

**ROGÉRIO PAZETTI**

**Efeitos da ciclosporina A e da secção brônquica  
sobre o sistema mucociliar de 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: Paulo Manuel Pêgo Fernandes

**São Paulo  
2006**

# DEDICATÓRIA

*AOS MEUS PAIS, Alcides e Anna, que me deram a vida e zelam por mim com toda sua dedicação e amor; incansáveis em proporcionar, com muito sacrifício, as condições necessárias, para que os filhos alcancem seus objetivos; sempre presentes, ajudando a vencer os obstáculos que aparecem em nosso caminho, procurando mostrar a melhor forma de superá-los e apoiando nossas próprias decisões.*

*AOS MEUS IRMÃOS, Anna Paula e Roderlei, sempre prontos a mimar o irmão caçula com sua enorme generosidade, paciência, respeito e amor.*

*AOS MEUS FILHOS, dons preciosos de Deus.*

*“Teus filhos em torno à tua mesa serão como brotos de oliveira. Assim será abençoado aquele que teme o Senhor.” (Salmos 127,3)*

*Maria Catarina*

*Maria Letícia*

*Maria Clarissa*

*Maria Heloísa*

*Maria Elisabeth*

*José Gregório*

*e Maria Carolina*

## DEDICATÓRIA ESPECIAL

*“Uma mulher virtuosa é a coroa de seu marido (...) Superior ao das pérolas é o seu valor. (...) a graça de sua modéstia vale mais do que o ouro. (...) é um dom recebido do Senhor.” (Provérbios)*

*“Aquele que possui uma mulher virtuosa tem com que tornar-se rico; é uma ajuda que lhe é semelhante, e uma coluna de apoio.” (Eclesiástico 36,26)*

*“Como fundamentos eternos sobre pedra firme, assim são os preceitos divinos no coração de uma mulher santa.” (Eclesiástico 26,24)*

*“Assim como o sol que se levanta nas alturas de Deus, assim é a beleza de uma mulher honrada, ornamento de sua casa.” (Eclesiástico 26,21)*

*“Muitas mulheres demonstram vigor, mas tu excedes a todas.”  
(Provérbios 31,29)*

*À MINHA ESPOSA, simplesmente Bárbara.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, criador de todas as coisas visíveis e invisíveis, por sustentar a minha existência.*

*Ao meu orientador, Professor Paulo Manuel Pêgo Fernandes, responsável direto pela minha entrada na pós-graduação. Foi graças ao seu “convite” que decidi que já era hora de realizar meu próprio trabalho científico. Suas idéias e intervenções foram decisivas nos momentos de dúvida. Agradeço também a liberdade e a confiança que me foram dadas para a condução dos trabalhos.*

*Ao meu chefe, Professor Fábio Biscegli Jatene, pela confiança em mim depositada ao longo desses 13 anos de convivência.*

*Ao Professor Paulo Hilário Nascimento Saldiva, pela oportunidade que me deu para trabalhar como estagiário no Laboratório de Poluição Atmosférica, quando ainda era graduando, e por permitir que passasse a trabalhar no Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica, após o convite do Prof. Fábio Jatene. Nosso contato é diário, o que permite absorver muito de sua experiência científica na condução dos estudos.*

*À Professora Vera Luiza Capelozzi, pela atenção e ajuda dispensadas em diversas ocasiões na análise histopatológica das amostras.*

*Ao Dr. Geraldo Lorenzi-Filho, pelo auxílio na discussão e correção de várias etapas do trabalho. Apesar das inúmeras atividades que tem, sempre se mostrou pronto em atender meus pedidos de ajuda.*

*Ao Professor Luiz Felipe Pinho Moreira, pelas importantes sugestões na estruturação do trabalho bem como pelo auxílio e discussão sobre a análise estatística dos dados obtidos.*

*À Dra. Mariângela Macchione, minha tutora, literalmente distante no final do estudo, mas que ajudou deveras, no início, com sugestões importantes para a adequação da metodologia empregada.*

*À Dra. Naomi Kondo, pelo incentivo e pelos importantes conselhos na elaboração e análise dos resultados.*

*Ao Dr. Edwin Roger Parra Cuentas, pela enorme ajuda na análise dos cortes histológicos e dos resultados obtidos nas demais fases do trabalho.*

*Ao Dr. Joaquim Edson Vieira, pelas conversas e sugestões quando surgiram os primeiros problemas técnicos.*

*À Dra. Rosangely de Cassia Cavanha Corsi, pela discussão inicial sobre o projeto de estudo.*

*À bióloga Célia Etsuco Kobayashi Omosako, do Laboratório de Pesquisa do InCor, pelos serviços prestados na dosagem da ciclosporina.*

*Aos Drs. Alexandre Xavier e Marcelo Said, por terem gentilmente cedido algumas fotos.*

*Às colegas do Grupo de Defesa Pulmonar, pela hospitaleira acolhida em tempos de reforma física do laboratório.*

*Aos colegas dos Laboratórios de Poluição Atmosférica Experimental e de Terapêutica Experimental desta Faculdade, e do Laboratório Anatômico Cirúrgico do InCor, pela troca de informações nos momentos necessários, auxiliando de forma direta ou indireta a realização deste trabalho.*

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

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

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

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

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

# SUMÁRIO

## RESUMO

## SUMMARY

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>9</b>
3.1. TRANSPLANTE PULMONAR .....	9
3.1.1. Histórico.....	9
3.1.2. Problemas e desafios .....	11
3.2. SECÇÃO BRÔNQUICA.....	14
3.2.1. Sistema respiratório .....	14
3.3. CICLOSPORINA A .....	23
3.3.1. Histórico.....	23
3.3.2. Metabolismo.....	25
3.3.3. Mecanismos de ação.....	26
3.3.4. Efeitos colaterais .....	28
3.3.5. Monitoramento .....	29
3.3.6. Vias de administração.....	30
3.3.7. Posologia.....	31
<b>4. MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1. DESENHO EXPERIMENTAL .....	34
4.2. SECÇÃO E ANASTOMOSE BRÔNQUICA .....	36
4.3. APLICAÇÃO DA CICLOSPORINA A E DA SOLUÇÃO SALINA .....	41
4.4. DOSAGEM DA CICLOSPORINA A NO SANGUE TOTAL.....	42
4.4.1. Coleta.....	42
4.4.2. Dosagem da ciclosporina A.....	42
4.5. SACRIFÍCIO .....	43
4.6. TRANSPORTABILIDADE DO MUÇO <i>IN VITRO</i> .....	43
4.6.1. Coleta.....	43
4.6.2. Análise .....	45
4.7. FREQUÊNCIA DE BATIMENTO CILIAR <i>IN SITU</i> .....	49

4.8. VELOCIDADE DE TRANSPORTE MUCOCILIAR <i>IN SITU</i> .....	50
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
5.1. DOSAGEM DA CICLOSPORINA A .....	54
5.2. INFLUÊNCIA DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	55
5.3. INFLUÊNCIA DA CICLOSPORINA A E DA SECÇÃO BRÔNQUICA .....	56
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>75</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>



## RESUMO

PAZETTI, R. *Efeitos da ciclosporina A e da secção brônquica, sobre o sistema mucociliar de ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 110p.

As infecções são a causa mais freqüente de morbidade e mortalidade observadas tanto aguda como tardiamente nos pacientes receptores de transplante pulmonar, o que pode estar diretamente relacionado a uma deficiência no transporte mucociliar do sistema respiratório. Nosso objetivo foi avaliar a influência de dois fatores envolvidos com o transplante pulmonar sobre o transporte mucociliar de ratos: a secção e anastomose brônquica e a imunossupressão pela ciclosporina A. Setenta e dois ratos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de acordo com: i) procedimento operatório e ii) terapia a que seriam submetidos. Os resultados mostram que houve uma diminuição significativa da Frequência de Batimento Ciliar *in situ*, da Transportabilidade do Muco *in vitro* e da Velocidade de Transporte Mucociliar *in situ* medidos a partir do brônquio principal esquerdo dos ratos tratados com ciclosporina A ( $p<0,001$ ). A Frequência de Batimento Ciliar *in situ* dos brônquios

operados mostrou-se diminuída também no grupo tratado com solução salina e sacrificado no 30º dia após a operação ( $p=0,001$ ). Já a Velocidade de Transporte Mucociliar *in situ* mostrou uma diminuição significativa em todos os grupos submetidos à secção brônquica ( $p<0,001$ ). Houve um efeito sinérgico entre a terapia com ciclosporina A e a secção brônquica, causando um prejuízo ao transporte mucociliar ainda maior do que quando analisados isoladamente. Concluímos que a Velocidade de Transporte Mucociliar *in situ* foi agudamente prejudicada após a secção brônquica e terapia imunossupressora pela ciclosporina A, havendo diminuição da frequência de batimento dos cílios e alteração das propriedades viscoelásticas do muco respiratório.

## SUMMARY

PAZETTI, R. *Effects of cyclosporine A and bronchial section on mucociliary system in rats* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2006. 110p.

Infections are the most common cause of early and late morbidity and mortality in lung transplant recipient, and can be directly related to impaired mucociliary transport. Our aim was to assess the influence of bronchial section and immunosuppression on mucociliary transport in rats. Seventy two rats were randomly distributed in five groups according to i) surgical procedure and ii) drug therapy. There was a significant impairment on Ciliary Beating Frequency *in situ*, Mucus Transportability Rate *in vitro* and Mucociliary Transport Speed *in situ* from operated bronchus of cyclosporine A-treated rats ( $p<0.001$ ). Ciliary Beating Frequency from operated bronchus was also impaired in saline-treated rats that were killed on 30th postoperative day ( $p=0.001$ ). Mucociliary Transport Speed was impaired in all bronchi underwent to section ( $p<0.001$ ). We conclude that bronchial section and cyclosporine therapy impaired all factors analyzed. Also there was a synergic effect between cyclosporine therapy and bronchial section on ciliary beating frequency.

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

O sucesso alcançado atualmente nos transplantes pode ser atribuído a alguns fatores, tais como: a evolução da tecnologia, a qual trouxe um grande avanço técnico-cirúrgico; o conhecimento que se obteve sobre o funcionamento do sistema imunológico; e ainda o aprimoramento do uso dos agentes imunossupressores para a prevenção e controle do processo de rejeição desencadeado pelo organismo após o implante do enxerto (Corsi et al., 1995).

O transplante pulmonar é uma opção terapêutica efetiva para pacientes com doença pulmonar em fase terminal (Kirby e Mehta, 1992; Benfield e Wain, 2000; Stewart e Patterson, 2001) como enfisema, fibrose cística, hipertensão pulmonar e bronquiectasia (Chhajed, 2002).

Devido ao alto índice de rejeição aguda, que ocorre especialmente nas primeiras semanas após o transplante, o uso de agentes imunossupressoras é imprescindível (Tanoue, 2002).

Dentre os agentes anti-rejeição usados hoje em dia, a ciclosporina A (CsA) ocupa um lugar de destaque devido ao seu largo uso aliado aos incontáveis estudos que continuam sendo realizados sobre esse fármaco (Corsi, 1998).

A CsA é um potente agente imunossupressor que tem sido amplamente usado em humanos e é considerado o tratamento de primeira linha, não só para prevenir a rejeição de enxertos, mas também para o tratamento de doenças autoimunes (Komzakova et al., 2002), como diabetes tipo I (Stiller et al., 1983), artrite reumatóide (Muller e Herrmann, 1979), esquistossomose (Bueding et al., 1981), malária (Thommen-Scott, 1981), entre outras.

Por outro lado, o uso desses agentes imunossupressores é o maior determinante das infecções pulmonares, que ainda são a causa mais comum de morbidade e mortalidade em pacientes receptores de diferentes tipos de enxertos (Speich e van der Bij, 2001).

Entretanto, as infecções pulmonares, que podem ocorrer após o transplante, não estão apenas relacionadas à terapia imunossupressora. Os procedimentos executados durante o ato cirúrgico, como secção brônquica, anestesia e ventilação mecânica, entre outros, podem levar a danos transitórios e permanentes do sistema de transporte mucociliar (Aeba et al., 1993).

O sistema mucociliar é o principal mecanismo de defesa contra agentes invasores das vias aéreas e funciona basicamente pela ação conjunta de dois de seus componentes: o muco e os cílios. Ele

remove continuamente as partículas e os microorganismos que aderem ao muco presente na árvore respiratória.

As conseqüências da agressão decorrente da secção do brônquio podem ser verificadas não só localmente, no epitélio ciliado adjacente à ferida cirúrgica, mas em toda a porção distal à linha de síntese da anastomose (Pinsker et al., 1979).

Estudos relatam que, após o transplante, tanto o transporte mucociliar quanto a frequência de batimento dos cílios estão diminuídos, e que também há um aumento na rigidez do muco (Paul et al., 1989; Marelli et al., 1991; Read et al., 1991; Shankar et al., 1991; Herve et al., 1993; Veale et al., 1993; Tomkiewicz et al., 1995).

Aeba et al. (1993) relataram que a secção de importantes estruturas ligadas ao brônquio, como vasos sanguíneos e linfáticos, resulta no desenvolvimento precoce e no aumento da gravidade da pneumonia após os transplantes pulmonares.

Nossos estudos prévios mostram que o transporte mucociliar está diminuído até o 30º dia após a cirurgia de secção brônquica. No entanto, esta diminuição é menor do que a observada em instantes mais próximos do ato cirúrgico, como aos dois, sete e 15 dias de pós-operatório, sugerindo, dessa forma, que há uma recuperação do sistema mucociliar ao longo do tempo (Rivero et al., 2001).

Até o momento, pouco se sabe sobre o efeito direto dos agentes imunossupressores sobre o sistema mucociliar.

Num estudo recente, administramos azatioprina, outra droga imunossupressora normalmente usada por pacientes receptores de enxerto, e verificamos uma diminuição do transporte mucociliar após sete dias de terapia. O mesmo não foi observado nos grupos tratados por 15 e 30 dias (Said et al., 2005).

Assim, nos propusemos a dar continuidade a esta importante linha de pesquisa, visando contribuir para o entendimento da ação de outra droga imunossupressora, a ciclosporina A, comumente utilizada por pacientes receptores de enxertos.



**2.**

## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

Tivemos como objetivos neste estudo verificar, sobre o sistema mucociliar de ratos:

1. os efeitos da ciclosporina A;
2. os efeitos da secção brônquica;
3. a existência de sinergia entre esses dois fatores.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1. Transplante Pulmonar**

##### **3.1.1. Histórico**

O transplante pulmonar experimental começou na antiga União Soviética, em 1946. O fisiologista russo, Vladimir Petrovich Demikhov, foi o primeiro a realizar transplantes intratorácicos em cães de: coração; coração e lobo de um pulmão; coração e pulmões; e pulmões. No total, Demikhov usou mais de 50 variações destas cirurgias na realização de cerca de 300 transplantes (Mendeloff, 2002).

Os trabalhos na década de 50 buscavam entender a fisiologia e dominar a técnica de reimplante (Lansman et al., 1990). Já nos anos 60, os estudos sobre imunologia do enxerto conduziram ao primeiro transplante pulmonar em um ser humano, ocorrido nos Estados Unidos, em 1963, no University of Mississippi Medical Center (Hardy et al., 1963; Dalton, 1995). O paciente que recebeu o enxerto era um homem de 58 anos com uma obstrução do brônquio principal esquerdo devido a um carcinoma (Mendeloff, 2002).

O primeiro transplante pulmonar usado como paliativo foi registrado no Canadá, em 1986, após o advento de efetivos e toleráveis regimes de imunossupressão (Benfield e Wain, 2000).

Recentemente, o transplante pulmonar completou seu 35º aniversário. O período foi marcado por 20 anos iniciais de lento progresso, seguidos por 15 anos de explosivo crescimento e sucesso (Meyers e Patterson, 1999).

