CAROLINA ARRUDA DE FARIA

Avaliação dos efeitos da sinvastatina via Inibidor do Ativador do Plasminogênio 1 (PAI-1) sobre a terapia celular com células estromais mesenquimais

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

Área de Concentração: Ciências Biológicas (Genética)

Orientador: Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro-Paes

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Faria, Carolina Arruda de

Avaliação dos efeitos da sinvastatina via Inibidor do Ativador do Plasminogênio 1 (PAI-1) sobre a terapia celular com células estromais mesenquimais. Ribeirão Preto, 2016.

93 p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Ribeiro-Paes, João Tadeu.

1. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica - DPOC.
2. Terapia celular. 3. Células estromais mesenquimais - CTM.
4. Sinvastatina.
5. Inibidor do Ativador do Plasminogênio 1 - PAI-1.

Faria CA. **Avaliação dos efeitos da sinvastatina via Inibidor do Ativador do Plasminogênio 1 (PAI-1) sobre a terapia celular com células estromais mesenquimais.**

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À toda a minha família, de casa e do laboratório, com muito carinho, por terem me suportado (em todos os sentidos da palavra) durante o período de elaboração deste trabalho.

Agradecimentos:

Agradeço primeiramente a Deus por tudo. Agradeço também toda a minha família pelo apoio dado a mim durante o período de realização deste trabalho.

Ao meu orientador, prof. Dr. João Tadeu Ribeiro-Paes, sou grata pelos ensinamentos e correções, e ao laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel, onde aprendi as bases da ciência.

Sou extremamente grata por terem me acolhido e tido paciência comigo nesses 4 anos, ao prof. Dr. Wilson Araújo Silva Júnior, Dalila Lucíola Zanetti, Greice Andreotti de Molfetta e todos do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática – LGMB, onde surgiram as premissas deste trabalho e onde foram realizados os ensaios genéticos. Cederam a mim não somente seu tempo e dedicação, mas também excelente estrutura, suporte técnico e financeiro, bem como ensinamentos valiosos e imprescindíveis à realização de grande parte deste trabalho.

Agradeço a Cleide Araujo Silva e a Mônica Oliveira Leal por todo carinho e cuidado oferecido aos animais utilizados neste trabalho e ao Laboratório de Estudos Experimentais em Animais – LEEA, por toda a estrutura, onde foram realizados a maioria dos ensaios in vivo.

Expresso também minha gratidão à professora Mirian Bassi e ao laboratório de Fisiologia da Faculdade de Odontologia da Unesp de Araraquara por sua prestatividade, por terem cedido sua estrutura e por sua orientação fundamental na realização das pletismografias.

Meus agradecimentos a todos os laboratórios da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto – FundHeRP, onde foram realizados os experimentos. Em especial, ao Laboratório de Cultura Celular, onde foram realizados os ensaios em cultura, ao Laboratório de Imunofluorescência, onde foram confeccionadas e avaliadas as lâminas histológicas, ao Laboratório de Química de Proteínas, onde foram analisadas as proteínas, e a Lucas Eduardo Botelho de Souza por seu apoio e orientação fundamentais nos ensaios de bioluminescência.

“C’est le temps que tu a perdu pour ta
rose qui fait ta rose si importante.”

“Foi o tempo que dedicaste à tua
rosa que a fez tão importante”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Faria CA. Avaliação dos efeitos da sinvastatina via Inibidor do Ativador do Plasminogênio 1 (PAI-1) sobre a terapia celular com células estromais mesenquimais [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2016 93f.

