Aristides Tadeu Correia

Efeitos do basiliximab com e sem a terapia tríplice na depuração mucociliar das vias aéreas de ratos: estudo experimental

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

Programa de: Cirurgia Torácica e Cardiovascular
Orientador: Dr. Rogerio Pazetti

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Correia, Aristides Tadeu
Efeitos do basiliximab com e sem a terapia tríplice na depuração mucociliar das vias aéreas de ratos : estudo experimental / Aristides Tadeu Correia. -- São Paulo, 2017.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientador: Rogerio Pazetti.

Descritores: 1.Transplante de pulmão 2.Imunossupressores 3.Depuração mucociliar 4.Muco 5.Células caliciformes 6.Mucina-5AC 7.Basiliximab. 8.Modelos animais 9.Ratos

USP/FM/DBD-039/17

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Anisio Correia (in memoriam) e Maria José Correia, seres humanos inspiradores e generosos, que me ensinaram tudo que eu precisava aprender para seguir o meu caminho e cumprir a minha missão na vida.

A minha amada esposa, Lúcia de Fátima Rodrigues Correia, que sempre esteve ao meu lado e que nunca mediu esforços para que eu pudesse completar mais essa jornada. Obrigado pelo amor, alegria e confiança.

Ao meu amado filho, Augusto Rodrigues Correia, que com sua curiosidade em querer saber de tudo, sempre estimula de maneira especial os meus pensamentos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, quero agradecer a Deus, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Ao Dr. Rogerio Pazetti, orientador desta tese e amigo, pela orientação, pelo incentivo, pela confiança depositada em mim e por sempre estar disponível para esclarecer dúvidas e oferecer sugestões.

Ao Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes, professor titular da disciplina de Cirurgia Torácica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter iniciado esta linha de pesquisa, sem isto nada disto teria sido possível, obrigado pela oportunidade de realizar um sonho.

Ao Prof. Dr. Fabio Biscegli Jatene, professor titular da disciplina de Cirurgia Cardiovascular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela contribuição no meu processo de aprendizado.

Aos acadêmicos Afonso Bento e Hugo Hirano, pela ajuda na administração das drogas imunossupressoras aos animais e na leitura das lâminas de muco, mas acima de tudo pela amizade construída no decorrer dessas atividades.

À Dra. Monique Matsuda, pela orientação, sugestões e imensa ajuda na realização das análises de biologia molecular, meu muito obrigado de coração.

À Dra. Mariangela Macchione, pelo apoio e sugestões, muito obrigado.

Às biólogas Maria Cecília e Elizabete S. dos Santos, pelo inestimável auxílio nas análises de biologia molecular e na leitura das lâminas de imuno-histoquímica.

À bióloga e amiga Francine, pela ajuda em todos os momentos, auxiliando em diversas fases deste trabalho.

Às amigas do laboratório LIM 61 Liliane, Natália, Karina e Tatiana, pela colaboração e disponibilidade constantes.

À colega do curso de Pós Graduação, Patrícia Nolasco, pela orientação e ajuda na análise de Dot Blot.

À Senhora Roseli Araújo, pelo apoio em distintos momentos, o meu muito obrigado!

Aos amigos Marcelo Zeviani, Sônia Souza e Regina Deladore, que em alguns finais de semana, me ajudaram na administração das drogas imunossupressoras aos animais.

Ao amigo Pedro Gabriel Martins Elias, funcionário do Laboratório de Oftalmologia – LIM 33, pela importante contribuição.

Às Senhoras Neusa R. Dini, Juliana L. Sobrinho, Monica Souto e Valdecira B. Ferreira, funcionárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Torácica e Cardiovascular, pela paciência e pelo carinho na orientação dos trâmites da Pós-Graduação.

À minha amiga de longa data, Marcia Cristina Augusto Cottet, pela amizade sincera, incentivo e ajuda em todos os momentos.

À amiga Rosangela Monteiro, pela amizade e por tudo que me ensinou durante o tempo que trabalhamos juntos no museu, muito obrigado.

Ao Dr. Rodolfo de Paula Vieira, professor do programa de pós-graduação da Universidade Nove de Julho, pelo apoio, sugestões ao trabalho e por ter aberto as portas do seu laboratório para que nós realizássemos a extração de proteína e a análise de Western Blotting das minhas amostras, meu muito obrigado.

À Dra. BreAnne MacKenzie, pela orientação e ajuda na extração de proteína e realização da técnica de Western Blotting das minha amostras. Muito obrigado.

À Alana dos Santos Dias, do Laboratório de Imunologia Pulmonar e do Exercício da Universidade Nove de Julho, pelo apoio.

À Dra. Vera Luiza Capelozzi, professora de patologia da Faculdade de Medicina da USP, pelas orientações e sugestões para a realização da leitura das lâminas de imuno-histoquímica.

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

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, e que, por ventura, eu tenha me esquecido de agradecer.

NORMATIZAÇÃO

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVO 6

3 REVISÃO DA LITERATURA 8

3.1 História do transplante de órgãos 9

3.2 História do transplante de pulmão 12

3.3 Os imunossupressores 16

3.3.1 Inibidores de calcineurina 16

3.3.1.1 Ciclosporina 17

3.3.1.2 Tacrolimo 19

3.3.2 Inibidores do ciclo celular 20

3.3.2.1 Azatioprina 20

3.3.2.2 Ácido micofenólico - Micofenolato 23

3.3.3 Glicocorticóides 24

3.3.4 Fármacos imunossupressores de indução 27

3.4 Epitélio das vias aéreas 29

3.4.1 Células ciliadas 30

3.4.2 Células caliciformes 31

3.4.3 Células serosas 31

3.4.4 Células basais 32

3.4.5 Células de Clara 32

3.4.6 Glândulas submucosas 33

3.4.7 Camada de muco gel 33

3.4.8 Regulação do gene MUC 35

4 MÉTODOS 37

4.1 Animais e grupos 38

4.2 Eutanásia dos animais e coleta de tecido pulmonar 40

4.3 Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA) 41

4.4 Coleta do muco 41

4.5 Determinação da FBC 42

4.6 Determinação da VTMC 44

4.7 Transportabilidade do muco *in vitro* 44

4.8 Análise morfométrica – muco ácido e neutro 47

4.9 Avaliação da expressão do gene Muc5ac 48

4.9.1 Extração do RNA total 48

4.9.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) 49

4.9.3 PCR em tempo real 50

4.10 Avaliação da concentração da proteína mucina do gene Muc5ac 51

4.10.1 Extração e quantificação da proteína total 51

4.10.2 Quantificação da proteína mucina do gene Muc5ac por Dot Blot 52

4.11 Avaliação de células apoptóticas por imuno-histoquímica 54

4.11.1 Preparao das lâminas para imuno-histoquímica 54

4.11.2 Quantificação de células positivas para Bcl-2 e Caspase 3 56

4.12 Análise estatística 57

4.12.1 Estatística descritiva 57

4.12.2 Estatística inferencial 57

5 RESULTADOS 58

5.1 Análise do lavado broncoalveolar (LBA) 59

5.2 Determinação da FBC 61

5.3 Determinação da VTMC 62

5.4 Transportabilidade do muco - *in vitro* 64

5.5 Análise morfométrica – muco ácido e neutro 67

5.6 Análise quantitativa da expressão do gene Muc5ac 71

5.7 Avaliação da concentração da proteína mucina do gene Muc5ac por Dot Blot 73

5.8 Quantificação de células marcadas com anticorpo anti-Bcl-2 75

5.9 Quantificação de células marcadas com anticorpo anti-Caspase 3 77

6 DISCUSSÃO 80

7 CONCLUSÃO 91

8 ANEXO 93

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 95

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

(em ordem alfabética)

6-MMP	6-Metilmercaptopurina
6-MP	6-Mercaptopurina
6-TGMP	6-Tioguanina nucleiotídeo
6-TU	6-Tioúrico
ABTO	Associação Brasilieira de Transplante de Órgãos
ANOVA	Análise de Variância
ARBP	Fosfoproteína ribossomal acídica P0 (do inglês: acidic ribosomal phosphoprotein P0
ATP	Adenosina trifosfato
CA	Câmara acrílica
CCD	Dispositivo de carga acoplada (do inglês: charge-coupled device)
CD25	Grupo de diferenciação 25 (do inglês: cluster of differentiation)
CF	Câmera filmadora
CFTR	Regulador de condutância transmembrana em fibrose cística
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
Ct	Ciclo limiar (do ingles: cicle threshold)
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DP	Desvio padrão
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EGF	Fator de crescimento tumoral (do inglês: epidermal growth factor)
EM	Esteriomicroscópio
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ES	Estroboscópio
FBC	Frequência de batimento ciliar
FMUSP	Faculade de Medicina da Universidade de São Paulo
Forbol	Acetato de tetradecanoiforbol
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
GCs	Glicocorticóides
HPRT	Hipoxantina guanina fosforibosil trasnferase
hTBEC	Human tracheobronchial epithelial cell
IL-13	Interleucina 13
IL-2	Interleucina 2
IL-2R	Receptor da interleucina 2
IL-2Rα	Subunidade alfa do receptor da interleucina-2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9

IMPDH	Inosina monofosfato de desidrogenase
IQ	Intervalo interquartil
ISHLT	International Society For Heart And Lung Transplantation
JNK	Jun N-terminal kinase
LBA	Lavado broncoalveolar
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês: mitogen-activated protein kinases)
metTIMP	Tioinosina monofosfato metilada
MF	Monitor de frequência
MFS	Micofenolato de sódio
MI	Monitor de imagem
MMF	Micofenolato de mofetila
MO	Microscópio óptico
MyD88	Fator 88 de diferenciação mieloide (do inglês: myeloid differentiation factor 88
NFAT	Nuclear factor of activated t cells
NFkB	Fator nuclear kappa b (do inglês: nuclear factor kappa b)
NU	Nebulizador ultrassônico
OR	Ocular reticulada
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio

PPAT	Amido fosforibosil transferase
RGC	Receptor de glicocorticóides
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
TCR	Receptor de célula t (do inglês; t cell receptor)
TIMP	Tioinosina monofosfato
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TPMT	Tiopurina metiltransferase
VTMC	Velocidade de transporte mucociliar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Comparações múltiplas entre os grupos tratados por 7 e 15 dias da VTMC 63

Tabela 2 Comparações múltiplas da velocidade relativa de transporte do muco no palato de rã dos animais tratados por 15 dias 66

Tabela 3 Comparações múltiplas do número de células da via aérea marcadas com anticorpo anti-Bcl-2 entre os grupos tratados por 7 e 15 dias 76

Tabela 4 Comparações múltiplas do número de células da via aérea marcadas com anticorpo anti-Caspase-3 entre os grupos tratados por 7 e 15 dias 78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismo de ativação do linfócito T e mecanismos de ação dos imunossupressores na inibição do linfócito T 17

Figura 2 Fórmula química da ciclosporina..... 18

Figura 3 Fórmula química da molécula de tacrolimo 20

Figura 4 Moléculas de Azatioprina e 6-mercaptopurina..... 22

Figura 5 Moléculas de ácido micofenólico, micofenolato mofetil e micofenolato de sódio. 24

Figura 6 Moléculas de prednisona e prednisolona 26

Figura 7 Esquema do anticorpo monoclonal quimerizado murino-humano do basiliximabe 28

Figura 8 Esquema do epitélio respiratório. 30

Figura 9 Esquema do sinal de transdução da rota que regula a transcrição do gene MUC. 36

Figura 10 Abertura do brônquio esquerdo para coleta do muco com pincel 42

Figura 11 Equipamentos utilizados para medida da frequência de batimento ciliar e da velocidade de transporte mucociliar "in situ"..... 43

Figura 12 Equipamentos utilizados para medida da transportabilidade das amostras de muco em palato de rã..... 46

Figura 13 Palato de rã sob a visão da objetiva reticulada..... 46

Figura 14 Corte histológico da via aérea de pulmão de rato corado com PAS e AB sob a visão da objetiva reticulada de pontos e retas (aumento de 400X)..... 47

Figura 15 Pontos de proteínas aderidos à membrana de nitrocelulose corados com ponceau..... 52

Figura 16 Equipamento de dot blot utilizado para transferência da proteína para a membrana de nitrocelulose..... 53

Figura 17 Cortes histológicos do epitélio de vias aérea de pulmões de ratos sob a visão da objetiva reticulada de pontos e retas (aumento de 400X)..... 56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Comparação do número de leucócitos encontrados no LBA entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice tratados por 7 dias 59

Gráfico 2 Comparação do número de leucócitos encontrados no LBA entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice tratados por 15 dias 60

Gráfico 3 Comparação do número de leucócitos encontrados no LBA entre os tempos 7 e 15 dias de cada grupo: Controle, Basiliximabe, Tríplice, e Basiliximabe+Tríplice 60

Gráfico 4 Comparação da FBC entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice em 7 e 15 dias 61

Gráfico 5 Comparação da FBC entre os tempos de 7 e 15 dias nos grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice. 62

Gráfico 6 Comparação da VTMC entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice em 7 e 15 dias 63

Gráfico 7 Comparação da VTMC entre os tempos de 7 e 15 dias nos grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice 64

Gráfico 8 Comparação da velocidade relativa de transporte do muco no palato de rã entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 7 dias 65

Gráfico 9 Comparação da velocidade relativa de transporte do muco no palato de rã entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 15 dias. 65

Gráfico 10 Comparação da velocidade relativa de transporte do muco no palato de rã entre os tempos de 7 e 15 dias nos grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice..... 66

Gráfico 11 Comparação da porcentagem do muco ácido das células caliciformes entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 7 dias 67

Gráfico 12 Comparação da porcentagem de muco ácido das células caliciformes entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 15 dias 68

Gráfico 13 Comparação da porcentagem de muco neutro entre os tempos dentro de cada grupo: Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice 69

Gráfico 14 Comparação da porcentagem de muco neutro das células caliciformes entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 7 dias 70

Gráfico 15 Comparação da porcentagem de muco neutro das células caliciformes entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 15 dias 70

Gráfico 16 Comparação da porcentagem de muco neutro das células caliciformes entre os tempos dentro de cada grupo: Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice 71

Gráfico 17 Comparação da expressão relativa do gene Muc5ac entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basixilimabe+Tríplice de animais tratados por 7 dias 72

Gráfico 18 Comparação da expressão relativa do gene Muc5ac entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basixilimabe+Tríplice de animais tratados por 15 dias 72

Gráfico 19 Comparação da expressão relativa do gene Muc5ac entre os tempos dentro de cada grupo: Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basixilimabe+Tríplice 73

Gráfico 20 Comparação da concentração da proteína mucina do gene Muc5ac entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basixilimabe+Tríplice de animais tratados por 7 dias 74

Gráfico 21 Comparação da concentração da proteína mucina do gene Muc5ac entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basixilimabe+Tríplice de animais tratados por 15 dias 74

Gráfico 22 Comparação da concentração da proteína mucina do gene Muc5ac entre os tempos dentro de cada grupo: Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basixilimabe+Tríplice 75

Gráfico 23 Comparação do número de células da via aérea marcadas com anticorpo anti-Bcl-2 entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basixilimabe+Tríplice de animais tratados por 7 e 15 dias 76

Gráfico 24 Comparação do número de células da via aérea marcadas com anticorpo anti-Bcl-2 entre os tempos 7 e 15 dias de tratamento dentro de cada grupo: Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basixilimabe+Tríplice 77

Gráfico 25 Comparação do número de células da via aérea marcadas com anticorpo anti-Caspase-3 entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basixilimabe+Tríplice de animais tratados por 7 e 15 dias 78

Gráfico 26 Comparação do número de células da via aérea marcadas com anticorpo anti-Caspase-3 entre os tempos 7 e 15 dias de tratamento dentro de cada grupo: Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basixilimabe+Tríplice 79

RESUMO

RESUMO

Correia AT. *Efeitos do basiliximab com e sem a terapia tríplice na depuração mucociliar das vias aéreas de ratos: estudo experimental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: Uma imunossupressão eficaz é fundamental para a sobrevivência do paciente após o transplante de pulmão. Estudos prévios demonstraram que drogas imunossupressoras como ciclosporina A, tacrolimo, micofenolato de sódio e prednisona prejudicaram a depuração das vias aéreas de ratos. Para prevenir a rejeição aguda, o basiliximab tem sido utilizado como terapia de indução previamente ao transplante de pulmão em muitos centros ao redor do mundo. Entretanto, existem poucos trabalhos reportando seus efeitos adversos. **Objetivo:** Avaliar se o basiliximab isolado e em conjunto com a terapia tríplice (tacrolimo, micofenolato de sódio e prednisona) causa efeitos adversos no aparelho mucociliar traqueobrônquico, alterando a depuração mucociliar das vias aéreas de ratos. **Método:** Oitenta ratos foram distribuídos em quatro grupos conforme o tratamento: Controle, Basiliximab, Tríplice e Basiliximab+Tríplice; e dois subgrupos de acordo com o tempo de tratamento: 7 e 15 dias. Após o período de tratamento, os animais foram eutanasiados e as seguintes análises foram realizadas: análise do lavado broncoalveolar, frequência de batimento ciliar (FBC), velocidade de transporte mucociliar (VTMC), transportabilidade do muco in vitro, histologia, expressão do gene Muc5ac, concentração da proteína mucina do gene Muc5ac e avaliação de apoptose celular no epitélio das vias aéreas. **Resultados:** Não houve alteração do número de leucócitos no lavado broncoalveolar e da FBC entre os grupos. Já a VTMC foi menor nos grupos Basiliximab e Basiliximab+Tríplice tratados por 7 dias, enquanto nos animais tratados por 15 dias a velocidade foi menor nos grupos Trípice e Basiliximab+Tríplice. O transporte do muco *in vitro* foi menor no grupo Basiliximab+Tríplice tratado por 15 dias. A porcentagem dos mucos ácido e neutro não foi diferente entre os grupos tratados por 7 e 15 dias, o mesmo ocorreu para a expressão e concentração da proteína mucina do gene Muc5ac. Os grupos Tríplice e Basiliximab+Tríplice tratados por 7 e 15 dias, respectivamente, apresentaram número maior de células

apoptóticas no epitélio da via aérea. **Conclusão:** A droga basiliximab, isolada e em conjunto com a terapia tríplice, prejudicou o aparelho mucociliar traqueobrônquico de ratos, especificamente a depuração mucociliar.

Descritores: Transplante de pulmão; Imunossupressores; Depuração mucociliar; Muco; Células caliciformes; Mucina-5AC; Basiliximab; Modelos animais; Ratos.

ABSTRACT

ABSTRACT

Correia AT. *Effects of basiliximab with and without triple therapy on mucociliary clearance of the airway of rats: experimental study* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Introduction: Optimal immunosuppression is critical to the survival of the patient after lung transplantation. Previous studies showed that immunosuppressive drugs such as cyclosporine, tacrolimus, sodium mycophenolate and prednisone impaired mucociliary clearance of rats. To prevent acute rejection, basiliximab has been used as induction therapy before lung transplantation in many centers around the world. However, there are few studies reporting its side effects. **Objective:** Evaluate if basiliximab alone and in combination with triple therapy (tacrolimus, sodium mycophenolate and prednisone) causes adverse effects on the tracheobronchial mucociliary apparatus by impairing airways mucociliary clearance of rats. **Method:** Eighty rats were divided into four groups according to treatment: Control, Basiliximab, Triple and Basiliximab+Triple; and according to the treatment time: 7 and 15 days. After the treatment period, the animals were euthanized and the following analyzes were performed: bronchoalveolar lavage, ciliary beating frequency (CBF), mucociliary transport velocity (MCTV), mucus transportability rate *in vitro*, hystology, Muc5ac gene expression, concentration of the mucin protein of the Muc5ac gene and evaluation of cellular apoptosis in the airway epithelium. **Results:** There was no alteration in the number of leukocytes in the bronchoalveolar lavage fluid and the CBF between groups. The MCTV was lower in the Basiliximab and Basiliximab+Triple groups treated for 7 days, while the velocity was lower in the Triple and Basiliximab+Triple groups treated for 15 days. The mucus transportability rate *in vitro* was lower in the Basiliximab+Triple group treated for 15 days. There was no difference in percentage of both acidic mucus and neutral mucus between groups treated for 7 and 15 days. Also, there was no difference in the expression and concentration of the mucin of the Muc5ac gene. The Triple and Basiliximab+Triple groups treated for 7

and 15 days, respectively, had a higher number of apoptotic cells in the airway epithelium. **Conclusion:** The basiliximab, alone and in conjunction with triple therapy, impaired the tracheobronchial mucociliary apparatus of rats, specifically the mucociliary clearance.

Descriptors: Lung transplantation; Immunosuppressive agents; Mucociliary clearance; Mucus; Goblet cells; Mucin 5AC; Basiliximab; Models, Animal; Rats.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O transplante de pulmão é uma alternativa terapêutica para pacientes com pneumopatias crônicas não-neoplásicas em estágio terminal, como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), fibrose pulmonar idiopática, fibrose cística e hipertensão pulmonar primária[1]. Dados fornecidos pela "International Society for Heart and Lung Transplantation" (ISHLT), mostram que anualmente, no mundo inteiro, são realizados cerca de 4000 transplantes de pulmão e que este número vem crescendo a cada ano. No Brasil, entre janeiro e setembro de 2016, foram realizados 71 transplantes, segundo dados da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO).

O sucesso do transplante de pulmão nos dias de hoje é devido ao desenvolvimento de técnicas de preservação do pulmão doado, das técnicas de anastomose brônquica[2], e principalmente da descoberta e introdução das drogas imunossupressoras[3].

Embora haja alguma variabilidade nos medicamentos usados em diferentes centros de transplante pulmonar, a abordagem para imunossupressão é geralmente similar. Os regimes de manutenção tipicamente envolvem três distintas classes de agentes imunossupressores: inibidores de calcineurina (ciclosporina e tacrolimo), agentes antiproliferativos (azatioprina e micofenolato) e corticosteróides[4].

Em adição aos regimes de manutenção, no momento do transplante ou no período pós-operatório prévio, muitos centros estão utilizando agentes imunossupressores de indução para suprimir o sistema imunológico do

receptor no período pós-transplante imediato, dessa forma, diminuindo a interação inicial entre as células imunológicas do receptor com os antígenos do enxerto do doador. Há uma preocupação que a aloreatividade inicial não somente conduza a um aumento da rejeição aguda como também a inflamação crônica de baixo nível[5]. O basiliximabe (Simulect®), um anticorpo específico para o receptor da Interleucina 2 (IL-2R), é um exemplo de agente imunossupressor de indução[6,7].

Embora vários trabalhos sugiram que o aumento da imunossupressão no período pós-transplante imediato reduz o risco de rejeição aguda, este benefício potencial pode ser compensado negativamente por um aumento no risco de infecções ou pela indução de outros efeitos adversos associados à terapia[4].

Sabe-se que a principal causa de morte no primeiro mês pós-transplante de pulmão é a infecciosa[8,9], coincidindo com o mesmo período de maior disfunção do epitélio mucociliar[10]. O aparelho mucociliar é o primeiro mecanismo de defesa da árvore traqueobrônquica contra todos os tipos de partículas inaladas[11,12]. Ele é composto do epitélio ciliar que se estende da laringe até os bronquíolos terminais[11-13]. Além das células ciliadas, o epitélio traqueobrônquico também é composto de células produtoras de muco denominadas células caliciformes[11-14]. Com exceção dos bronquíolos, sob o epitélio da traquéia e do brônquio são encontradas as glândulas submucosas que também produzem muco[11,13-15].

O principal componente do muco é uma glicoproteína denominada mucina. As mucinas que são predominantes nas secreções das vias aéreas

são expressas por dois genes, o MUC5AC e o MUC5B. As células caliciformes produzem exclusivamente mucina expressa pelo MUC5AC, enquanto que a mucina expressa pelo MUC5B é encontrada em células mucosas das glândulas submucosas[13-16].

Existem trabalhos que mostram que os imunossupressores apresentam efeitos adversos nas células da via aérea e principalmente no funcionamento do aparelho mucociliar.

Estudo realizado por Neuringer et al., sobre ação de inibidores da calcineurina no epitélio da via aérea em cultura de células epiteliais traqueobrônquicas humanas, “human tracheobronchial epithelial cell” (hTBEC), demonstrou que a ciclosporina A, em doses dentro dos picos de concentrações clinicamente relevantes para inibição da calcineurina, causou lesão progressiva com redução significante do epitélio mucociliar, interferiu profundamente no crescimento das células indiferenciadas e causou necrose de células bem diferenciadas após 5 dias de tratamento. Este trabalho também mostrou a existência de genes relacionados aos inibidores da calcineurina, como o fator nuclear de células T ativadas “nuclear factor of activated T-cells (NFAT), FKBP12 e ciclofilina, presentes em hTBEC[17].

Pazetti et al. também avaliaram o efeito da ciclosporina A, mas em estudo experimental com ratos. Eles verificaram a diminuição da produção de mucina em células caliciformes, como também uma disfunção do aparelho mucociliar quanto à velocidade de transporte do muco do brônquio de ratos tratados com ciclosporina A, em comparação a ratos tratados com salina (grupo controle)[18].

Silva et al., também em estudo experimental com ratos, avaliaram os efeitos do micofenolato de sódio no aparelho mucocilar. Eles verificaram que, nos animais tratados com micofenolato de sódio, a freqüência do batimento ciliar (FBC) e a velocidade de transporte mucocilar (VTMC) foram menores[19].

Braga et al. avaliaram os efeitos da prednisona no aparelho mucociliar das vias aéreas de ratos, e constataram que nos animais tratados com predninisona a velocidade de transporte do muco no palato de rã foi menor comparado com os animais tratados com salina[20].

Prado e Silva et al. mostraram os efeitos causados no aparelho mucociliar de ratos por dois regimes de imunossupressão. O primeiro regime constituído pelas drogas tacrolimo, micofenolato de sódio e prednisona e o segundo regime constituído pelas drogas ciclosprorina A, azatioprina e prednisona. Os animais tratados tanto com o regime 1 quanto com o regime 2 apresentaram menor VTMC, menor FBC e alteração na proporção de muco ácido e neutro[21].

Embora já se saiba que os imunossupressores de indução sejam bem tolerados e apresentem eventos adversos leves, nada se sabe sobre a existência ou não de algum evento adverso no aparelho mucociliar. Neste trabalho, nos propusemos a avaliar os efeitos do antagonista do IL-2R de células T, anticorpo monoclonal basiliximabe (Simulect®) no aparelho mucociliar de ratos.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar se a droga basiliximabe, isolada e em conjunto com a terapia tríplice (tacrolimo, micofenolato de sódio e prednisona), causa efeitos adversos no aparelho mucociliar traqueobrônquico de ratos, especificamente na depuração mucociliar.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 História do transplante de órgãos

No início do século XX, o sucesso do transplante de tecidos não viscerais, tais como de pele e de córneas humanas, já tinha sido reportado. Neste período, podemos destacar os principais desenvolvimentos na área do transplante, como: habilidades cirúrgicas, incluindo métodos de anastomose vascular; experimentação de transplante de órgãos em modelos animais; descobertas observacionais que foram importantes no direcionamento de outros trabalhos; mecanismos imunológicos da rejeição do enxerto pelo sistema imunológico nativo do receptor[22].

O cirurgião francês Alexis Carrel, laureado com o prêmio Nobel de medicina em 1912, foi um precursor da cirurgia vascular e do transplante de órgãos. Ele desenvolveu métodos de sutura de anastomose vascular, reconstrução de vasos e preservação de órgãos com a técnica de resfriamento e armazenamento a frio[22].