Em 1997, o número de transplantes de pulmão e de coração-pulmão excedia 1000 nos Estados Unidos e 1400 no mundo todo. A sobrevida acima de um ano era de cerca de 75% dos melhores diagnósticos. Os resultados funcionais já eram excelentes e duráveis, aumentando o volume expiratório forçado de 15% a 20% do prognóstico normal pré-operatório para 75% a 80% do prognóstico pós-operatório na maioria dos casos (Meyers e Patterson, 1999).

Durante a última década, ocorreu uma melhora marcante no resultado do transplante pulmonar simples e duplo. O índice de sobrevida atualmente em algumas instituições está próximo dos 90% (Benfield e Wain, 2000).

O transplante pulmonar proporciona uma sobrevida muito boa e aceitável tanto em curto quanto em longo prazo para pacientes com doença pulmonar avançada. O uso mais difundido de doadores distantes pode ser empregado em receptores selecionados sem comprometimento dos resultados breves ou tardios (Stewart e Patterson, 2001).

### 3.1.2. Problemas e desafios

Desde o primeiro transplante de pulmão simples com sucesso a longo termo, em 1983, seguido por um bem sucedido transplante duplo em 1986, o transplante pulmonar tornou-se uma opção para o tratamento de doenças respiratórias em estágio final de várias etiologias (Cooper, 1991; Kaiser et al., 1991; Aebe et al., 1992; Hoyos et al., 1992; Hosenpud et al., 1994; Speich e van der Bij, 2001), incluindo enfisema, fibrose alveolar, fibrose cística, hipertensão pulmonar e bronquiectasia (Ward e Muller, 2000).

A história do transplante pulmonar em humanos, desde 1963 até o presente, tem como principais desafios: a contaminação brônquica pela exposição do enxerto a organismos transportados pelo ar, o deficiente suprimento de sangue para o brônquio e o problema do edema pulmonar após a reperfusão (Grover e Murray, 1997).

Os problemas a serem enfrentados pelos programas de transplante pulmonar neste século incluem a indisponibilidade de pulmões doadores, as limitações técnicas de preservação do enxerto pulmonar coletado, a rejeição, os efeitos indesejáveis dos agentes imunossupressores, as infecções oportunistas e a prevenção e tratamento

da Síndrome da Bronquiolite Obliterante (SOB) (King et al., 1997; Snell et al., 1997; Stewart e Patterson, 2001).

No transplante pulmonar, as dificuldades começam na obtenção de um órgão satisfatório, pois a maioria dos doadores com morte cerebral não pode ser considerada. Mudanças da homeostase induzidas pelo sistema imunológico levam a microêmbolos e extravasamento para o espaço alveolar. Há também o constante risco de infecção devido à redução terapêutica de defesas endógenas e ao fato do órgão transplantado estar em constante comunicação com o meio exterior (Hoyer, 1978).

Infecção e rejeição ainda representam as duas maiores causas de complicações no pós-operatório imediato e merecem atenção particular (Crawford, 1995).

As infecções ainda são a causa mais comum de morbidade e mortalidade em pacientes receptores de transplante pulmonar (Brooks et al., 1985; Aeba et al., 1993; Winter et al., 1993). Infecções bacterianas compreendem aproximadamente metade de todas as complicações infecciosas. Infecções e doenças causadas por citomegalovírus se tornaram menos freqüentes devido a uma adequada profilaxia (Calhoon et al., 1992). Como o citomegalovírus está envolvido na patogenia da bronquiolite obliterativa, a menor freqüência desta infecção pode

também reduzir a ocorrência deste que é um dos principais obstáculos para o sucesso do transplante pulmonar. Infecções fúngicas invasivas permanecem sendo um problema, mas elas têm também diminuído em frequência devido a um melhor controle dos fatores de risco, como as doenças por citomegalovírus e terapia antifúngica preventiva (Brooks et al., 1985; Calhoon et al., 1992; Crawford, 1995; Speich e van der Bij, 2001).

Apesar do uso de potentes drogas imunossupressoras, a rejeição aguda, que ocorre frequentemente, especialmente nas primeiras semanas e meses após o transplante (Chhajed et al., 2002), e a subsequente Síndrome da Bronquiolite Obliterante (SOB) indicam claramente que as estratégias atuais de imunossupressão não estão sendo suficientemente adequadas (Stewart e Patterson, 2001).

Uma meticulosa supervisão pós-operatória continua sendo crucial no tratamento de pacientes receptores de transplante pulmonar com respeito à rápida detecção e pronto tratamento de rejeição e infecção (Dummer et al., 1986; Ward e Muller, 2000; Speich e van der Bij, 2001).



### **3.2. Secção brônquica**

Dentre os fatores envolvidos na cirurgia de transplante pulmonar, a secção brônquica parece ter um papel importante no quadro geral de complicações pós-operatórias citadas anteriormente.

O brônquio é um dos componentes das vias respiratórias e participa do complexo mecanismo de defesa do organismo - o sistema mucociliar - contra agentes invasores presentes no ar atmosférico (Puchelle, 1980; Konietzko, 1986).

Dada a importância deste componente, consideramos conveniente uma breve explanação sobre as características gerais do sistema respiratório.

#### **3.2.1. Sistema respiratório**

O sistema respiratório dos mamíferos é composto pelas vias aéreas e pelos pulmões. As vias aéreas são classificadas como: de condução e de trocas gasosas.

As vias aéreas de condução compreendem desde as fossas nasais até os bronquíolos terminais e são constituídas por um epitélio

pseudoestratificado ciliado que está em contato com uma delgada membrana basal.

As células que compõem o epitélio das vias de condução podem ser divididas em secretoras e ciliadas, principalmente.

#### **3.2.1.1. Células ciliadas**

As células ciliadas, presentes em toda a extensão da árvore traqueobrônquica, apresentam forma colunar e possuem cerca de 200 cílios (5-7  $\mu\text{m}$  de comprimento) na superfície apical livre. Observa-se uma diminuição gradual no número e no tamanho dos cílios quanto mais distal é a região da via aérea considerada (Serafini e Michaelson, 1977). O retículo endoplasmático rugoso e o sistema golgiense são bastante desenvolvidos nestas células. Numerosas mitocôndrias encontram-se no ápice da célula, próximas aos corpúsculos basais, enquanto que na extremidade oposta está, geralmente, o núcleo.

Os cílios são prolongamentos citoplasmáticos e possuem uma estrutura parecida com a do centríolo, podendo-se ver, num corte transversal, um par de microtúbulos centrais circundado por nove pares periféricos. É o chamado axonema padrão 9+2 (Junqueira e Carneiro, 1985).

Quimicamente, os cílios são formados por heterodímeros de  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina, dineína e mais outras 200 proteínas, aproximadamente, que se associam através de várias ligações radiais e circunferenciais, garantindo não só a manutenção da estrutura do axonema como também o controle dos movimentos ciliares (Satir e Sleight, 1990).

O movimento ciliar é produzido pela hidrólise do ATP pela dineína e pode ser dividido em duas etapas: propulsão e recuperação. Na etapa propulsiva, o cílio se movimenta perpendicularmente à superfície da célula, no sentido distal-proximal da via aérea. Ao chegar próximo da base, tem início a etapa de recuperação, na qual o cílio descreve uma trajetória no sentido contrário à da etapa anterior, ou seja, proximal-distal, deslocando-se lateralmente com um ângulo de  $30^\circ$  aproximadamente em relação à superfície celular. Esse movimento ocorre com uma velocidade duas vezes menor que a da etapa de propulsão. A frequência de batimento ciliar normal tem valores entre 10 e 20 Hz (Satir e Sleight, 1990; Lorenzi e Saldiva, 1991).

Há também um sincronismo entre o batimento dos cílios que estão próximos, pois quando um deles está em movimento faz com que os outros o acompanhem devido à transmissão mecânica do impulso (Wong et al., 1993).

A estrutura dos cílios pode estar alterada tanto em condições de doenças congênitas quanto devido a agressões crônicas do epitélio respiratório (Pedersen et al., 1981; Saldiva, 1990).

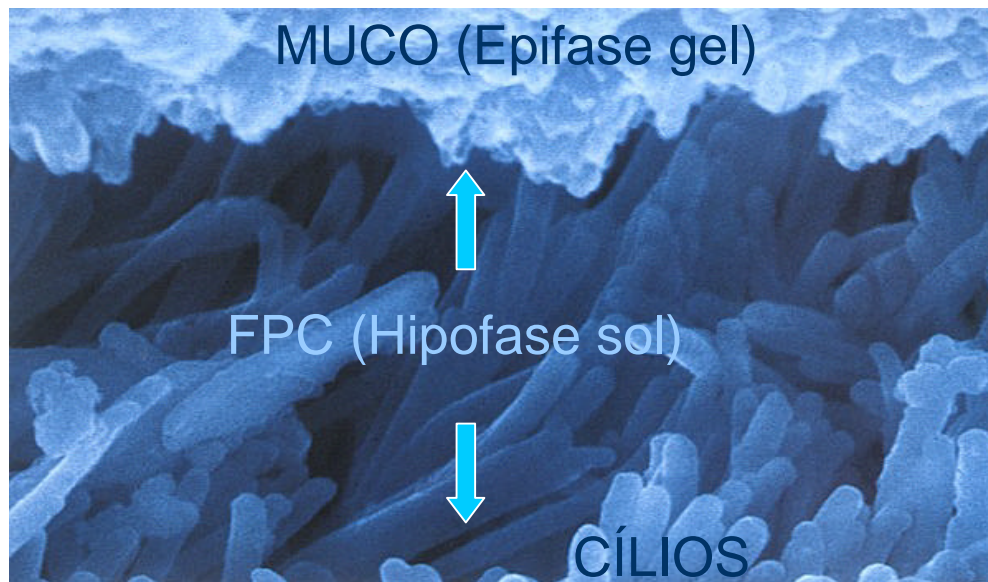
### **3.2.1.2. Células secretoras**

Quanto às células secretoras do epitélio respiratório, elas podem ser de três tipos: serosas, mucosas e de Clara. Basicamente, estas células são compostas por um núcleo pequeno na região basal da célula, sistema golgiense e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidos na região perinuclear e numerosos grânulos de secreção na sua porção apical.

As células mucosas produzem diferentes tipos de glicoproteínas e são responsáveis pela parte mais viscosa do líquido que reveste as vias aéreas, enquanto as serosas são uma das fontes da fase mais fluida da secreção brônquica (Figura 1) (Saldiva, 1990).

As células de Clara participam da produção de surfactante presente nos bronquíolos e alvéolos, além de prover um meio adequado para o batimento dos cílios na região dos bronquíolos. Além da função secretora, suas enzimas oxidativas tomam parte na inativação de

substâncias inaladas e sua finalidade no transporte transepitelial de eletrólitos não é totalmente conhecida (Welsh, 1987).



**Figura 1.** Fotomicrografia do epitélio ciliado brônquico mostrando as duas camadas que compõem o muco respiratório: o fluido periciliar (FPC) e a fase gel (Wanner et al., 1996)

### 3.2.1.3. Células inflamatórias

Além das células secretoras e ciliadas, um outro tipo presente no epitélio e na camada submucosa merece citação: as células inflamatórias, dentre as quais os linfócitos B e T ocupam lugar de destaque, formando o sistema BALT (do inglês “Bronchial Associated Lymphoid Tissue”), responsável pela defesa imunológica do trato respiratório. O BALT secreta imunoglobulinas IgA nos segmentos

proximais e IgG nos distais. A IgA brônquica é importante para a prevenção de infecções e reconhecimento de células tumorais, participando do sistema de vigilância imunológica (Saldiva, 1990). Pacientes com deficiência de IgA e de algumas subclasses de IgG mostram um aumento da susceptibilidade a infecções e prejuízo da função pulmonar (Bjorkander et al., 1985).

#### **3.2.1.4. Muco**

Um outro importante componente do sistema mucociliar é a secreção (muco) presente nas vias aéreas, que tem como principais funções: lubrificar e umedecer a superfície das vias condutoras, diminuindo, assim, a tensão superficial dos pequenos bronquíolos, os quais tendem a colapsar ao final da expiração; proteger o epitélio contra agressores exógenos; e interagir com os cílios para que estes funcionem normalmente, resultando numa limpeza adequada da árvore respiratória (Festa, 1993; Culp et al., 1995).

O muco é produzido no sistema golgiense e secretado pelas vesículas na forma condensada. Após a clasmocitose, o muco aumenta rapidamente seu volume devido à hidratação.

O muco respiratório acompanha toda a via aérea, sendo sua presença indispensável para que ocorra o transporte mucociliar. É composto por água (95%), eletrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Ca}^{+2}$ ) e substâncias orgânicas (carboidratos, lipídeos e proteínas) (Kalinier et al., 1986; Lorenzi-Filho, 1993; Kondo, 1997), formando um polímero hidrofílico cujas estruturas terciárias e quaternárias lhe conferem propriedades viscoelásticas (Macchione et al., 1998). A água representa a parte solvente, enquanto os vários polímeros, que se agrupam aleatoriamente, formam a chamada matriz do muco.

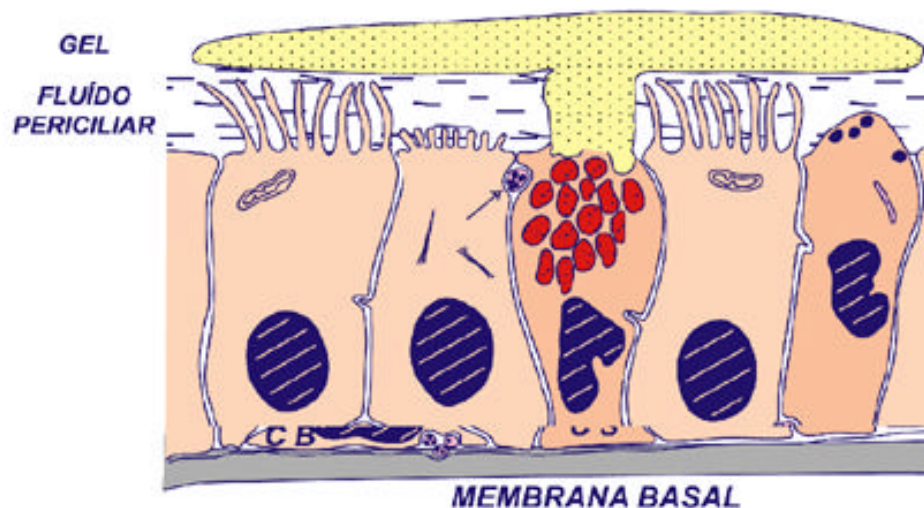
O componente principal da matriz são as mucinas, macromoléculas bastante heterogêneas, compostas de açúcares e proteínas e secretadas por células mucosas do epitélio e das glândulas submucosas. Possuem um esqueleto protéico central com áreas densamente glicosiladas (80%) e outras não glicosiladas (20%), e cadeias laterais de oligossacarídeos presas ao filamento protéico através de ligações O-glicosídicas (Silberberg, 1988).

Além das mucinas, muitas outras substâncias fazem parte da matriz do muco, como os lipídeos, proteoglicanos, proteases e antiproteases, substâncias antioxidantes, tampões, imunoglobulinas, lisozima, peroxidase, lactoferrina, proteínas ricas em prolina, albumina,

DNA, actina e outras substâncias sem papel exatamente conhecido (Verdugo, 1990; Lorenzi-Filho, 1993; Wanner et al., 1996).

O arranjo de todas essas substâncias dá ao muco uma configuração especial própria, possuindo duas camadas: a primeira, chamada fase sol, é mais fluida, está localizada perto da membrana celular e tem espessura aproximadamente igual ao tamanho dos cílios; a outra, chamada fase gel, é mais viscosa e está disposta sobre a fase sol. A espessura da camada sol é de extrema importância para o adequado funcionamento do sistema, pois se ela estiver maior que o normal, os cílios não irão alcançar a fase gel, responsável pelo carregamento das partículas aderidas; e se estiver menor, o movimento de recuperação dos cílios estará prejudicado devido à interferência mecânica da fase gel sobre uma porção maior do corpo dos cílios (Figura 2) (Welsh, 1987; Lorenzi-Filho, 1993).





