KAWAGUCHI, A. T.; SHIRAI, M. Afferent Reinnervation after lung transplantation in the rat. **J. Heart Lung Transplant**, v. 17, p. 341-348, 1998.
64. KEENAN, R.J.; KONISH, H.; KAWAI, A.; PARADIS, I.L.; NUNLEY, D.R.; IACONO, ALT.; HARDESTY, R.L.; WEYANT, R. J.; GRIFFITH, B. Clinical trial of tacrolimus versus cyclosporine in lung transplantation. **Ann. Thorac. Surg.**, v.60, p. 580-585, 1995.
65. KING, M.; MACKLEM, P. T. Rheological properties of microliter quantities of normal mucus. **J. Appl. Phisiol.**, v. 42, p. 797-802, 1977.
66. KING, M. Mucus and mucociliary clearance. **J. Am. Thorac. Soc.**, v. 11 (1), p. 1-8, 1982.

- 67.KING, M.; BROCK, G.; LUNDELL, C. Clearance of mucus by simulated cough. **J. Appl. Physiol.**, v. 58 (6), p. 1776-1782, 1985.
- 68.KING, M.; ZAHM, J. M.; PIERROT, D.; VAQUEZ-GIROD, S.; PUCHELLE, E. The role of mucus gel viscosity, spinnability, and adhesive properties and clearance simulated cough. **Biorheology**, v. 26, p. 737-745, 1989.
- 69.KONIETZKO, N. Mucus transport and inflammation. **Eur. J. Respir. Dis.**, v. 69 (Suppl. 147), p. 72-79, 1986.
- 70.LAMBLIN, G.; AUBERT, J. P.; PERINI, J. M. Human respiratory mucins. **Eur. Respir. J.**, v. 5, p. 247-256, 1992.
- 71.LANDMAN, G.; NETO, R. S. A. Mecanismos de defesa pulmonar. **Jornal de Pneumologia**, v. 13 (Suppl. 3), p. 1-6, 1987.
- 72.LEE, W. I.; VERDUGO, P. Ciliary activity by laser light-scattering spectroscopy. **Ann. Biomed. Eng.**, v. 5, p. 248-259, 1977.
- 73.LENARD, L. Clinical implications of thiopurine methyltransferase optimization of drug dosage and potential drug interactions. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 20, p. 527-531, 1998.
- 74.LITT, M. Physicochemical determinants of mucociliary flow. **Chest**, v. 80 (Suppl 6), p. 846-849, 1981.
- 75.LONGORIA, J.; ROBERTS, R.F.; MARBOE, C.C.; STOUCH, B.C.; STARNES, V.A.; BARR, M.L. Sirolimus (rapamycin) potentiates

cyclosporine in prevention of acute lung rejection. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.117, p. 714-718, 1999.

76. LORENZI, G.; SALDIVA, P. H. N. Aspectos Funcionais do aparelho mucociliar. In: Paulo Tavares. **Atualizações em Fisiologia: Respiração**. Rio de Janeiro, RJ, Editora Cultura Médica, 1991, p. 89-99.
77. LULIN, M.; YANTANG, L. Comparison of the immunosuppressive and toxic effects of TII and azathioprine. **Transplant Proceedings**, v. 30, p. 3517-3518, 1998.
78. LUNDBERG, J. M.; HOKFELT, T.; MARTLING, C. R.; SARIA, A.; CUELLO, C. Substance P immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. **Cell. Tissue Res.**, v. 235, p. 251-261, 1984.
79. MACCHIONE, M.; GUIMARÃES, E. T.; SALDIVA, P. H. N.; LORENZI-FILHO, G. Methods for studying respiratory mucus and mucus clearance. **Brazil. J. Medic. Biol. Res.**, v. 28, p. 1347-1355, 1995.
80. MARCK, K. W.; WILDEVUUR, C. R. H. Lung transplantation in the rat: Technique and survival. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 34, p. 74-80, 1982.
81. MARELLI, D.; PAUL, A.; NGUYEN, D. M.; SHENNIB, H.; KING, M.; WANG, NAI-SAN; WILSON, J. A.; MULDER, D. S.; CHIU, R. The reversibility of impaired mucociliary function after lung transplantation. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 102, p. 908-912, 1991.