Em outubro de 1905, Carrel juntamente com Charles Claude Guthrie publicaram o trabalho da realização com sucesso do primeiro autotransplante de órgão sólido. O rim de um cão de pequeno porte foi retirado e transplantado no pescoço. A artéria renal foi unida com a artéria carótida, a veia renal com a veia jugular externa e o ureter com o esôfago. O rim produziu urina imediatamente, mas o animal morreu após alguns dias de infecção[22].

Mais tarde, em 1906, eles removeram um rim de um cão e o mantiveram funcionando por poucos dias no corpo de outro cão[22].

Apesar do sucesso técnico cirúrgico, Carrel acreditava que o grande impedimento para o sucesso completo do transplante de órgãos em animais e em seres humanos era devido a uma resposta hostil do hospedeiro no processo de rejeição[22,23].

De acordo com Carrel[24]

> No caso de um órgão, extirpado de um animal e reimplantado nele mesmo por uma determinada técnica, continua a funcionar normalmente, e cessa sua funcionalidade normal quando transplantado em outro animal pela mesma técnica, a causa do distúrbio fisiológico não pode ser atribuída a fatores cirúrgicos, mas sim devido á influência do receptor, ou seja, por fatores biológicos.

Pode-se considerar o início da década de 1940 como um marco na pesquisa do transplante de órgãos. Foi neste período que o biólogo inglês Peter Brian Medawar, através dos seus estudos de transplante de pele em coelhos, começou a esclarecer as bases da rejeição dos enxertos de órgãos[25-27].

Medawar mostrou que enxertos de pele são bem tolerados nos autotransplantes. Entretanto, nos alotransplantes, os enxertos são rejeitados e a velocidade de reação da rejeição é acelerada quando a dosagem do enxerto é maior[25]. Ele também mostrou que um segundo enxerto de pele de

origem do mesmo doador também é rejeitado de forma acelerada, fornecendo evidências para uma fase de sensibilização da resposta imune e o conceito de memória imunológica[26].

Rupert Everett Billingham, outro pioneiro da imunologia do transplante, contribuiu enormemente para o desenvolvimento do campo de transplante de órgãos[28]. Billingham e Medawar estabeleceram muitas das leis fundamentais do transplante que permanecem intactas até hoje[28].

Billinghan, Krohn e Medawar, em experimentos de alotransplante de pele realizados em coelhos, mostraram que hormônios corticosteroides da glândula adrenal podem retardar a rejeição do enxerto[29].

Em 1953, Billinghan, Brent e Medawar, inoculando células do baço imunocompetentes de camundongos adultos em camundongos fetais ou neonatais, mostraram que esses camundongos quando adultos apresentaram a capacidade de tolerar os enxertos de tecidos dos animais doadores das células do baço. Com isso, eles estabeleceram que a tolerância para aloenxertos de pele poderia ser induzida[30].

Em 1960, Medawar recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, juntamente com o australiano Frank Burnet, pelo estabelecimento das bases da tolerância imunológica, que modificou definitivamente a história da rejeição de órgãos[27,31,32].

Medawar e seus colegas acreditavam que a realização de um transplante de rim entre gêmeos idênticos poderia dar certo sem a ocorrência de rejeição do órgão, e em 1954, Joseph Murray e John Merrill mostram que a hipótese de Medawar estava correta. Eles realizaram um

transplante de rim entre gêmeos idênticos e o receptor viveu por oito anos após a cirurgia sem nenhuma evidência de rejeição, sendo este o primeiro transplante de órgão sólido realizado com sucesso entre seres humanos[23].

Dois anos mais tarde, Murray e Merrill realizaram outro transplante de rim entre gêmeos idênticos. O receptor foi uma mulher de 55 anos que viveu ativamente bem até a década de 1990[23].

O primeiro transplante de coração realizado com sucesso, aconteceu no ano de 1967, na África do Sul, pelo cirurgião Christian Barnard. Louis Washkansky de 55 anos recebeu o novo coração de uma mulher jovem que morreu em um acidente de carro. Washkansky viveu por 18 dias após a cirurgia[23].

3.2 História do transplante de pulmão

O fisiologista russo Vladimir P. Demikhov foi um pioneiro no transplante experimental de órgãos, realizando alotransplante de coração e bloco de coração e pulmão em cães. Em 1947, ele realizou o primeiro transplante isolado de pulmão. A sobrevida do cão foi de sete dias após o transplante, e a causa do óbito foi deiscência da linha da sutura brônquica[33,34]. A partir desse período, inúmeros pesquisadores se destacaram pelos avanços obtidos em pesquisas nesta área e tornaram-se conhecidos por seus estudos em enxertos de lobos pulmonares e transplante pulmonar em cães[35].

Em 1950, o francês Henri Metras publicou o trabalho intitulado “Note préliminair esur la greffe totale du poumon chez le chien”. Neste trabalho, Metras relata seu trabalho preliminar de alotransplante unilateral do pulmão esquerdo em cães, onde ele introduziu novos conceitos cirúrgicos e foi o primeiro a apresentar animais com sobrevida maior que 20 dias no pós-transplante[36].

O cirurgião James D. Hardy, na década de 60, realizou mais de 400 transplantes pulmonares em cães e observou que a deterioração funcional do enxerto levava à morte do animal receptor em aproximadamente sete dias, resultado este atribuído à rejeição, e que a sobrevida dos animais submetidos ao transplante pulmonar unilateral praticamente dobrava com o uso de Metotrexato e que o uso de Azatioprina aumentava a sobrevida em até 30 dias[37].

Baseados na experiência adquirida com os transplantes experimentais, Hardy e sua equipe acreditaram na possível realização do transplante clínico, e em 15 de abril de 1963, na Universidade de Mississipi, nos Estados Unidos, eles realizaram o primeiro transplante de pulmão em um ser humano. O receptor foi um homem de 58 anos de idade com carcinoma de pulmão. O paciente sobreviveu apenas 18 dias, mas este evento marcou o início de uma nova era para o transplante de pulmão[37].

Após a cirurgia pioneira de Hardy, entre 1963 e 1980, foram realizados aproximadamente 40 transplantes de pulmão em seres humanos. Entretanto, nenhum desses transplantes apresentou um tempo de sobrevida longo e a maioria dos centros fracassou devido a sérias complicações

cirúrgicas e infecciosas[38]. A imunossupressão utilizada nesta época consistia de azatioprina e altas doses de prednisona[3].

Mesmo com o desenvolvimento da técnica da preservação do pulmão doado, das técnicas de anastomose brônquica e de reanastomose do suprimento das artérias brônquicas[39], foi somente a partir de 1981, com a introdução da ciclosporina, como novo agente imunossupressor potente, que foi possível maior desenvolvimento nesse método terapêutico[3].

Em 1981, Dr. Bruce A. Reitz e Shumway, na Universidade de Stanford, realizaram o primeiro transplante de coração-pulmão humano com sucesso. A paciente foi uma mulher de 45 anos de idade que sofria de hipertensão pulmonar primária[40,41]. A paciente sobreviveu por cinco anos após o transplante e a causa da morte foi uma queda acidental[41]. Os pulmões e o coração não apresentaram achados de rejeição crônica no momento da morte[41]. A terapia imunossupressora consistiu de predinisolona, azatioprina e ciclosporina[40,41].

No início da década de 1980, Dr. Joel D. Cooper e sua equipe da Universidade de Toronto no Canadá, em estudos experimentais em cães, mostraram melhoras significativas na cicatrização brônquica com doses mais baixas de esteróides e que a azatioprina e a ciclosporina não apresentaram efeito adverso na cicatrização da anastomose brônquica[42,43].

Outro dado importante quanto à cicatrização brônquica, foram os trabalhos que mostraram que quando se aplicava um envoltório de omento na anastomose brônquica de cães submetidos ao transplante pulmonar, melhorava a cicatrização e causava neovascularização do brônquio[44-46].

Em 1983, Dr. Cooper e sua equipe realizam com sucesso o primeiro transplante de pulmão unilateral. Este foi um transplante de pulmão esquerdo no qual foi utilizado o envoltório omental no brônquio[47]. O receptor foi o Sr. Tom Hall, um executivo de hardware de 58 anos de idade que sofria de fibrose pulmonar idiopática. O tratamento com drogas imunossupressoras consistiu de azatioprina, ciclosporina e prednisona. Hall sobreviveu por seis anos após o transplante e a causa da morte foi por falha renal[48].

No Brasil, o primeiro transplante de pulmão foi realizado pelo Dr. José de Jesus Camargo Peixoto, no ano de 1989, na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Dez anos mais tarde, em 1999, Dr. Camargo e seu grupo também realizaram o primeiro transplante de pulmão entre vivos[49].

No estado de São Paulo, o primeiro transplante de pulmão foi realizado em 1990, na Escola Paulista de Medicina pela equipe do Dr. Vicente Forte[50].

3.3 Os Imunossupressores

3.3.1 Inibidores de calcineurina

A calcineurina é uma proteína fosfatase citoplasmática presente em vários tipos celulares, incluindo os linfócitos[51,52]. Ela integra o conjunto de proteínas que estão relacionadas com a rota bioquímica de ativação dos linfócitos T e transcrição do RNAm da interleucina 2 (IL-2)[04,52,53].

A ativação do linfócito T se inicia com a interação entre o receptor do linfócito T (TCR do inglês: T cell receptor) e o antígeno apresentado por uma célula apresentadora de antígeno. Essa interação ativa a cascata bioquímica elevando a concentração de cálcio citoplasmático. A concentração elevada de cálcio ativa a proteína cálcio-dependente calmodulina, uma proteína que também participa da rota bioquímica de ativação do linfócito T. A calmodulina ativada, por sua vez, ativa a calcineurina que causa a desfosforilação do fator de transcrição NFAT. O NFAT desfosforilado migra para o interior do núcleo celular, onde ele se liga ao promotor do gene da IL-2 e promove a transcrição do gene[04,52-54] (Figura 1).

As drogas imunossupressoras Ciclosporina A e o Tacrolimo são considerados inibidores de calcineurina, pois elas apresentam a capacidade de neutralizar a ação da calcineurina e desta forma impedir a transcrição da IL-2[04,51-54].

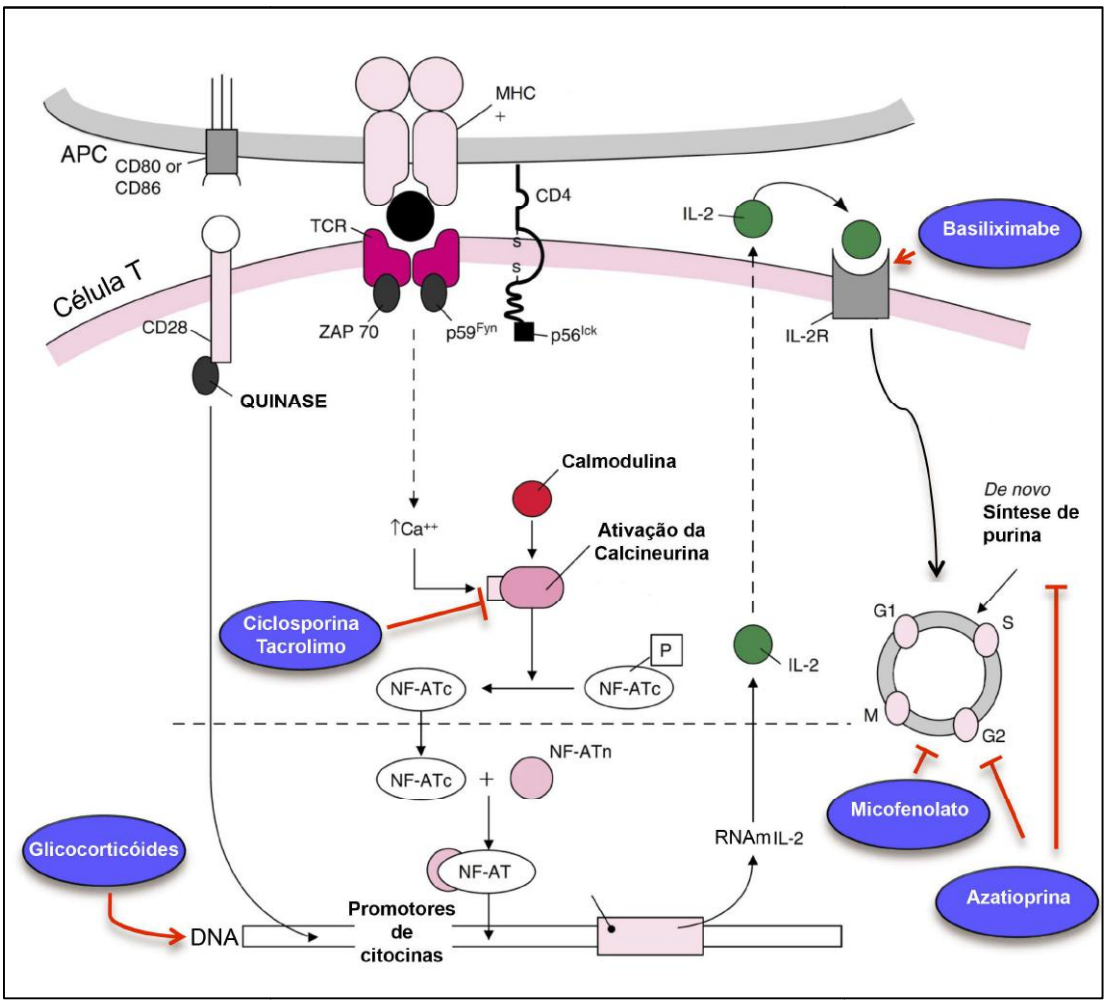


Figura 1 - Mecanismo de ativação do linfócito T e mecanismos de ação dos imunossupressores na inibição do linfócito T. Modificado de: Dunn CJ et al., 2001

3.3.1.1 Ciclosporina

A ciclosporina foi descoberta e desenvolvida na década de 1970 por pesquisadores da empresa farmacêutica Sandoz, pertencente ao grupo Novartis, na Basileia, Suíça. Ela é produzida por duas espécies de fungos, o *Cylindrocarpon lucidum*, descoberto em amostras de solo de Wisconsin, Estados Unidos, e *Tolypocladium inflatun* (originalmente classificado como *Trichoderma polysporum*) descoberto em amostras de solo de Hardanger

Vidda, Noruega[55-57]. Destes, somente o *T. inflatum* foi utilizado para o desenvolvimento e produção em grande escala da ciclosporina, por ser capaz de crescer em meio de cultura líquido[56].

A estrutura da ciclosporina foi determinada por Weber e colaboradores; ela é um undecapeptídio cíclico, neutro e lipofílico. Quando o segundo aminoácido da molécula é um ácido alfa-aminobutírico, a ciclosporina é denominada como ciclosporina A, e quando o segundo aminoácido é uma alanina, a molécula é denominada como ciclosporina B (Figura 2)[56].

O mecanismo de ação da ciclosporina inicia-se no citoplasma do linfócito T. A ciclosporina liga-se a um tipo de imunofilina, a ciclofilina, o complexo ciclosporina/ciclofilina inibe a atividade fosfatase serina/treonina da calcineurina e, desta forma, o NFAT não é desfosforilado e não migra para o núcleo, inibindo assim a ativação do linfócito T[54,58,59] (Figura 1).

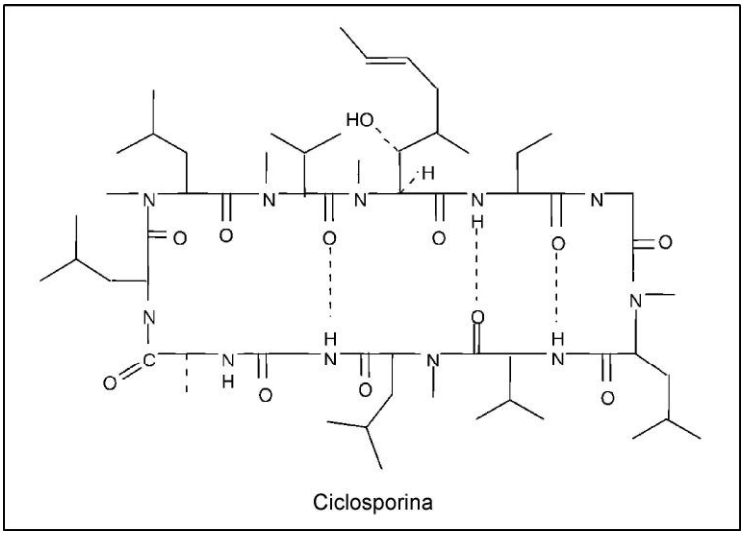


Figura 2 - Fórmula química da ciclosporina. Extraído de: Taylor et al., 2005

3.3.1.2 Tacrolimo

Inicialmente chamado de FK506, o tacrolimo foi descoberto e desenvolvido na década de 1980, no Japão, por pesquisadores da empresa farmacêutica Fujisawa Pharmaceuticals, hoje com o nome de Astellas Pharma[60]. O tacrolimo é uma molécula policetídeo macrolídeo produzida pela bactéria actinomiceto *Streptomyces tsukubaensis*[62,63], que foi encontrada em amostras de solo da base do Monte Tsukuba localizado em Tóquio[60](Figura 3).

O tacrolimo possui importantes qualidades imunossupressoras, por inibir a proliferação e diferenciação de células T-citotóxicas[60]. A terapia com tacrolimo tem contribuído tanto para o sucesso de transplante de órgãos que, em 2001, se tornou um agente imunossupressor de grande uso no transplante pulmonar[63].

O mecanismo de ação do tacrolimo é semelhante ao da ciclosporina, mas com poder de 10 a 100 vezes maior[64]. No citoplasma do linfócito T, o tacrolimo liga-se a outro tipo de imunofilina, o FKBP12; o complexo tacrolimo/FKBP12 também inibe a atividade fosfatase serina/treonina da calcineurina e, desta forma, previne a desfosforilação do NFAT, que acaba também não migrando para o núcleo e, por conseguinte, a ativação do linfócito T deixa de ocorrer[58,59] (Figura 1).

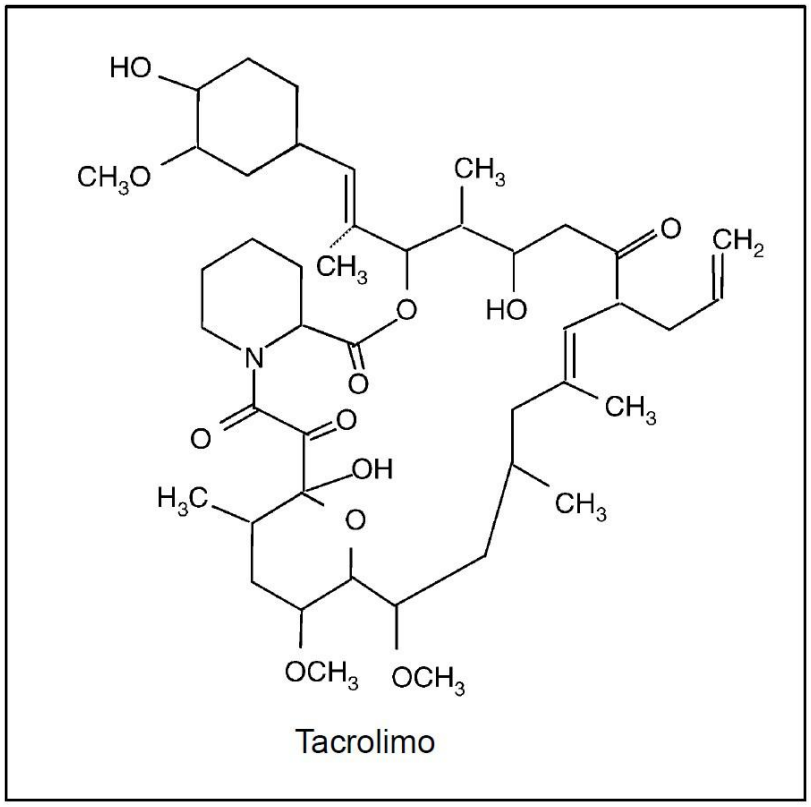


Figura 3 - Fórmula química da molécula de tacrolimo. Extraído de: Taylor et al., 2005

3.3.2 Inibidores do ciclo celular

3.3.2.1 Azatioprina

No final dos anos 50, nos laboratórios da empresa farmacêutica Wellcome Research, Gertrude Belle Elion e George Hitchings criaram vários análogos de nucleotídeos, com objetivo de proteger a molécula 6-mercaptorpurina (6-MP) da degradação metabólica que destrói seu efeito antileucêmico[65].

No mesmo período, Sir Roy Calne e colaboradores observaram que a 6-MP apresentava também efeito imunossupressor e que prolongava a

sobrevida de cães submetidos a transplante de rim, embora com várias morbidades causadas pela droga[66].

Calne obteve alguns dos análogos de nucleotídeos criados por Elion e Hitchings e testou o efeito imunossupressor desses compostos. Um desses compostos, BW57-322 (azatioprina), se destacou em termos de eficácia e tolerabilidade. A azatioprina foi menos tóxica do que a 6-MP e proporcionou maior tempo de sobrevida do enxerto[66].

A azatioprina é uma purina análoga sintética. No sangue, em uma reação não enzimática, ela é convertida na molécula 6-MP (Figura 4), que, na sequência, é metabolizada por três enzimas: a xantina oxidase, que a converte para o ácido 6-tioúrico (6-TU); a tiopurina metiltransferase (TPMT), que a converte para 6-metilmercaptopurina (6-MMP); e a hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HPRT), que a converte para tioinosina momofosfato (TIMP)[65,66].

As moléculas 6-TU e 6-MMP são metabólitos inativos, mas a molécula TIMP é convertida em dois compostos ativos: a tioinosina monofosfato metilada (metTIMP), pela ação da enzima TPMT; e a 6-tioguanina nucleotídeo (6-TGMP), pela ação da enzima inosina monofosfato de desidrogenase (IMPDH)[65,66].

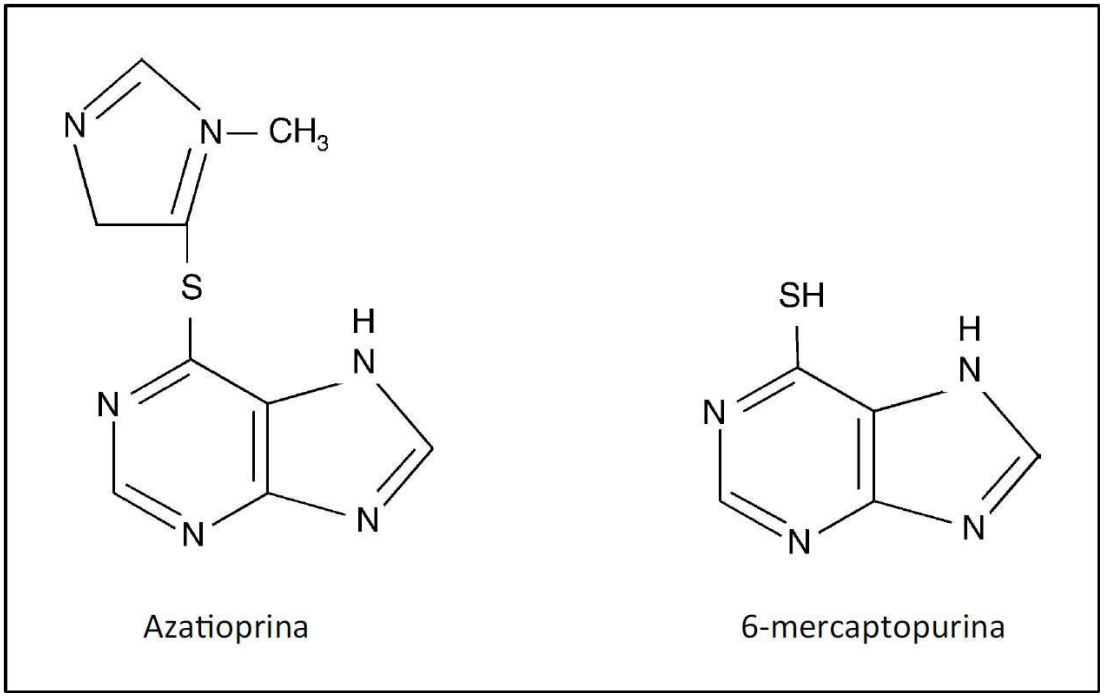


Figura 4 - Moléculas de Azatioprina e 6-mercaptopurina. Extraído de: Taylor et al., 2005

O composto metTIMP tem a capacidade de inibir a enzima amido fosforibosil transferase (PPAT) pertencente à rota bioquímica *de novo* da síntese das purinas[67]. A síntese das purinas é realizada por duas vias metabólicas, a via *de novo* e a via de salvamento. Os linfócitos apresentam apenas a via *de novo*, e dessa forma, a azatioprina acaba apresentando uma relativa especificidade pelos linfócitos[65,68](Figura 1).

O composto 6-TGMP apresenta a capacidade de incorporar-se nas moléculas de DNA e RNA como uma falsa base, provocando assim, a parada do ciclo celular e apoptose[65-68].

3.3.2.2 Ácido micofenólico – Micofenolato

Bartolomeu Gosio, no ano de 1896, isolou da fermentação de culturas de fungos da espécie *Penicillium stoloniferum* o ácido micofenólico[69]. Ele foi utilizado como um agente sistêmico para o tratamento de psoríase na década de 1970 e no mesmo período suas propriedades imunossupressoras foram elucidadas[69,70]. No entanto, sua tolerabilidade foi limitada pelos distúrbios gastrointestinais que causavam náuseas, vômitos, diarréia e cólicas na maioria dos pacientes[69].

Pesquisas subsequentes conduziram ao desenvolvimento de dois pró-fármacos derivados do ácido micofenólico, o micofenolato de mofetila e o micofenolato sódico[70]. O micofenolato de mofetila é um imunossupressor altamente eficaz, mas a sua utilização é limitada por eventos adversos gastrointestinais[70-72]. O micofenolato de sódio foi desenvolvido com o objetivo de reduzir os eventos adversos na porção gastrointestinal superior, relacionados com o ácido micofenólico[70-73].

Os dois pró-fármacos, micofenoato de mofetila e o micofenolato de sódio, são metabolizados no fígado, sendo convertidos no ácido micofenólico[68] (Figura 4).

O mecanismo de ação do ácido micofenólico acontece na via *de novo* da síntese das purinas[68-72], mas diferente da azatioprina, ele não é incorporado nas moléculas de DNA e RNA[69,72]. O alvo do ácido micofenólico na via *de novo* da purinas é a enzima IMPDH. O resultado da inibição da

IMPDH leva a depleção de nucleotídeos de guanosina especificamente nos linfócitos B e T[68-72](Figura 1).