**Figura 2.** Desenho esquemático mostrando células ciliadas e as duas camadas que compõem o muco respiratório: o fluido periciliar e a fase gel (Wanner et al., 1996)

O muco respiratório considerado ideal é aquele que possui um componente elástico que seja capaz de transferir o movimento dos cílios à camada de muco, e um componente deformável que possa promover o deslocamento do muco mediante a energia transmitida pelo batimento ciliar (Lopez-Vidriero, 1987).

A limpeza eficiente da árvore respiratória através do transporte mucociliar depende de uma perfeita interação entre cílios e muco, a qual está condicionada à ação coordenada de três atividades celulares básicas: geração de força, função secretora e transporte de água e íons. Qualquer falha num desses elementos pode ser altamente prejudicial ao transporte mucociliar.

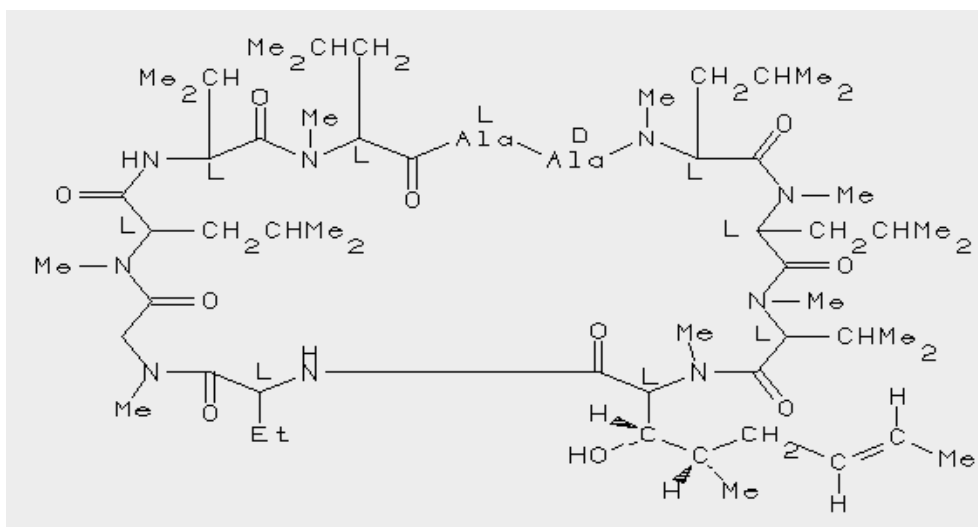
O sistema nervoso autônomo afeta diferentes aspectos da secreção das vias aéreas, como o volume de produção, as propriedades reológicas, o transporte iônico transepitelial e a taxa de transporte mucociliar (Handman e Neto, 1987; Gatto, 1993).

Portanto, o transporte mucociliar normal depende de uma correta interação entre uma série de fatores, como um epitélio íntegro com funcionamento ciliar coordenado e uma perfeita composição do muco, em quantidade adequada e com propriedades viscoelásticas ideais (Macchione et al., 1998).

### **3.3. Ciclosporina A**

#### **3.3.1. Histórico**

A CsA é um polipeptídeo cíclico hidrofóbico composto de 11 aminoácidos, com fórmula  $C_{62}H_{111}O_{12}$  e peso molecular 1.202,6 (Figura 3). Ela foi descrita, inicialmente, em 1969, a partir das espécies de fungos *Trichoderma polysporum* e *Cylindrocarpo lucidum* (Laupacis et al., 1981; Milpied, 1988).



**Figura 3.** Representação da fórmula estrutural da ciclosporina A

A CsA utilizada comercialmente é produzida a partir da cultura do fungo *Tolypocladium inflatum* (Borel et al., 1976).

Os efeitos biológicos da ciclosporina - imunossupressão e ausência de citotoxicidade - foram descobertos durante um programa de pesquisa no qual muitos cientistas da empresa Sandoz estavam envolvidos, dentre os quais, os Drs. J. Borel e H. Stahelin (Heusler e Pletscher, 2001).

O isolamento de CsA a partir de culturas do fungo *Tolypocladium inflatum* e a subsequente elucidação de suas propriedades imunossupressoras por Borel et al. (1976) teve grande impacto clínico.

No início dos anos 80 a CsA foi introduzida no campo dos transplantes de órgãos resultando num aumento extraordinário da sobrevida do enxerto.

Dentre as drogas imunossupressoras, a CsA ocupa o primeiro lugar na escolha para o tratamento de pacientes com órgãos transplantados (Ruhlmann e Nordheim, 1997).

### **3.3.2. Metabolismo**

Devido à natureza lipofílica da molécula, a ciclosporina é altamente difundida nos órgãos e distribui-se rapidamente nos depósitos tanto teciduais quanto plasmáticos (Atkinson et al., 1983; Smith et al., 1983). Distribui-se pelo sangue, sendo que 90% de sua composição liga-se a proteínas plasmáticas, e 10% a granulócitos e linfócitos (Lemaire e Jillemont, 1982; Miraz et al., 1983).

Mais de 70% da ciclosporina administrada é metabolizada no fígado e excretada na bile, nas fezes, e até 10% dos seus metabólitos podem ser eliminados pela urina (Kahan et al., 1989). No homem, a absorção da droga é realizada no intestino delgado e sua meia vida é de cerca de seis a nove horas (Wood et al., 1983; Ryffel et al., 1988).

### 3.3.3. Mecanismos de ação

Embora os eventos moleculares ainda não sejam bem compreendidos, evidências indicam que a CsA bloqueia um estágio inicial na ativação dos linfócitos T, além de inibir a produção de interleucina 2 e outras linfocinas (Kahan et al., 1983; Mauer, 1985; Nussemlat e Palestine, 1986; Khanna et al., 1994).

Uma teoria proposta sobre o mecanismo de ação da CsA é sua influência sobre o cálcio citoplasmático, essencial para a função celular normal (Colombani et al., 1985; Harding et al., 1986; Legrue et al., 1986; Citterio e Kahan, 1989; Mihatsch et al., 1998). A hipótese sugere que a ciclosporina se ligue a uma proteína citoplasmática, e que essa ligação seja proporcional à potência da sua imunossupressão (Shevach, 1985; Calabresi e Parks, 1987; Kahan et al., 1989).

A ciclosporina também pode ligar-se a receptores nucleares, inibindo a transcrição genética que codifica polipeptídeos secretados por fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e monócitos (Harding et al., 1986).

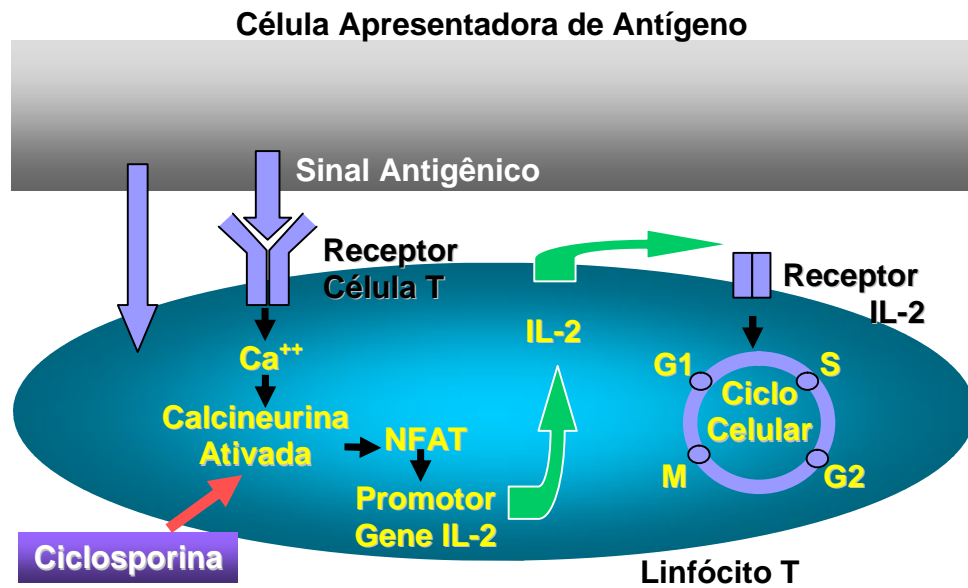
A CsA, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, atua sobre os linfócitos T imunocompetentes, sendo altamente específica para estas células

(Borel et al., 1977; Lillehoj et al., 1984; Helin e Edginton, 1984; Bennett e Norman, 1986).

A CsA interfere nos estágios iniciais do ciclo celular, afetando a proliferação de células linfóides no início da mitose (Burckhardt e Guggenheim, 1979; Hess et al., 1988).

Simon et al. (2001) e Sovcikova et al. (2002) reportam que há uma relação direta entre a citotoxicidade induzida pela CsA e a mudança na atividade das enzimas mitocondriais, bem como uma indução na produção de superóxido.

Portanto, a CsA atua em vários estágios da resposta imunológica a um antígeno, inibindo seletivamente funções específicas dos linfócitos, restringindo a expansão clonal ou ativação funcional de linhagens celulares (Figura 4) (Leoni et al., 1978; King et al., 1997).



**Figura 4.** Esquema propondo o mecanismo de ação da ciclosporina sobre os linfócitos T. Gentilmente cedido pelo Dr. Rogério Souza

### 3.3.4. Efeitos colaterais

Após o transplante, as drogas imunossupressoras induzem frequentemente alterações lipídicas e intolerância glucosídica que resultam em piora do prognóstico dos pacientes. O controle do lipídio sérico é crítico no tratamento dos pacientes após o transplante (Ducobu, 2002).

Os efeitos colaterais mais comumente relatados incluem hipertricose, tremor, hipertensão, redução da função renal devido à nefrotoxicidade, disfunção hepática, fadiga, hipertrofia gengival, distúrbios gastrintestinais (anorexia, náusea, vômitos, dor abdominal e

diarréia) e sensação de queimação nas mãos e nos pés (geralmente na primeira semana de tratamento). Mais raramente podem ocorrer cefaléias, erupções cutâneas de origem possivelmente alérgica, anemia leve, aumento de peso, edema, pancreatite e convulsões. Os efeitos colaterais são geralmente dose-dependentes, respondendo prontamente à redução da dose (Kreft et al., 1987; Kaito et al., 1993; Rob et al., 1996; Mihatsch et al., 1998; Kano et al., 1999; Oriji e Schanz, 2001).

### **3.3.5. Monitoramento**

O monitoramento da CsA em amostras de sangue é essencial para otimizar a eficácia terapêutica da droga e minimizar sua toxicidade já que existem variações substanciais entre os pacientes com relação aos parâmetros farmacocinéticos dessa droga (Kahan et al., 1995; Loffreda et al., 1997). Além disso, pode haver interações medicamentosas entre a CsA e diversas outras drogas normalmente administradas para pacientes submetidos a transplante. A dosagem da ciclosporina sangüínea é um instrumento eficaz na identificação de tais interações indicando prontamente sua magnitude (Holt e Pitty, 1989).

A dosagem da CsA sangüínea é feita, em geral, através do método de radioimunoensaio (RIE) (Buonpane, 1990) devido a uma



série de facilidades que ele proporciona, como a sensibilidade do método, o tempo relativamente rápido de rotação para um grande número de amostras, a disponibilidade da aparelhagem, entre outras (Corsi, 1998).

Dentre os vários equipamentos disponíveis para este fim está o TDxFLx<sup>®</sup>, um recurso automatizado para a realização de uma série de testes de laboratório, como drogas terapêuticas, bioquímica, proteínas específicas, tóxicos e drogas de abuso.

O sistema TDxFLx<sup>®</sup> utiliza a tecnologia de fluorescência polarizada (Fluorescence Polarization Immunoassay - FPIA) e a metodologia de imunoensaio por competição.

### **3.3.6. Vias de administração**

Em humanos a CsA pode ser administrada na forma oral, intramuscular e intravenosa, sendo a primeira a forma mais comumente usada. Wassef et al. (1985) avaliaram o perfil farmacocinético da CsA em ratos, utilizando as diferentes vias de administração e concluíram que a injeção pela via subcutânea não requer anestesia, é mais tolerada pelo animal e permite que a droga atinja níveis plasmáticos adequados e uniformes (Spolidorio, 1991).

### 3.3.7. Posologia

As concentrações terapêuticas ideais de CsA ainda não estão bem determinadas. Segundo Towpic et al. (1985), a dose tem que ser ajustada individualmente. Vários estudos experimentais relatam o uso de doses entre 5 e 25mg/Kg de peso corporal/dia (Spolidorio, 1991; Aeba et al., 1993; Corsi et al., 1995; Rob et al., 1996; Corsi, 1998; Orij e Schanz, 2001). Outros estudos, visando verificar a associação da CsA com outras drogas ou sua ação tóxica, relatam o uso de doses entre 1,25 e 3 mg/Kg/dia ou 50mg/Kg/dia, respectivamente (Sovickova et al., 2002).

Baseados nos fatos até aqui mencionados, como o número crescente de cirurgias para transplante de pulmão, o uso cada vez mais intenso de drogas imunossupressoras para evitar a rejeição do órgão, além de um alto índice de mortalidade dos pacientes receptores de enxertos, principalmente devido a infecções do sistema respiratório, consideramos oportuno e relevante o desenvolvimento de um modelo experimental que trouxesse dados sobre os mecanismos envolvidos no prejuízo do transporte mucociliar observado nos pacientes receptores de órgãos.

Dessa forma, iniciamos, há alguns anos, uma linha de pesquisa em transplante pulmonar em ratos para avaliar os efeitos causados por dois importantes fatores envolvidos nesse tipo de cirurgia: a secção brônquica e o uso de drogas imunossupressoras (Rivero et al., 2001; Xavier, 2004; Said, 2005).

## **4. MÉTODOS**

## 4. MÉTODOS

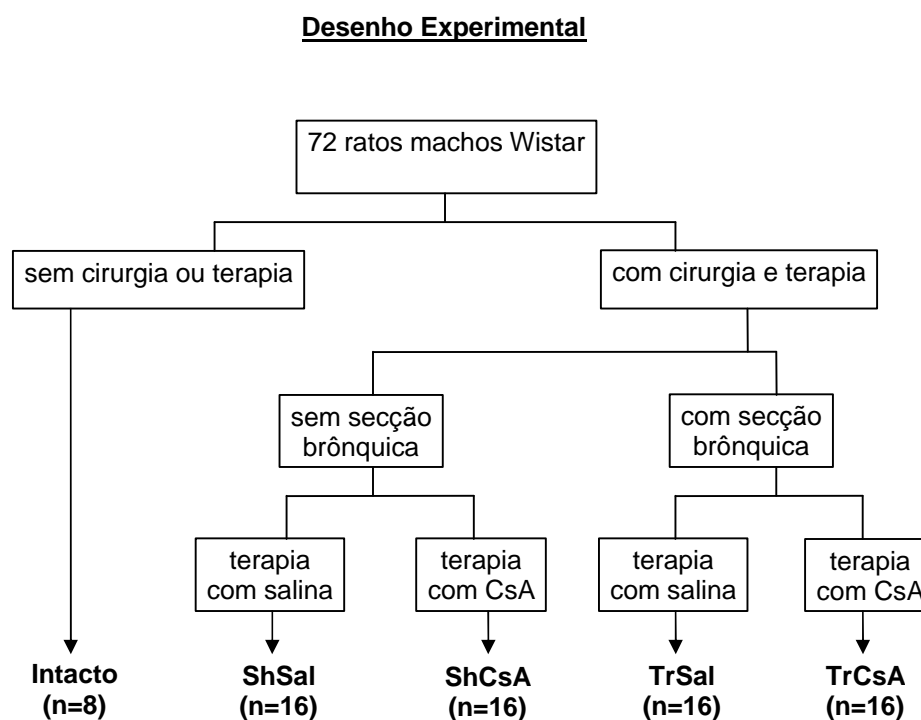
Utilizamos 72 ratos machos da raça Wistar-Furth, com peso médio de 300g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Os animais foram submetidos ao procedimento operatório no Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica da FMUSP, e mantidos em gaiolas individuais no biotério do mesmo laboratório, sendo pesados e avaliados diariamente até a data do sacrifício.