- 82.MCDONALD, D. M. The ultrastructure and permeability of tracheobronchial blood vessels in health and disease. **Eur. Respir. J.**, v. 3 (suppl. 12), p. 572s-585s, 1990.

- 83.MACDOWELL, A. E. M.; BARRET, L. A.; GLAVIN, F.; HARRIS, C. C.; TRUMP, B. F. The respiratory epithelium. I. Human Bronchus. **J. Natl. Cancer. Inst.**, v. 61, p. 539-549, 1978.

- 84.MACDOWELL, A. E. M.; COMBS, J. W.; MEWKIRK, C. A quantitative light and electron microscopic study of hamster tracheal epithelium with special attention to so-called intermediate cells. **Exp. Lung. Res.**, v. 4, p. 227-236, 1983.

- 85.MCFADDEN, P. M.; EMORY, W. B. Lung Transplantation. **Surg. Clin. North. Am.**, v. 78 (5), p. 749-762, 1998.

- 86.METRAS, H. Note préliminaire sur la graffe totale du poumon chez le chien. **C. R. Acad. Sci.**, v. 231, p. 1176-1177, 1950.

- 87.MEYERS, B.F.; LYNCH, J.; TRULOCK, E.P.; GUTHRIE, J.; COOPER, J.D.; PATTERSON, G.A. Lung transplantation: a decade of experience. **Annals of Surgery**, v. 230, p 362-371,

- 88.MILNE, D. S.; GASCOIGNE, A. D.; ASHCROFT, T.; SVILAND, L.; MALCOLM, A. J.; CORRIS, P. A. Organizing pneumonia following pulmonary transplantation and the development of obliterate bronchiolitis. **Transplantation**, v. 57, p. 1757-1762, 1994.

89. MITRA, A.K.; NARURKAR, M.M. Kinetics of azathioprine in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 35, p. 165-171, 1987.
90. MIZUTA, T.; KAWAGUCHI, A.; NAKAHARA, K.; KAWASHIMA, Y. Simplified rat lung transplantation using a cuff technique. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 97, p. 578-581, 1989.
91. MORGENROTH, K.; BOLZ, J. Morphological features of the interaction between mucus and surfactant on the bronchial mucosa. **Respiration**, v. 47, p. 225-231, 1985.
92. MUYLEM, A. V.; MÉLOT, C.; ANTOINE, M.; KNOOP, C.; ESTENN, M. Role of pulmonary function in the detection of allograft dysfunction after heart-lung transplantation. **Thorax**, v. 52, p. 643-647, 1997.
93. NADEL, J. A. Autonomic control of airway smooth muscle and airway secretions. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 115, p. 117-126, 1977.
94. NOVICK, R. J.; POSSMAYER, F.; VELDHUIZEN, R. A. W.; MENKIS, A. H.; MCKENZIE, F. N. Surfactant analysis and replacement therapy: A future tool of the lung transplant surgeon. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 52, p. 1194-1200, 1991.
95. OHORI, N. P.; MICHAELIS, M. G.; JAFFE, R.; WILLIAMS, P.; YOUSEM, S. A. Adenovirus pneumonia in lung transplant recipients. **Hum. Pathol.**, v. 26 (10), p. 1073-1079, 1995.

96. PACK, R. J.; RICHARDSON, P. S. The aminergic innervation of the human bronchus: a light and electron microscopic study. **J. Anat.**, v. 138, p. 493-502, 1984.

97. PARTANEN, M.; LAITINEN, A.; HERVONEN, A.; TOIVANEN, M.; LAITINEN, L. A. Catecholamine and acetylcholinesterase containing nerves in human lower respiratory tract. **Histochem**, v. 76, p. 175-188, 1982.

98. PAUL, A.; MARELLI, A.; SHENNIB, H.; KING, M.; WANG, N. S.; WILSON, J. A. S.; MULDER, D. S.; CHIU, R. C. J. Mucociliary function in autotransplanted, allotransplanted and sleeve resected lungs. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 98, p. 523-528, 1989.