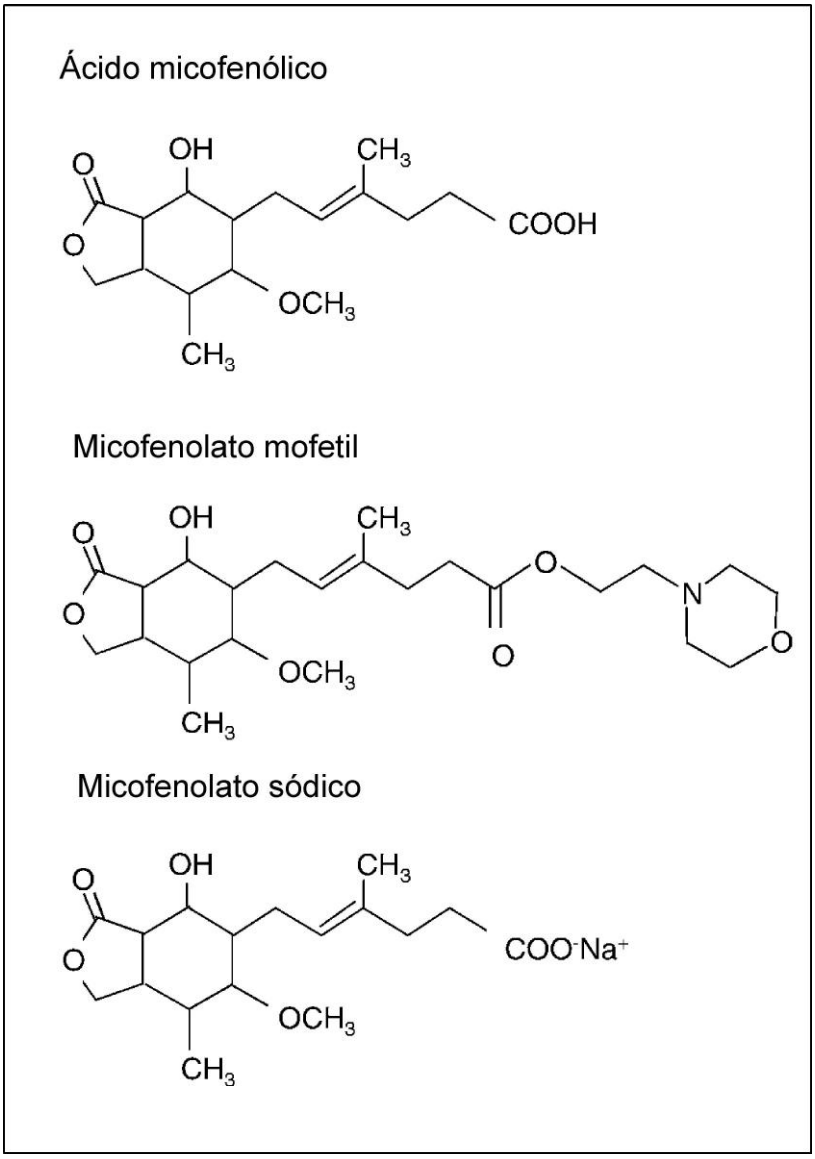


Figura 5 - Moléculas de ácido micofenólico, micofenolato mofetil e micofenolato de sódio. Extraído de: Taylor et al., 2005

3.3.3 Glicocorticóides

Em 1950, Philip Showalter Hench, Edward Calvin Kendall e Tadeusz Reichstein foram laureados com o Prêmio Nobel em medicina e fisiologia

pela descoberta, isolamento e aplicações clínicas da cortisona no tratamento da artrite reumatóide[74]. A cortisona é um hormônio esteróide da classe dos glicocorticóides (GCs)[74].

Os GCs são produzidos pelas glândulas suprarrenais estimuladas por hormônios do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Eles estão envolvidos na regulação de respostas imunológicas, bem como no controle de respostas ao estresse[75].

Hoje existem GCs sintéticos, como a prednisona e a prednisolona[76], que são os principais GCs utilizados na prevenção de rejeição de enxertos no transplante de órgãos[64,68]. A prednisona é metabolizada no fígado, sendo convertida em prednisolona que é o componente ativo da droga[68] (Figura 5).

O mecanismo de ação dos GCs é realizado através de três efeitos: genômico direto, genômico indireto e não genômico[77].

O efeito genômico direto ocorre quando o GC entra na célula e liga-se a um receptor citoplasmático denominado receptor de glicorticóides (RGC). O complexo GC/RGC é translocado para o núcleo celular promovendo o aumento da expressão de vários genes. Dois exemplos importantes são os genes da anexina e da fosfatase da proteína quinase ativada por mitógeno “mitogen-activated protein kinases” (MAPK). As proteínas anexina e fosfatase da MAPK inibem a síntese de prostaglandina[77].

No efeito genômico indireto, o RGC inibe o fator de transcrição Kappa B “nuclear factor Kappa B” (NF-kB) que leva à diminuição da enzima Ciclo-oxigenase-2 (COX-2), e isso culmina com a inibição da síntese da prostaglandina[77].

Por último, no efeito não genômico, o RGC ativa a oxido nítrico-sintase endotelial, que protege contra lesões induzidas por isquemia-reperfusão[77].

Esses mecanismos em conjunto acabam levando a uma diminuição da resposta inflamatória devido a uma redução da produção de citocinas e pela leucocitose neutrofílica, acompanhada da redução de eosinófilos, monócitos e linfócitos T; os linfócitos B são menos afetados e com isso a produção de anticorpos é preservada[77](Figura 1).

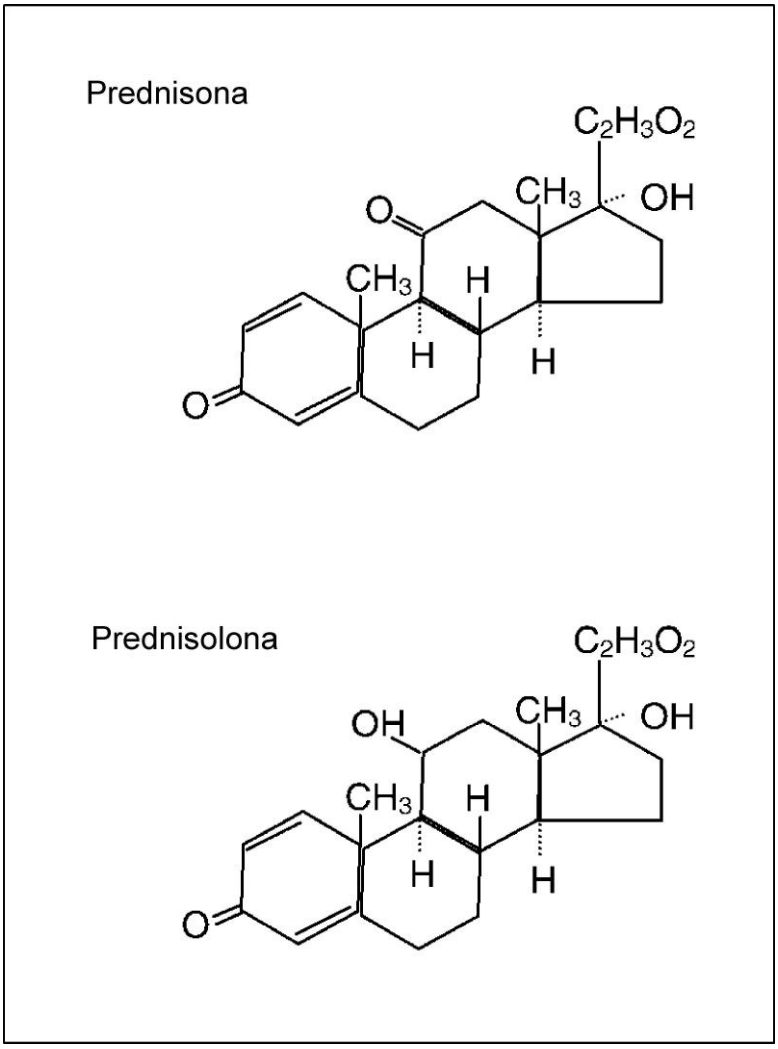


Figura 6 - Moléculas de prednisona e prednisolona. Extraído de: Taylor et al., 2005

3.3.4 Fármacos imunossupressores de indução

No geral, os imunossupressores de indução podem ser divididos em duas categorias: anticorpos de depleção e anticorpos de não depleção.

Os anticorpos de depleção podem ser monoclonais (Alentuzumabe e Orthoclone) e policlonais (globulina antilinfócito, globulina antitimócito equino e globulina antitimócito de coelho). Tanto os monoclonais quanto os policlonais diminuem radicalmente o número de células T aloreativas no momento do transplante fazendo com que o hospedeiro fique insensível em relação a um enxerto incompatível[78].

Os anticorpos de não depleção inibem a atividade das células T sem causar depleção celular. Como exemplo podemos citar os anticorpos daclizumabe (Zenapax®) e basiliximabe (Simulect®)[78].

Daclizumabe (Zenapax®) é um anticorpo monoclonal humanizado contendo uma pequena porcentagem (~10%) de sequência de anticorpo murino, e o basiliximabe (Simulect®) é um anticorpo monoclonal quimerizado murino-humano com 25% de anticorpo murino (Figura 7). Os dois anticorpos são antagonistas do IL-2R, e se ligam com alta afinidade à subunidade alfa do receptor da interleucina-2 (IL-2Rα ou CD25), ativando tirosinas quinases intracelulares que inibem a produção de citocinas. Como a subunidade α é expressa somente em células T ativadas, células T não ativadas não são afetadas, de tal modo que o IL-2R é um alvo altamente específico para intervenção biológica[6,7,79,80] (Figura 1).

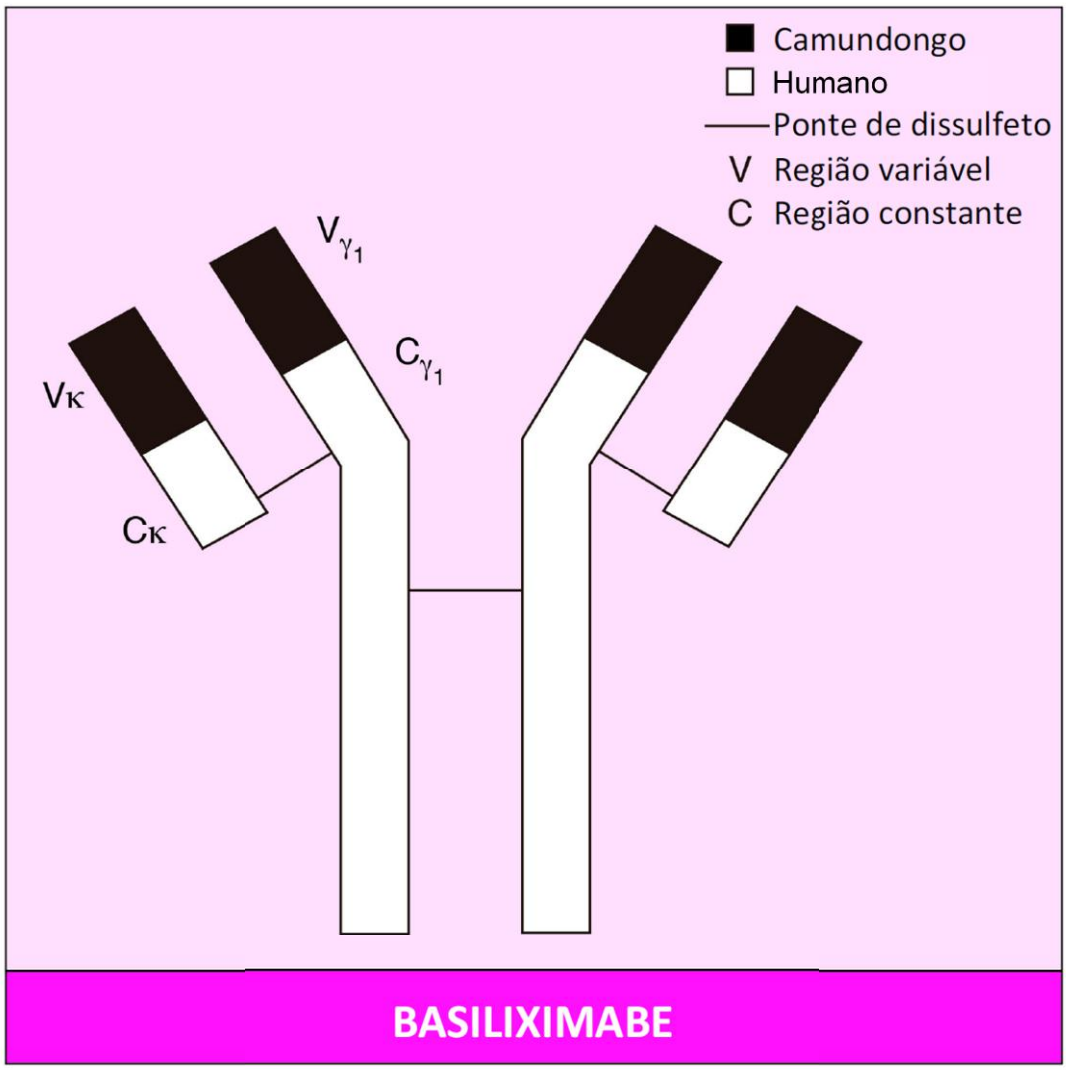


Figura 7 - Esquema do anticorpo monoclonal quimerizado murino-humano do basiliximabe. Extraído de: Onrust SV et al., 1999

A seletividade elevada de IL-2R é simultaneamente a razão para sua excelente tolerabilidade e pela qual uma resposta imune ainda pode ser montada na presença da indução de antagonistas de IL-2R, ignorando a via de IL-2[81].

Estudos comparativos mostram que o basiliximabe (Simulect®) é igualmente eficaz ou superior ao daclizumabe (Zenapax®) na prevenção da rejeição aguda celular em transplante renal[82].

3.4 Epitélio das vias aéreas

O pulmão é um dos poucos órgãos que estão em contato direto com o ambiente externo. Dado o fato que nós inspiramos 6 a 12 litros de ar por minuto, o pulmão é constantemente exposto a micróbios inalados, alérgenos e materiais particulados, os quais deverão ser depurados sem induzir inflamação, de modo a manter a homeostase. A mucosa do trato das vias aéreas desempenha um papel importante na proteção dos pulmões contra os insultos ambientais e na manutenção da homeostase[13].

O trato das vias aéreas pode ser dividido em duas zonas: a zona condutora e a zona respiratória. Na zona condutora, o ar inalado é umedecido, aquecido e limpo antes de alcançar a zona respiratória inferior, onde ocorre a troca gasosa e a oxigenação do sangue. A zona condutora compreende as cavidades nasais, faringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos, enquanto que a zona respiratória inclui os bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e sacos alveolares[13].

A partir da traqueia, a zona condutora sofre uma ramificação dicotômica, levando ao surgimento de dois brônquios principais. Estes, por sua vez, ramificam-se em uma série de brônquios e bronquíolos. O tamanho das vias aéreas progressivamente diminui a partir da traqueia ao bronquíolo terminal, a porção mais distante da zona condutora. O bronquíolo terminal conecta-se aos ductos alveolares através do bronquíolo respiratório, que apresenta características tanto do bronquíolo quanto do alvéolo[13].

O epitélio das vias aéreas é composto por células ciliadas e células secretoras. Estas células estão presentes em similar número formando um mosaico[13,14](Figura 8).

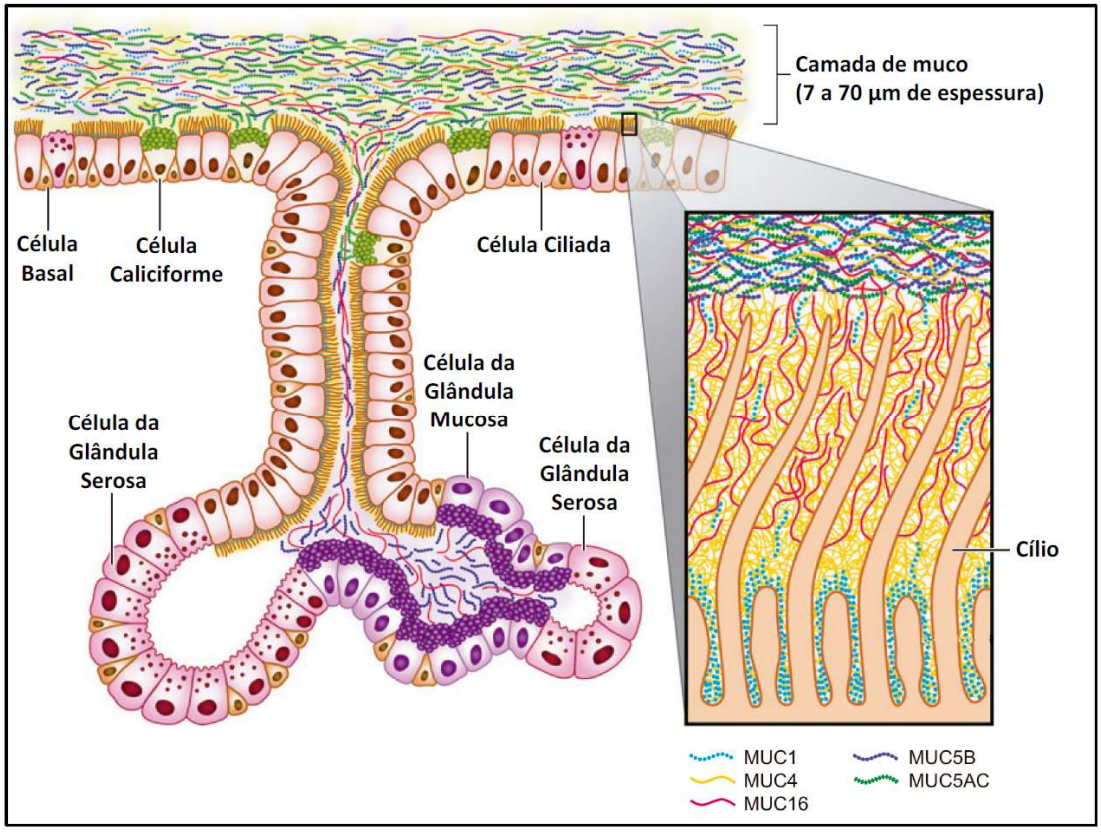


Figura 8 - Esquema do epitélio respiratório. Células ciliadas e caliciformes na superfície do epitélio e glândula submucosa com suas células secretoras de muco. Extraído de: Hattrup LC et al., 2005

3.4.1 Células ciliadas

As células ciliadas são responsáveis por mais de 50% de todas as células epiteliais da via aérea de condução. Cada célula apresenta aproximadamente de 200 a 300 cílios e o comprimento de cada cílio varia de 3,6 a 6 µm. Um grande número de mitocôndrias está presente logo abaixo

da superfície apical e fornecem energia para o batimento ciliar coordenado[13] (Figura 8).

3.4.2 Células caliciformes

As células caliciformes são as principais células produtoras de muco; em geral, elas estão presentes nas vias aéreas cartilaginosas, aquelas com diâmetros superiores a 3 milímetros. Elas apresentam grânulos que contém glicoproteínas de mucinas ácidas na região apical do citoplasma e um núcleo condensando na região basal, dando a estas células uma forma única. Em vias aéreas normais, a proporção entre células caliciformes e ciliadas é de 1:5 e essa relação aumenta em situações de doenças crônicas das vias aéreas, como a asma, DPOC e fibrose cística. As células caliciformes secretam mucinas de glicoproteínas de alto peso molecular dentro do lúmen da via aérea, no qual interceptam e removem partículas estranhas, protegendo assim a superfície epitelial. A secreção de mucina deve ser bem regulada, já que o excesso da produção pode bloquear as vias aéreas e prejudicar a adequada depuração mucociliar[13].

3.4.3 Células serosas

As células serosas são encontradas nas extremidades distais das glândulas submucosas e assemelham-se morfologicamente às células caliciformes. O fluido secretado dessas células contribui diretamente para o

volume da superfície líquida da via aérea, a hidratação do muco liberado pelas células caliciformes e a imunidade inata[13](Figura 8).

3.4.4 Células basais

As células basais estão conectadas à membrana basal através de hemidesmossomo, fornecendo a base para a fixação das células ciliadas e células caliciformes na lâmina basal. Elas apresentam potencial para regular respostas inflamatórias, defesa oxidante e movimento de água transepitelial[13](Figura 8).

3.4.5 Células de Clara

As células de Clara são restritas aos bronquíolos terminais, e tem um formato ovoide na espécie humana, mas irregular em outras espécies.

A característica mais marcante das células de Clara são os grânulos de secreção de elétrons denso ligados a membrana. Embora estes grânulos não contenham glicoproteínas como as células caliciformes, elas secretam proteínas surfactantes e antiproteinases que podem proteger o epitélio do brônquio[13].

As células de Clara são consideradas como células-tronco devido à habilidade de proliferar-se e repovoar bronquíolos terminais; células basais e produtoras de muco podem se desenvolver a partir de células de Clara[13].

3.4.6 Glândulas submucosas

As glândulas submucosas estão localizadas entre as bandas em espiral do músculo liso e as placas de cartilagem. Cada glândula está conectada com o lúmen da via aérea por um ducto ciliado que impulsiona as secreções externas e um ducto de coleta não ciliado. As glândulas são compostas de células de muco (60%) e células serosas (40%) que secretam proteoglicanos e proteínas antimicrobianas[14](Figura 8).

3.4.7 Camada de muco gel

O muco é um gel com propriedades de um sólido macio, elástico, e um fluido viscoso, que juntamente com as células ciliadas, forma a “escada rolante” mucociliar, essencial para a depuração das vias aéreas[14].

O muco normal é composto de 97% de água e 3% de sólidos como eletrólitos, lipídios, proteínas e glicoproteínas denominas mucinas. As mucinas são moléculas extremamente grandes (até 3x10 D por monômero), com regiões ricas de resíduos de serina e treonina ligados pelos seus grupos laterais de hidroxilas em cadeias de açúcar (O-glicosilação), representando menos de 30% dos sólidos[14].

As mucinas são expressas por genes denominados MUC para espécie humana e Muc para outras espécies[16]. Na espécie humana, existem 17 genes MUC, sete dos quais produzem mucinas que permanecem ligados à membrana celular. Cinco das mucinas segregadas têm domínios ricos em terminais de cisteína, que formam ligações dissulfureto resultando em

polímeros que conferem as propriedades de um gel. Dois destes polímeros, MUC5AC e MUC5B, são fortemente expressos nas vias aéreas e são detectados em quantidades similares no muco humano[14]. As células caliciformes produzem exclusivamente mucina expressa pelo MUC5AC, enquanto que a mucina expressa pelo MUC5B é encontrada em células mucosas das glândulas submucosas[14,16]. Os genes MUC5AC e MUC5B formam polímeros homotípicos (monômeros de MUC5AC ligam-se somente com MUC5AC e monômeros de MUC5B ligam-se somente com MUC5B), estruturados como cadeias simples longas em vez de ramos[14]. A cadeia do lado glicano liga-se em grandes quantidades de líquido (cem vezes o seu peso), no qual permite que o muco aja como um lubrificante e a camada de gel sirva como um reservatório de líquido para a camada periciliar. A hidratação do muco afeta dramaticamente sua viscosidade e suas propriedades elásticas, que, por sua vez, determinam como efetivamente ele é removido pela ação ciliar e tosse. O muco saldável contém 3% de sólidos, com a consistência de clara de ovo. Entretanto, a hipersecreção da mucina ou a desregulação do volume da superfície líquida podem aumentar a concentração dos sólidos até 15%, resultando em um muco muito viscoso e elástico que não é facilmente depurado. Em adição, um muco desidratado adere mais facilmente à parede da vias aéreas[14].

3.4.8 Regulação dos genes MUC

Os genes MUC5AC e MUC5B estão localizados no cromossomo 11p15.5. Os estímulos extracelulares para que ocorra a transcrição do gene MUC em células caliciformes são conduzidos através de diversas rotas metabólicas, como, por exemplo, a rota MyD88 e pelas rotas da família das (MAPKs), como, por exemplo, a "extracellular signal-regulated kinase" (ERK), P38 MAPKinase, "jun N-terminal Kinase" (JNK)[16].

Ao final destas rotas metabólicas, os estímulos extracelulares acabam ativando fatores de transcrição relacionados ao gene MUC5AC, como a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), Sp1, NF-kB e AP-1[16,82](Figura 9).

Vários tipos de mediadores podem estimular a expressão dos genes para produção das mucinas das vias aéreas, como por exemplo, produtos de células inflamatórias (elastase de neutrófilo), componentes bacterianos (lipopolisacarídeos), mediadores pro-inflamatórios [fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucinas (IL-4, IL-9 e IL-13)], fatores de crescimento "epidermal growth factor" (EGF), poluentes, acetato de tetradecanoilforbol (Forbol) e fumaça de cigarro[16,82](Figura 9). Asma, DPOC e fibrose cística estão associadas com a hipersecreção e acúmulo de muco na via aérea[82].

Muitos dos mediadores que regulam positivamente a expressão do gene MUC5AC, como TNF-α, prostaglandina e forbol, não regulam a expressão do gene MUC5B. Por outro lado, as interleucinas (IL-6, IL-7 e IL-8) regulam positivamente a expressão tanto do gene MUC5B quanto do

gene MUC5AC. Isso mostra que existe uma regulação específica e diferente dos genes MUC em resposta a mediadores imunológicos e inflamatórios[16].

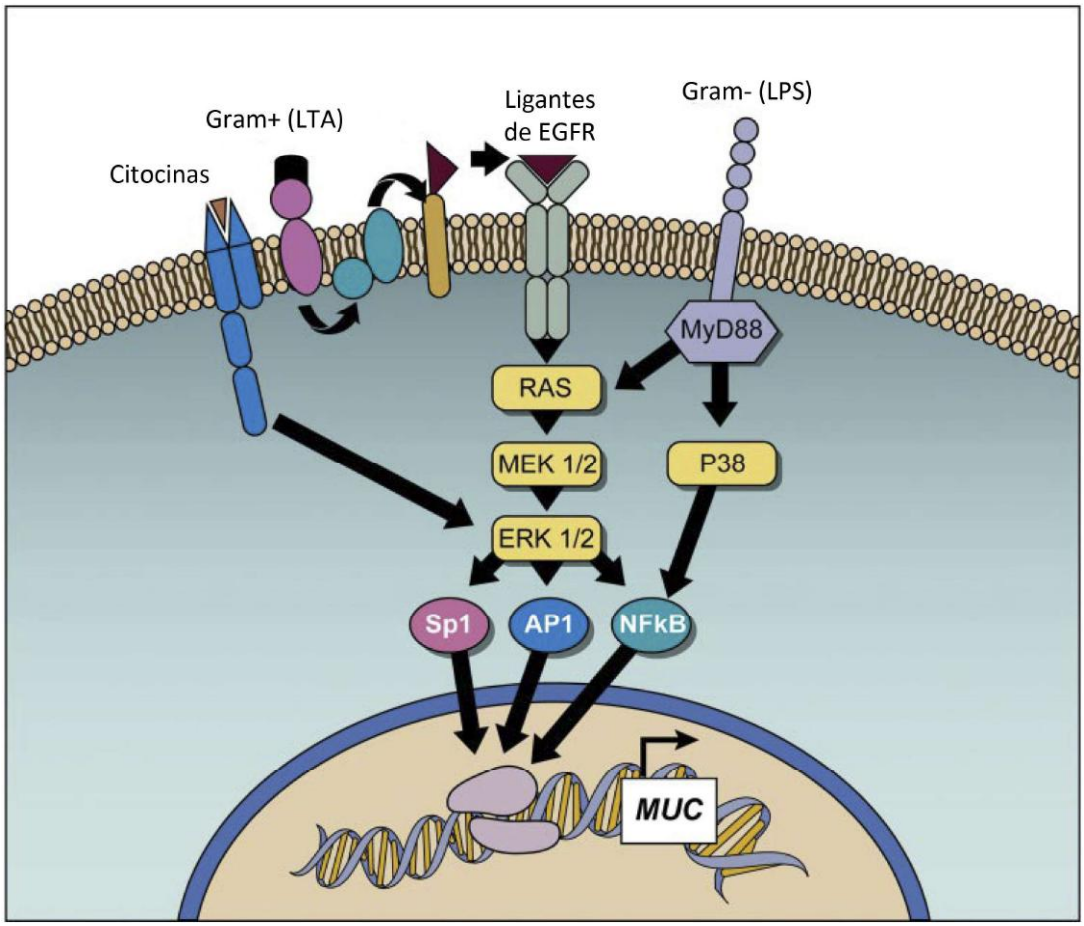


Figura 9 - Esquema do sinal de transdução da rota que regula a transcrição do gene MUC. Citocinas, produtos de bactérias Gram+ e Gram- e ligantes do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), ligam-se a receptores específicos de membrana e ativam o gene MUC via rotas MAPK e MyD88. Extraído de: Rose MC et al., 2005

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Animais e grupos

Os animas receberam os cuidados de acordo com os “Principle of Laboratory Animal Care”, formulados pelo “National Society for Medical Research”, e o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, preparado pelo “Institute of Laboratory Animal Resources” e publicado pelo “National Reserch Council of the National Academy Press” 1996, p. 1-35.