Os animais receberam água e ração balanceada *ad libitum*, e foram tratados durante todo o experimento segundo as normas internacionais vigentes que regem sua utilização na pesquisa científica (Guide, 1996; Report, 2001).

### 4.1. Desenho experimental

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos, de acordo com o procedimento operatório e o tratamento terapêutico a que seriam submetidos (figura 5).



**Figura 5.** Fluxograma mostrando a composição dos grupos de acordo com o tratamento cirúrgico e terapêutico a que foram submetidos

Os animais do grupo Intacto foram acompanhados por 90 dias até a data do sacrifício, sem terem sido submetidos ao procedimento cirúrgico e ao tratamento terapêutico.

Os animais dos grupos ShSal e ShCsA receberam a aplicação diária de solução salina a 0,9% e de ciclosporina A, respectivamente, após terem sido submetidos ao procedimento operatório, sem a realização da secção brônquica.

Já os animais dos grupos TrSal e TrCsA receberam doses diárias de solução salina a 0,9% e de ciclosporina A, respectivamente, porém, após terem sido submetidos ao procedimento operatório completo, isto é, com secção brônquica.

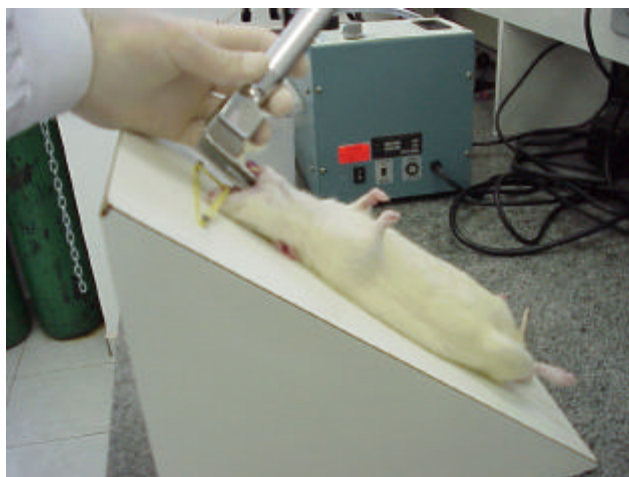
#### 4.2. Secção e anastomose brônquica

Os animais foram sedados em câmara contendo anestésico inalatório isoflurano (Isothane, Baxter) (figura 6a), e intubados com cateter de polietileno 14-G de 7,0 cm de comprimento. A intubação orotraqueal foi realizada com auxílio de laringoscópio pediátrico com lâmina adaptada para o uso em pequenos animais (figura 6b).



**Figura 6a.** Câmara inalatória contendo gás anestésico para sedação para intubação orotraqueal

A seguir, o cateter foi conectado a um ventilador mecânico para pequenos animais (Harvard Apparatus, modelo 683), com volume corrente de 10 ml/kg de peso corporal e frequência de 70 ciclos por minuto (figura 6c).



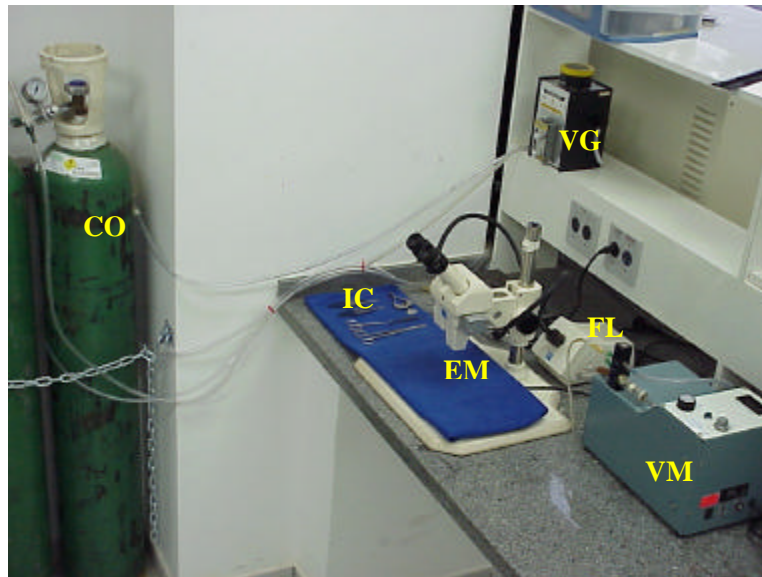
**Figura 6b.** Intubação orotraqueal sendo realizada com auxílio de laringoscópio pediátrico adaptado para pequenos animais



**Figura 6c.** Animal sob ventilação mecânica e anestesia geral inalatória



A anestesia foi mantida com o mesmo gás isoflurano a 2%, administrado juntamente com gás oxigênio puro, com fluxo de 0,5 l/min (figura 6d).



**Figura 6d.** Equipamentos usados para a realização do procedimento cirúrgico. IC = instrumental cirúrgico; VM = ventilador mecânico; VG = vaporizador de gases; EM = estereomicroscópio; CO = cilindro de oxigênio; FL = fonte de luz

O animal foi posicionado em decúbito lateral direito, efetuando-se a assepsia e a tricotomia da região torácica esquerda.

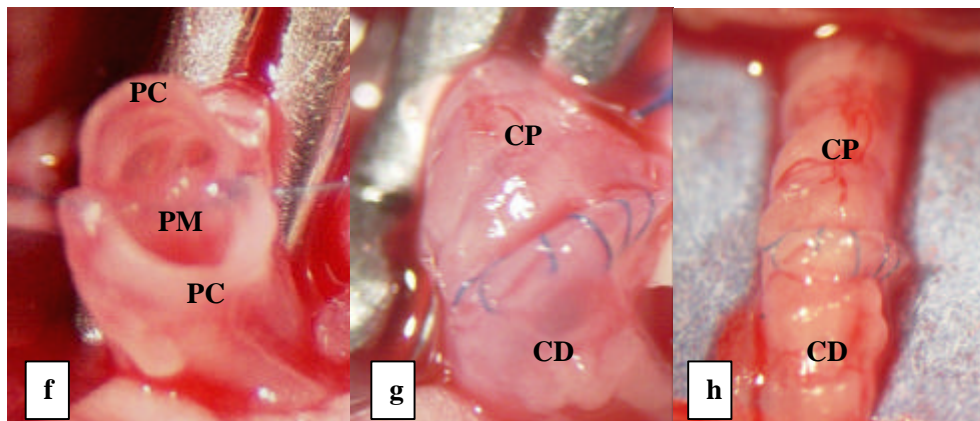
Em seguida, procedeu-se a abertura da caixa torácica através de toracotomia esquerda de aproximadamente 3,0 cm no quinto espaço intercostal (figura 6e).



**Figura 6e.** Animal em decúbito lateral direito podendo-se visualizar a porção superior do pulmão esquerdo após realização da toracotomia

Estando o pulmão esquerdo visível, realizou-se o rompimento cuidadoso do ligamento inferior. Após este procedimento, o brônquio esquerdo foi isolado da artéria e veia pulmonares através de dissecação e ligado na extremidade proximal, junto à carena, utilizando-se fio de algodão 2-0.

Em seguida, o brônquio foi seccionado no seu diâmetro total, próximo à ligadura, e a anastomose brônquica realizada com sínteses contínuas, usando-se fio de polipropileno 8-0, tanto na porção cartilaginosa quanto na membranosa (figuras 6f-h).

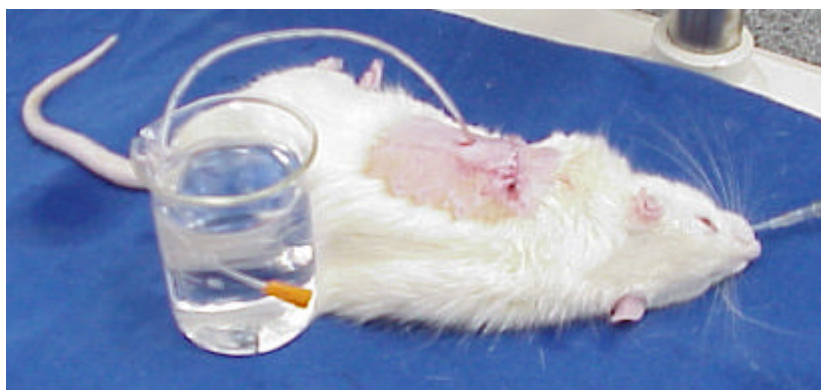


**Figura 6f-h.** Visualização da anastomose brônquica esquerda realizada com fio de polipropileno 8-0. Aumento de 8x. CD = coto distal; CP = coto proximal; PM = porção membranosa; PC = porção cartilaginosa

Finalizada a anastomose, a ligadura brônquica foi retirada, restabelecendo-se o suprimento de ar para o pulmão esquerdo.

A ferida cirúrgica foi submetida à síntese em três planos: intercostal, muscular e cutâneo. A drenagem do tórax foi realizada por meio de um cateter 19-G, mantido até a retirada total das secreções resultantes do ato cirúrgico (figura 6i).

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



**Figura 6i.** Posicionamento do dreno torácico até retorno da respiração espontânea

O procedimento operatório foi realizado sempre pelo mesmo pesquisador, com técnica limpa, não-estéril, e com auxílio de um estereomicroscópio (ZEISS, mod. Stemi DRC) com aumento de até 16x.

#### **4.3. Aplicação da ciclosporina A e da solução salina a 0,9%**

Os animais dos grupos ShCsA e TrCsA receberam aplicações diárias de ciclosporina A (SANDIMMUN<sup>®</sup>, 50mg/ml, NOVARTIS), por via subcutânea, na dose de 10 mg/Kg (= 0,2 ml/Kg) de massa corporal.

Os ratos do grupo ShSal e TrSal receberam solução salina 0,9%, também por via subcutânea, na dose de 0,2 ml/Kg de peso corporal.

#### **4.4. Dosagem da ciclosporina A no sangue total**

##### **4.4.1. Coleta**

A coleta da amostra de sangue foi realizada imediatamente antes do sacrifício.

Todos os ratos que receberam ciclosporina A foram submetidos à coleta de 0,3 ml de sangue através de punção da artéria aorta abdominal. Em seguida, a amostra foi introduzida em frasco contendo 100 µl de anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), e mantida sob refrigeração a -70 °C.

##### **4.4.2. Dosagem da ciclosporina A**

A dosagem da ciclosporina A foi realizada pelo Laboratório de Pesquisa e Farmacologia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas - FMUSP.

Para a análise, utilizou-se a tecnologia de fluorescência polarizada (Fluorescence Polarization Immunoassay - FPIA) e a metodologia de imunoensaio por competição, por meio do sistema TDxFLx<sup>®</sup>.

#### **4.5. Sacrifício**

O sacrifício dos animais ocorreu em dois instantes a partir da data do procedimento cirúrgico: oito animais de cada grupo após 30 dias, e os outros oito, após 90 dias. Todos os animais do grupo Intacto foram sacrificados após acompanhamento por 90 dias.

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (THIOPENTAX, 0,5g, CRISTÁLIA) e sacrificados pelo método de exangüinação, através da secção da artéria aorta abdominal.

#### **4.6. transportabilidade do muco *IN VITRO***

##### **4.6.1. Coleta**

Após o sacrifício, procedeu-se a retirada dos pulmões, com subsequente dissecação do brônquio principal esquerdo. As amostras de muco foram coletadas com auxílio de um pincel de pêlos macios (Tigre, nº 02) (figura 7).



**Figura 7.** Coleta de amostra de muco do brônquio esquerdo com auxílio de pincel de pêlos finos

O pincel foi posicionado no brônquio principal através de uma pequena abertura feita na porção cartilaginosa do mesmo. O muco que ficou aderido ao pincel foi colocado sobre uma lâmina histológica contendo óleo mineral, e, a seguir, colocado em tubo tipo eppendorf contendo a mesma substância.

As amostras foram mantidas sob refrigeração a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a data da análise da transportabilidade *in vitro*.

#### 4.6.2. Análise

As amostras de muco foram submetidas a um teste classicamente aceito e relatado como sendo um método *in vitro*: a transportabilidade em palato de rã (Puchelle et al., 1983; Rubin et al., 1990).

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

O procedimento foi realizado da seguinte forma: a rã (*Rana catesbeiana*) foi anestesiada através de hipotermia induzida em câmara contendo gelo triturado, por cerca de 50 minutos. A seguir, não respondendo aos testes de verificação de reflexo, foi decapitada, com auxílio de uma guilhotina própria para sacrifício de animais de



experimentação, e o seu palato retirado através de dissecação, tomando-se o devido cuidado para não danificar a superfície epitelial.

O palato foi mantido por 48 horas sob refrigeração a 4°C para que o muco da rã fosse quase totalmente esgotado pela ação de seu próprio aparelho ciliar. O muco restante foi, então, coletado para servir de controle, em relação ao muco dos ratos.

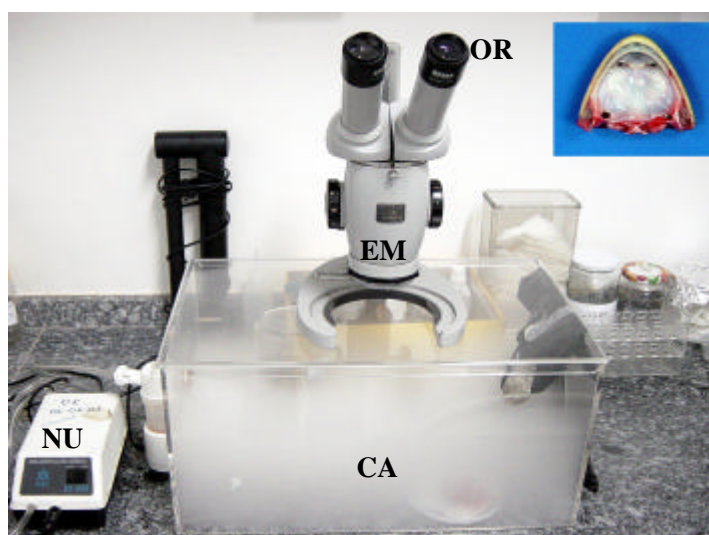
Durante os procedimentos de medida da velocidade, o palato foi mantido sob temperatura ambiente, dentro de uma câmara de acrílico com 100% de umidade relativa do ar, mantida pelo vapor de uma solução de Ringer em água destilada (1:1) (73,8 mEq/l Na<sup>+</sup>, 2mEq/l K<sup>+</sup>, 2,3 mEq/l Ca<sup>+2</sup> e 78 mEq/l Cl<sup>-</sup>) produzido por um nebulizador ultrassônico (mod. US-800, ICEL<sup>®</sup>).

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

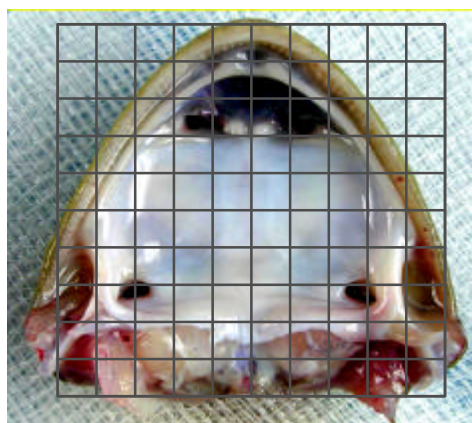
A alíquota de muco foi colocada sobre o epitélio ciliado da região anterior do palato da rã e, durante o seu deslocamento em direção

à região posterior, foi cronometrado o tempo gasto para que fosse percorrida uma distância pré-estabelecida de 6 mm.

A medida foi feita através da observação do conjunto por meio de um estereomicroscópio (Zeiss), posicionado sobre a tampa da câmara de acrílico, o qual estava composto por uma ocular reticulada. O aumento utilizado foi de 8x (figuras 8 e 9).