99. PAVIA, D.; BATEMAN, J. R. M.; SHEAHAN, N. F.; AGNEW, J. E.; NEWMAN, S. P.; CLARKE, S. W. Techniques for measuring lung mucociliary clearance. **Eur. J. Respir. Dis.**, v. 61 (Suppl. 110), p. 157-177, 1980.

100. PILLAI, R. S.; CHANDRA, T.; MILLER, I. F.; LLOYD-STILL, J.; YEATES, D. B. Work of adhesion of respiratory tract mucus. **J. Appl. Physiol.**, v. 72 (4), p. 1604-1610, 1992.

101. PLOPPER, C. G.; MARIASSY, A. T.; WILSON, D. W.; ALLEY, J. L.; NISHIO, S. J.; NETTESHEIM, P. K. Comparison of nonciliated tracheal epithelial cells in six mammalian species: ultrastructure and population densities. **Exp. Lung. Res.**, v. 5, p. 281-294, 1983.

102. PROP, J. M.; EHRIE, M. G.; CRAPO, J. D.; WILDEVUUR, C. R. H. Reimplantation response in isografted rat lungs. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 87, p. 702-711, 1984.

103. PUCHELLE, E.; GIRARD, F.; ZAHN, J. M. Rheology of bronchial secretions and mucociliary transport. **Bull. Eur. Physiopathol. Resp.**, v. 12, p. 771-779, 1976.
104. PUCHELLE, E.; ZAHM, J. M.; GIRARD, F.; BERTRARD, A.; POLI, J. M.; AUG, F.; SADOUL, P. Mucociliary transport in vivo and *in vitro*. **Eur. J. Respir. Dis.**, v. 61, p. 254-264, 1980.
105. PUCHELLE, E.; ZAHM, J. M.; AUG, F. Viscoelasticity protein content and ciliary transport rate of sputum in patients with recurrent and chronic bronchitis. **Biorheology**, v. 18, p. 659-666, 1981.
106. PUCHELLE, E.; TOUNIER, J. M.; ZAHM, J. M.; SADOUL, P. The frog palate for studying mucus transport velocity and mucociliary frequency. **Eur. J. Respir. Dis.**, v. 64 (Suppl. 128), p. 293-303, 1983a.
107. PUCHELLE, E.; ZAHM, J. M.; DUVIVIER, C. Spinability of bronchial mucus. Relationship with viscoelasticity and mucous transport properties. **Biorheology**, v. 20, p. 239-249, 1983b.
108. PUCHELLE, E.; ZAHM, J. M.; JACQUOT, J.; PLOTKOWSKI, C.; DUVIVIER, C. A simple technique for measuring adhesion properties of human bronchial secretions. **Eur. J. Resp. Dis.**, v. 71, p. 281-282, 1987.
109. READ, R. C.; SHANKAR, S.; RUTMAN, A.; FELDMAN, C.; YACOUN, M.; COLE, P. J.; WILSON, R. Ciliary beat frequency and structure of recipient and donor epithelia following lung transplantation. **Eur. Respir. J.**, v. 4, p. 796-801, 1991.

110. REICHENSPURNER, H.; KUR, F.; TREEDE, H.; MEISER, B.M.; DEUTSCH, O.; WELZ, A. VOGELMEIER, C.; SCHWAIBLMAIR, M.; MULLER, C.; FURST, H. BRIEGEL, J.; REICHART, B. Optimization of the immunosuppressive protocol after lung transplantation. **Transplantation**, v. 68, p. 67-71, 1999.
111. REID, L.; JONES, R. Bronchial mucosal cells. **Fed. Proc.**, v. 38, p. 191-196, 1978.
112. REINHEIMER, T.; BERNEDO, K. H.; OELERT, B. Z.; PACKE, K.; WESSLER, L. Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig and human: species differences in role of airway mucosa. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. L722-L728, 1996.
113. REITZ, B. A.; WALLWORK, J. L.; HUNT, S. A. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 306, p. 557-564, 1982.
114. RICHARDSON, J. B. Nerve supply to the lung. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 119, p. 785-802, 1979.
115. RIVERO, D.H.F.R.; LORENZI, G.; PAZETTI, R.; JATENE, F.B.; SALDIVA, P.H.N. Effects of bronchial transection and reanastomosis on mucociliary system. *Chest*, v. 119, p.1510-1515, 2001.
116. ROBSON, A. M.; SMALLMAN, L. A.; DRAKE-LEE, A. B. Factors affecting ciliary function *in vitro*: a preliminary study. **Clin. Otolaryngol.**, v. 17, p. 125-129, 1992.
117. ROSE, M. C. Mucins: structure, function and role in pulmonary diseases. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. L413-L429, 1992.