Foram utilizados 80 ratos machos da raça Wistar, pesando entre 200 e 250g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Para o cálculo da amostra, nos baseamos nos dados do trabalho de Pazetti et al[18]. O cálculo foi realizado no programa MINITAB Release 14.12.0 Statistical Sofware utilizando-se poder de amostra de 80% e alfa de 5%.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos de acordo com o tipo de terapia e com dois subgrupos cada um, baseando-se na data de sacrifício, sendo 10 animais para cada subgrupo.

Grupo Controle (n=20) – Animais que receberam administração de água filtrada (2,5 mL/kg) diariamente por gavagem, sendo eutanasiados após 7 e 15 dias.

Grupo Basiliximabe (n=20) – Animais que receberam administração de duas doses de basiliximabe (1 mg/kg) por via intravenosa em bolus. A primeira dose foi aplicada no primeiro dia e a segunda no quarto dia de tratamento, sendo eutanasiados após 7 e 15 dias da segunda dose de basiliximabe.

Grupo Tríplice (n=20) – Animais que receberam administração de Tacrolimo (1 mg/kg), Micofenolato de sódio (30 mg/kg) e Prednisona (1,25 mg/kg) diariamente por gavagem, sendo eutanasiados após 7 e 15 dias.

Grupo Basiliximabe+Tríplice (n=20) – Animais que receberam administração de Tacrolimo (1 mg/kg), Micofenolato de sódio (30 mg/kg) e Prednisona (1,25 mg/kg) por gavagem diariamente e duas doses de basiliximabe (1 mg/kg) por via intravenosa em bolus. A primeira dose foi aplicada 4 dias antes do início de tratamento das outras drogas e a segunda no primeiro dia de tratamento das outras drogas, sendo eutanasiados após 7 e 15 dias da segunda dose de basiliximabe.

O basiliximabe foi diluído em água para injeção e as outras drogas foram diluídas em água filtrada. Para realizar a diluição das drogas micofenolato de sódio e prednisona, que possuem apresentação em comprimidos, elas primeiramente foram trituradas no almofariz com o uso do pistilo. As concentrações de cada droga que foram administradas já tinham

sido testadas em ratos em trabalhos prévios[21,35-37]. O volume administrado das drogas por gavagem foi de 1 mL.

4.2 Eutanásia dos animais e coleta de tecido pulmonar

Na data da eutanásia, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg) por via intraperitoneal. Após sedação, foi realizada uma laparatomia e em seguida, os animais foram eutanasiados pelo método de exsanguinação, através da secção da artéria aorta abdominal.

Para a retirada dos pulmões, foi realizada uma esternotomia e sob visão de um microscópio, os pulmões foram retirados em bloco por meio de dissecção minuciosa e cuidadosa de toda a árvore traqueobrônquica.

Os lobos do pulmão direito foram separados e acondicionados em tubos para realização de análises posteriores.

Os lobos cardíaco e médio foram coletados e colocados em tubo eppendorf contendo solução de RNA*later* (Qiagen) para estabilização do RNA total para análise de PCR em tempo real; o lobo inferior foi coletado e colocado em tubo eppendorf seco para quantificação da concentração da proteína mucina pelo método de Dot Blot; e para a confecção de lâminas histológicas, o lobo superior foi coletado e colocado em recipiente contendo solução de formaldeído 10% e após 24 horas, a solução de formaldeído foi trocada por solução de álcool 70%.

As carcaças dos animais foram colocadas em sacos brancos identificados com etiqueta preenchida para descarte de carcaças. Os sacos

foram acondicionados em freezer no laboratório e o descarte ocorreu mediante solicitação telefônica aos responsáveis pela coleta.

Com exceção do material para histologia, todos os tubos foram armazenados no freezer -80ºC.

4.3 Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA)

O LBA foi realizado instilando-se através da traqueia 5 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) no pulmão esquerdo com imediata aspiração do mesmo; a seguir, a solução de PBS foi centrifugada a 300 g por 10 minutos a 5°C. Depois da centrifugação e retirada do sobrenadante, o pellet celular foi ressuspendido com 5 mL de PBS para a contagem do número total de células por mL, realizada em câmara de Neubauer. Foram confeccionadas lâminas de cytospin (Cytospin-2, Shandon Instruments Sewickley, EUA), que foram posteriormente coradas com Diff-Quik para a contagem diferencial celular (300 células/lâmina)[83,84].

4.4 Coleta do muco

Para a coleta do muco, o bloco coração-pulmão foi colocado sobre uma gaze embebida com solução salina a 0,9%; foi realizada uma pequena incisão na parede cartilaginosa dos brônquios fonte direito e esquerdo por onde foi inserido um pincel fino com cerdas macias para a coleta do muco

(Figura 10). O muco coletado foi imerso em óleo mineral e colocado em tubos eppendorf que foram armazenados em freezer a -80°C.

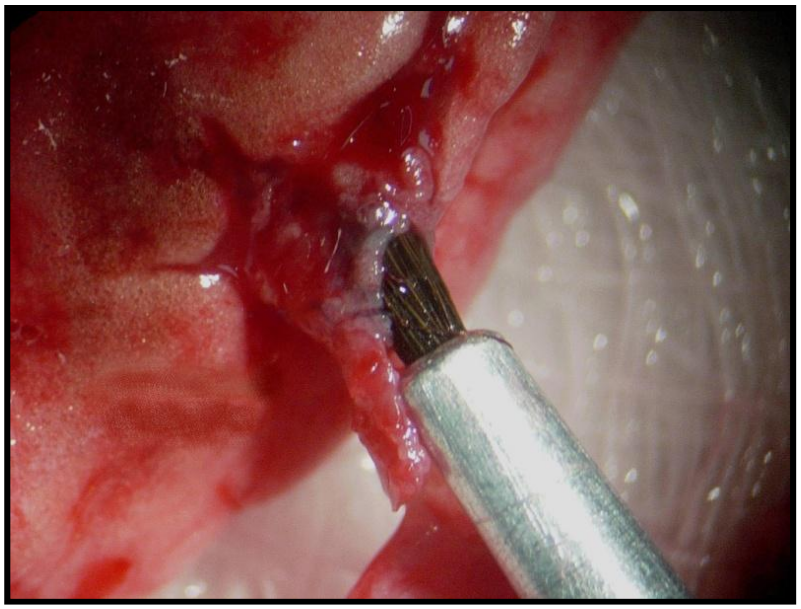


Figura 10: Abertura do brônquio esquerdo para coleta do muco com pincel

4.5 Determinação da FBC

Após a coleta das amostras de muco, foi realizada a dissecção dos brônquios, sob visão microscópica (Zeiss, modelo Stemi DRC). A parede posterior membranosa dos brônquios direito e esquerdo foram retiradas, permanecendo apenas a parede anterior cartilaginosa.

Uma câmera filmadora (Sony, modelo 3CCD Íris), acoplada ao microscópio, foi utilizada para captar a imagem do epitélio ciliar do brônquio. Esta imagem foi exibida em um monitor (Sony Trinitron).

Um estroboscópio (Machine Vision Strobe, modelo 5000, U.S.A.), acoplado a um computador, foi posicionado próximo ao epitélio ciliar do

brônquio de tal forma que, quando ligado, passou a emitir feixes de luz sobre o epitélio. A frequência dos feixes de luz foi controlada e expressa numericamente. Quando a frequência dos feixes de luz coincidiu com a FBC, cada feixe de luz passou a iluminar a mesma fase de movimento do cílio, resultando numa aparente imobilidade do mesmo. Assim, de forma indireta, a FBC foi obtida[18] (Figura 11).

Todas as medidas de batimento ciliar foram realizadas pelo mesmo observador, que desconhecia o grupo estudado.

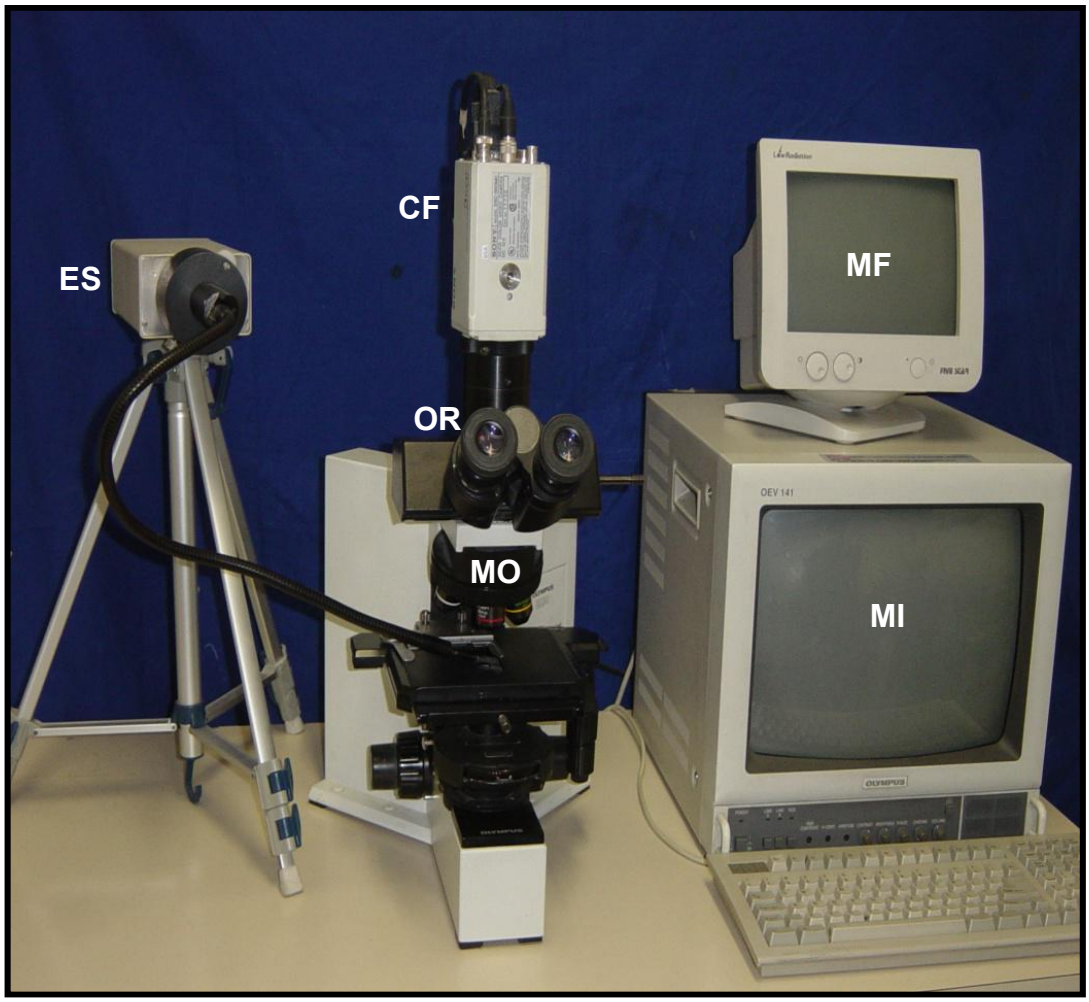


Figura 11: Equipamentos utilizados para medida da frequência de batimento ciliar e da velocidade de transporte mucociliar “in situ”. ES = estroboscópio; CF = câmera filmadora; MO = microscópio óptico; OR = ocular reticulada; MF = monitor de frequência; MI = monitor de imagem.

4.6 Determinação da VTMC

Logo após a determinação da FBC, no mesmo microscópio (Figura 11), equipado com ocular reticulada de área conhecida em aumento de 100 vezes, foi realizada a medida da VTMC através da observação direta de partículas aderidas a camada de muco do epitélio brônquico. O transporte das partículas ao longo do brônquio foi cronometrado de acordo com a distância percorrida pela partícula de um ponto a outro da objetiva reticulada e expresso como velocidade em milímetros por minuto (milímitros/minuto = distância percorrida/tempo). Foram obtidas três medidas, e a média dessas medidas foi tomada como valor principal para a análise estatística[18].

4.7 Transportabilidade do muco *in vitro*

O modelo inicialmente sugerido por Sade et al.[85] e King et al.[86] para obtenção do palato de rã foi utilizado neste estudo. A rã *Rana catesbeiana* foi anestesiada através de hipotermia induzida em câmera contendo gelo triturado, por cerca de 30 minutos. A seguir, quando a rã não estava respondendo aos testes de verificação de reflexos, ela foi decapitada com auxílio de uma guilhotina própria para sacrifício de animais de experimentação, e o seu palato retirado por meio de dissecação, tomando-se o devido cuidado para não danificar a superfície epitelial. O palato ficou em repouso por 24 horas em câmara fria a 4ºC para ter seu muco esgotado

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

Durante as medidas, o palato foi mantido em câmara de acrílico com 100% de umidade através de nebulização contínua, a partir de um nebulizador ultrassônico com solução salina a 2/3 diluída em água (0,61% de NaCl). Foi colocado sobre a câmara de acrílico um microscópio estereoscópico em aumento de oito vezes com objetiva reticulada através da qual foi possível visualizar o deslocamento do muco sobre a superfície do palato (Figuras 12 e 13).

Foi então iniciada a análise com três medidas iniciais do tempo de deslocamento do muco da rã sobre o palato (controle). Em seguida, o tempo de deslocamento do muco do rato foi cronometrado obtendo-se três medidas (milímetros/minuto) de três amostras de muco teste. Por fim, foram obtidas mais três medidas finais do muco da rã (controle).

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

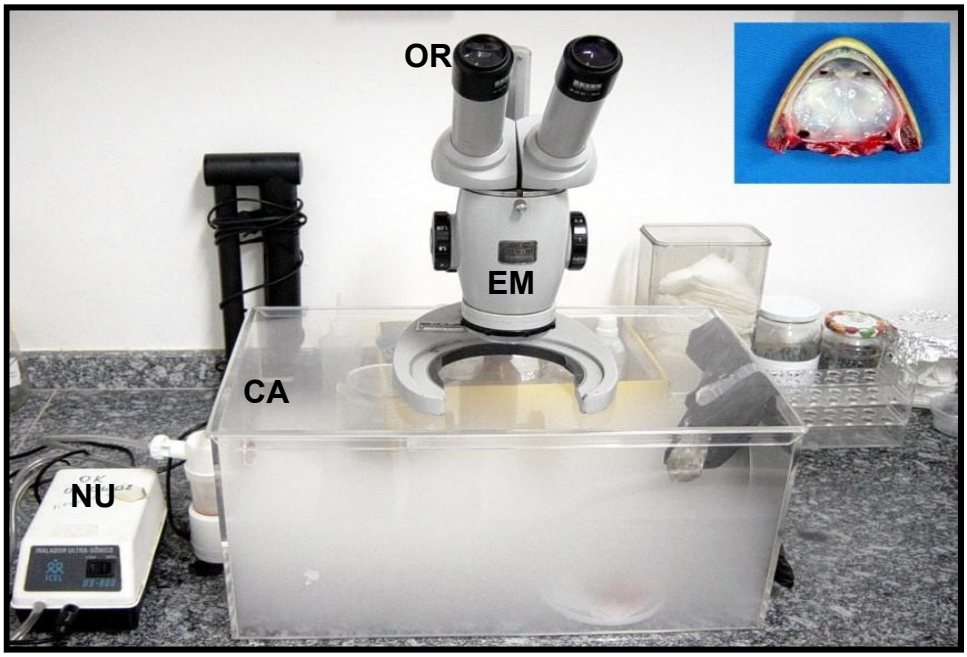


Figura 12 – Equipamentos utilizados para medida da transportabilidade das amostras de muco em palato de rã. NU = nebulizador ultrassônico; CA = câmara acrílica; EM = estereomicroscópio; OR = ocular reticulada

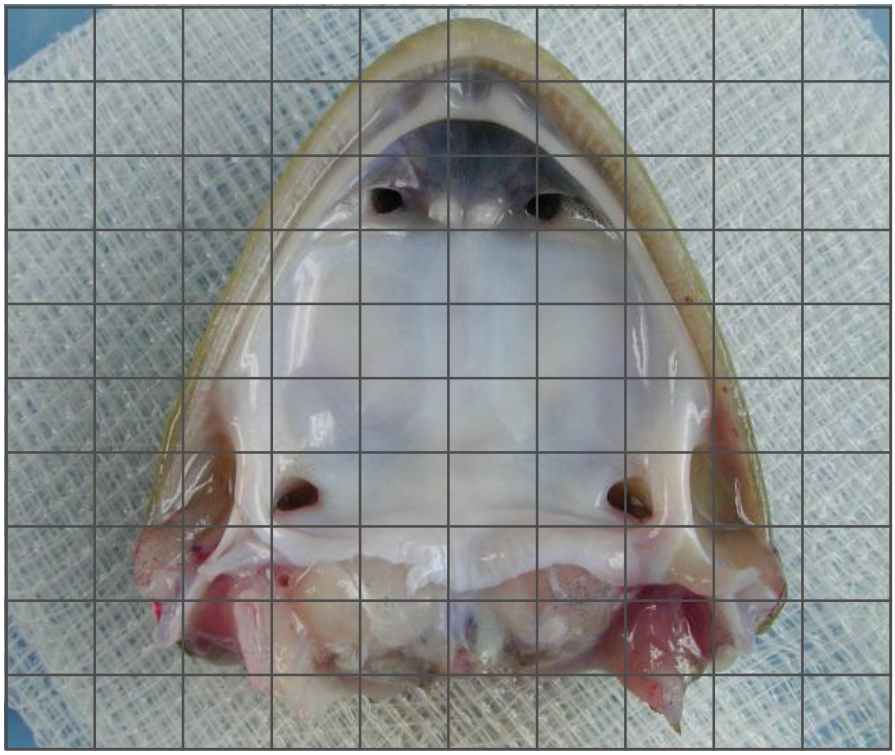


Figura 13 - Palato de rã sob a visão da ocular reticulada

4.8 Análise morfométrica – muco ácido e neutro

Os pulmões e vias aéreas foram fixados em formaldeído 10% e submetidos à preparação rotineira para confecção de lâminas histológicas. O estudo verificou as alterações na qualidade e quantidade de muco de células caliciformes, em lâminas coradas com Azul Alciano “Alcian Blue” (AB) para muco ácido e ácido periódico e reagente de Shiff “Periodic Acid-Schiff” (PAS) para muco neutro. A quantificação dos dois tipos de muco foi realizada com uso de microscópio óptico equipado com ocular reticulada de retas e pontos, determinando-se a porcentagem de muco estocado nas células caliciformes por área de epitélio[18] (Figura 14).

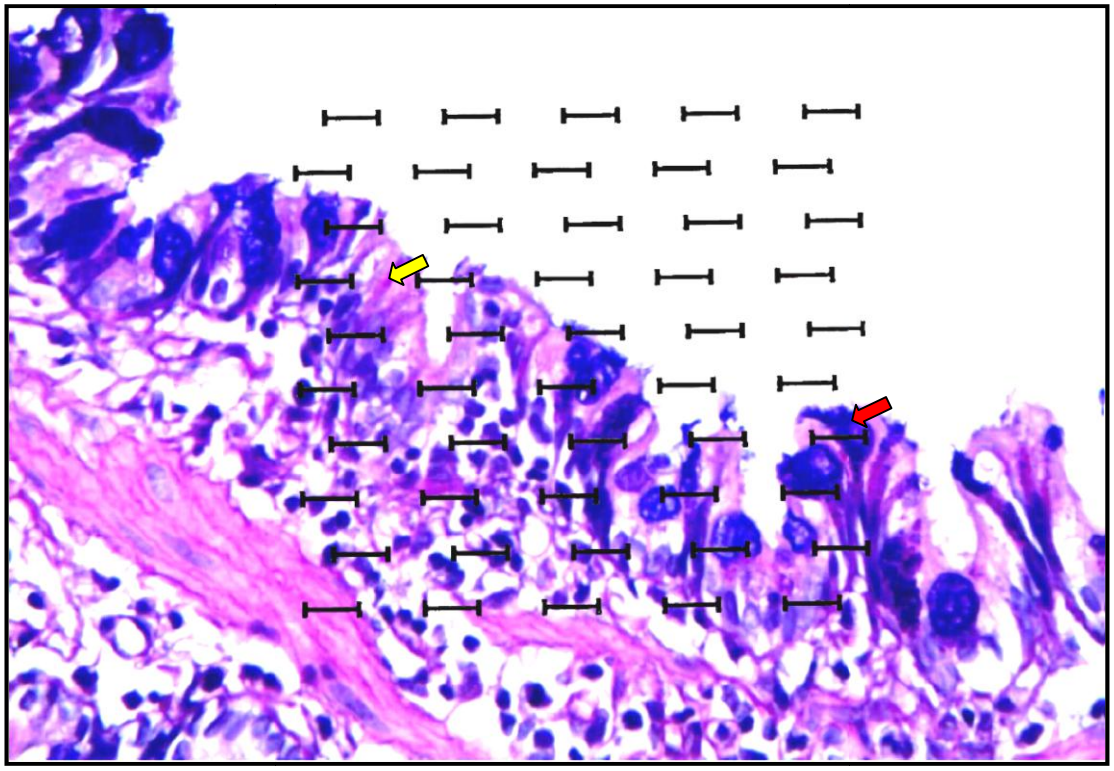


Figura 14 - Corte histológico da via aérea de pulmão de rato corado com PAS e AB com retículo de pontos e retas (aumento de 400x): seta amarela - célula caliciforme com muco neutro e seta vermelha - célula caliciforme com muco ácido

4.9 Avaliação da expressão do gene Muc5ac

4.9.1 Extração do RNA total

Foram realizadas análises qualitativas e quantitativas da expressão de mRNA para o gene Muc5ac de células caliciformes do tecido traqueobrônquico.

Primeiramente o RNA Total foi extraído utilizando-se 100 mL de trizol® para cada 100 mg de tecido. O material foi triturado no homogeneizador de microtubos, e após a homogeneização, foi acrescentado 0,2 mL (200 µL) de clorofórmio para cada 1 mL de trizol®. Os tubos foram agitados manualmente por inversão por 15 segundos e depois incubados por 3 minuntos (na bancada) em temperatura ambiente. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 12000 g por 15 minutos a 8ºC.

Após a centrifugação, nos tubos formaram-se 3 fases, sendo a primeira transparente, constituída de RNA total, a segunda branca e viscosa, formada por DNA e a última no fundo do tubo, de cor vermelha, formada por proteínas.

A fase aquosa transparente (sobrenadante) foi retirada e transferida para um tubo limpo. O RNA total foi precipitado com isopropanol (0,5 mL para cada 1mL de trizol®), ficando incubado por um período de 10 minutos em temperatura ambiente. Logo em seguida os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12000 g a 4ºC. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspendido em etanol 75% (1 mL de etanol para cada 1 mL de trizol®). Novamente os tubos foram centrifugados por 5

minutos a 7500 g a 4ºC. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ficou secando em temperatura ambiente. Após a secagem o pellet foi ressuspendido com H_2O tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) (Sigma, St. Louis, MO, USA).

As amostras foram dosadas em fluoespectrômetro Nanodrop 3300 (Thermo). Considerou-se que uma unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 40 µg/mL de RNA. A relação de absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm do RNA total foi calculada para a certificação da ausência de contaminação protéica. A integridade do RNA total foi analisada em gel de agarose 1%, em condições desnaturantes. Só foram utilizados os RNAs que apresentaram as bandas ribossômicas 28S e 18S. O RNA total foi utilizado imediatamente para a síntese da 1a fita de cDNA.

4.9.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A reação de transcriptase reversa para a obtenção do cDNA foi preparada utilizando-se o Kit Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Dois µg do RNA total foram utilizados para a transcrição reversa por meio de oligonucleotídeos iniciadores (randomprimers). Essa mistura foi incubada sequencialmente a 25ºC por 10 min., 42ºC por 50 min., 70°C por 15 min., e 4ºC por 1 min. O cDNAfoi armazenado a -20°C.

4.9.3 PCR em tempo real

A análise quantitativa do gene Muc5ac foi realizada por meio de PCR em tempo real. Dois microlitros de cDNA de cada amostra foi amplificada por meio do ensaio por SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen Valencia, CA, USA) em uma reação com volume final de 20 µL e primers específicos. O controle negativo da reação consistiu de água em substituição ao cDNA. A amplificação dos produtos de PCR foi realizada no equipamento Applied Biosystems StepOnePlus™. Os dados foram analisados pelo programa StepOne™ Software v2.2.2 com base no valor de Ct ("cicle threshold" ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge dado limiar, o que permite a análise quantitativa da expressão do fator em avaliação.

Os valores de Ct obtidos nesses experimentos foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA em relação aos do gene constitutivo da fosfoproteína ribossomal acídica (ARBP), que foi amplificado para normalização das amostras.

Essa relação é denominada pelo Delta Delta Ct (ΔΔCt) que é calculada pela fórmula:

ΔCt da amostra = (Ct gene-alvo - Ct gene endógeno)

ΔCt da amostra referência = (Ct gene-alvo - Ct gene endógeno)

ΔΔCt = (ΔCt amostra – ΔCt amostra referência)

Em função da característica logarítmica dessa variável, foi utilizado o parâmetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a análise dos dados conforme recomendado na

literatura[87]. Assim, foi possível determinar a expressão gênica individual de cada animal.

As sequências dos primers específicos para o gene Muc5ac de ratos que foram utilizados neste estudo estão depositada no GenBank (acesso nº AB042530)[88]:

Fita sense, 5'-AACTCTGCCCACCACAAGC-3';

Fita antisense, 5'-TGCCATCTATCCAATCAGTCCAAT-3'.

4.10 Avaliação da concentração da proteína mucina do gene Muc5ac

4.10.1 Extração e quantificação da proteína total

A proteína total foi extraída de 100 mg de tecido pulmonar de cada amostra utilizando a solução de lise "RIPA Lysis Buffer 1x" Santa Cruz (SC-24948). As amostras foram colocadas em tubos juntamente com a solução de lise e 5 beads de aço utilizadas para lise de materiais. O equipamento utilizado para lise das amostras foi o (Cryolys Cooling - modelo BC-CRLS)

Após a lise, os tubos foram transferidos para uma centrífuga e foram centrifugados por 20 minutos a 4°C a 1500 RPM. Terminada a centrifugação, o sobrenadante contendo proteína total, foi transferido para um tubo limpo. O pellet foi descartado.

Para a obtenção do valor de concentração das amostra, em cada poço de uma placa de ELISA, foi colocado 10 µL de cada amostra diluída

40X em PBS e 80 µL de solução de BCA do kit BCA assay da Thermo. A quantificação da proteína total foi realizada utilizando-se o equipamento de leitura de microplacas ELISA da Molecular Devices modelo SpectraMax I3.