**Figura 8.** Equipamentos utilizados para medida da transportabilidade das amostras de muco em palato de rã. NU = nebulizador ultrassônico; CA = câmara acrílica; EM = estereomicroscópio; OR = ocular reticulada



**Figura 9.** Representação do palato de rã sendo visualizada através de ocular reticulada

Foram realizadas cinco tomadas de tempo de cada amostra de muco, sendo utilizada, para fins estatísticos, a média aritmética dos valores observados. A cada cinco amostras de muco dos ratos, foi feita a medida da transportabilidade do muco da própria rã.

A velocidade do deslocamento (transportabilidade) das amostras de muco dos ratos (a) foi comparada com a do muco da própria rã (b), sendo, assim, expressa como velocidade relativa (c). Assim, temos:  $c = b/a$ .

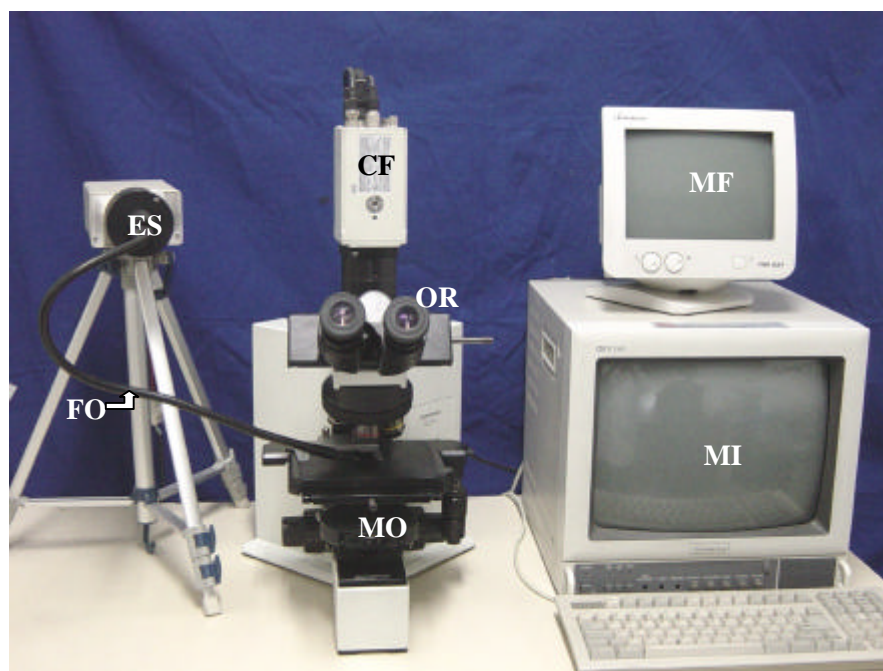
#### **4.7. Frequência de batimento ciliar *in situ***

Após a coleta das amostras de muco, efetuou-se a abertura total do brônquio principal esquerdo, através de um corte longitudinal no ângulo de contato entre as porções cartilaginosa e membranosa, para exposição do epitélio ciliado presente nas paredes internas das vias respiratórias.

A imagem do epitélio ciliado brônquico foi captada por uma câmera filmadora (Sony, mod. 3CCD Iris) acoplada a um microscópio óptico (Olympus BX50), com aumento de 100x, e enviada para um monitor de vídeo (Sony Trinitron).

Um estroboscópio (Machine Vision Strobe, mod.5000, U.S.A.), adaptado com fibra óptica, foi colocado em frente ao epitélio ciliado, passando a emitir “flashes” a uma frequência constante conhecida (figura 10).

Ao mesmo tempo em que se observava a imagem do epitélio ciliado gerada no monitor, ia-se diminuindo a frequência da luz emitida pelo estroboscópio, até o momento em que não era mais possível a percepção dos movimentos ciliares. Neste ponto, o mesmo valor da frequência do estroboscópio, registrado no monitor, era atribuído ao batimento ciliar.



**Figura 10.** Equipamentos utilizados para medida da frequência de batimento ciliar e da velocidade de transporte mucociliar. CF = câmera filmadora; ES = estroboscópio; FO = fibra óptica; MF = monitor de frequência; MI = monitor de imagem; MO = microscópio óptico; OR = ocular reticulada

#### **4.8. Velocidade de Transporte Mucociliar *in situ***

A Velocidade de Transporte Mucociliar *in situ* foi medida através da observação direta de partículas de carbono aderidas ao muco do epitélio ciliado brônquico.

A observação foi feita com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus BX50), equipado com ocular reticulada, sob aumento de 100x (figura 10).

Cerca de 1µl de uma solução contendo partículas de carbono foi depositado na extremidade do brônquio; a velocidade de deslocamento das partículas aderidas ao muco, ao longo do epitélio ciliado brônquico, foi cronometrada e registrada como a distância que a solução percorreu num determinado intervalo de tempo (mm/min).

O estudo da transportabilidade do muco *in vitro*, bem como da frequência de batimento ciliar e da velocidade de transporte mucociliar *in situ* foram realizados no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, Grupo de Defesa Pulmonar.

#### 4.9. análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se a versão 4.0 do programa *Graphpad Prism for Windows*.

Utilizamos o teste de variância de duplo fator para verificar a interferência dos fatores analisados, bem como uma possível interação entre eles.

Utilizamos ainda o teste de Bonferroni para verificar a diferença entre os grupos para cada fator analisado.

Os dados estão representados em forma de tabelas e gráficos, e expressos como média  $\pm$  desvio padrão, tendo sido considerado como significativo um valor de  $p < 0,05$ .

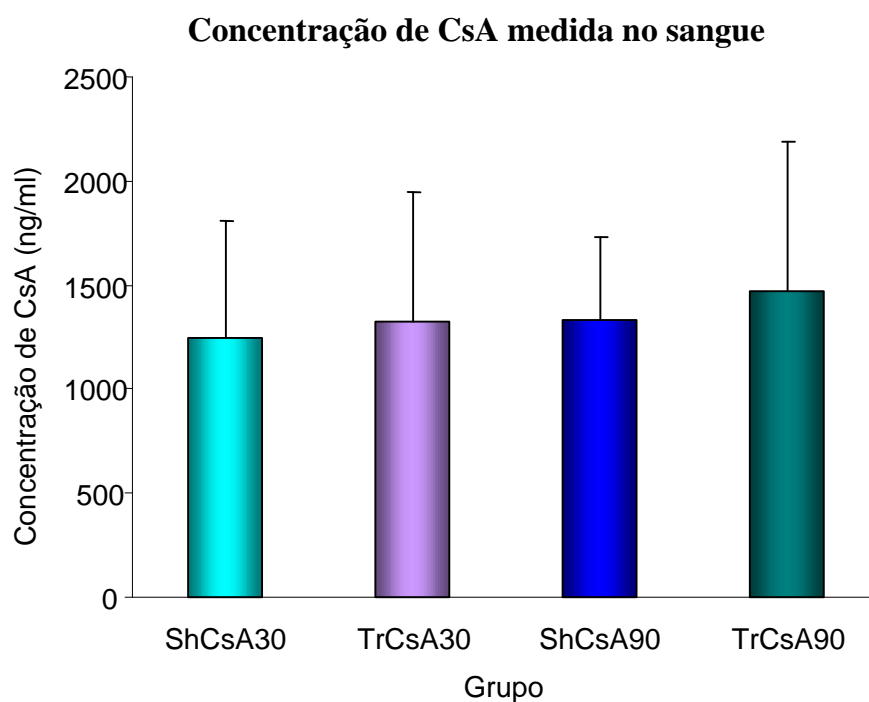
## **5. RESULTADOS**



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Dosagem da CsA sangüínea

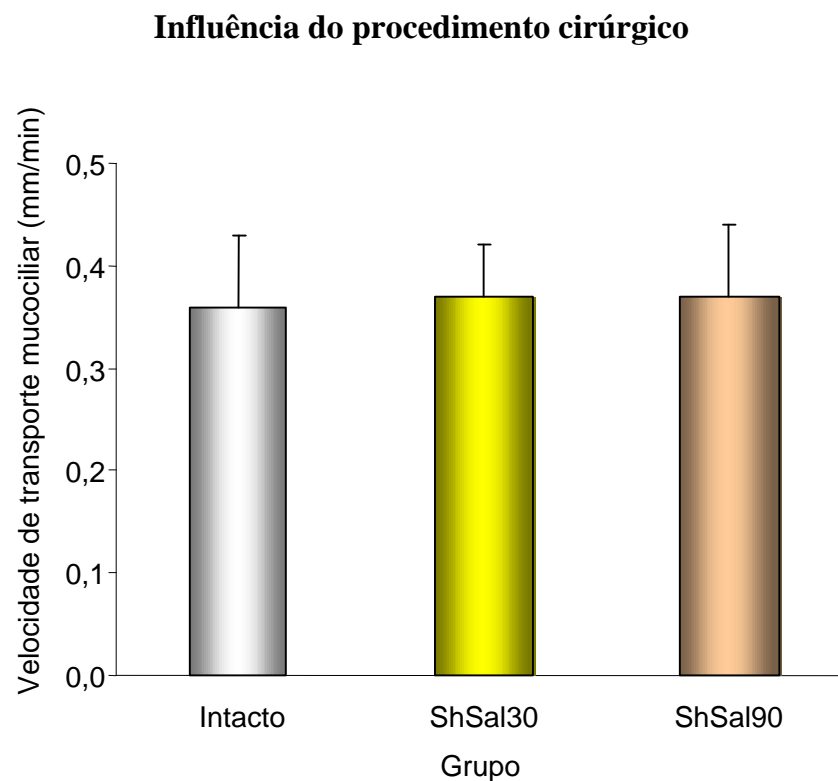
Os valores médios da concentração de CsA nas amostras de sangue coletadas tiveram pouca variação entre os grupos estudados, não havendo diferença estatisticamente significativa (figura 11).



**Figura 11.** Comparação entre os grupos que foram submetidos ao procedimento operatório sem ou com secção brônquica e tratados com CsA por 30 ou 90 dias, quanto à concentração sangüínea de CsA (Média±DP) no momento do sacrifício. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos

## 5.2. Influência do procedimento cirúrgico

Os resultados obtidos revelaram que os procedimentos envolvidos no ato cirúrgico, tais como ventilação mecânica, anestesia, estresse, entre outros, não comprometeram a fisiologia do sistema mucociliar do trato respiratório de ratos, quanto aos parâmetros e períodos avaliados (figura 12).



**Figura 12.** Comparação entre o grupo Intacto e os que foram submetidos ao procedimento operatório sem secção brônquica e tratados com solução salina por 30 ou 90 dias, quanto à velocidade de transporte mucociliar *in situ* (Média±DP) medida no brônquio esquerdo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos

### 5.3. influência da ciclosporina a e da secção brônquica

Os parâmetros avaliados - frequência de batimento ciliar *in situ*, transportabilidade das amostras de muco em palato de rã (*in vitro*) e velocidade de transporte mucociliar *in situ* – estão representados nas figuras 13, 14 e 15, respectivamente.

Todos os parâmetros foram influenciados pela terapia com ciclosporina A, dado que os grupos tratados por 30 ou 90 dias (ShCsA30 e ShCsA90) apresentaram uma diminuição significativa nos seus valores ( $p<0,001$ ) quando comparados aos animais tratados com solução salina por iguais períodos (ShSal30 e ShSal90).

Os animais submetidos à secção brônquica apresentaram uma diminuição significativa tanto na frequência de batimento dos cílios (figura 13), aos 30 ( $p<0,001$ ; grupo TrSal30) e 90 dias ( $p=0,005$ ; grupo TrSal90), quanto na velocidade de transporte mucociliar *in situ* ( $p<0,001$ ; figura 15).

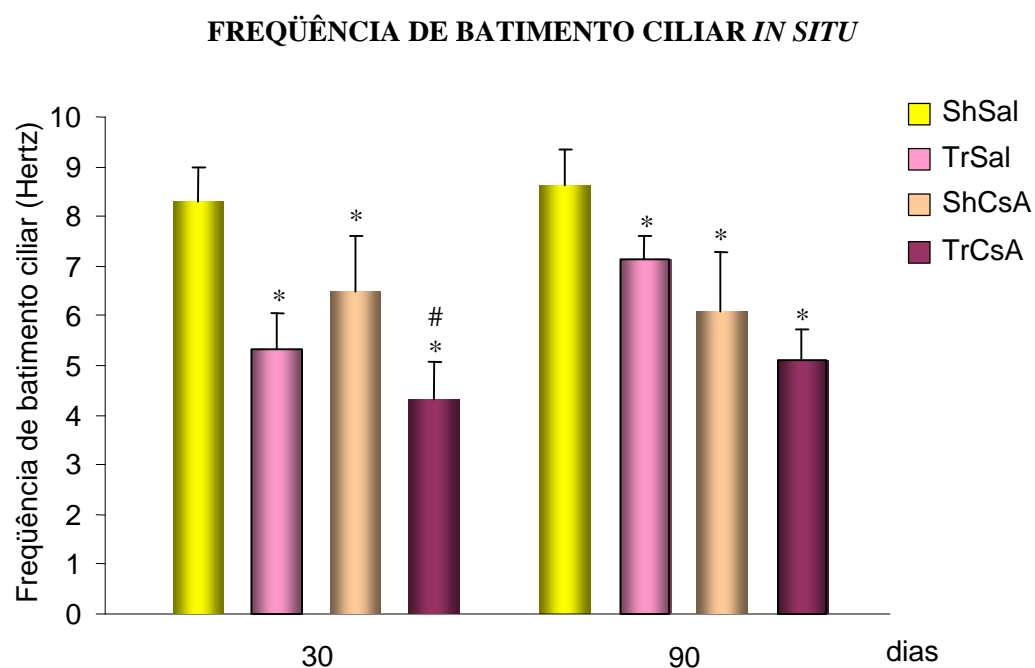
O mesmo não foi observado em relação à transportabilidade das amostras de muco *in vitro* (figura 14), a qual não apresentou valores significativamente diferentes ( $p>0,05$ ) entre os grupos submetidos ou não à secção brônquica (TrSal vs ShSal).

Houve uma tendência de recuperação da frequência de batimento ciliar e da velocidade de transporte *in situ* 90 dias após a

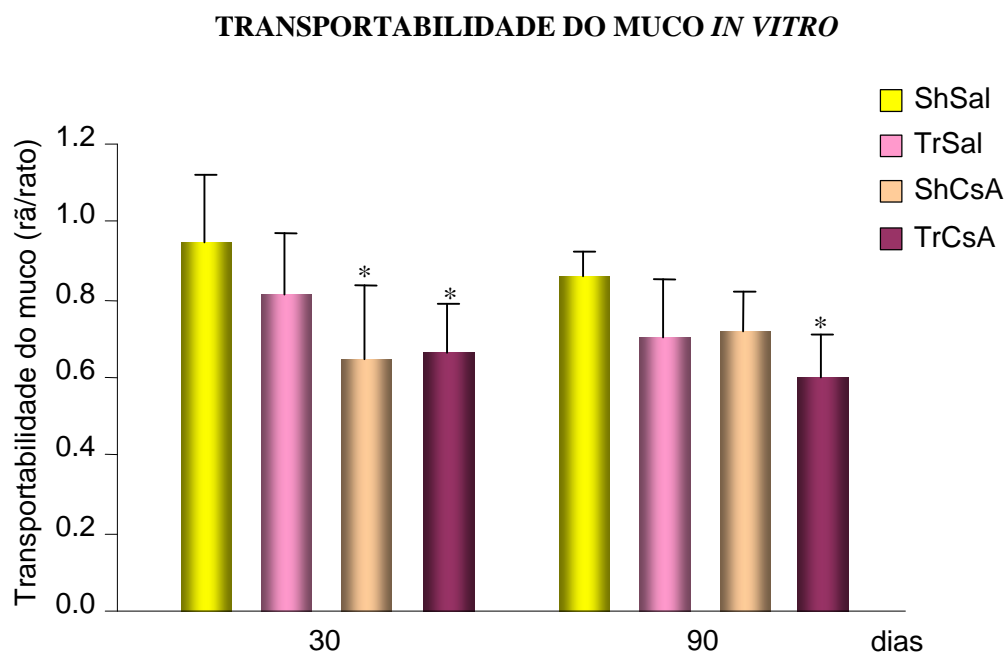
secção brônquica, sendo significativa ( $p<0,001$ ) apenas nos animais tratados com solução salina (TrSal).