118. RUBIN, B. K.; RAMIREZ, O.; KING, M. Mucus-depleted frog palate as a model for the study of mucociliary clearance. **J. Appl. Physiol.**, v. 69 (2), p. 424-429, 1990.
119. RUBIN, B. K. Surface properties of respiratory secretions: relationship to mucus transport. In: Baum, G. L.; Priel, Z.; Roth, Y.; Liron, N.; Ostfield, E. J. Eds. **Cilia, Mucus and Mucociliary Interactions**. New York, Marcel Dekker, Inc., 1998, p. 317-324.
120. SACKNER, M. A.; YERGIN, B. M.; BRITO, M.; JANUSZKIEWICZ, A. The effect of adrenergic agonists on tracheal mucous velocity. **Bull. Eur. Physiopath. Respir.**, v. 15, p. 505-511, 1979.
121. SADÉ, J.; SILBERBERG, N. A. E.; NEVO, A. C. The role of mucus in transport by cilia. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 102, p. 52-58, 1970.
122. SALDIVA, P. H. N. Aparelho mucociliar: Aspectos funcionais e métodos de estudo. **J. Pneumol.**, v. 16 (3), p. 161-170, 1990.
123. SALDIVA, P. H. N.; PARADA, M. A. C.; MACCHIONE, M.; PAIVA, P. S. O.; GUIMARÃES, E. T.; LORENZI, G.; MARTINS, M. A.; MONTES, G. S.; BALBANI, A. P.; KING, M. Nasal mucus clearance in rat: differences with Sex and phase of the estrous cycle. **J. Appl. Toxicol.**, v. 15 (4), p. 289-295, 1995.
124. B.; YACOUB, M. Mucociliary function after lung transplantation. **Transplant. Proc.**, v. 23, p. 1222-1223, 1991.
125. SHUMWAY, N.E.; OYER, P.E.; STINSON, E.B. Improved survival after heart-lung transplantation. **J. Thoracic. Cardiovasc. Surg.**, v.99, p. 54-60, 1990

126. SLEIGH, M. A. The nature and action of respiratory tract cilia. In: Brain, J. P.; Proctor, D. F.; Reid, L. M. Eds. **Respiratory defense mechanism. Part I**, New York, Marcel Dekker, 1977, p. 247-288.
127. SLEIGH, M. A. Ciliary function in transport of mucus. **Eur. J. Respir. Dis.**, v. 64 (Suppl. 128), p. 287-292, 1983.
128. SPRINGALL, D. R.; POLAK, J. M.; HOWARD, L.; POWER, R. F.; KRAUSZ, T.; MANICKAM, S.; BANNER, N. R.; KHAGANI, A.; ROSE, M.; YACOUB, M. H. Persistence of intrinsic neurones and possible phenotypic changes after extrinsic denervation of human respiratory tract by heart-lung transplantation. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 141, p. 1538-1546, 1990.
129. STONE, R. M.; GINSBERG, J.; COLAPINTO, R. F.; PEARSON, F. G. Bronchial artery regeneration after radical hilar stripping. **Surg. Forum.**, v. 17, p. 109-110, 1966.
130. TAKACHI, T.; MAEDA, M.; SHIRAKUSA, T.; HAYASHIDA, Y. Sympathetic reinnervation of unilaterally denervated rat lung. **Act Physiol. Scand.**, v. 154, p. 43-50, 1995.
131. TREEDE, H.; REICHENSPURNER, H.; MEISER, B. M.; KUR, F.; FURST, H.; VOGELMEIER, C.; BRIEGEL, J.; REICHART, B. Incidence and spectrum of infections in lung transplanted patients: comparison of four different immunosuppressive protocols. **Transplantation Proceedings**, v. 33, p. 1620-1621, 2001.