4.10.2 Quantificação da proteína mucina do gene Muc5ac por Dot Blot

A técnica de dot blot basicamente, consiste na fixação das proteínas na forma de pontos em uma membrana de nitrocelulose (Figura 15). A transferência das proteínas para a membrana ocorre através da formação de vácuo gerado pele equipamento de dot blot, que consiste de uma placa com 96 poços e uma câmara conectada à um compressor de ar utilizado para gerar o vácuo (figura 16). A membrana de nitrocelulose juntamente com um filtro é colocada entre a placa de 96 poços e a câmera.

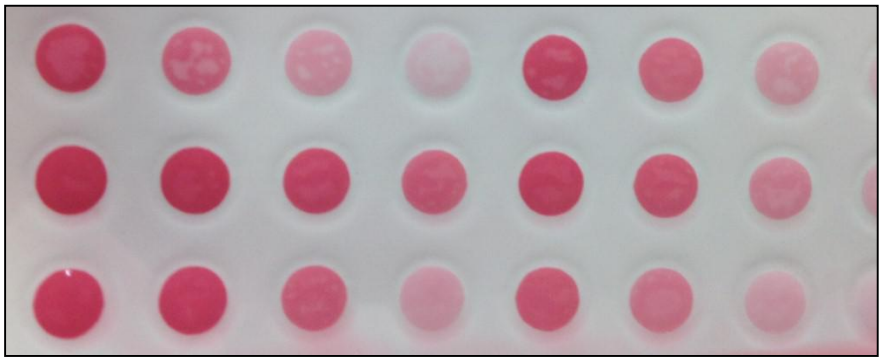


Figura 15 – Membrana de nitrocelulose com os pontos de proteínas aderidos e corados com ponceau

Figura 16 – Equipamento de dot blot utilizado para transferência da proteína para a membrana de nitrocelulose

Com objetivo de obter a melhor diluição para a análise de concentração da proteína mucina do gene Muc5ac, 12,5 µg/µl da proteína total de cada amostra foi diluída 50X em solução de PBS. Após esta diluição foi realizada uma diluição seriada em solução de PBS 1:2, 1:4 e 1:8. Estas diluições de cada amostra foram aplicadas na placa de dot blot com volume de 200 µL.

Após a adsorção das amostras na membrana de nictrocelulose, o bloqueio foi realizado com solução de leite desnatado a 5% em tampão contendo tris base 10 mM, NaCl 150 mM e 0,05% de Tween, pH7,4 (TBS-T).

A detecção da proteína mucina do gene Muc5ac foi realizada pela incubação com anticorpo primário Santa Cruz® (Mucin 5AC Anticorpo (45M1): sc-21701) diluído 1:500 em TBS-T por 16 horas a 4°C. Após este período, a membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo secundário

fluorescente (LI-COR Biociences) anti-mouse diluído 1:2000 em TBS-T por uma hora em temperatura ambiente. A revelação foi realizada pelo método fluorescente no sistema Odyssey imaging system (LI-COR Biociences). A densitometria das marcações foi realizada utilizando o software do sistema Odyssey.

4.11 Avaliação de células apoptóticas por imuno-histoquímica

4.11.1 Preparo das lâminas para imuno-histoquímica

Primeiramente, foi montado o conjunto de lâminas silanizadas contendo os cortes de tecido de aproximadamente 3 a 4 µm de espessura, em suporte adequado.

Em seguida, as lâminas passaram rapidamente em três banhos de xilol frio, dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um banho de álcool 70°. Terminado os banhos, iniciou-se a desparafinização do tecido em xilol à quente, em estufa à 60 - 65°C, durante 10 à 20 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas em água corrente e depois em água ultra pura. Após as lavagens, as lâminas foram mergulhadas em ácido fórmico por 3 minutos e depois lavadas novamente com água corrente e água ultra pura.

Para todos os marcadores a recuperação dos antígenos foi realizada em alta temperatura em panela de pressão pascal (Dako) por 1 minuto à 125°C, onde as lâminas foram colocadas em solução de citrato pH 6,0. Após

esse processo, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada.

Para a realização do bloqueio, foi utilizada uma mistura meio a meio de metanol com água oxigenada (3%) por 10 minutos, essa operação foi repetida duas vezes. Após o bloqueio, as lâminas foram lavadas em água corrente, depois com água destilada e por fim, com PBS três vezes por três minutos.

Na sequência, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários em câmera úmida, permanecendo na geladeira por um período de 18 - 20 horas. A titulação do anticorpo para Caspase 3 (NB 500-210, Novus Biologicals) foi de 1:2400 e para o anticorpo para Bcl-2 (NB 100-56101, Novus Biologicals) a titulação foi de 1:100.

Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas com TBS por 3 minutos e depois incubadas com por 30 minutos à 37°C com o polímero-HRP EasyLink One (ref. 12-20502 Immunobioscience, EUA).

Na sequência da incubação com o polímero-HRP, as lâminas foram lavadas com TBS três vezes por 3 minutos e então foi realizada a revelação colocando as lâminas em solução de cromógeno (70 mg de DAB - diaminovenzidina) em 100 mL de tris-HCL pH 7,6 + 30 uL de água oxigenada 30 V por 5 minutos, sendo realizada lavagens em água corrente após esse período.

Por fim, foi realizada a contra coloração em Hematoxilina de Harris por 20 segundos para cada lâmina e a lavagem em água corrente por 5 minutos.

4.11.2 Quantificação de células positivas para Bcl-2 e Caspase 3

A quantificação da porcentagem de células da via aérea marcadas para Bcl-2 e Caspase 3 foi realizada com uso de microscópio óptico equipado com ocular reticulada de retas e pontos, foram contadas as células positivas e negativas que coincidiram com os pontos do retículo, e desta forma foi calculada a porcentagem das células positivas para os marcadores de Bcl-2 e Caspase 3 (Figura 17).

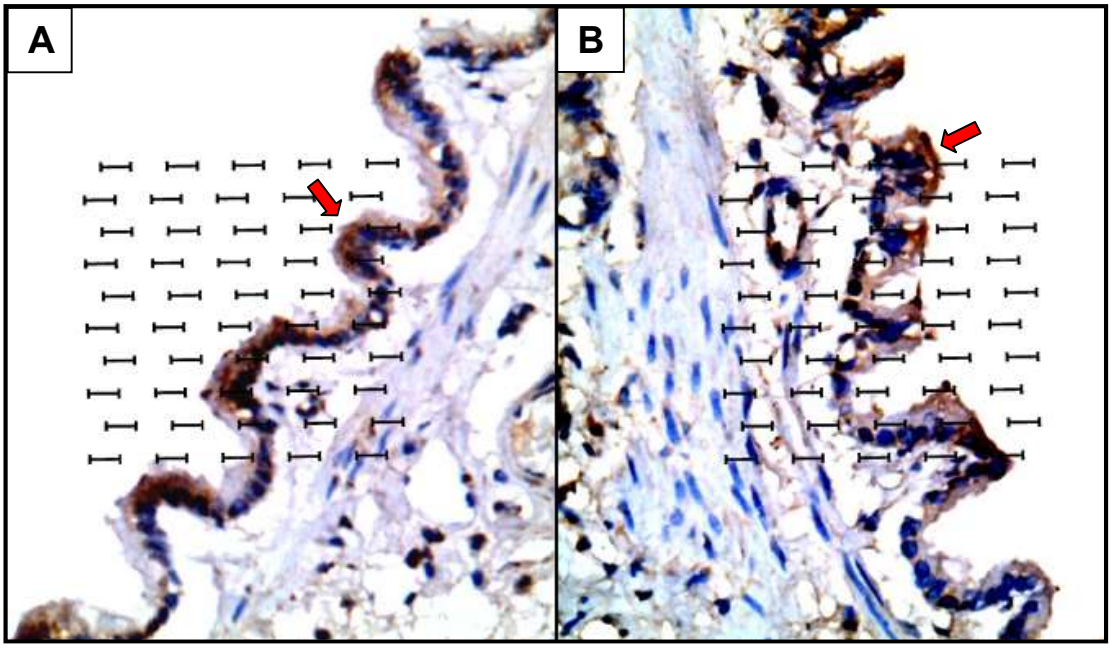


Figura 17 - Cortes histológicos de vias aéreas de pulmões de ratos com retículo de pontos e retas (aumento de 400x): Em A, a seta indica células do epitélio da via aérea imunocoradas com anticorpos para Bcl-2 e em B, a seta indica células do epitélio da via aérea imunocoradas com anticorpos para Caspase 3

4.12 Análise estatística

4.12.1 Estatística descritiva

As análises descritivas para os dados quantitativos que apresentaram distribuição normal foram realizadas, apresentado as médias acompanhadas dos respectivos desvios padrão (+dp). Para os dados quantitativos sem distribuição normal, foram expressos através das medianas e intervalo interquartil IQ(25 – 75%). Os pressupostos da distribuição normal em cada grupo e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliados respectivamente, com o teste de Shapiro-Wilk e com o teste de Levene.

4.12.2 Estatística inferencial

Para as variáveis quantitativas que apresentaram distribuição normal onde foram analisados dois fatores (grupo e tempo), foi utilizada a Análise de Variância de Duplo Fator (ANOVA), e quando foi necessária a realização de comparações múltiplas de médias, foi utilizado o teste de Bonferroni. Quando a variável não apresentou distribuição normal, recorremos ao teste Kruskal-Wallis para o fator grupo e quando foi necessário a realização de comparações múltiplas, foi utilizado o teste de Dunn. Para o fator tempo foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Todas as análises foram realizadas no software SPSS 21 for Windows com nível de significância de $\alpha=0,05$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Análise do lavado broncoalveolar (LBA)

Na avaliação do número de leucócitos encontrados no LBA dos animais tratados por 7 e 15 dias, não foi encontrada diferença estatisticamente significante na comparação entre os grupos (Gráficos 1 e 2). Na comparação entre os tempos 7 e 15 dias de cada grupo, foi encontrada diferença estatisticamente significante nos grupos Basiliximabe e Tríplice, sendo que em 15 dias o número de leucócitos foi maior do que em 7 dias (Gráfico 3).

Gráfico 1 - Comparação do número de leucócitos encontrados no LBA entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice tratados por 7 dias

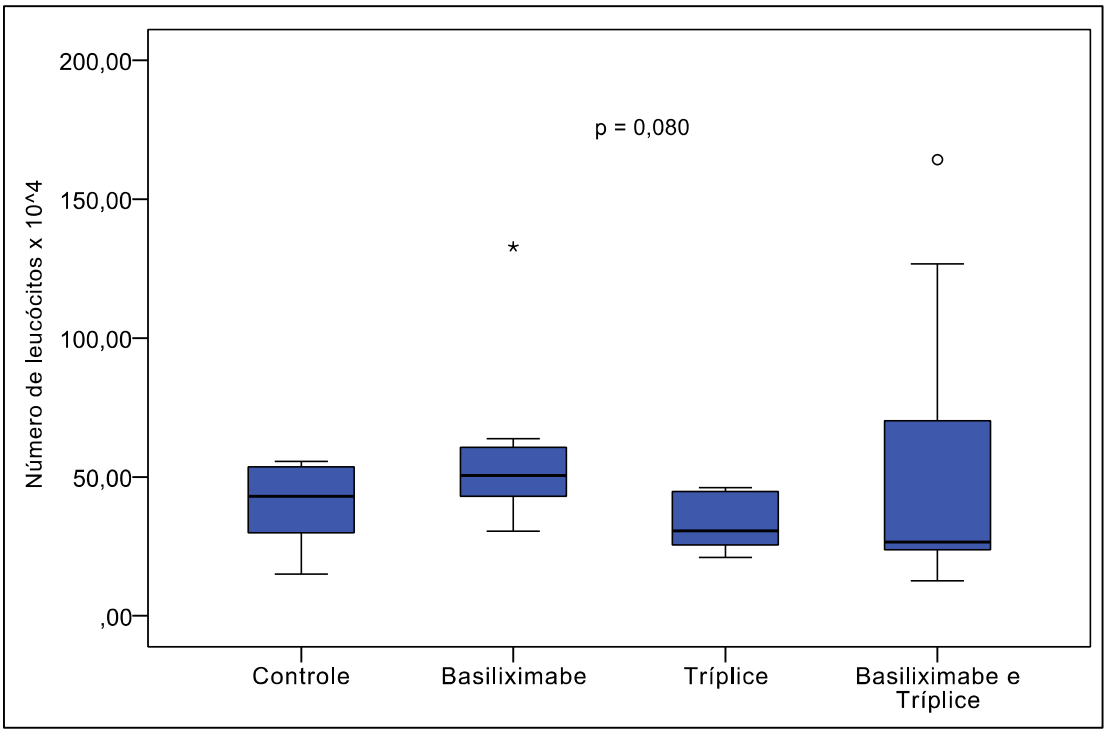


Gráfico 2 - Comparação do número de leucócitos encontrados no LBA entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice tratados por 15 dias

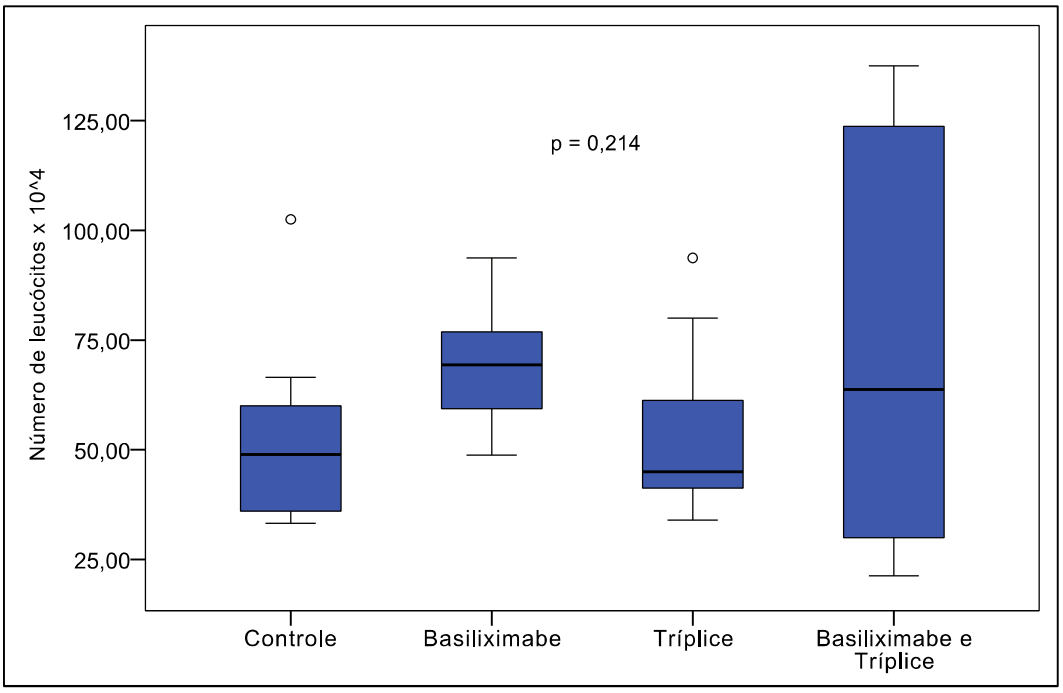
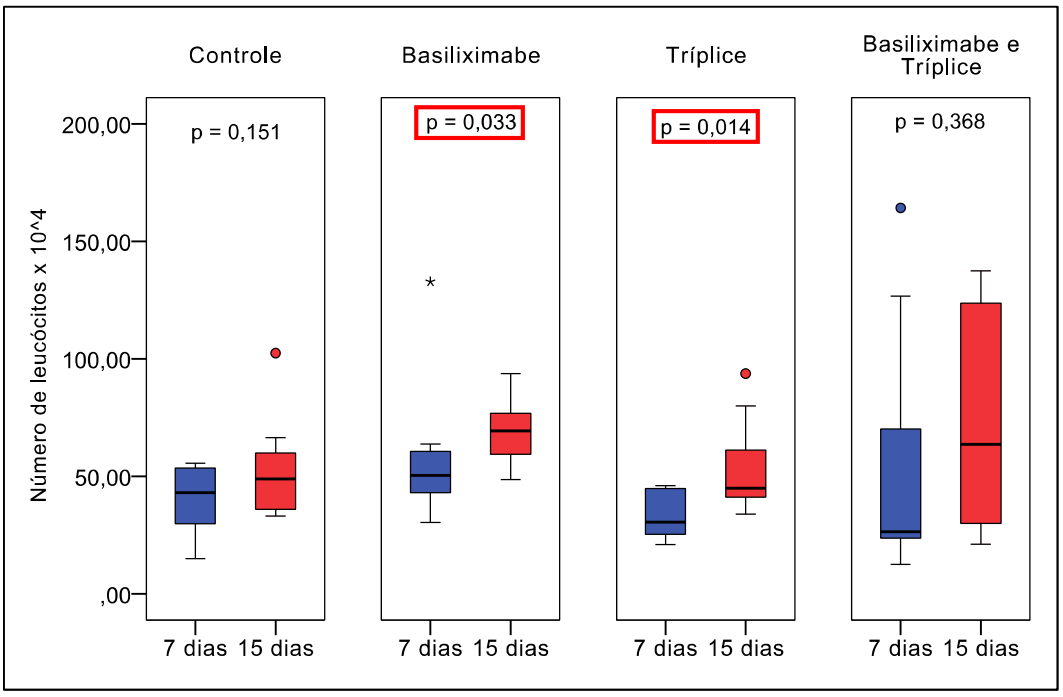


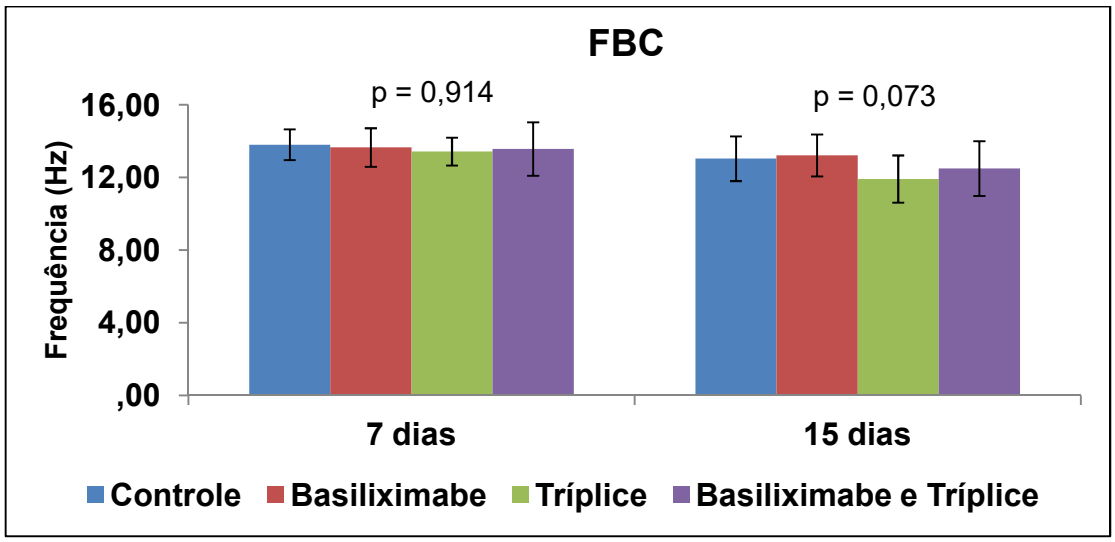
Gráfico 3 - Comparação do número de leucócitos encontrados no LBA entre os tempos 7 e 15 dias de cada grupo: Controle, Basiliximabe, Tríplice, e Basiliximabe+Tríplice



5.2 Determinação da FBC

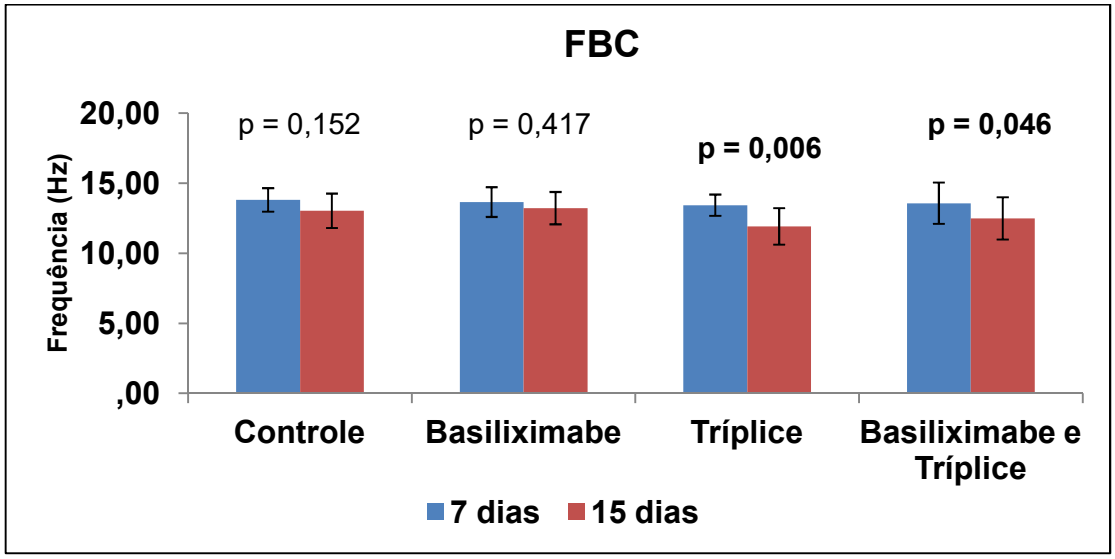
Não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os grupos dentro de cada tempo estudado quanto a FBC (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Comparação da FBC entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice em 7 e 15 dias.



Nas comparações entre os tempos 7 e 15 dias, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quanto a FBC nos grupos tratados com a terapia tríplice e terapia tríplice combinada com basiliximabe (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Comparação da FBC entre os tempos de 7 e 15 dias nos grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice



5.3 Determinação da VTMC

Nos grupos tratados por 7 dias, a droga basiliximabe diminuiu a VTMC quando administrada isoladamente e combinada com a terapia tríplice. Nos grupos tratados por 15 dias, a VTMC foi mais baixa nos grupos tratados com a terapia tríplice isolada e combinada com basiliximabe (Gráfico 6 e Tabela 1).

Gráfico 6 – Comparação da VTMC entre grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice em 7 e 15 dias

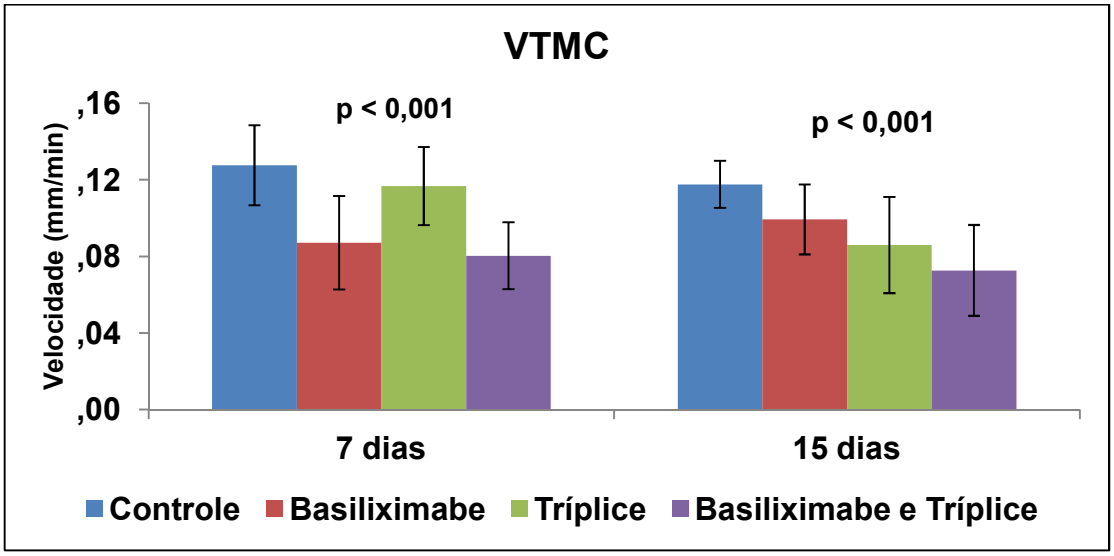
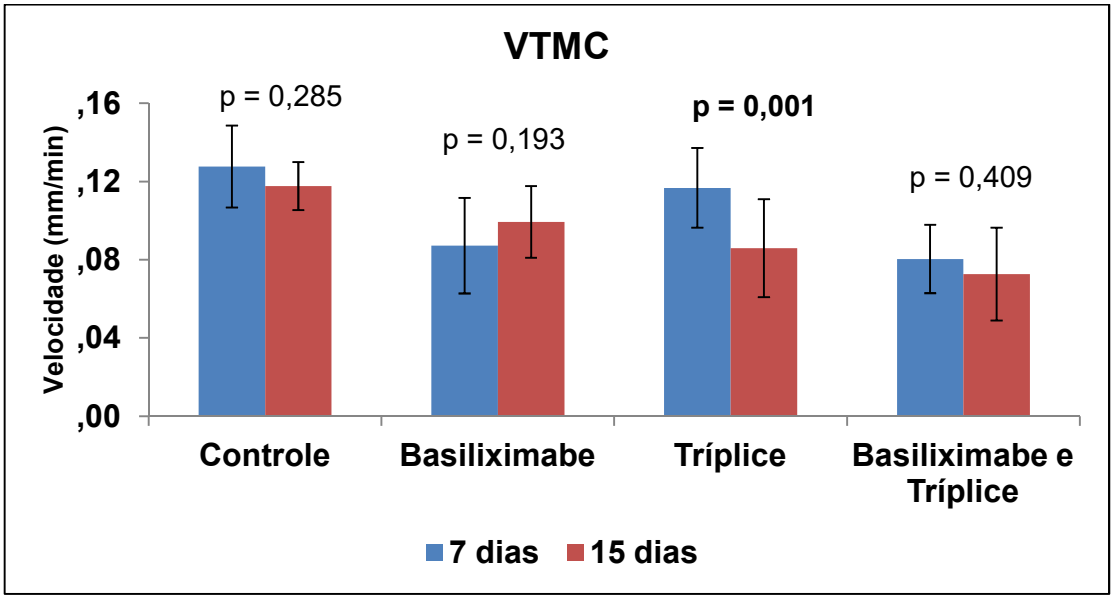


Tabela 1 – Comparações múltiplas entre os grupos tratados por 7 e 15 dias da VTMC

Grupos	p	
	7 dias	15 dias
Controle x Basiliximabe	**< 0,001**	0,311
Controle x Tríplice	> 0,999	**0,006**
Controle x Basiliximabe+Tríplice	**< 0,001**	**< 0,001**
Basiliximabe x Tríplice	**0,013**	0,910
Basiliximabe x Basiliximabe+Tríplice	> 0,999	**0,031**
Tríplice x Basiliximabe+Tríplice	**0,001**	0,942

Nas comparações entre os tempos, o único grupo que apresentou diferença estatisticamente significante foi o grupo tratado com a terapia tríplice (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Comparação da VTMC entre os tempos de 7 e 15 dias nos grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice



5.4 Transportabilidade do muco - *in vitro*

Nos grupos tratados por 7 dias, não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os grupos (Gráfico 8). Nos grupos tratados por 15 dias, a velocidade relativa de transporte do muco foi mais baixa no grupo tratado com a terapia tríplice combinada com basiliximabe comparado com o grupo controle. (Gráfico 9 e tabela 2).