Os grupos submetidos conjuntamente à terapia com ciclosporina A e à secção brônquica (TrCsA) apresentaram valores de frequência de batimento ciliar (figura 13) significativamente menores em relação aos animais submetidos a apenas um dos dois fatores isoladamente (TrSal e ShCsA), evidenciando um efeito sinérgico entre esses fatores.

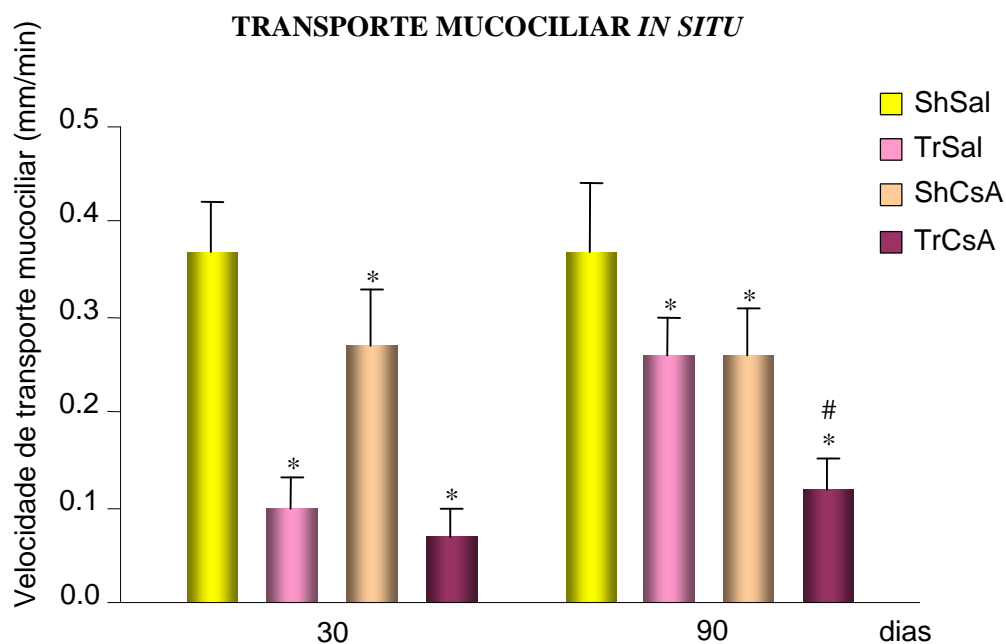
Quanto à velocidade de transporte mucociliar *in situ* (figura 15), essa interação entre os fatores foi observada apenas no grupo estudado por 90 dias (TrCsA90).



**Figura 13.** Frequência de batimento ciliar (Média±DP) medida no brônquio esquerdo de ratos submetidos ou não à secção brônquica e tratados com solução salina ou ciclosporina A por 30 ou 90 dias. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (\*vs ShSal; #vs TrSal30 e ShCsA30;  $p < 0,001$ )



**Figura 14.** Transportabilidade em palato de rã (Média±DP) das amostras de muco coletadas do brônquio esquerdo de ratos submetidos ou não à secção brônquica e tratados com solução salina ou ciclosporina A por 30 ou 90 dias. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (\*vs ShSal;  $p < 0,001$ )



**Figura 15.** Velocidade de transporte mucociliar *in situ* (Média±DP) medida no brônquio esquerdo de ratos submetidos ou não à secção brônquica e tratados com solução salina ou ciclosporina A por 30 ou 90 dias. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (\*vs ShSal; #vs TrSal90 e ShCsA30 e 90;  $p<0,001$ )

Os valores individuais, bem como os valores médios por grupo, da concentração de CsA das amostras de sangue coletadas estão mostrados nas tabelas 1 e 2, respectivamente, do item Anexos.

Os valores individuais e médios da frequência de batimento ciliar, registrada no brônquio esquerdo dos animais de cada grupo, encontram-se nas tabelas 3 e 4, respectivamente, do item Anexos.

Os valores individuais e médios da transportabilidade em palato de rã das amostras de muco coletas do brônquio esquerdo dos animais de cada grupo, encontram-se nas tabelas 5 e 6, respectivamente, do item Anexos.

Os valores individuais e médios da velocidade de transporte mucociliar *in situ*, registrada no brônquio esquerdo dos animais de cada grupo, encontram-se nas tabelas 7 e 8, respectivamente, do item Anexos.



## **6. DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

O perfeito funcionamento do sistema mucociliar depende, por um lado, da correta interação entre os seus vários componentes, como: um epitélio ciliado morfofisiologicamente íntegro, com cílios movimentando-se de forma sincronizada; uma quantidade adequada de muco, com propriedades viscoelásticas ideais; e uma perfeita composição e tamanho da camada de fluido periciliar (Lorenzi et al., 1992).

Por outro lado, esses fatores são diretamente dependentes do estado de inervação e vascularização local (Peatfield e Richardson, 1983). Durante o transplante de pulmão, ambos os suprimentos nervoso e circulatório são completamente interrompidos e não são reconectados, podendo, assim, causar muitos distúrbios no transporte mucociliar (Paul et al., 1989; Gade et al., 2001).

Vários estudos relatam a importância da proteção da anastomose brônquica - através do pedículo do omento, por exemplo, para promover a revascularização local e evitar complicações letais (Legal et al., 1987; Santillan-Doherty et al., 1989).

Pinsker et al. (1979) usaram um modelo experimental em cães para testar a influência do tamanho do componente brônquico distal

sobre a cicatrização da anastomose. Eles concluíram que a anastomose lobar (próxima ao pulmão) reduz os efeitos deletérios, provavelmente, devido ao melhor suprimento sangüíneo colateral pulmonar. Em contraste, a anastomose longa simples (próxima à carena) causa um maior grau de necrose.

No presente estudo, realizamos uma anastomose longa simples e os resultados mostraram um prejuízo importante do transporte mucociliar nos brônquios operados no 30º dia após a cirurgia, corroborando os dados obtidos por Rivero et al. (2001).

Porém, algo diverso foi observado no grupo sacrificado no 90º dia após a secção, pois a diminuição do transporte mucociliar apresentada não foi tão intensa quanto no grupo anterior.

Este prejuízo agudo (30 dias) seguido de uma recuperação tardia (90 dias) do transporte mucociliar, em ratos tratados com solução salina, pode indicar uma certa capacidade de regeneração do epitélio ciliado brônquico.

Brody et al. (1972) observaram que, já na primeira semana após a cirurgia, o transporte mucociliar retorna a valores normais em cães submetidos ao transplante pulmonar, permanecendo assim, mesmo em estudos superiores a 26 semanas.

Entretanto, um outro estudo mostrou que o transporte mucociliar esteve prejudicado na maioria dos pulmões transplantados por períodos superiores a vários meses após a cirurgia (Edmunds et al., 1969).

Nossos resultados são similares aos obtidos por Marelli et al. (1991), os quais relataram que há uma recuperação da função mucociliar 12 semanas após o transplante pulmonar, e que esta pode ser atribuída à revascularização local.

Um segundo importante fator, além da lesão física, que aumenta o risco de infecção pulmonar no período pós-operatório imediato é o uso de agentes imunossupressores para evitar a rejeição ao enxerto.

A ciclosporina A foi escolhida para ser testada neste estudo devido ao seu largo uso em pacientes receptores de órgãos (Kahan et al., 1995; Ruhlmann e Nordheim, 1997; Vaden, 1997).

O estudo da CsA, quanto à sua estrutura, via de administração, efeitos imunossupressores e tóxicos, bem como sua administração em associação com outras drogas imunossupressoras, é ainda objeto de pesquisa (Corsi, 1998).

As vias de administração da CsA, mais freqüentemente utilizadas em transplantes humanos, são a peroral e a endovenosa. Em

estudos experimentais em ratos, opta-se geralmente pela utilização das vias intramuscular e subcutânea.

Quanto à dosagem, procura-se utilizar aquela que previne a rejeição do transplante e apresenta baixo efeito colateral. A dose de CsA administrada é variável conforme o tipo de transplante, assim como entre os transplantados, os quais apresentam diferentes respostas ao processo de rejeição (Corsi et al., 1995).

Neste estudo, a CsA foi administrada diariamente, por via subcutânea, na dose de 10 mg/Kg de peso corporal. Optamos por este regime terapêutico, baseados nos trabalhos de Wassef et al. (1985) e Delaere et al. (1995), além dos estudos já citados, os quais mostraram que esta dose suprime efetivamente a resposta imune após o transplante, é bem tolerada pelo rato e mantém uma concentração sérica constante.

Importante para a nossa decisão também foi o trabalho de Spolidorio (1991), o qual usou o teste cutâneo de hipersensibilidade tardia provocado pelo DNCB (2,4dinitroclorobenzeno), para a avaliação da resposta imunológica de ratos imunossuprimidos pela ciclosporina. O teste foi realizado de acordo com Vadas et al. (1975) e Corsini et al. (1979). Os resultados obtidos mostraram baixos índices de positividade às reações cutâneas no teste ao DNCB em ratos tratados com ciclosporina.

A dosagem realizada nas amostras de sangue coletadas dos animais imunossuprimidos com a CsA revelou valores muito similares aos achados nos trabalhos experimentais já realizados, onde se procurou estabelecer a disposição cinética dessa droga (Corsi et al., 1995).

Julgamos relevante citar, neste ponto, que, apesar de todos os cuidados por nós observados no estabelecimento do protocolo ideal para esse estudo, não pudemos evitar os efeitos colaterais próprios da droga em questão, como já mencionados anteriormente.

Foi assim que, no início dos experimentos, observamos um importante índice de morbidade e mortalidade dos animais imunossuprimidos, nos primeiros dias após o procedimento operatório, quando comparados aos tratados com solução salina. Mesmo entre estes últimos, observamos uma certa morbidade, sendo que demoravam três dias, em média, para apresentarem sinais de retomada do padrão normal de atividades. Já nos animais imunossuprimidos, esse período era, em média, de oito dias.

Essa observação levou-nos a reformular o desenho experimental que havia sido traçado inicialmente. Assim, eliminamos os grupos em que os animais seriam sacrificados 1, 2 ou 7 dias após a cirurgia, com o intuito de evitar a possível interferência da morbidade nas medidas realizadas, decorrente tanto do procedimento cirúrgico

quanto dos efeitos colaterais resultantes da terapia com ciclosporina A, como falta de apetite, hipertricose e tremor das extremidades, entre outros.

Quanto aos resultados obtidos na medida da velocidade de transporte mucociliar, da frequência de batimento ciliar e da transportabilidade das amostras de muco em palato de rã, nos animais submetidos à imunossupressão pela ciclosporina A, observamos que, de forma geral, esses componentes do sistema mucociliar foram significativamente prejudicados.

Além disso, notamos a interferência da ciclosporina sobre o grupo TrCsA90, o qual não apresentou uma recuperação significativa do sistema mucociliar do brônquio operado quando comparado ao grupo TrCsA30. Lembrando que no grupo TrSal90, tratado com solução salina, verificamos a recuperação do sistema em comparação com o grupo TrSal30.

Não fazia parte de nossos objetivos, neste estudo, investigar o local exato, bem como o mecanismo, de ação da CsA no nível molecular; porém, podemos fazer algumas inferências sobre o que vários autores já relataram.

Embora os eventos moleculares não estejam bem definidos, evidências indicam que a CsA bloqueie um estágio inicial da ativação

dos linfócitos (King et al., 1997; Ceyhan et al., 1998), além de inibir a produção de interleucina-2 e outras linfocinas (Winter et al., 1995; Wada et al., 1998).

Uma teoria sobre o mecanismo de ação da CsA trata de sua influência sobre o cálcio citoplasmático, o qual é essencial para uma função celular normal (Ruhlmann e Nordheim, 1997; Mihatsch et al., 1998).

Alguns autores relatam ainda que há uma relação direta entre a citotoxicidade induzida pela CsA e mudanças nas atividades de enzimas mitocondriais (Simon et al., 2001; Sovcikova et al., 2002).

A CsA poderia também se associar a receptores nucleares para inibir a transcrição genética de proteínas secretadas por fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e monócitos (Khanna et al., 1994).

Baseados nesses dados, podemos supor a influência da CsA sobre a atividade das células do epitélio respiratório, prejudicando tanto o mecanismo de batimento ciliar quanto a produção e composição do muco, já que, neste estudo, a velocidade de transporte mucociliar medida nos brônquios principal esquerdo foi significativamente diminuída após o tratamento com CsA por 30 ou 90 dias.

Por fim, julgamos importante fazer algumas considerações sobre o papel da secreção brônquica no transporte mucociliar.



O muco respiratório deve possuir algumas características que permitam sua interação com as células ciliadas, como uma espessura adequada da camada periciliar (fase sol) e um comportamento mecânico ideal.

Se a camada periciliar estiver muito alargada, os cílios não serão capazes de alcançar a fase gel - sobre a qual ficam aderidas as partículas inaladas, não podendo, desta forma, empurrá-la adiante, ao longo da árvore respiratória.

Por outro lado, se a camada periciliar for muito fina, os cílios ficarão permanentemente em contato com a fase gel, tornando bastante difícil o movimento de recuperação dos mesmos (Widdicombe e Widdicombe, 1995).

Em ambas as situações, haverá um prejuízo no transporte mucociliar, ocasionando uma estagnação do muco respiratório, característica de várias doenças das vias aéreas (Macchione et al., 1995), dado que os microorganismos patogênicos aí presentes terão mais tempo para atingirem as células-alvo.

A composição da fase sol é controlada por um complexo mecanismo de absorção e secreção de líquidos através de vários canais iônicos da membrana apical das células epiteliais. Além disso, os canais

iônicos provavelmente regulam o grau de hidratação da fase gel, modulando suas propriedades reológicas (Verdugo, 1990).

O muco respiratório deve ter ainda propriedades físicas ideais (viscosidade e elasticidade) para permitir a penetração dos cílios e para receber sua energia transmitida, promovendo, assim, o transporte do muco através do epitélio (Lopez-Vidriero, 1987).

Para avaliar a transportabilidade das amostras de muco, utilizamos um modelo in vitro de palato de rã depletado de muco. Este modelo é bastante útil devido ao fato de o palato da rã-touro ser revestido com um epitélio pseudoestratificado semelhante ao encontrado nas vias aéreas do ser humano (Puchelle et al., 1988). Em adição, Rubin et al. (1990) sugeriram que o muco da rã-touro tem propriedades viscoelásticas similares às do muco respiratório normal de mamíferos.

Nossos resultados mostraram uma diferença significativa entre as amostras coletadas dos grupos tratados com CsA e dos tratados com salina, e também entre as dos brônquios operados e dos que não o foram. Esses dados suportam a hipótese da influência direta ou indireta tanto da terapia com CsA quanto da secção brônquica sobre a estrutura do muco respiratório, resultando num prejuízo da transportabilidade pelo epitélio ciliado do palato de rã.

## **7. CONCLUSÕES**

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitiram concluir que:

1. A secção brônquica causou a diminuição na frequência de batimento dos cílios e alterou as propriedades viscoelásticas do muco, o que resultou numa diminuição da velocidade do transporte mucociliar brônquico.
2. A imunossupressão pela ciclosporina A também ocasionou a diminuição da velocidade de transporte mucociliar, como resultado de uma diminuição da frequência de batimento ciliar e da transportabilidade do muco.
3. Houve um efeito sinérgico entre a secção brônquica e a terapia com ciclosporina A sobre a frequência de batimento ciliar nos dois tempos estudados, bem como sobre a velocidade de transporte mucociliar *in situ* após 90 dias de tratamento.