- 132.VEALE, D.; GLASPER, P. N.; GASCOIGNE, A.; DARK, J. H.; GIBSON, G. J.; CORRIS, P. A. Ciliary beat frequency in transplanted lungs. **Thorax**, v. 48, p. 629-631, 1993.

- 133.VEITH, F. J.; MONTEFUSCO, C.; KAMBELZ, S. L.; MOLLENKOPF, F. P. Lung transplantation. **Heart Transplantation**, v. 2, p. 155-164, 1983.

- 134.VERDUGO, P. Ca^{2+} dependent hormonal stimulation of ciliary activity. **Nature**, v. 283, p. 764-765, 1980.

- 135.VERDUGO, P.; JOHNSON, N. TAM, P. Y. β -Adrenergic stimulation of respiratory ciliary activity. **J. Appl. Physiol.**, v. 48 (5), p. 868-871, 1980.

- 136.VERDUGO, P. Globet cells secretion and mucogenesis. **Anu. Rev. Physiol.**, v. 52, p. 157-176, 1990.

- 137.VERDUGO, P. Mucin exocytosis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 144, p. 533-537, 1991.

- 138.WAIN, J.C.; WRIGHT, C.D.; RYAN, D.P.; ZORB, S.L.; MATHISEN, D.J.; GINNS, L.C. Induction immunosuppression for lung transplantation with OKT3. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 67, p187-193, 1999.

- 139.WARNER, F. D. The fine structure of the ciliary and flagellar axoneme. In: Sleight, M. A. Ed. **Cilia and flagella**. London, Academic Press, 1974, p. 11-37.

140. WANNER, A.; SALATHÉ, M. ORIORDAN, T. G. Mucociliary clearance in the airways. **State of the Art. Am. Respir. Crit. Care Med.**, v. 154, p. 1868-1902, 1996.
141. WIDDICOMBE, J. G. Innervation of tracheobronchial circulation. In: Kaliner, M. A.; Barner, P. J. Editors. **The airways**, New York, Marcel Dekker. Inc., 1988, p. 595-597.
142. WONG, L. B. MILLER, I. F.; YEATES, D. B. Stimulation of ciliary beat frequency by autonomic agonists in vivo. **J. Appl. Physiol.**, v. 65 (2), p. 971-981, 1988a.
143. WONG, L. B. MILLER, I. F.; YEATES, D. B. Regulation of ciliary beat frequency by autonomic mechanisms: *in vitro*. **J. Appl. Physiol.**, v. 65 (4), p. 1895-1901, 1988b.
144. YATSCOFF, R.W.; ASPESLET, L.J.; GALLANT, H.L. Pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 428-432, 1998.
145. YEATES, D. B.; SPEKTOR, D. M.; LEIKAUF, M. S.; BRUCE, R. P. Effects of drugs on mucociliary transport in the trachea and bronchial Airways. **Chest**, v. 80, p. 870-873, 1981.
146. YEATES, D. B.; LARKRIDGE, C. G.; MARRINELLI, A.; HARSHBARGER, R. D.; MUSSELMAN, R. P.; PITT, B.; RAJU, T. N.; GERRITY, T. R.; LOURENÇO, R. V. Unsedated animal models of pulmonary mucociliary transport. **Biorheology**, v. 21, p. 273-283, 1984.

147. ZINS, B.J.; SANDBORN, W.J.; MCKINNEY, J.A.; MAYS, D.C.; VAN OS, E.C.; TREMAINE, W.J.; MAHONEY, D.W.; ZINSMEISTER, A.R.; LIPSKY, J.J. A dose-ranging study of azathioprine pharmacokinetics after single-dose administration of delayed-release oral formulation. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 37, p. 8-46, 1997.