Gráfico 8 - Comparação da velocidade relativa de transporte do muco no palato de rã entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 7 dias

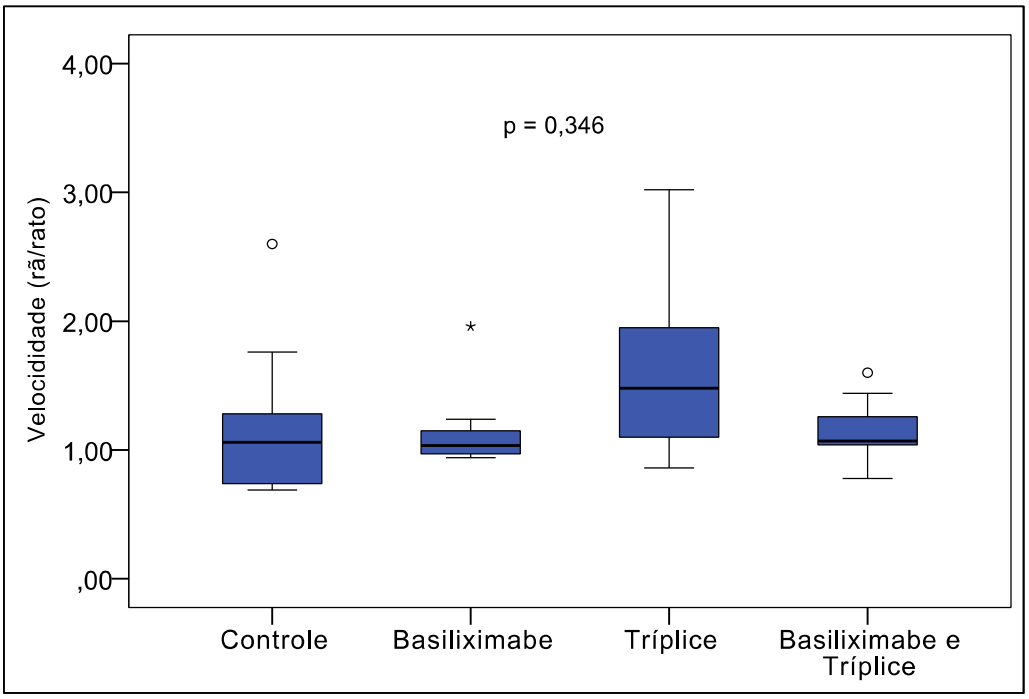


Gráfico 9 - Comparação da velocidade relativa de transporte do muco no palato de rã entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 15 dias

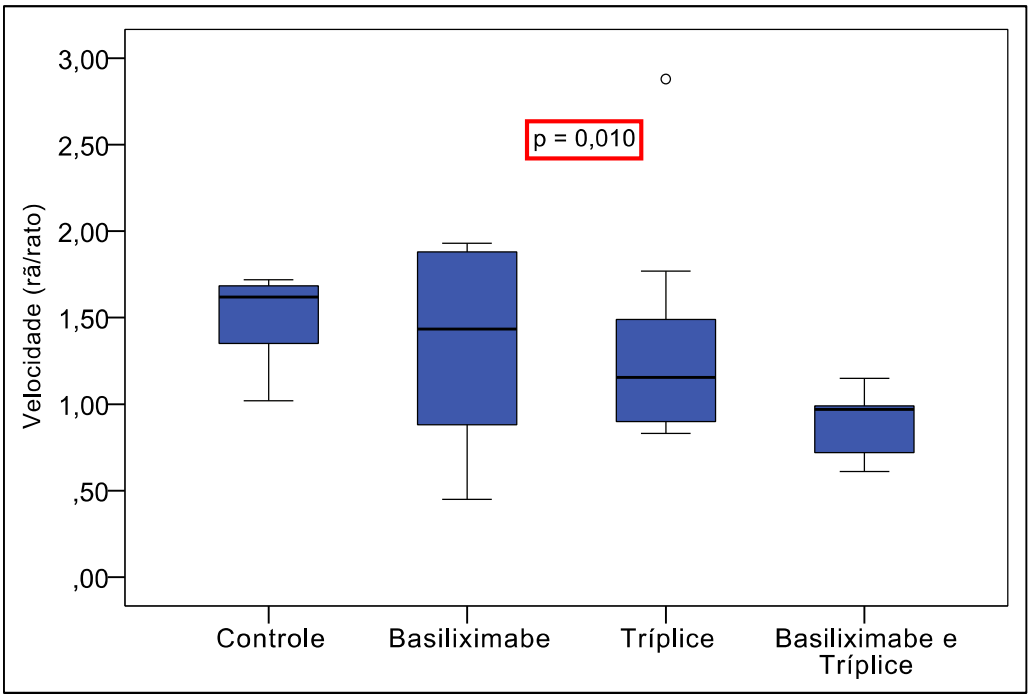
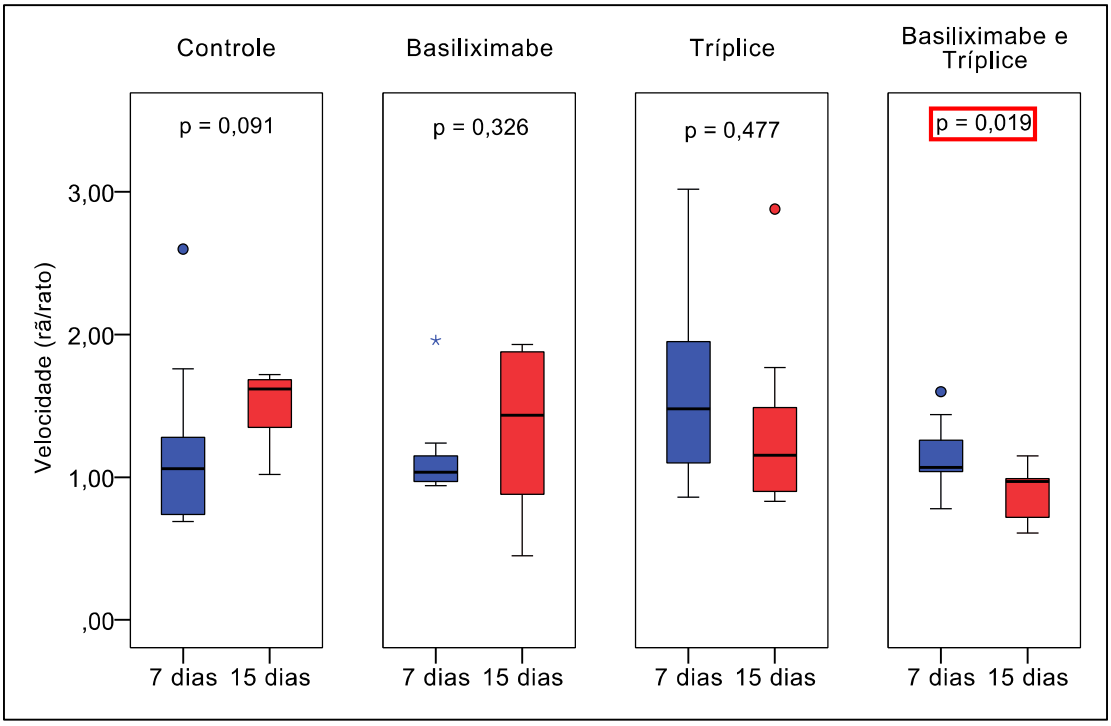


Tabela 2 – Comparações múltiplas da velocidade relativa de transporte do muco no palato de rã dos animais tratados por 15 dias

Grupos	p
Controle x Basiliximabe	0,999
Controle x Tríplice	0,999
Controle x Basiliximabe+Tríplice	**0,050**
Basiliximabe x Tríplice	0,999
Basiliximabe x Basiliximabe+Tríplice	0,205
Tríplice x Basiliximabe+Tríplice	0,292

Na comparação entre os tempos de 7 e 15 dias, somente o grupo Basiliximabe+Tríplice apresentou diferença estatisticamente significante, sendo que os animais tratados por 15 dias apresentaram mediana de velocidade relativa de transporte do muco menor do que dos animais tratados por 7 dias (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Comparação da velocidade relativa de transporte do muco no palato de rã entre os tempos de 7 e 15 dias nos grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice



5.5 Análise morfométrica - muco ácido e neutro

Não houve diferença estatisticamente significante quanto a quantidade de muco ácido entre grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice, tratados por 7 e 15 dias (Gráficos 11 e 12).

Gráfico 11 - Comparação da porcentagem de muco ácido das células caliciformes entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 7 dias

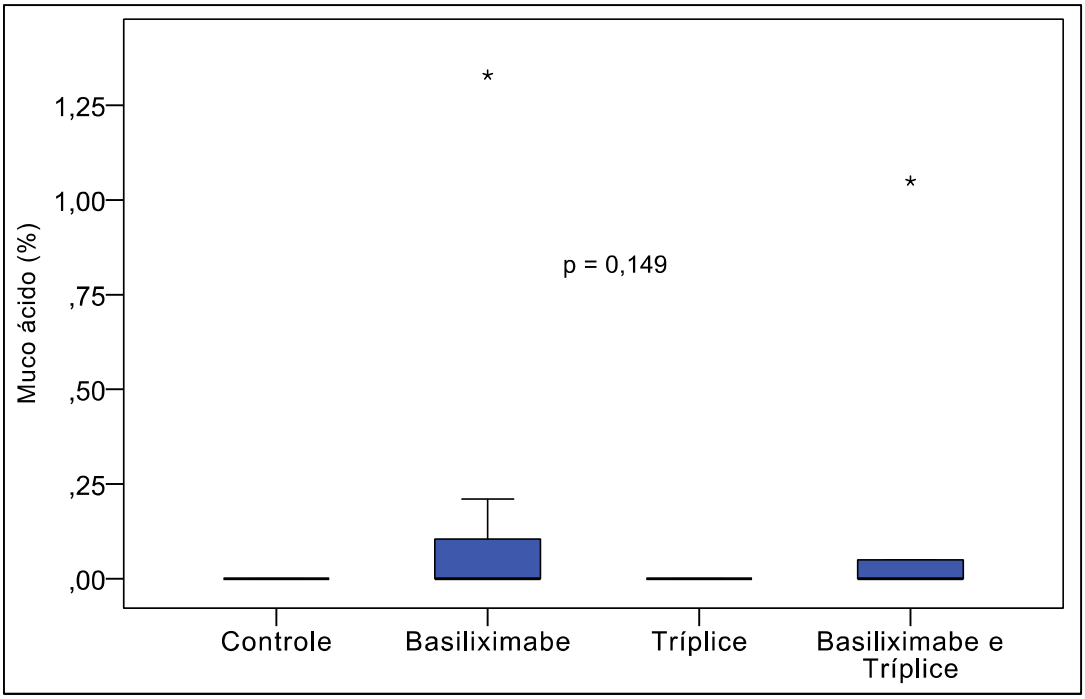
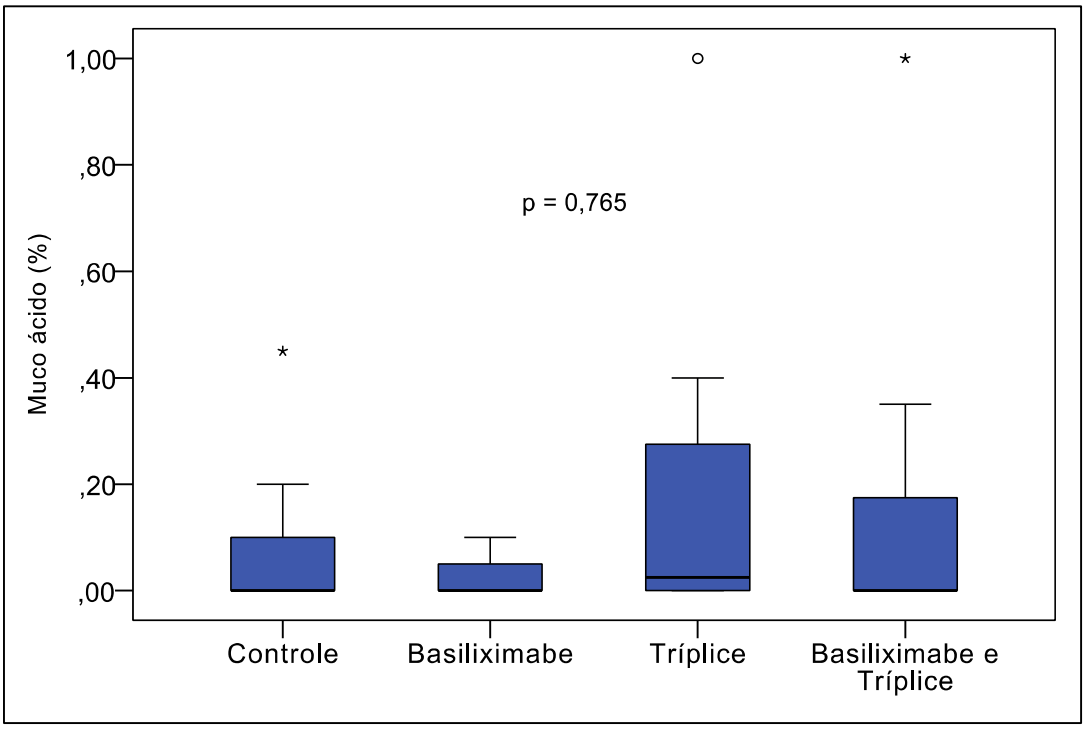
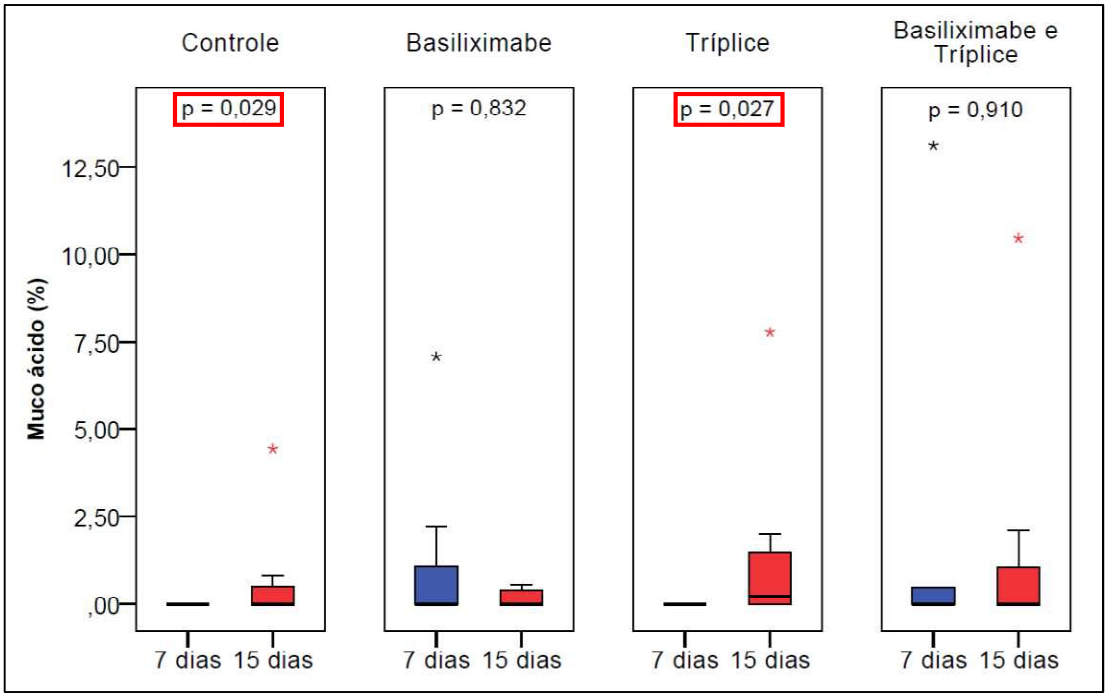


Gráfico 12 - Comparação da porcentagem de muco ácido das células caliciformes entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 15 dias



Na comparação da porcentagem de muco ácido entre os tempos de 7 e 15 dias, somente os grupos Controle e Tríplice apresentaram diferença estatisticamente significante, sendo que os animais tratados por 15 dias apresentaram mediana de porcentagem do muco ácido maior do que dos animais tratados por 7 dias (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Comparação da porcentagem de muco neutro entre os tempos dentro de cada grupo: Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice



Não houve diferença estatisticamente significante quanto a quantidade de muco neutro entre grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice, tratados por 7 e 15 dias (Gráficos 14 e 15).

Gráfico 14 - Comparação da porcentagem de muco neutro das células caliciformes entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 7 dias

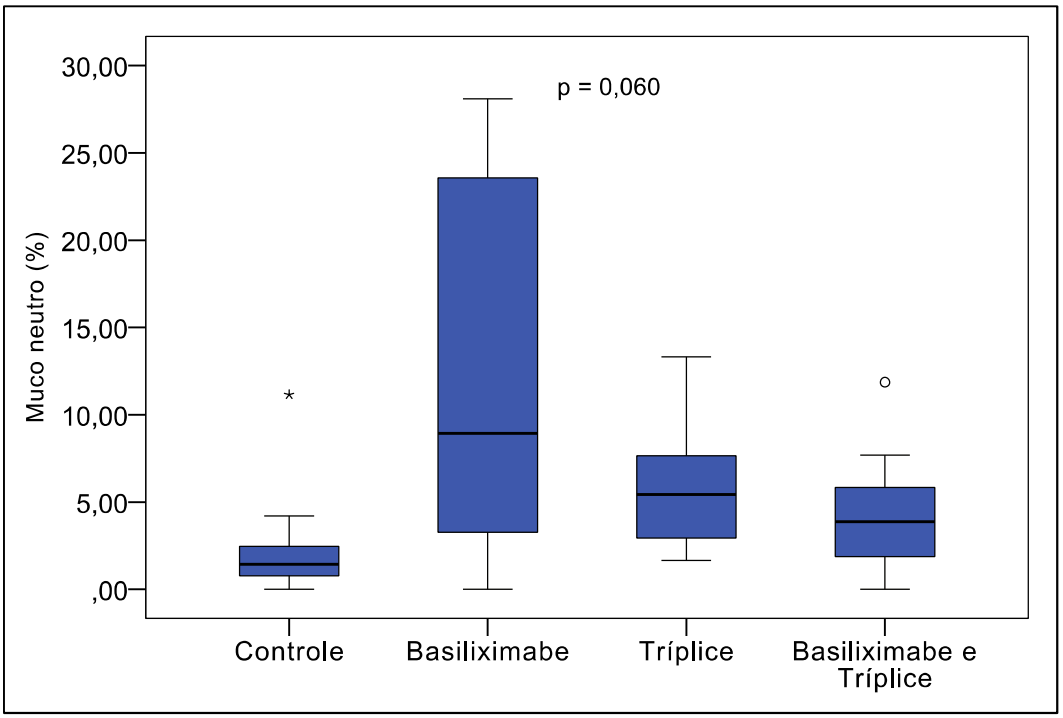
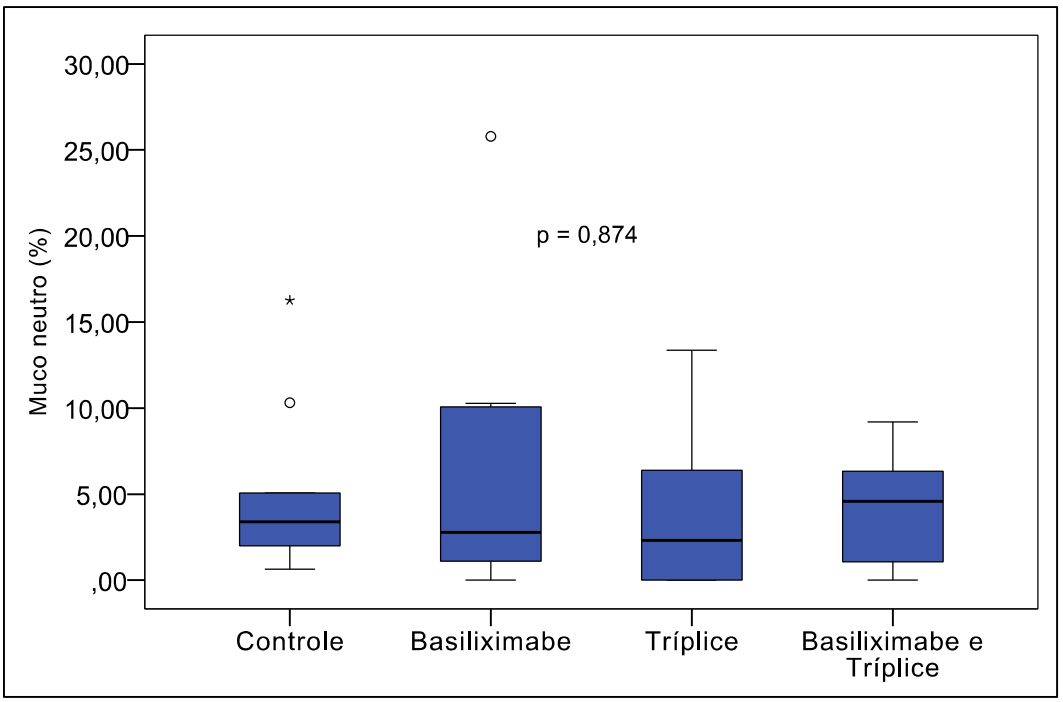
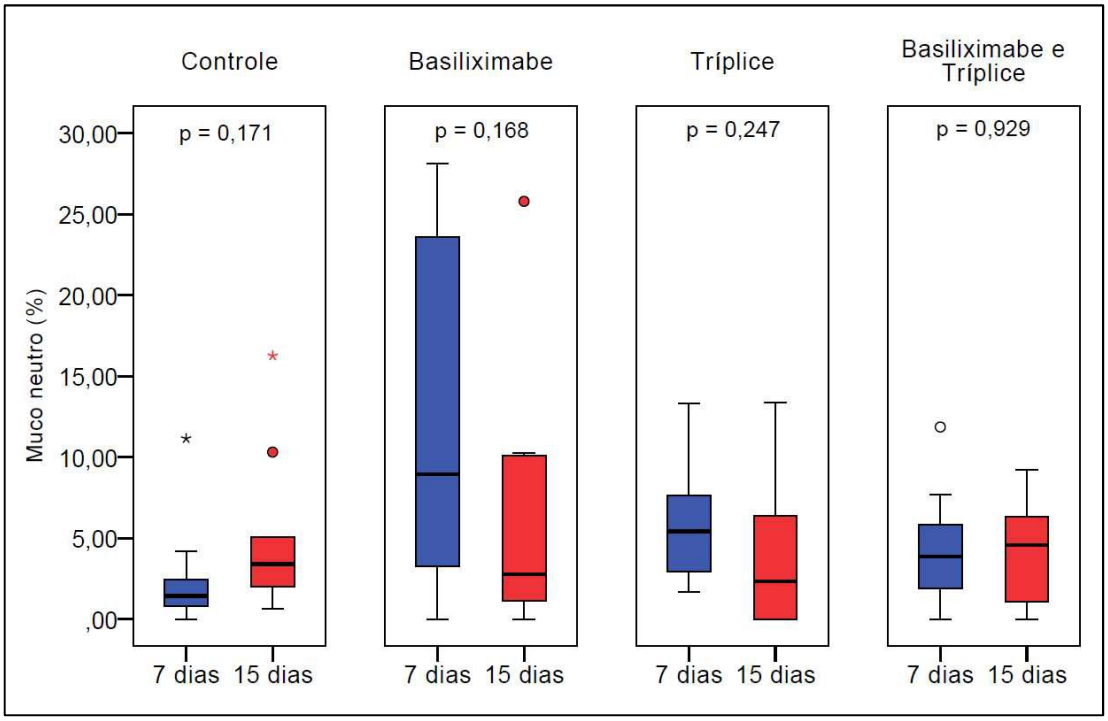


Gráfico 15 - Comparação da porcentagem de muco neutro das células caliciformes entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 15 dias



Na comparação da porcentagem de muco neutro entre os tempos de 7 e 15 dias, não foi encontrada diferença estatisticamente significante em nenhum dos grupos (Gráfico 16).

Gráfico 16 - Comparação da porcentagem de muco neutro das células caliciformes entre os tempos dentro de cada grupo: Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice



5.6 Análise quantitativa da expressão do gene Muc5ac

Não houve diferença estatisticamente significante quanto à concentração relativa de RNAm do gene Muc5ac entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice, tratados por 7 e 15 dias e na comparação entre os tempos de 7 e 15 dias para cada grupo. (Gráficos 17, 18 e 19).

Gráfico 17 - Comparação da expressão relativa do gene Muc5ac entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 7 dias

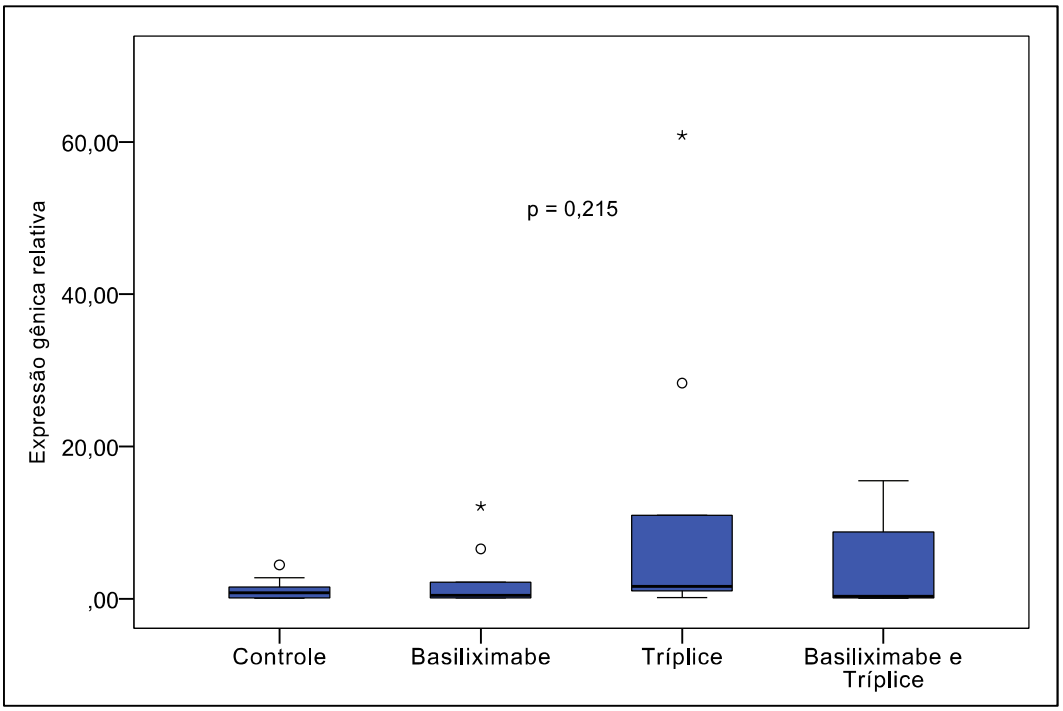


Gráfico 18 - Comparação da expressão relativa do gene Muc5ac entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 15 dias.