## **8.**

# **ANEXOS**

**Tabela 1.** Valores individuais da concentração de ciclosporina A (CsA) no sangue total.

Animal	Concentração de CsA no sangue (ng/ml)
1ShCsA30	428,96
2ShCsA30	699,58
3ShCsA30	1005,52
4ShCsA30	1223,58
5ShCsA30	1309,46
6ShCsA30	1424,60
7ShCsA30	1623,52
8ShCsA30	2257,36
1ShCsA90	720,92
2ShCsA90	984,98
3ShCsA90	1157,08
4ShCsA90	1260,70
5ShCsA90	1370,76
6ShCsA90	1506,70
7ShCsA90	1642,24
8ShCsA90	2010,16
1TrCsA30	554,30
2TrCsA30	635,96
3TrCsA30	1007,84
4TrCsA30	1205,06
5TrCsA30	1421,12
6TrCsA30	1525,58
7TrCsA30	1805,84
8TrCsA30	2451,16
1TrCsA90	506,10
2TrCsA90	723,74
3TrCsA90	1131,60
4TrCsA90	1421,60
5TrCsA90	1495,00
6TrCsA90	1683,66
7TrCsA90	1973,68
8TrCsA90	2804,34

**Tabela 2.** Valores médios da concentração de ciclosporina A (CsA) no sangue total por grupo.

Grupo	Concentração sangüínea de CsA (média $\pm$ DP; ng/ml)
ShCsA30	1246,57 $\pm$ 563,88
ShCsA90	1331,69 $\pm$ 399,59
TrCsA30	1325,86 $\pm$ 624,80
TrCsA90	1467,47 $\pm$ 725,38



**Tabela 3.** Valores individuais de frequência de batimento ciliar (FBC) do brônquio esquerdo (Hertz).

Animal	FBC	Animal	FBC	Animal	FBC
1Intacto	8,49	1ShCsA30	6,81	1TrSal90	7,84
2Intacto	9,60	2ShCsA30	7,64	2TrSal90	7,68
3Intacto	9,15	3ShCsA30	7,13	3TrSal90	7,27
4Intacto	7,85	4ShCsA30	4,97	4TrSal90	6,77
5Intacto	8,84	5ShCsA30	4,55	5TrSal90	7,17
6Intacto	8,06	6ShCsA30	6,73	6TrSal90	6,55
7Intacto	7,67	7ShCsA30	7,25	7TrSal90	6,67
8Intacto	7,53	8ShCsA30	6,86	8TrSal90	7,22
1ShSal30	8,15	1TrCsA30	4,39	1ShCsA90	5,35
2ShSal30	8,23	2TrCsA30	4,05	2ShCsA90	6,53
3ShSal30	7,92	3TrCsA30	3,98	3ShCsA90	7,13
4ShSal30	9,34	4TrCsA30	4,76	4ShCsA90	6,93
5ShSal30	8,74	5TrCsA30	3,40	5ShCsA90	5,04
6ShSal30	8,47	6TrCsA30	4,22	6ShCsA90	6,72
7ShSal30	8,86	7TrCsA30	3,86	7ShCsA90	7,05
8ShSal30	7,07	8TrCsA30	5,91	8ShCsA90	3,83
1TrSal30	4,72	1ShSal90	9,46	1TrCsA90	4,84
2TrSal30	5,98	2ShSal90	9,05	2TrCsA90	4,75
3TrSal30	4,37	3ShSal90	10,45	3TrCsA90	5,31
4TrSal30	6,22	4ShSal90	8,51	4TrCsA90	4,04
5TrSal30	5,62	5ShSal90	10,14	5TrCsA90	5,52
6TrSal30	5,16	6ShSal90	7,52	6TrCsA90	5,03
7TrSal30	6,03	7ShSal90	8,97	7TrCsA90	6,21
8TrSal30	4,54	8ShSal90	7,75	8TrCsA90	5,15

**Tabela 4.** Valores médios da Frequência de Batimento Ciliar (FBC) por grupo.

Grupo	FBC
	(média±DP; Hertz)
Intacto	8,40 ± 0,75
ShSal30	8,35 ± 0,68
TrSal30	5,33 ± 0,73
ShCsA30	6,49 ± 1,11
TrCsA30	4,32 ± 0,75
ShSal90	8,98 ± 1,04
TrSal90	7,15 ± 0,47
ShCsA90	6,07 ± 1,20
TrCsA90	5,11 ± 0,63

**Tabela 5.** Valores individuais da Transportabilidade do Muco *in vitro* (TM; rato/rã).

Animal	TM	Animal	TM	Animal	TM
1Intacto	1,06	1ShCsA30	0,66	1TrSal90	0,66
2Intacto	0,98	2ShCsA30	0,48	2TrSal90	1,03
3Intacto	1,05	3ShCsA30	0,45	3TrSal90	0,76
4Intacto	1,06	4ShCsA30	0,62	4TrSal90	0,72
5Intacto	1,05	5ShCsA30	0,78	5TrSal90	0,65
6Intacto	0,81	6ShCsA30	0,64	6TrSal90	0,64
7Intacto	0,87	7ShCsA30	0,52	7TrSal90	0,59
8Intacto	0,96	8ShCsA30	1,04	8TrSal90	0,55
1ShSal30	0,63	1TrCsA30	0,62	1ShCsA90	0,76
2ShSal30	1,15	2TrCsA30	0,78	2ShCsA90	0,71
3ShSal30	0,94	3TrCsA30	0,41	3ShCsA90	0,68
4ShSal30	0,90	4TrCsA30	0,79	4ShCsA90	0,80
5ShSal30	1,02	5TrCsA30	0,62	5ShCsA90	0,86
6ShSal30	1,13	6TrCsA30	0,73	6ShCsA90	0,59
7ShSal30	0,82	7TrCsA30	0,74	7ShCsA90	0,57
8ShSal30	1,00	8TrCsA30	0,57	8ShCsA90	0,77
1TrSal30	0,97	1ShSal90	0,86	1TrCsA90	0,68
2TrSal30	0,76	2ShSal90	0,91	2TrCsA90	0,41
3TrSal30	1,08	3ShSal90	0,86	3TrCsA90	0,71
4TrSal30	0,79	4ShSal90	0,80	4TrCsA90	0,64
5TrSal30	0,65	5ShSal90	0,90	5TrCsA90	0,57
6TrSal30	0,60	6ShSal90	0,76	6TrCsA90	0,75
7TrSal30	0,88	7ShSal90	0,96	7TrCsA90	0,49
8TrSal30	0,74	8ShSal90	0,82	8TrCsA90	0,57

**Tabela 6.** Valores médios da Transportabilidade do Muco *in vitro* (TM) por grupo.

Grupo	TM
	(média $\pm$ DP; rato/rã)
Intacto	0,98 $\pm$ 0,10
ShSal30	0,95 $\pm$ 0,17
TrSal30	0,81 $\pm$ 0,16
ShCsA30	0,65 $\pm$ 0,19
TrCsA30	0,66 $\pm$ 0,13
ShSal90	0,86 $\pm$ 0,06
TrSal90	0,70 $\pm$ 0,15
ShCsA90	0,72 $\pm$ 0,10
TrCsA90	0,60 $\pm$ 0,11

**Tabela 7.** Valores individuais da Velocidade de Transporte Mucociliar *in situ* (VTM) do brônquio esquerdo (mm/min).

Animal	VTM	Animal	VTM	Animal	VTM
1Intacto	0,34	1ShCsA30	0,24	1TrSal90	0,28
2Intacto	0,49	2ShCsA30	0,32	2TrSal90	0,31
3Intacto	0,26	3ShCsA30	0,29	3TrSal90	0,28
4Intacto	0,33	4ShCsA30	0,16	4TrSal90	0,22
5Intacto	0,37	5ShCsA30	0,21	5TrSal90	0,29
6Intacto	0,35	6ShCsA30	0,26	6TrSal90	0,23
7Intacto	0,39	7ShCsA30	0,34	7TrSal90	0,21
8Intacto	0,32	8ShCsA30	0,31	8TrSal90	0,29
1ShSal30	0,35	1TrCsA30	0,08	1ShCsA90	0,20
2ShSal30	0,38	2TrCsA30	0,08	2ShCsA90	0,26
3ShSal30	0,40	3TrCsA30	0,06	3ShCsA90	0,34
4ShSal30	0,44	4TrCsA30	0,09	4ShCsA90	0,31
5ShSal30	0,39	5TrCsA30	0,04	5ShCsA90	0,20
6ShSal30	0,36	6TrCsA30	0,07	6ShCsA90	0,28
7ShSal30	0,41	7TrCsA30	0,05	7ShCsA90	0,27
8ShSal30	0,26	8TrCsA30	0,12	8ShCsA90	0,20
1TrSal30	0,10	1ShSal90	0,40	1TrCsA90	0,13
2TrSal30	0,08	2ShSal90	0,37	2TrCsA90	0,12
3TrSal30	0,13	3ShSal90	0,48	3TrCsA90	0,11
4TrSal30	0,07	4ShSal90	0,34	4TrCsA90	0,08
5TrSal30	0,13	5ShSal90	0,43	5TrCsA90	0,12
6TrSal30	0,09	6ShSal90	0,28	6TrCsA90	0,13
7TrSal30	0,05	7ShSal90	0,35	7TrCsA90	0,19
8TrSal30	0,11	8ShSal90	0,29	8TrCsA90	0,10

**Tabela 8.** Valores médios da Velocidade de Transporte Mucociliar *in situ* (VTM) por grupo.

Grupo	VTM
	(média±DP; mm/min)
Intacto	0,36 ± 0,07
ShSal30	0,37 ± 0,05
TrSal30	0,10 ± 0,03
ShCsA30	0,27 ± 0,06
TrCsA30	0,07 ± 0,03
ShSal90	0,37 ± 0,07
TrSal90	0,26 ± 0,04
ShCsA90	0,26 ± 0,05
TrCsA90	0,12 ± 0,03

## **9. REFERÊNCIAS**

## 9. REFERÊNCIAS

Aeba R, Keenan RJ, Hardesty RL, Yousem SA, Hamamoto I, Griffith BP. University of Wisconsin solution for pulmonary preservation in a rat transplant model. *Ann Thorac Surg*. 1992;53:240-6.

Aeba R, Stout JE, Francalancia NA, Keenan RJ, Duncan AJ, Yousem SA, Buckart GJ, Yu VL, Griffith BP. Aspects of lung transplantation that contribute to increased severity of pneumonia. An experimental study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1993;106:449-57.

Atkinson K, Boland J, Bitton K, Biggs J. Blood and tissue distribution of cyclosporine in humans and mice. *Transplant Proc*. 1983;15:2430-6.

Benfield JR, Wain JC. The history of lung transplantation. *Chest Surg Clin N Am*. 2000;10:189-99.

Bennett WM, Norman DJ. Action and toxicity of cyclosporine. *Ann Ver Med*. 1986;37:215-24.



Bjorkander J, Bake B, Oxelius VA, Hanson LA. Impaired lung function in patients with IgA deficiency and low levels of IgG<sub>2</sub> or IgG<sub>3</sub>. *N Engl J Med*. 1985;313:720-4.

Borel JF, Feurer C, Gubler HV. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Action*. 1976;6:468-75. [Abstract, PubMed ID 8969].

Borel JF, Feurer C, Magnée C, Stähelin H. Effects of the new antilymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology*. 1977;32:1117-25. [Abstract, PubMed ID 328380].

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

Brooks RG, Hofflin JM, Jamieson SW, Stinson EB, Remington JS. Infectious complications in heart-lung transplant recipients. *Am J Med*. 1985;79:412-22.

Bueding E, Hawkins J, Cha YN. Antischistosomal effects of cyclosporin A. *Agents Actions*. 1981;11(4):380-3.

Buonpane E. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine (CSA). *Conn Med*. 1990;54(1):17-9.

Burckhardt JJ, Guggenheim B. Cyclosporin A 'in vivo' and 'in vitro' suppression of rat lymphocyte function. *Immunology*. 1979;36:753.

Calabresi P, Parks RE. Agentes antiproliferativos e drogas usadas na imunossupressão. In: Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 7a ed. Rio de Janeiro: Koogan; 1987. p.817-56.

Calhoon JH, Nichols L, Davis R. Single lung transplantation: factors in postoperative cytomegalovirus infection. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1992;103:21-6.

Ceyhan BB, Sungur M, Celikel CA, Celikel T. Effect of inhaled cyclosporin on the rat airway: histologic and bronchoalveolar lavage assessment. *Respiration*. 1988;65(1):71-8.

Chhajed PN, Tamm M, Malouf MA, Glanville AR. Lung transplantation: management and complications. *Indian J Chest Dis Allied Sci.* 2002;44(1):31-43. [Abstract, PubMed ID 11845931].

Citterio F, Kahan BD. The inhibitory effect of cyclosporine on the nuclear proliferative response to a variety of T cell activators. *Transplantation.* 1989;47:334-8.

Cockburn IT, Krupp P. The risk of neoplasms in patients treated with cyclosporine A. *J Autoimmun.* 1989;2(5):723-31.

Colombani PM, Robb A, Hess AD. Cyclosporin A binding to calmodulin: a possible site of action on T lymphocytes. *Science.* 1985;228:337-9.

Cooper JD. Current status of lung transplantation. *Transplant Proc.* 1991;23:21-14.

Corsi RCC, Silva ABD, Santos JC, Santos SRCJ, Gemperli R, Ferreira MC. Disposição cinética da ciclosporina A após administração de dose

única subcutânea; estudo experimental em ratos. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo*. 1995;50(Supl):30-4.

Corsi RCC. *Efeitos do uso prolongado da ciclosporina A sobre a cicatrização da pele: aspectos clínicos e histológicos: estudo experimental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1998.

Corsini AC, Bellucci SB, Costa MG. A simple method of evaluating delayed type hypersensitivity in mice. *J Immunol Methods*. 1979;30(2):195-200.

Crawford SW. Respiratory infections following organ transplantation. *Curr Opin Pulm Med*. 1995;1(3):209-15. [Abstract, PubMed ID 9363055].

Culp DJ, Latchney LR, Frampton MW, Jahnke MR, Morrow PE, Utell MJ. Composition of human airway mucins and effects after inhalation of acid aerosol. *Am J Physiol*. 1995;269:L358-70.

Dalton ML. The first lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1995;60(5):1437-8.

Delaere PR, Liu ZY, Hermans R, Sciort R, Fenster L. Experimental tracheal allograft revascularization and transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;110(3):728-37.

Dieperink H, Kemp E, Leyssac PP, Starklint H. Cyclosporine A: effectiveness and toxicity in a rat model. *Clin Nephrol.* 1986;25:46-50.

Ducobu J. Metabolic modifications related to immunosuppressive drugs. *Rev Med Brux.* 2002;23(3):56-9. [Abstract, PubMed ID 12143154].

Dummer JS, Montero CG, Griffith BP, Hardesty RL, Paradis IL, Hom DS. Infections in heart lung transplant recipients. *Transplantation.* 1986;41:725-9.

Edmunds LH, Stallone RJ, Graft PD, Sagel SS, Greenspan RH.. Mucus transport in transplanted lungs of dogs. *Surgery.* 1969;66:15-21.

Festa E. *Efeito do amiloride na velocidade de transporte mucociliar e na diferença de potencial transepitelial no palato isolado de rã* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1993.

Flechner SM. Cyclosporine: a new and promising immunosuppressive agent. *Urol Clin North Am.* 1983;10(2):263-75. [Abstract, PubMed ID 6304967].

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

Gatto LA. Cholinergic and adrenergic stimulation of mucociliary transport in the rat trachea. *Respir Physiol.* 1993;92(2):209-217.

Grover GJ, Murray HN. Reperfusion Injury: Significance and Prospects for Treatment. *J Thromb Thrombolysis* [Internet] 1997 Jan;4(1):103-4. Disponível em: <http://www.springerlink.com/media/l2t6dgrxvgcyp9jmet8l/contributions/k/6/0/5/k6058qug63802kk1.pdf>

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

Handman G, Neto RSA. Mecanismos de defesa pulmonar. *J Pneumol.* 1987;13(3):1-6.

Harding MW, Handschumacher RE, Speicher DW. Isolation and amino acid sequence of Cyclosporin. *J Biol Chem.* 1986;261:8547-55.