APÊNDICES

A- Planilha das Medidas da Velocidade Relativa

Palato de rã – valores expressos em
milímetros/minuto.

rã1	61- aza151aE			rã2	34-aza7 4D	25az151aD	44tr15 2E
12	18			9	8	14	8
9	12			8	8	13	7
12	12			8	7	11	8
10	10			7	7	11	10
10	10			8	9	12	12
rã3	63az15 3E	42Tr30 9E		rã4	33az72A D	12Tr152A D	62Az152 E
9	16	18		9 13	20	16	17
8	14	23		10 12	8	15	11
9	9	29		7 11	8	15	20
8	10	33		9 14	16	18	21
8	12	18		11 14	15	12	18
rã5	18Tr7 4A D	40Tr30 6 E	8Tr15 2 D	rã6	4Tr30 6 D	68Az71A E	
10	27	76	37	11	28	10	
11	18	59	44	19	32	13	
7	14	78	77	12	34	21	
9	11	62	56	16	16	14	
10	12	69	47	12	15	12	
rã7	14Tr7 1A D	10Tr15 4 D	42Tr30 9 E	rã8			
14 13	8	13	9	10			
15 10	7	16	12	12			
13 11	9	12	10	11			
17 11	7	14	10	8			
12 11	8	12	11				
rã9	41Tr30 8 E	67Aza7 1 E	30Az15 6D	rã10	2Tr30 4 D	72Az7 6E	54Tr74A E
10	18	9	9	8	15	12	10
12	24	10	8	9	11	10	11
11	30	8	12	7	12	12	11
8	27	11	12	9	11	11	12
9	26	9	10	7	13	9	11

ră11	27Az15 3D	26Az15 2D	35Az7 5D	ră12	21Az30 3D	56Az30 2E	13Tr7 1D
9	12	15	11	10 9	13	11	13
10	10	13	10	8 10	16	11	10
10	9	14	9	8 8	13	10	11
9	9	15	11	9 9	14	11	13
11	10	12	10	9 12	14	11	12
ră13	28Az152AD	70Az7 4 E	69Az72AE	ră14	45Tr15 3E	55Az30 1E	20Az30 2D
9	13	10	11	10	13	12	10
7	11	11	9	8	11	11	11
7	12	11	9	10	11	14	9
8	13	10	10	10	9	11	12
7	12	12	10	9	11	13	11
ră15	32Az71A D	19Az30 1D	11Tr151A D	ră16			
8	12	9	14	10			
7	11	8	12	11			
9	11	8	13	10			
8	12	7	14	10			
8	10	8	12	12			
ră17	51Tr72A E	3Tr30 5D	15Tr72A D	ră18	17Tr73A D	4Tr30 6 D	48Tr152A E
10	14	20	16	14	10	16	14
10	10	11	10	12	8	38	15
13	14	12	8	10	8	53	8
10	10	13	10	12	10	32	9
9	11	10	11	8	10	29	15
ră19	65Az15 5E	49Tr 7 1E	5Tr30 8 D	ră20	34Az7 4 D	53Tr7 3A E	6 Tr30 9 D
9	16	14	31	12	12	21	30
9	11	10	21	16	15	19	27
10	9	12	16	20	9	25	15
10	17	12	20	14	16	17	18
11	11	13	27	16	18	23	19