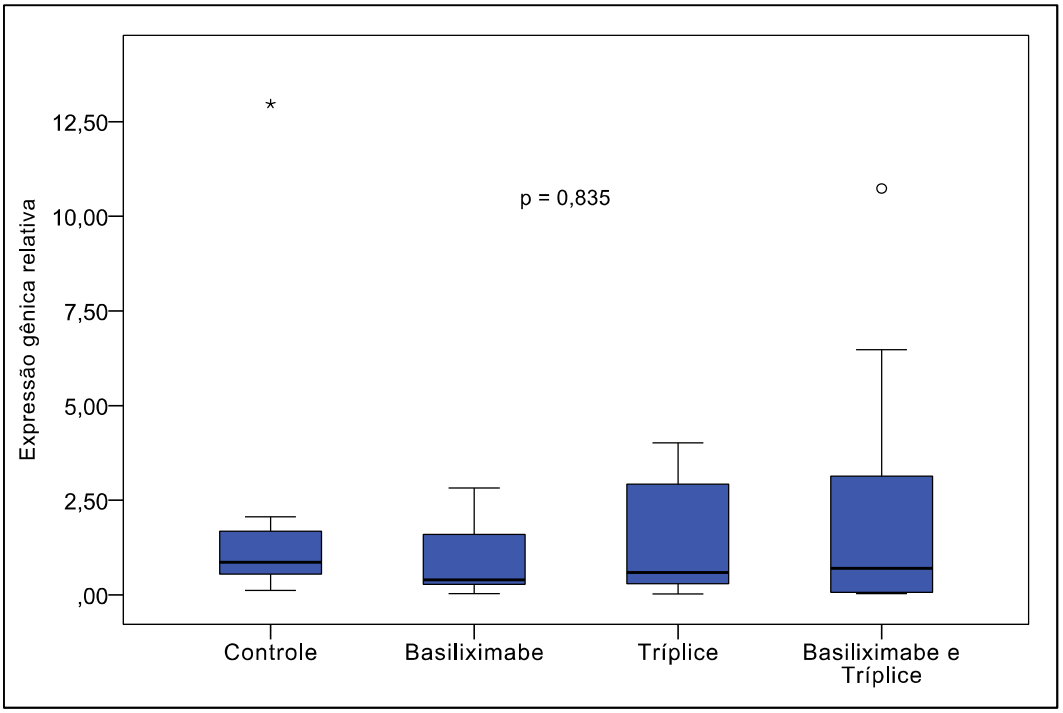
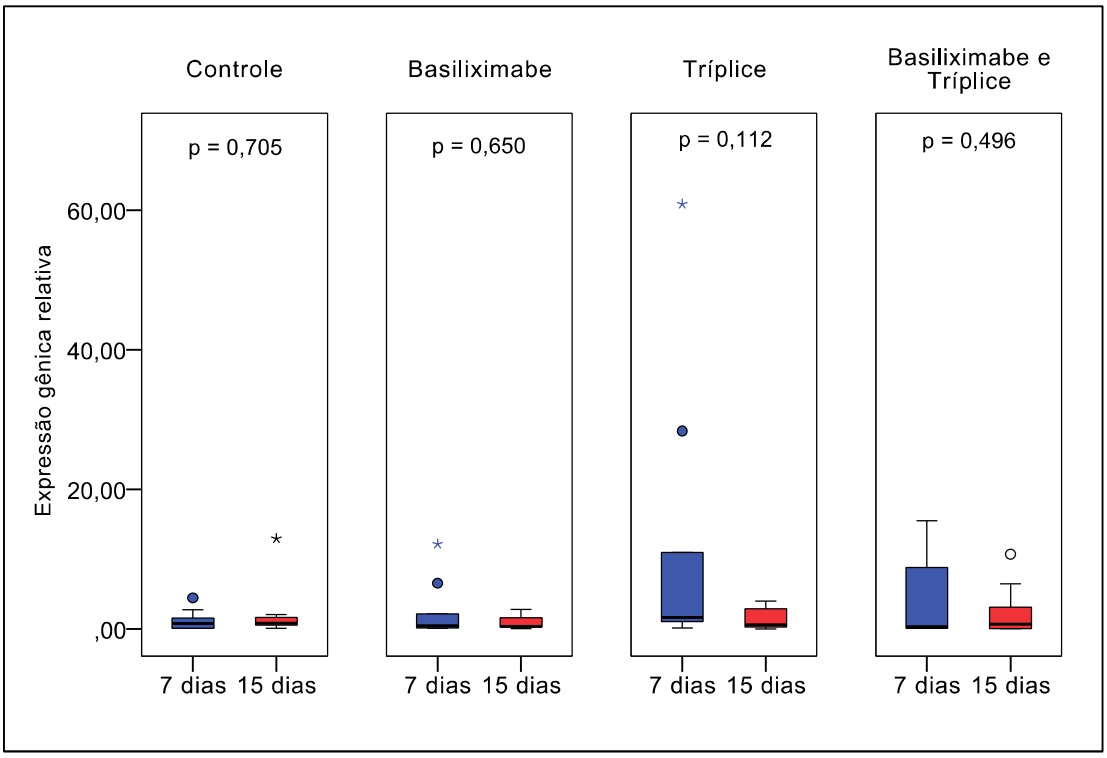


Gráfico 19 - Comparação da expressão relativa do gene Muc5ac entre os tempos dentro de cada grupo: Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice



5.7 Avaliação da concentração da proteína mucina do gene Muc5ac por Dot Blot

Não houve diferença estatisticamente significante quanto à intensidade do dot blot da proteína mucina do gene Muc5ac entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice, tratados por 7 e 15 dias. Na comparação entre os tempos de 7 e 15 dias para cada grupo, só no grupo controle, foi encontrada diferença estatísticamente significante, sendo que os animais tratados por 15 dias apresentaram mediana da intensidade do dot blot da concentração da mucina menor do que os animais tratados por 7 dias (Gráficos 20, 21 e 22).

Gráfico 20 - Comparação da concentração da proteína mucina do gene Muc5ac entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 7 dias

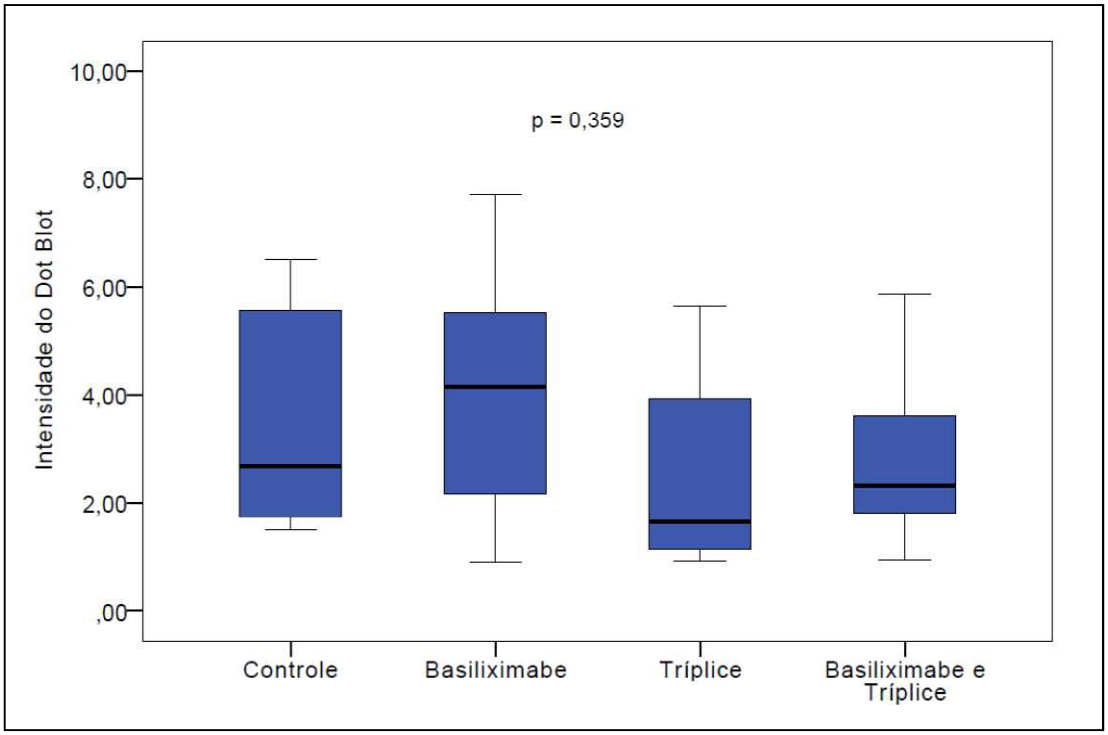


Gráfico 21 - Comparação da concentração da proteína mucina do gene Muc5ac entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 15 dias

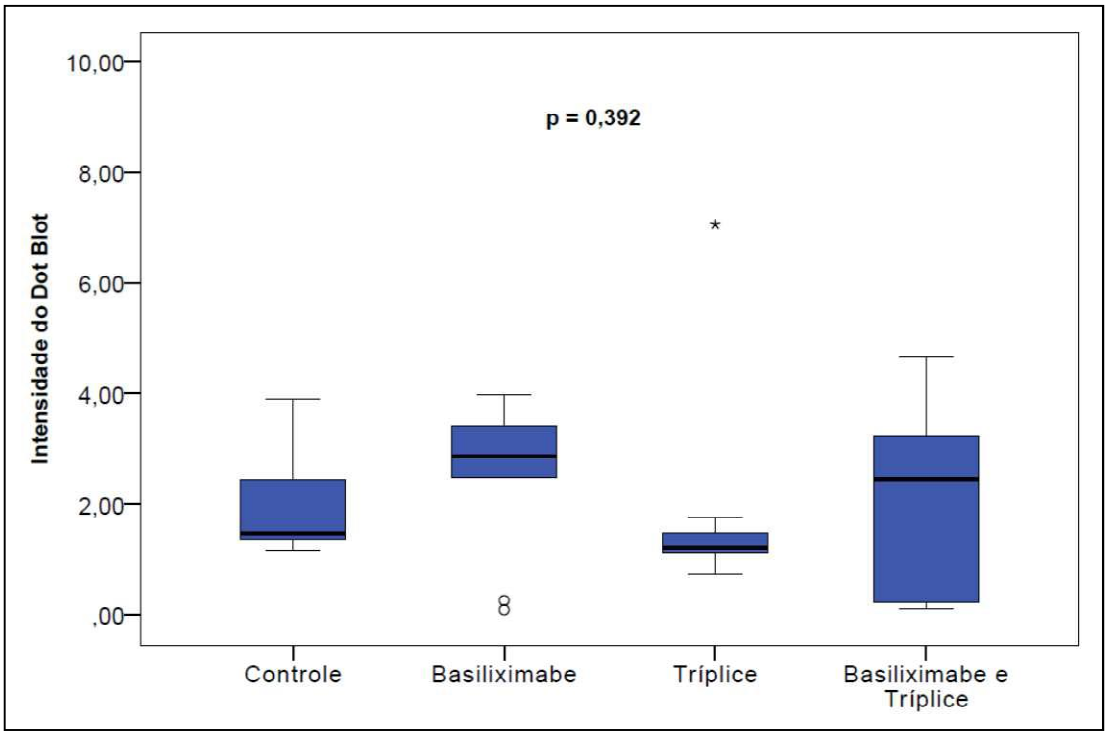
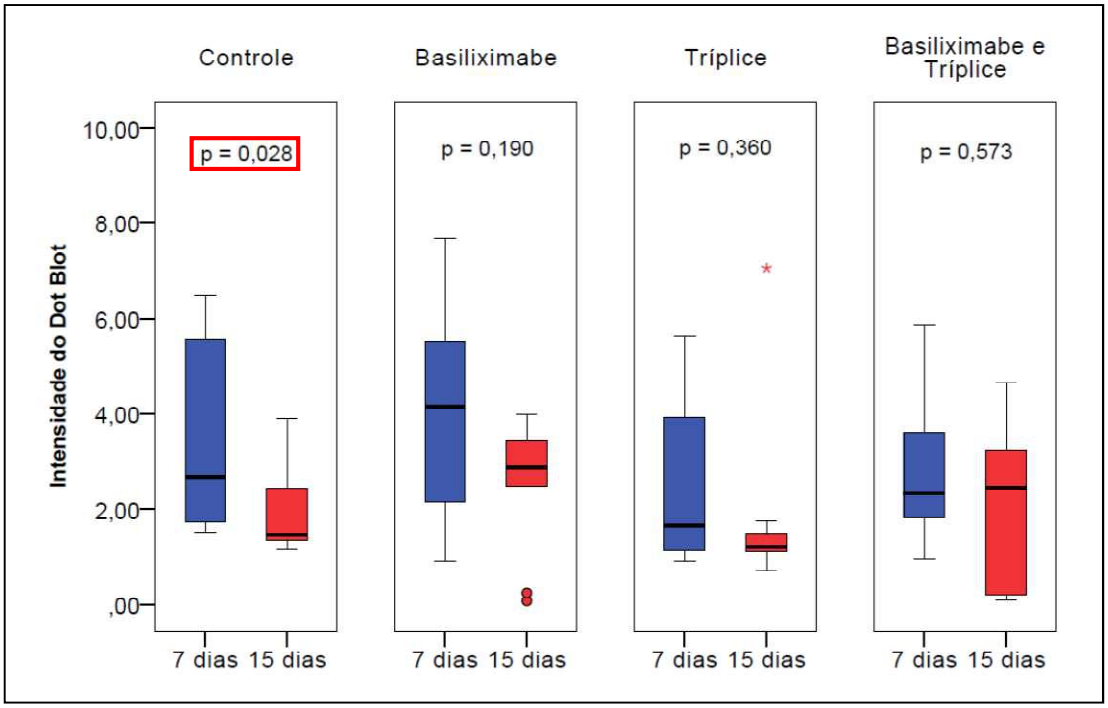


Gráfico 22 - Comparação da concentração da proteína mucina do gene Muc5ac entre os tempos dentro de cada grupo: Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice



5.8 Quantificação de células marcadas com anticorpo anti-Bcl-2

Houve diferença estatisticamente significante quanto à porcentagem de células da via aérea marcadas com anticorpo anti-Bcl-2 entre os grupos tratados por 7 dias, sendo que o grupo Basiliximabe+Tríplice apresentou uma porcentagem média de células marcadas para Bcl-2 maior do que o grupo Tríplice e o grupo Basiliximabe. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos tratados por 15 dias (Gráfico 23 e Tabela 3). Na comparação entre os tempos de 7 e 15 dias para cada grupo, com exceção do grupo Basiliximabe+Tríplice, todos os grupos apresentaram diferença estatísticamente significante, sendo que os animais tratados por 15 dias

apresentaram porcentagem média de células marcadas para Bcl-2 maior do que os animais tratados por 7 dias (Gráfico 24).

Gráfico 23 - Comparação do número de células da via aérea marcadas com anticorpo anti-Bcl-2 entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 7 e 15 dias

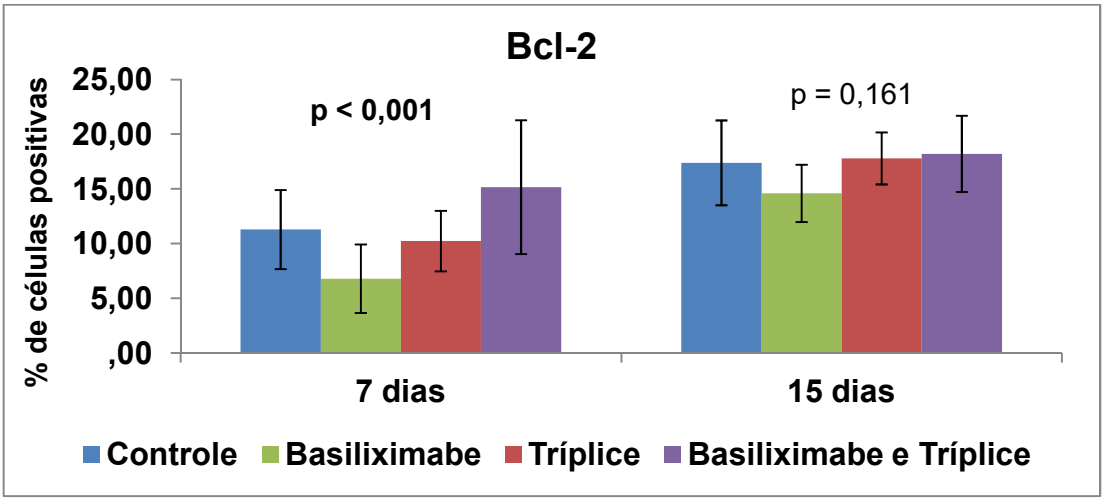
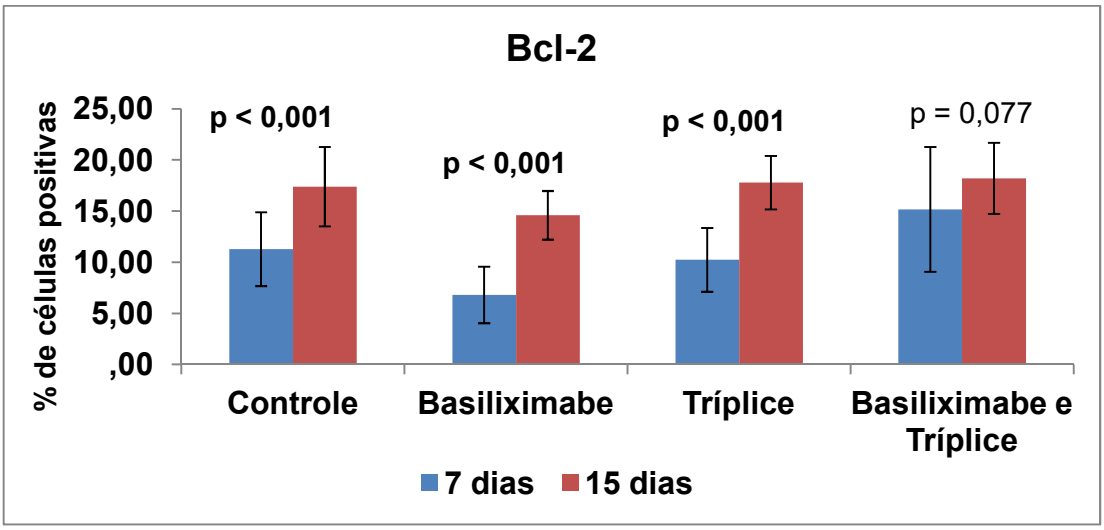


Tabela 3 – Comparações múltiplas do número de células da via aérea marcadas com anticorpo anti-Bcl-2 entre os grupos tratados por 7 e 15 dias

Grupos	p
Controle x Basiliximabe	**0,050**
Controle x Tríplice	0,999
Controle x Basiliximabe+Tríplice	0,131
Basiliximabe x Tríplice	0,248
Basiliximabe x Basiliximabe+Tríplice	**< 0,001**
Tríplice x Basiliximabe+Tríplice	**0,024**

Gráfico 24 - Comparação do número de células da via aérea marcadas com anticorpo anti-Bcl-2 entre os tempos 7 e 15 dias de tratamento dentro de cada grupo: Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice



5.9 Quantificação de células marcadas com anticorpo anti-Caspase 3

Houve diferença estatisticamente significante quanto à porcentagem de células da via aérea marcadas com anticorpo anti-Caspase-3 entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice, tratados por 7 e 15 dias, sendo que, nos animais tratados por 7 dias o grupo Tríplice apresentou uma porcentagem média de células marcadas para Caspase-3 maior do que os grupos Controle e Basiliximabe, já nos animais tratados por 15 dias, o grupo Basiliximabe+Tríplice apresentou uma porcentagem média de células marcadas para Caspase-3 maior do que os grupos Controle e Basiliximabe (Gráfico 25 e Tabela 4). Na comparação entre os tempos de 7 e 15 dias para cada grupo, só no grupo Tríplice, foi encontrada diferença estatísticamente significante, sendo que os animais tratados por 7 dias

apresentaram uma porcentagem média de células marcadas para Caspase-3 maior do que os animais tratados por 15 dias (Gráfico 26).

Gráfico 25 - Comparação do número de células da via aérea marcadas com anticorpo anti-Caspase-3 entre os grupos Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice de animais tratados por 7 e 15 dias

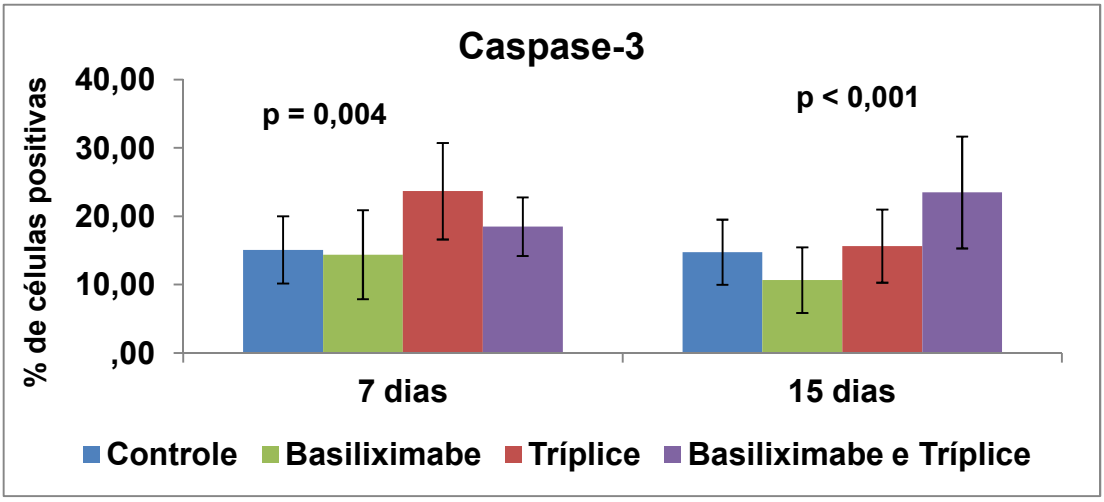
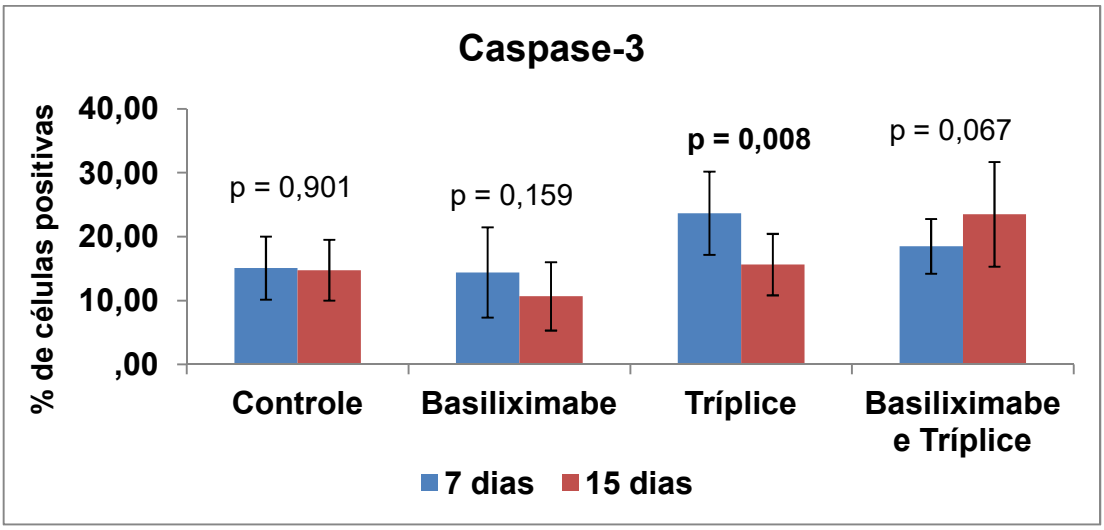


Tabela 4 – Comparações múltiplas do número de células da via aérea marcadas com anticorpo anti-Caspase-3 entre os grupos tratados por 7 e 15 dias

Grupos	p	
	7 dias	15 dias
Controle x Basiliximabe	> 0,999	0,799
Controle x Tríplice	**0,013**	> 0,999
Controle x Basiliximabe+Tríplice	> 0,999	**0,014**
Basiliximabe x Tríplice	**0,006**	0,537
Basiliximabe x Basiliximabe+Tríplice	0,742	**< 0,001**
Tríplice x Basiliximabe+Tríplice	0,345	**0,058**

Gráfico 26 - Comparação do número de células da via aérea marcadas com anticorpo anti-Caspase-3 entre os tempos 7 e 15 dias de tratamento dentro de cada grupo: Controle, Basiliximabe, Tríplice e Basiliximabe+Tríplice



6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os pulmões são expostos a aproximadamente 12000 L de ar por dia, ar que frequentemente está contaminado com uma variedade de substâncias, como por exemplo, particulados de diferentes tamanhos, substâncias químicas, fumaça de cigarro e organismos biológicos[15,90].

Mesmo com toda essa agressão, os pulmões conseguem funcionar de forma eficaz[90]. Isto se deve ao fato do epitélio das vias aéreas apresentar em sua superfície uma camada protetora de muco, que desempenha papel importante nos mecanismos de defesa do hospedeiro, servindo como uma barreira físico-química, prevenindo que substâncias químicas, particulados, bactérias e vírus alcancem a mucosa subjacente[12,13,15,16,90,91].

A depuração de corpos estranhos da superfície do epitélio das vias aéreas exposta ao ar ocorre por meio das células ciliadas[12,13,15,16,85]. Os cílios destas células batem constantemente em sincronia, e o transporte é produzido pela interação das células ciliadas com a camada de muco, removendo as partículas inaladas das vias aéreas[15,92]. O processo de limpeza das vias aéreas através da interação entre as células ciliadas e o muco é denominado de depuração mucociliar[15].

O mecanismo de movimento ciliar ocorre por meio de um conjunto de proteínas que estão localizadas no interior de cada cílio, denominado de axonema. O axonema é composto por nove duplas de microtúbulos interconectados e dispostos em um círculo. No centro do círculo encontra-se um par de microtúbulos, denominados microtúbulos centrais. As duplas de

microtúbulos que formam o círculo são conectadas a braços de dineína, uma proteína motora com atividade de ATPase[92].

Durante o movimento ciliar, ocorre ligação entre moléculas de ATP e moléculas de dineína. A dineína por sua vez, libera e encurta o braço que liga as duplas de microtúbulos fazendo com que elas deslizem uma após a outra. À medida que as moléculas de ATP vão sendo hidrolisadas, as ligações entre as duplas de microtúbulos retornam para a posição inicial. O controle do batimento ciliar ocorre na presença de cálcio, que controla a disponibilidade de ATP para o axonema[92].

O muco fica sobre uma camada fluida de aproximadamente 6 µm de espessura, denominada camada periciliar. A camada periciliar é muito importante para o perfeito funcionamento da depuração ciliar, porque ela fornece um meio de baixa viscosidade entre a superfície ciliar e a camada de muco, facilitando o movimento do cílio[14,92].

Como o epitélio é altamente permeável à água, o volume líquido da camada periciliar é determinado pela quantidade de cloreto de sódio no lúmen da via aérea. Por sua vez, a quantidade de cloreto de sódio é regulada pela concentração de sódio e cloro, onde o sódio é absorvido por canais de sódio e o cloro é liberado através do regulador de condutância transmembrana em fibrose cística (CFTR) e pelos canais de cloro que são ativados por cálcio[14,92].

Muitos fatores podem causar alterações no funcionamento normal da depuração mucociliar, como desafios agudos ao trato respiratório por toxinas ambientais, doenças pulmonares e processos inflamatórios das vias

aéreas[15,16,85]. Como exemplo dessas alterações, podemos citar a hipersecreção de mucinas pelas células secretoras, mudança do perfil histoquímico normal das glicoproteínas e metaplasia de células secretoras [93]. As alterações do funcionamento normal do aparelho mucociliar culminam com a diminuição da depuração mucociliar[14,15].