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

Helin HJ, Edginton TS. Cyclosporin-A regulates monocyte macrophage effector functions by affecting instructor T-cells: Inhibition of monocyte procoagulant response to allogeneic stimulation. *J Immunol.* 1984;132:1074.

Herve P, Silbert D, Cerrina J, Simonneau G, Darteville P. Impairment of bronchial mucociliary clearance in long-term survivors of heart/lung and double-lung transplantation. *Chest*. 1993;103:59-63.

Hess AD, Esa AH, Colombani PM. Mechanisms of action of cyclosporine: effects on cells of the immune system and on subcellular events in T cell activation. *Transplantation Proceedings*. 1988;2:30-40.

Heusler K, Pletscher A. The controversial early history of cyclosporin. *Swiss Med Wkly*. 2001;131(21-22):299-302.

Holt DW, Pitty MC. Sandimmun, guia prático II – Ciclosporina e monitoramento. Suíça: Sandoz; 1989.

Hom DS, Pasculle AW. Infection in the transplant recipient. In: Makowka, L., ed. *The handbook of transplantation management*. Austin: R.G. Co; 1991, p.448-516.

Hosenpud JD, Novick RJ, Breen TJ, Daily OP. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Eleventh Official Report. *J Heart Lung Transplant*. 1994;13:561-70.



Hoyer J. Transplantation pneumonology. *Munch Med Wochenschr.* 1978;120(6):167-70.

Hoyos AL, Patterson GA, Maurer JR, Ramirez JC, Miller JD, Winton TL. Pulmonary Transplant. Early and late results. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992;103:295-306.

Junqueira LC, Carneiro J. A célula. Em: Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1985. p.29-57.

Kahan BD, Van Buren CT, Nierberger W. Cyclosporine: pharmacokinetics, metabolism and drug interactions. *Transplant Proc.* 1983;15:2409-12.

Kahan BD, Oates JA, Wood AJJ. Cyclosporine in drug therapy. *N Engl J Med.* 1989;321:1725-8.

Kahan BD, Welsh M, Rutzky LP. Challenges in cyclosporine therapy: the role of therapeutic monitoring by area under the curve monitoring. *Ther Drug Monit.* 1995;17(6):621-4.

Kaiser LR, Cooper JD, Trulock EP, Pasque MK, Triantafillou A, Haydock D. The evolution of single lung transplantation for emphysema. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991;102(3):333-41.

Kaito K, Masuoka H, Kobayashi M, Nishiwaki K, Shimada T, Yoshida M, Ochiai S, Katayama T, Sakai O. Cyclosporin for pure red cell aplasia caused rapid improvement of anemia and increase of CD4/8 ratio. *Rinsho Ketsueki.* 1993;34(2):159-64.

Kaliner M, Shelhamer JH, Borson B, Nadel J, Patow C, Marom Z. Human respiratory mucus. *Am Rev Respir Dis.* 1986;134(3):612-21.

Kano K, Kyo K, Yamada Y, Ito S, Ando T, Arisaka O. Comparison between pre- and posttreatment clinical and renal biopsies in children receiving low dose ciclosporine-A for 2 years for steroid-dependent nephrotic syndrome. *Clin Nephrol.* 1999;52(1):19-24.

Khanna A, Li B, Stenzel KH, Suthanthiran M. Regulation of new DNA synthesis in mammalian cells by cyclosporine. Demonstration of a transforming growth factor beta-dependent mechanism of inhibition of cell growth. *Transplantation*. 1994;57 (4):577-82.

King M, Macklem PT. Rheological properties of microliter quantities of normal mucus. *J Appl Physiol*. 1977;42:797-802.

King MB, Jessurun J, Savik SK, Murray JJ, Hertz MI. Cyclosporine reduces development of obliterative bronchiolitis in a murine heterotopic airway model. *Transplantation*. 1997;63(4):528-32.

Kirby TJ, Mehta A. Lung transplantation: state of the art. *Appl Cardiopulm Pathophysiol*. 1992;4(4):263-71.

Komzakova I, Safarcik K, Brozmanova H, Grundmann M. Therapeutic monitoring of cyclosporine A. *Ceska Slov Farm*. 2002;51(4):159-67.

Kondo CS. *Os efeitos do furosemide endovenoso sobre as propriedades físicas e transportabilidade do muco respiratório em pacientes*

*intubados sob ventilação mecânica* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1997.

Konietzko N. Mucus transport and inflammation. *Eur J Respir Dis Suppl.* 1986;147:72-9.

Kreft B, Marre R, Schulz E, Sack K. Experimental studies of the nephroprotective effect of fosfomycin. *Wien Med Wochenschr.* 1987;137(4):83-8.

Lansman SL, Ergin MA, Griepp RB. The history of heart and heart-lung transplantation. *Cardiovasc Clin.* 1990;20(2):3-19.

Laupacis A, Keown DA, Ulan RA, Sinclair NR, Stiller CR. Hyperbilirubinaemia and cyclosporin-A levels. *Lancet.* 1981;2:1426-7.

Lee S. Historical significance on rat organ transplantation. *Microsurgery.* 1990;11:115-21.

Legal YM, Chittal SM, Wright ES. Peritracheal membranous adipose tissue for early revascularization of the bronchial anastomosis. *Can J Surg*. 1987;30(5):333-7.

Legrue SJ, Turner R, Weisbrodt N, Dedman JR. Does the binding of cyclosporine to calmodulin result in immunosuppression? *Science*. 1986;234:68-71.

Lemaire M, Jillemont JP. Role of lipoproteins and erythrocytes in the in vitro binding and distribution of Cyclosporin A in the blood. *J Pharm Pharmacol*. 1982;34:715-7.

Leoni C, Garcia RC, Allison AC. Effects of cyclosporin A on human lymphocytes in culture. *J Clin Lab Immunol*. 1978;1:67.

Lillehoj HE, Malek TR, Shevak EM. Differential effect of cyclosporin A on the expression of T and B lymphocyte activation antigens. *J Immunol*. 1984;133:244.

Linder J. Infection as a complication of heart transplantation. *J Heart Transplant*. 1988;7(5):390-4.

Loffreda A, Contaldi C, Santis DD, Marabese I, Chiaiese C, Formato P, Motola G, Russo F, D'Alessio O, Lampa E, Rossi F. Problems associated with the use and monitoring of cyclosporin. Experience at a Clinical Pharmacology Service. *Minerva Med.* 1997;88(12):543-9.

Lopez-Vidriero MT. Biochemical basis of physical properties of respiratory tract secretions. *Eur J Respir Dis Suppl.* 1987;153:130-5.

Lorenzi-Filho G. *Efeitos da nebulização de solução salina e n-acetilcisteína sobre o muco respiratório de ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1993.

Lorenzi-Filho G, Saldiva PHN. Aspectos funcionais do aparelho mucociliar. Em: Tavares P. *Atualizações em Fisiologia: Respiração*. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica; 1991. p.89-99.

Lorenzi-Filho G, Böhm GM, Guimarães ET, Costa-Vaz MA, King M, Saldiva PHN. Correlation between rheological properties and *in vitro* ciliary transport of rat nasal mucus. *Biorheology.* 1992;29:433-40.

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

Macchione M, Lorenzi-Filho G, Guimarães ET, Junqueira VB, Saldiva PHN. The use of the frog palate preparation to assess the effects of oxidants on ciliated epithelium. *Free Radic Biol Med.* 1998;24:714-21.

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

Mauer G. Metabolism of cyclosporine. *Transplant Proc.* 1985;17:19-26.

Mendeloff EN. The history of pediatric heart and lung transplantation. *Pediatr Transplantation.* 2002;6:270-9.

Meyers BF, Patterson GA. Lung transplantation: current status and future prospects. *World J Surg.* 1999;23(11):1156-62.

Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickleit V, Ryffel B. The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol.* 1998;49 (6):356-63.

Milpied B. La Cyclosporine in Dermatologie. *Ann Dermatol Venerol.* 1988;115:391-7.

Miraz W, Zink RA, Graf A. Distribution and transfer of Cyclosporine among the various human lipoprotein classes. *Transplant Proc.* 1983; 15:2426-31.

Nussenblatt RB, Palestine AG. Cyclosporine: immunology, pharmacology and therapeutic uses. *Surv Ophthalmol.* 1986;31:159-69.

Orij G, Schanz N. Nitric oxide in CsA-induced hypertension: role of beta-adrenoceptor antagonist and thromboxane A<sub>2</sub>. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2001;65(5-6):259-63.

Paul A, Marelli A, Shennib H, King M, Nai-San W, Wilson JAS, Mulder DS, Chiu RCJ. Mucociliary function in autotransplanted,



allografted and sleeve resected lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989;98:523-8.

Peatfield AC, Richardson PS. Evidence for non-cholinergic, non-adrenergic nervous control of mucus secretion into the cat trachea. *The Journal of Physiology.* 1983;342:1335-45.

Pedersen M, Morkassel E, Nielsen MH, Mygind N. Kartagener's Syndrome: Preliminary report on cilia structure, function, and upper airway symptoms. *Chest.* 1981;80(6):858-60.

Pinsker KL, Koerner SK, Kamholz SL, Hagstrom JW, Veith FJ. Effect of donor bronchial length on healing: a canine model to evaluate bronchial anastomotic problems in lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1979;77(5):669-73.

Puchelle E. Pathologic bronchial secretions and mucociliary transport. *Ann Anesthesiol Fr.* 1980;21(6):661-6.

Puchelle E, Tournier JM, Petit A, Zahm JM, Lauque D, Vidailhet M, Sadoul P. The frog for studying mucus transport velocity and mucociliary frequency. *Eur J Respir Dis.* 1983;128(Suppl):293-303.

Puchelle E, Zahm JM, Aug F. Methods of studying mucociliary function. *Presse Med.* 1988;17(10):479-84.

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

Report of the American Veterinary Medicine Association Panel on Euthanasia. *Journal of the American Veterinary Medicine Association.* 2001;218(5).

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

Rob, PM, Lebeau A, Nobiling R, Schmid H, Bley N, Dick K, Weigelt I, Rohwer J, Gobel Y, Sack K, Classen HG. Magnesium metabolism: basic

aspects and implications of ciclosporine toxicity in rats. *Nephron*. 1996;72(1):59-66.

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

Ruhlmann A, Nordheim A. Effects of the immunosuppressive drugs CsA and FK506 on intracellular signalling and gene regulation. *Immunobiology*. 1997;198(1-3):192-206.

Ryffel B, Foxwell BM, Mihatsch MJ, Donatsch P, Maurer G. Biologic significance of cyclosporine metabolites. *Transplant Proc*. 1988;20(2):575-80.

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

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

Santillan-Doherty P, Jasso R, Gaxiola M, Villalba-Caloca J. Protection of bronchial anastomosis with omental pedicle in unilateral lung transplant. *Rev Invest Clin*. 1989;41(2):117-22.

Satir P, Sleight MA. The physiology of cilia and mucociliary interactions. *Annu Rev Physiol*. 1990;52:137-55.

Serafini SM, Michaelson ED. Length and distribution of cilia in human and canine airways. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1977;13(4):551-9.

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

Shevach EM. The effects of cyclosporine A on the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1985;3:397-423.

Silberberg A. A model for mucus glycoprotein structure. Comparison with submaxillary mucins. *Biorheology*. 1988;25(5):799-801.

Silveira PSP, Böhm GM, Yang HM, Wlen CL, Guimarães ET, Parada MAC, King M, Saldiva PHN. Computer assisted rheological evaluation of microsamples of mucus. *Comp Meth Prog Biomed.* 1992;39:51-60.

Simon N, Morin C, Bruguerolle B, Tillement JP. Effects of trimetazidine on altered functions of rat kidney induced by ciclosporine. *Therapie.* 2001;56(5):583-7.

Smith J, Hows J, Gordon-Smith EC. *In vitro* stability and storage of cyclosporine in human serum and plasma. *Transplant Proc.* 1983;15:2422-6.

Snell GI, Ward C, Wilson JW, Orsida B, Williams TJ, Walters EH. Immunopathological changes in the airways of stable lung transplant recipients. *Thorax.* 1997;52(4):322-8.

Sovcikova A, Tulinska J, Kubova J, Liskova A, Syrova D, Horakova K. Effect of cyclosporin A in Lewis rats in vivo and HeLa cells in vitro. *J Appl Toxicol.* 2002;22(3):153-160.

Speich R, van der Bij W. Epidemiology and management of infections after lung transplantation. *Clin Infect Dis*. 2001;33(1):S58-65.

Spolidorio LC. *Efeito da ciclosporina sobre o processo de reparo em tecido cutâneo de rato* [dissertação]. São Paulo (Piracicaba): Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 1991.

Stewart KC, Patterson GA. Current trends in lung transplantation. *Am J Transplant*. 2001;1(3):204-10.

Stiller CR, Laupacis A, Keown PA, Gardell C, Dupre J, Thibert P, Wall W. Cyclosporine: action, pharmacokinetics, and effect in the BB rat model. *Metabolism*. 1983;32(7):69-72.

Tanoue LT. Lung transplantation. *Lung*. 2002;170(4):187-200.

Thommen-Scott K. Antimalarial activity of cyclosporin A. *Agents Actions*. 1981;11(6-7):770-3.

Tomkiewicz RP, Ernst M, Shennib H, Ramirez O, Nguyen D, King M. Airway mucus and epithelial function in a canine model of single lung autotransplantation. *Chest*. 1995;107:261-5.

Towpik E, Kupiec-Weglinski JW, Schneider TM, Tyler D, Padberg W, Araneda D, Tilney NL. Cyclosporine and experimental skin allografts. Indefinite survival and development of specific immunologic unresponsiveness. *Transplantation*. 1985;40(6):714-8.

Vadas MA, Miller JF, Gamble J, Whitelaw A. A radioisotopic method to measure delayed type hypersensitivity in the mouse. Studies in sensitized and normal mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1975;49(5):670-92. [Abstract, PubMed ID 51830].

Vaden SL. Cyclosporine and tacrolimus. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*. 1997;12(3):161-6. [Abstract, PubMed ID 9283240]

Veale D, Glasper PN, Gascoine A, Dark JH, Gibson GJ, Corris PA. Ciliary beat frequency in transplanted lungs. *Thorax*. 1993;48:629-31.

Verdugo P. Goblet cells secretion and mucogenesis. *Annu Rev Physiol.* 1990;52:157-76.

Xavier AM. *Influência da Ciclosporina A sobre o sistema mucociliar após transplante pulmonar em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

Wada K, Kaminuma O, Mori A, Nakata A, Ogawa K, Kikkawa H, Ikezawa K, Suko M, Okudaira H. IL-5 producing T cells that induce airway eosinophilia and hiperresponsiveness are suppresse by dexamethasone and cyclosporin A in mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998;117(1):24-7. [Abstract, PubMed ID 9758892].

Wanner A, Salathe M, O’Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(6):1868-902.

Ward S, Muller NL. Pulmonary complications following lung transplantation. *Clin Radiol.* 2000;55(5):332-9.



Wassef R, Cohen Z, Langer B. Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats. Influence of route of administration and dosage. *Transplantation*. 1985;40(5):489-93.

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

Widdicombe JH, Widdicombe JG. Regulation of human airway surface liquid. *Respir Physiol*. 1995;99:3-12.

Winter JB, Groen M, Petersen AH, Wildevuur CR, Prop J. Reduced antibody responses after immunization in rat lung transplants. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(3):664-8.

Winter JB, Groen M, Welling S, van der Logt K, Wildevuur CR, Prop J. Inadequate antibody response against respiratory viral infection in long-surviving rat lung allografts. *Transplantation*. 1995;59:1583-9.

Wong LB, Miller IF, Yeates DB. Nature of the mammalian ciliary metachronal wave. *J Appl Physiol*. 1993;75(1):458-67.

Wood AJ, Maurer G, Niederberger W, Beveridge T. Cyclosporine: pharmacokinetics, metabolism and drug interactions. *Transplant Proc.* 1983;15:2409-13.