rã21		47Tr151AE		16Tr7 4 D		52Tr7 4 E		rã22		1Tr30 3 D		38Tr304 E		71Az7 5E			
16		19		29		26		15		45		14		68			
18		25		22		19		14		27		16		53			
15		26		28		18		10		27		18		45			
17		26		29		17		12		21		11		33			
27		25		29		14		11		26		10		32			
rã23		57Az30 3E		31Az7 1D		66Az15 6E		rã24									
29		41		17		14		14									
22		18		11		11		14									
19		17		13		11		17									
15		15		12		12		14									
18		14		13		12		24									
rã25		43Tr15 1E		44Tr15 2E		7Tr15 1 D		rã26		rã27		64Az152AE		9Tr15 3 D		29Az15 5 D	
14		24		29		24		12		18		30		19		25	
14		33		17		32		21		11		14		38		20	
17		42		16		32		12		11		16		18		25	
14		47		13		29		12		14		17		13		17	
24		48		18		43		23		13		14		16		25	
rã28		36Az7 6 D		50Tr7 1A E		39Tr30 5 E		rã 29		22Az304 D		23Az30 5 D		24Az30 6 D			
18		21		25		40		16		46		29		46			
11		17		19		87		20		28		33		28			
12		17		17		148		13		27		35		27			
13		14		20		44		12		22		16		28			
12		18		21		76		17		27		17		22			
rã30		58Az304E		59Az30 5E		60Az306 E		rã31									
16		22		42		16		22									
14		29		89		18		20									
19		15		140		13		19									
12		40		44		12		12									
17		37		78		20		15									

OBSERVAÇÕES:

- 1) as colunas não são regulares porque houveram medidas repetidas em várias rãs;
- 2) as colunas sem valores houve perda das propriedades de avaliação do muco

B - TABELA DO ÂNGULO DE CONTATO DO MUCO

Os valores são expressos em graus a partir do goniômetro

numero	nome	
1	TR30 - 3 D	0.56
2	TR30 - 4 D	0.71
3	TR30 - 5 D	0.81
4	TR30 - 6 D	0.31
5	TR30 - 8 D	0.55
6	TR30 - 9 D	0.78
7	TR15 - 1 D	0.5
8	TR15 - 2 D	0.18
9	TR15 - 3 D	0.63
10	TR15 - 4 D	0.79
11	TR15 - 1A D	0.71
12	TR15 - 2A D	0.73
13	TR7 - 1 D	0.9
14	TR7 - 1A D	1.35
15	TR7 - 2A D	0.98
16	TR7 - 4 D	0.56
17	TR7 - 3A D	1.14
18	TR7 - 4A D	0.57

19	AZA30 1 D	1.16
20	AZA30 2 D	0.82
21	AZA30 3 D	0.76
22	AZA30 4 D	0.52
23	AZA30 5 D	0.6
24	AZA30 6 D	0.51
25	AZA15 1A D	0.67
26	AZA15 2 D	0.67
27	AZA15 3 D	0.93
28	AZA15 2A D	0.86
29	AZA15 5 D	0.59
30	AZA15 6 D	0.88
31	AZA7 1 D	1.4
32	AZA7 1A D	0.83
33	AZA7 2A D	0.82
34	AZA7 4 D	1.05
35	AZA7 5 D	0.91
36	AZA7 6 D	0.93
37	TR30 - 3 E	0.22
38	TR30 - 4 E	0.19
39	TR30 - 5 E	0.21
40	TR30 - 6 E	0.13

41	TR30 - 8 E	0.36
42	TR30 - 9 E	0.36
43	TR15 - 1 E	0.42
44	TR15 - 2 E	0.91
45	TR15 - 3 E	0.79
46	TR15 - 4 E	1.01
47	TR15 - 1A E	0.64
48	TR15 - 2A E	0.86
49	TR7 -1 E	1.04
50	TR7 - 1A E	0.7
51	TR7 - 2A E	0.91
52	TR7 - 4 E	0.82
53	TR7 - 3A E	0.81
54	TR7 - 4A E	0.8
55	AZA30 1 E	0.71
56	AZA30 2 E	0.99
57	AZA30 3 E	0.88
58	AZA30 4 E	0.58
59	AZA30 5 E	0.24

60	AZA30 6 E	0.89
61	AZA15 1A E	0.75
62	AZA15 2 E	0.63
63	AZA15 3 E	0.72
64	AZA15 2A E	0.73
65	AZA15 5 E	0.99
66	AZA15 6 E	1.55
67	AZA7 1 E	0.95
68	AZA7 1A E	1
69	AZA7 2A E	1.08
70	AZA7 4 E	0.98
71	AZA7 5 E	0.35
72	AZA7 6 E	0.82