Alguns trabalhos demonstraram que drogas imunossupressoras, como a ciclosporina, tacrolimo e prednisona, também influenciam no funcionamento normal do aparelho mucociliar, alterando FBC, VTMC, pH do muco e velocidade de transporte do muco *in vitro*[17-21].

As alterações que ocorrem na FBC podem ser atribuídas ao aumento excessivo da quantidade do muco, mudanças na sua qualidade[14,15], ou um defeito direto da função ciliar, como a discinesia, onde o defeito é geralmente nos braços de dineína dos microtúbulos axonemais[12]. Em nosso estudo, observamos que a droga imunossupressora basiliximabe não provocou alterações na FBC. A FBC normal é de 12 a 15 vezes por segundo, resultando em uma VTMC de aproximadamente 1 mm por minuto. A taxa de batimento ciliar pode ser aumentada por agonistas de receptores purinérgicos, adrenérgicos, colinérgicos e de adenosina, bem como substâncias químicas irritantes[14].

Uma VTMC eficiente é dependente de uma adequada hidratação do muco[94]. O muco normal é um gel com baixa viscosidade e elasticidade e é facilmente transportado pelo batimento ciliar; por outro lado, o muco alterado tem alta viscosidade e elasticidade e é mais difícil de ser transportado pelo batimento ciliar, diminuindo a VTMC[13,14,93].

Da mesma forma que na FBC, as alterações que ocorrem na VTMC podem ser atribuídas a defeitos da função ciliar, como a discinesia, hipersecreção de mucina e mudanças na composição do muco, como alterações na biossíntese das glicoproteínas ou uma hidratação alterada da camada periciliar.

A hipersecreção de mucina e a mudança na composição química do muco podem ocorrer por processos inflamatórios e infecciosos. Este cenário é o mesmo que ocorre com algumas doenças, como bronquite crônica, fibrose cística e asma[92].

Os animais do nosso estudo foram tratados com imunossupressores, ficando susceptíveis a infecções e a processos inflamatórios. Apesar de não termos encontrado diferenças significantes entre os grupos quanto ao número de leucócitos no LBA, o número mediano amostral de leucócitos para os animais tratados com basiliximabe, principalmente nos animais tratados por 15 dias, foi maior comparado ao grupo Controle, e a variabilidade do número de leucócitos entre os animais dentro do grupo Basiliximabe+Tríplice foi muito expressiva.

Isto nos faz acreditar que muitos dos animais tratados com imunossupressores apresentaram algum grau de infecção e inflamação.

No nosso trabalho, observamos que o basiliximabe isolado e combinado com a terapia tríplice diminuiu a VTMC nos animais tratados por sete dias. Nos animais tratados por 15 dias, a VTMC foi alterada nos animais tratados com a terapia tríplice e nos animais tratados com basiliximabe combinado com a terapia tríplice.

O valor mais baixo da VTMC nos grupos Basilixiamabe e Basilixiambe+Tríplice provavelmente ocorreu pela ação rápida do imunossupressor basiliximabe. O basiliximabe é um indutor de imunossupressão que tem como objetivo prevenir a rejeição aguda[1,2].

Sendo assim, os animais destes grupos ficaram imunossuprimidos agudamente e, consequentemente, mais susceptíveis a infecções e a processos inflamatórios do que os animais dos outros grupos. Nos animais tratados por 15 dias, o efeito do basiliximabe, foi muito baixo ou praticamente inexistente, prevalecendo o efeito das drogas imunossupressoras da terapia tríplice.

Tanto nos animais de sete dias quanto nos animais de 15 dias, essa alteração da VTMC pode ter ocorrido por um aumento da produção de muco causado por processos inflamatórios e infecciosos.

A viscoelasticidade, que faz parte das propriedades reológicas do muco, em nosso estudo, foi analisada pela técnica de transportabilidade do muco no palato de rã[85,86,95].

Nesta análise, observamos que o basiliximabe isoladamente não causou alterações no muco quanto à viscoelasticidade. No entanto, nos animais tratados por 15 dias, a variabilidade entre os animais do grupo Basiliximabe foi expressiva, ficando claro que alguns animais apresentaram velocidade relativa (rã/rato) menor, indicando desta forma, muco menos viscoelástico. Foi observada também, uma viscoelasticidade significativamente menor nos animais tratados com basiliximabe combinado com a terapia tríplice.

Como o basiliximabe isolado não alterou a viscoelasticidade, que é um dos parâmetros da qualidade do muco e que pode alterar a VTMC, isto nos leva acreditar que as alterações que ocorreram na VTMC dos animais tratados por sete dias foram devido a um aumento da quantidade do muco por hipersecreção de mucinas pelas células secretoras.

O perfil histoquímico normal das glicoprotéinas mucinas varia com o nível da via aérea, fase de maturação e espécie. Nos seres humanos, as células secretoras de muco das vias aéreas podem produzir glicoproteínas neutras, ácidas ou uma mistura das duas[93]. As mucinas ácidas podem ser subdivididas em sialomucinas por apresentarem o ácido siálico ou sulfomucinas por apresentarem ésteres de sulfato[91].

Doenças pulmonares como bronquite e fibrose cística, além da fumaça de cigarro, alteram as características histoquímicas das mucinas, onde as células secretoras de muco produzem relativamente mais mucinas ácidas[92].

Em ratos, o muco neutro é preferencialmente secretado nas vias aéreas superiores e o muco ácido é secretado nas vias áreas periféricas. A exposição aguda à fumaça de cigarro elimina estas diferenças regionais dentro de 24 horas, resultando em dominância por células que produzem muco ácido e neutro em todo o trato respiratório do rato. A exposição prolongada à fumaça de cigarro acaba por resultar numa população de células que produzem apenas muco ácido[92].

A mediana da quantidade de muco ácido não sofreu alteração significante nos animais tratados com nenhuma das drogas

imunossupressoras utilizadas em nosso estudo. Porém, uma grande variabilidade é apresentada nos grupos Basiliximabe e Basiliximabe + Tríplice em 7 dias e nos grupos Tríplice e Basiliximabe + Tríplice em 15 dias. Isso mostra que, para alguns animais, os imunossupressores alteraram a quantidade de muco ácido. Provavelmente, isso aconteceu para aqueles animais que apresentaram número maior de leucócitos.

A mediana do muco neutro também não sofreu alteração significante nos animais tratados com drogas imunossupressoras. Porém, igualmente ao que foi observado com o muco ácido, os animais que receberam drogas imunossupressoras apresentaram variabilidade expressiva da quantidade de muco neutro.

Este nível mais alto da quantidade de muco ácido e neutro, para alguns animais dos grupos tratados com imunossupressores, mostra que houve um aumento da quantidade de muco produzido pelas células secretoras do epitélio das vias aéreas.

A elevação da quantidade de muco nas vias aéreas é devida ao aumento da expressão de mucinas pelos genes da família Muc, como por exemplo, o gene Muc5ac, um dos principais genes de produção de muco das vias aéreas, sendo expresso nas células caliciformes[14,16,82,92].

As células produtoras de muco apresentam proteínas de membrana que respondem a vários estímulos, como bactérias, material particulado e uma grande variedade de estímulos inflamatórios, ocasionados por uma variedade de citocinas das células inflamatórias. Estes estímulos ativam rotas de transdução de sinais e que, por fim, ativam o gene Muc5ac[16,82,88,89].

A asma, por ser uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, é um bom exemplo, apresentando muitas características do cenário, onde ocorrem infiltração e ativação de várias células inflamatórias[88]. Camundongos que foram sensibilizados com antígenos, quando desafiados com uma única dose aerossol de antígenos, apresentaram uma resposta aguda de neutrófilos duas a seis horas após o desafio, seguida por uma resposta tardia (1 a 7 dias após desafio) de linfócitos T auxiliar e eosinófilos. Esse processo inflamatório elevou a expressão do gene Muc5ac[88].

Em nosso estudo, a droga basiliximabe isolada e em combinação com as drogas da terapia tríplice não alterou de forma significante a expressão do gene Muc5ac, mas a variabilidade da expressão nos grupos Tríplice e Basiliximabe+Tríplice foi muito expressiva, com alguns animais apresentando valores de expressão gênica relativa para o gene Muc5ac bem elevados.

Após a transcrição do RNA mensageiro do gene Muc5ac, a proteína mucina é traduzida no ribossomo e em seguida transferida para o interior do complexo de Golgi, na região cis-Golgi, onde inicia-se a O-glicosilação da proteína mucina, após a transferência de N-Acetilgalactosamina (GalNAc) para aminoácidos serina e treonina pela enzima N-Acetilgalactosamina transferase. Desta forma, alterando a conformação de apomucinas globulares para moléculas lineares, facilitando a transferência de hexoses e ou hexosaminas para cada O-glicano nascente por uma série de glicosiltransferases. Após as mucinas estarem totalmente glicosiladas, elas são empacotadas e armazenadas em grânulos de secreção, ficando neste

estado, até que um secretagogo de mucina desencadeie a secreção da mucina na superfície apical[16].

Na avaliação da concentração da proteína mucina do gene Muc5ac nas vias aéreas pela análise da intensidade do dot blot, observamos que a droga basiliximabe isolada e em conjunto com as drogas da terapia tríplice não causou alterações significantes, sendo que nos animais tratados por 15 dias a mediana do grupo Basiliximabe foi maior que a do grupo Controle.

É importante ressaltar que os mecanismos que regulam os sinais de transdução que conduz ao aumento da expressão do gene Muc5ac são independentes dos mecanismos de secreção das mucinas[14,16]. A regulação da expressão do gene Muc requer minutos a horas e a biossíntese entre 6 e 24 horas, contrastando com o tempo de secreção que é bem rápido, ocorrendo em segundos a minutos[16.]

O ATP parece ser o secretagogo mais importante para a superfície do epitélio, atuando sobre os receptores purinérgicos $P2Y_2$, da membrana apical. A presença contínua de baixos níveis de ATP no líquido da superfície das vias aéreas causa baixa atividade de secreção, resultando na secreção basal de mucinas proporcionando uma barreira normal. Na presença elevada de ATP, grânulos de mucinas que estão acumulados intracelularmente são secretados rapidamente, causando uma hipersecreção de muco, podendo ocasionar uma oclusão luminal das vias aéreas[14].

Na avaliação do número de células apoptóticas pela quantificação de células marcadas por anticorpos anti-Bcl-2 e anti-Caspase 3, o basiliximabe isolado e em conjunto com as drogas da terapia tríplice, não causou

alterações nos animais tratados por 7 dias. Já nos animais tratados por 15 dias, o grupo Basiliximabe+Tríplice, apresentou valor médio da porcentagem de células apoptóticas maior comparado com os outros grupos. Embora o grupo Basiliximabe+Tríplice tenha apresentado um valor médio de células apoptóticas maior do que os outros grupos, este resultado provavelmente ocorreu pela ação da terapia tríplice, visto que o grupo tratado exclusivamente com basiliximabe não apresentou alteração quando comparado com o grupo Controle.

Com os nossos resultados, pudemos observar que a droga basiliximabe, causou alterações no aparelho mucociliar de forma indireta, através de processos inflamatórios e infecciosos, devido ao efeito imunossupressor desta droga. Isto não descarta um efeito direto da droga basiliximabe nas células ciliadas ou nas células produtoras de muco, como na expressão do gene Muc5ac, na biossíntese da mucina ou no processo de secreção das mucinas. Entretanto, para avaliações mais aprofundadas, o modelo de cultura ciliar de células do epitélio das vias aéreas se torna necessário, proporcionando um controle de um número maior de variáveis.

A comparação dos nossos resultados com outros da literatura fica limitada devido a escassez de estudos sobre os efeitos colaterais do basiliximabe em outros órgãos e tecidos.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A droga basiliximabe, isolada e em conjunto com a terapia tríplice (tacrolimo, micofenolato de sódio e prednisona), causou efeitos adversos no aparelho mucociliar traqueobrônquico de ratos, especificamente na depuração mucociliar.

8 ANEXO

8 ANEXO

Anexo A – Aprovação da Comissão de Ética

3799/12/055

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07/11/2012, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **315/12** intitulado: **"EFEITOS DO BASILIXIMAB COM E SEM A TERAPIA TRÍPLICE NA DEPURAÇÃO MUCOCILIAR DAS VIAS AÉREAS DE RATOS: ESTUDO EXPERIMENTAL"** que utilizará **120** animais da espécie **Ratos Wistar,** apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Rogerio Pazetti
Pesquisador (a) Executante: Aristides Tadeu Correia

CEP-FMUSP, 08 de Novembro de 2012.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fm@usp.br

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
13/11/12

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jatene FB, Fernandes PMP, Medeiros IL. Transplante pulmonar. Rev Med 2009;88:111-22.
2. Anderson MB, Kriett JM, Harrell J, Smith C, Kapelanski DP, Tarazi RY, Perricone A, Jamieson SW. Techniques for bronchial anastomosis. J Heart Lung Transplant 1995;14:1090-4.
3. McFadden PM, Emory WB. Lung transplantation. Surg Clin North Am 1998;78:749-62.
4. Floreth T, Ghorade SM, Ahya VN. Conventional and novel approaches to immunosuppression. Clin Chest Med 2011;32:265-77.
5. Bhorade SM, Stern E. Immunosuppression for lung transplantation. Proc Am Thorac Soc 2009;6:47-53.
6. Onrust VS, Wiseman LR. Basiliximab. Adis new drug profile 1999;57:207-13.
7. Chapman TM, Keating GM. Basiliximab – a review of its use as induction therapy in renal transplantation. Adis new drug profile 2003;63:2803-35.
8. Aeba R, Stout JE, Francalancia NA, Keenan RJ, Duncan AJ, Yousem SA, Burckart 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.
9. Crawford SW. Respiratory infections following organ transplantation. Curr Opin Pulm Med 1995;1:209-15.
10. Milne DS, Gascoigne AD, Ashcroft T, Sviland L, Malcolm AJ, Corris PA. Organizing pneumonia following pulmonary transplantation and the development of obliterate bronchiolitis. Transplantation 1994;57:1757-62.
11. Clarke SW, Pavia D. Lung mucus production and mucociliary clearance: methods of assessment. Br J Clin Pharmacol 1980;9:537-46.
12. Antunes MB, Cohen NA. Mucocilliary clearance - a critical upper airway host defense mechanism and methods of assessment. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2007;7:5-10.

13. Ganesan S, Comstock AT, Sajjan US. Barrier function of airway tract epithelium. Tissue barrier landes biosciences. Tissue Barriers 2013;1:1-9.
14. Fahy JV, Dichey BF. Airway mucus function and dysfunction. N Engl J Med 2010;363:2233-47.
15. Rogers DF. Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. Respir Care 2007;52:1134-46.
16. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. Physiol Rev 2006;86:245-78.
17. Neuringer IP, Sloan J, Budd S, Chalermeskulrat W, Park RC, Stonebraker JR, O'Neal WK, Aris RM, Randell SH. Calcineurin inhibitor effects on growth and phenotype of human airway epithelial cells in vitro. Am J Transplant 2005;5:2660-70.
18. Pazetti R, Pego-Fernandes PM, Ranzani OT, Parra ER, Lorenzi-Filho G, Jatene FB. Cyclosporin A reduces airway mucus secretion and mucocilliary clearance in rats. Clinics 2007;62:345-52.
19. Silva VF, Pazetti R, Soto Sde F, Siqueira MM, Correia AT, Jatene FB, Pego-Fernandes PM. Effects of mycophenolate socium on mucociliary clearance using a bronchial section and anastomosis rodent model. Clinics 2011;66:1451-6.
20. Braga KA, Nepomuceno NA, Correia AT, Jatene FB, Pêgo-Fernandes PM. The effects on mucociliary clearance of prednisone associated with bronchial section. Clinics 2012;67:647-51.
21. Prado e Silva M, Soto FS, Almeida FM, Limonete TTK, Parra ERC, Jatene FB, Fernandes PMP, Pazetti R. Immunosuppression effects on airway mucociliary clearance: comparison between two triple therapies. Ann Thorac Surg 2013;96:473-7.
22. Linden PK. History of solid organ transplantation and organ donation. Crit Care Clin 2009;25:165-184.
23. Shayan H. Organ transplantation: from myth to reality. Journal of investigative surgery 2001;14:135-8.
24. Carrel A, Remote results of the replantation of the kidney and the spleen. J Exp Med 1910;12:146-50.

25. Medawar PBM. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. J Anat 1944;78:176-99.
26. Medawar PBM. A second study of the behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. J Anat 1944;79:157-76.
27. Gowans JL. Peter Medawar: his life and work. Immunology letters 1989;21:5-8.
28. Brent LB. Rupert Everett Billinghan. The Lancet 2003;361:265.
29. Billingham RE, Krohn PL, Medawar PB. Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits. BrMed J 1951;2:1049-53.
30. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. J Immunol 1953;172:603-6.
31. Simpson E. Medawar's legacy to cellular immunology and clinical transplantation: a commentary on Billingham, Brent and Medawar (1956) 'quantitative studies on tissue transplantation immunity III. Actively acquired tolerance'. Philos Trans R Soc Lond B biol Sci 2015;370:1-12.
32. Ibrahim MY. Homenagem da nefrologia brasileira a Peter Brian Medawar. J Bras Nefrol 2015;37:7-8.
33. Konstantinov IE. A mystery of Vladimir P. Demikhov: the 50th anniversary of the first intrathoracic transplantation. Ann Thorac Surg 1998;65:1171-7.
34. Langer RM. Vladimer P. Demikhov, a pioneer of organ transplantation. Transplantation Proceedings 2011;43:1221-2.
35. Mendelogg EN. The history of pediatric heart and lung transplantation. Pediatr Transplantation 2002;6:270-9.
36. Metras H. Note préliminaire sur la graffe totale du poumon chez le chien. C R Acad Sci 1950;231:1176-7.
37. Hardy JD, Webb WR, Dalton ML, Walker GR Jr. Lung homotransplantation in man. JAMA 1963;186:1065-74.
38. Grover FL, Fullerton DA, Fullerton DA, Zamora MR, Mills C, Ackerman B, Badesch D, Brown JM, Campbell DN, Chetham P, Dhaliwal A, Diercks M, Kinnard T, Niejadlik K, Ochs M. The past, present, and future of lung transplantation. Am J Surg 1997;173:523-33.

39. Anderson MB, Kriett JM, Harrell J, Smith C, Kapelanski DP, Tarazi RY, Perricone A, Jamieson SW. Techniques for bronchial anastomosis. J Heart Lung Transplant 1995;14:1090-4.
40. Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. N Engl J Med 1982;306:557-64.
41. Reitz BA. The first successful combined heart-lung transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg 2011;141:867.
42. Lima O, Cooper JD, Peters WJ, Ayabe H, Townsend E, Luk SC, Goldberg M. Effects of methylprednisolone and azathioprine on bronchial healing following lung autotransplantation. J Thorac cardiovas Surg 1981;82:211-5.
43. Goldberg M, Lima O, Morgan E, Ayabe HA, Luk S, Ferdman A, Peters WJ, Cooper JD. A comparison between cyclosporine A and methylprednisolone plus azathioprine on bronchial healing following canine lung autotransplantation. J Thorac Cardiovasc Surg 1983;85:821-6.
44. Lima O, Goldberg M, Peters WJ, Ayabe H, Townsend E, Cooper JD. Bronchial omentopexy in canine lung transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg 1982;83:418-21.
45. Morgan E, Lima O, Goldberg M, Ferdman A, Luk SK, Cooper JD. Successful revascularization of totally ischemic bronchial autografts with omental pedicle flaps in dogs. J Thorac Cardiovasc Surg 1982;84:204-10.
46. Morgan E, Lima O, Goldberg M, Ayabe H, Ferdman A, Cooper JD. Improved bronchial healing in canine left lung reimplantation using omental pedicle wrap. J Thorac Cardiovasc Surg 1983;85:134-9.
47. Cooper JD, Ginsberg RJ, Goldberg M, Patterson GA, Pearson FG, Todd TRJ, Grossman R, Maurer J, HalloranP, Vellend H, Duffin J, Goldstein R, Contreras M. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. Toronto lung transplant group. N Engl J Med 1986;314:1140-5.
48. Hirji A. Lung transplantation in canada: only just the beginning. ISHLT 2013;4:1-2.

49. Camargo JJP, Rocha MG, Oliveira MEM, Godoy DV, Felicetti JC. Transplante isolado de pulmão – relato do primeiro caso realizado na américa do sul. Jornal de Pneumologia 1990;16:9.
50. Succi JE, Forte V, Perfeito JABT, Beppu OS, Martinez JAB, Buffolo E, Leão LEV, Santos ML. Transplante isolado de pulmão: experiência da escolar paulista de medicina. Rev Bras Cir Cardiovasc 1991;6:137-46.
51. Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. Physiological Reviews 2000;80:1483-510.
52. Castro APBM. Calcineurin inhibitors in the treatment of allergic dermatitis. J Pediatr 2006;82:166-72.
53. Colombo D, Ammirati E. Cyclosporine in transplantation-a history of converging timelines. Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents 2011;25:493-504.
54. Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL. Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)1 in organ transplantation. Drugs 2001;61:1957-2016.
55. Borel JF, Kis ZL. The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune). Transplant Proc 1991;23:1867-74.
56. Tribe HT. The discovery and development of cyclosporine. Mycologist 1998;12:20-2.
57. Demain AL1, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress.J Antibiot 2009;62:5-16.
58. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. Clin Immunol Immunopathol 1996;80:S40-5.
59. Hamawy MM, Knechtle SJ. An overview of the action of cyclosporine and FK506. Transplantation Reviews 2003;4:165-171.
60. Fung JJ. Tacrolimus and transplantation: a decade in review. Transplantation 2004;9:S41-3.

61. Kim HS, Park YI. Isolation and identification of a novel microorganism producing the immunosuppressant tacrolimus. J Biosci Bioeng 2008;105:418-21.

62. Chen D, Ahang Q, Cen P, Xu Zhinan, Liu W. Improvement of FK506 producition in Streptomyces tsukubaensis by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems. Appl Environ Microbiol 2012;78:5093-103.

63. Garrity ER Jr, Mehara MR. Un update on clinical outcomes in heart and lung transplantation. Transplantation 2004;77:S68-74

64. Scheffert JL, Raza Kashif. Immunosuppression in lung transplantation. J Thorac Dis 2014;6:1039-53.

65. Patel AA, Swerlick RA, McCall CO. Azathioprine in dermatology: the past, the present, and the future. J Am Acad Dermatol 2006;55:369-89.

66. Wise M, Callen JP. Azathioprine: a guide for the management of dermatology patients. Dermatol Ther 2007;20:206-15.

67. Zaza G, Cheok M, Krynetskaia N, Thorn C, Stocco G, Hebert JM, McLeod H, Weinshilboum RM, Relling MV, Evans WE, Klein TE, Altman RB. Thiopunine pathway. Pharmacogenet Genomics 2010;20:573-4.

68. Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. Crit Rev Oncol Hematol 2005;56:23-46.

69. Orvis AK, Wesson SK, Breza TS, Church AA, Michell Cl, Watkins SW. Mycophenolate mofetil in dermatology. J Am Acad Dermatol 2009;60:183-99.

70. Sollinger HW. Mycophenolates in transplantation. Clin Transplant 2004; 18:485-92.

71. Cooper M, Salvadori M, Budde K, Oppenheimer F, Sollinger H, Zeier M. Enteric-coated mycophenolate sodium immunosuppression in renal transplant patients: efficacy and dosing. Transplant Rev 2012;26:233-40.

72. Ingle GR, Shah T. Entereic-coated mycophenolate sodium for transplant immunosuppression. Am J Health Syst Pharm 2005;62:2252-9.

73. Burg M, Wieser SC, Kramer S, Fischer W, Lhotta K. Enteric-coated mycophenolate sodium reduces gastrointestinal symptoms in renal transplant patients. Transplant Proc 2009;41:4159-64.

74. Kirwan JR, Bálint G, Szebenyib. Anniversary: 50 years of glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 1999;38:100-2.

75. Bosscher KD, Berghe WV, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. J Neuroimmunol 2000;109:16-22.

76. Stahn C, Lowengerg M, Hommes DW, Buttgereit F, Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonist. Mol Cell Endocrinol 2007; 275:71-8.

77. van Sandwijk MS, Bemelman FJ, Berge IJ. Immunosuppressive drugs after solid organ transplantation. Neth J Med 2013;71:281-9.

78. Ippoliti G, Pellegrini C, Nieswandt V. Controversies about induction therapy. Transplant Proc 2001;43:2450-2.

79. Lake KD. Immunosuppressive drugs and novel strategies to prevent acute and chronic allograft rejection. Semin Respir Crit Care Med 2001;22:559-80.

80. Vicenti F, de Andrés A, Becker T, Choukroun G, Cole E, Gonzáles-Posada JM, Kumar MA, Moore R, Nadalin S,Nashan B, Rostaing L, Saito K, Yoshimura N. Interleukin-2 receptor antagonist induction in modern immunosuppression regimens for renal transplant recipients. Transpl Int 2006; 19:446-57.

81. Krischock L, Marks SD. Induction therapy: Why, when, and which agent. Pediatr Transplant 2010;14:298-313.

82. Thai P, Loukoianov A, Wachi S, Wu Reen. Regulation of airway mucin gene expression. Annu Rev Physiol 2008;70:405-29.

83. Almeida FM, Oliveira-Junior MC, Souza RA, Petroni RC, Soto SF, Soriano FG, de Carvalho PT, Albertini R, Damaceno-Rodrigues NR, Lopes FD, Castro-Faria-Neto HC, Martins MA, Dolhnikoff M, Pazetti R, Vieira RP. Creatine supplementation attenuates pulmonary and systemic effects of lung ischemia and reperfusion injury. J Heart Lung Transplant 2015;2498:1334-0.

84. Abreu Mda M, Pazetti R, Almeida FM, Correia AT, Parra ER, Silva LP, Vieira RP, Pêgo-Fernandes PM, Jatene FB. Methylene blue attenuates ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. J Surg Res 2014;192:635-41.

85. Sadé J, Eliezer N, Silberberg A, Nevo AC: The role of mucus in transport by cilia. Am Rev Respir Dis 1970;102:48-52.

86. King M, Festa E. The evolution of the frog palate model for mucociliary clearance. New York: Marcel Dekker 1998;191-201.

87. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}{}_{T}$ Method. Methods 2001 25:402-8.

88. Li R, Meng Z, Xie J. Effects of súlfur dioxide on the expressions of MUC5AC and ICAM-1 in airway of asthmatic rats. Regul Toxicol Pharmacol 2007;48:284-91.

89. Evans CM, Koo JS. Airway mucus: The good, the bad, the sticky. Pharmacol Ther 2009;121:332-48.

90. Sheehan JK, Kesimer M, Pickles R. Innate immunity and mucus structure and function. Novartis Found Symp 2006;279:155-66.

91. Hyun JS, Lee BS, Ryu HY, Sung JH, Chung KH, Yu IJ. Effects of repeated silver nanoparticles exposure on the histological structure and mucins of nasal respiratory mucosa in rats. Toxicol Lett 2008;182:24-8.

92. Samet JM, Cheng PW. The role of airway mucus in pulmonary toxicology. Environ Health Perspect 1994;102:89-103.

93. Jeffery PK, Li D. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. Eur Respir J 1997;10:1655-62.

94. Randell SH, Boucher RC. Effective mucus clearance is essential for respiratory health. Am J Respir Cell Mol Biol 2006;35:20-8.

95. Puchelle E, Zahm JM, Sadoul P. Mucociliary frequency of frog palate epithelium. Am J Physiol 1982;242:C31-5.