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é caracterizada pela limitação persistente de trocas gasosas, usualmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória crônica exacerbada das vias aéreas a partículas e gases nocivos. Apesar de prevenível e tratável, não se logrou até o presente uma terapêutica eficaz, que resulte na cura da doença. Neste cenário, a terapia celular apresenta-se como uma alternativa terapêutica potencialmente promissora em DPOC, bem como em outras doenças pulmonares degenerativas e de caráter inflamatório. Porém, vários aspectos da terapia celular carecem de um melhor entendimento. Um dos principais desafios ao sucesso da terapia celular são as baixas taxas de sobrevivência das células transplantadas. O Inibidor do Ativador de Plasminogênio 1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1 – PAI-1) pode representar um potencial mediador da sobrevivência de células estromais mesenquimais (CTM) pós-transplante, pois tem sido proposto que anticorpos neutralizadores do PAI-1 auxiliam no aumento da sobrevivência de CTM no tecido-alvo da terapia celular. Desta forma, a diminuição dos níveis de PAI-1 possui um potencial terapêutico interessante, ao modular os principais processos envolvidos na criação de um ambiente pouco propício ao "homing" celular durante o processo de injúria. A diminuição dos níveis de PAI-1 é promovida, pela sinvastatina, fármaco da família das estatinas. Desta forma, objetivou-se com este trabalho analisar os efeitos da sinvastatina sobre a expressão do PAI-1, bem como sua influência na sobrevivência das células infundidas para terapia celular de enfisema pulmonar em modelo murino. Camundongos da linhagem FVB foram submetidos à instilação intranasal de elastase para indução de enfisema pulmonar e, posteriormente, tratados com CTM do tecido adiposo e sinvastatina. Os resultados mostraram que, quanto aos aspectos morfológicos e funcionais, considerando-se a análise conjunta de ambos os pulmões, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos submetidos à instilação intranasal de elastase e submetidos à terapia celular com CTM tratados ou não com sinvastatina. Quando porém os pulmões foram analisados individualmente constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e os resultados referentes ao lado direito do pulmão dos animais tratados com elastase e que receberam sinvastatina e infusão de CTM. Diferenças anatômicas entre os lados direito e esquerdo do pulmão, levaram a uma maior deposição de células no lado direito, como evidenciado pelos resultados obtidos nos ensaios de bioluminescência. Pode-se, portanto, inferir que a recuperação morfológica no lado direito do pulmão de animais com DPOC/enfisema poderia ser decorrente de um efeito regenerativo parácrino das CTM associadas à sinvastatina.

Palavras-chave: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica – DPOC. Terapia celular. células estromais mesenquimais - CTM. Inibidor do Ativador do Plasminogênio 1 – PAI-1.

ABSTRACT

Faria CA. Evaluation of the effects of simvastatin in mesenchymal stromal cell therapy through Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1) [thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2016 93f.

Chronic Obstructive Pulmonary Disease - COPD is characterized by the persistent limitation of gas exchange, is usually progressive, and associated to a chronic augmented inflammatory response of the airways to particles and noxious gases. Despite preventable e treatable, an effective, curative therapeutic approach is yet to be achieved. In this context, cell therapy presents itself as a promising therapeutic approach for COPD and other pulmonary inflammatory and degenerative diseases. However, many aspects of cell therapy with stem cells remain unclear. One of the major challenges to the success of cell therapy are the low survival rates of transplanted cells. The Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1) is a potential mediator of the survival of mesenchymal stromal cells (MSC) after transplantation, since PAI-1 neutralizing antibodies have been shown to increase the survival rate of MSC in the target tissue of cell therapy. Thus, the decreased levels of PAI-1 has an interesting therapeutic potential to modulate key processes involved in creating an inhospitable environment, during the process of injury, to the homing of transplanted cells. Decreased levels of PAI-1 are promoted by simvastatin, a drug of the statins family. Thus, the goal of this work was to evaluate the effect of simvastatin *in vivo* on the expression of PAI-1, as well as its influence on the survival rate of infused cells in mice model of cell therapy for pulmonary COPD/emphysema. FVB mice were submitted pulmonary emphysema induction by means of intranasal instillation of elastase and than treated with adipose-derived mesenchymal stem cells and simvastatin. The results regarding morphological and functional aspects, when considering the analisys of both lungs, presented no statistically significant difference among the groups submitted to intranasal instillation of elastase and cell therapy with MSC, treated or not with simvastatin. However, when the lungs where analyzed individually, it was found that there was no statistically significant difference between the control group and the results regarding the right lung of animals treated with elastase and that received simvastatin and MSC infusion. Anatomical differences between the right and left sides of the lung lead to a higher deposition of cells in the right side, as observed in the bioluminescence assays. Thus, it is possible to infer that the morphological recovery in the right side of the lung of animals with DPOC/emphysema could be due to a regenerative paracrine effect of mesenchymal stem cells associated with simvastatin.

Keywords: Cronic Obstructive Pulmonary Disease – COPD. Cell therapy. Mesenchymal Stromal Cells - MSC. Simvastatin. Plaminogen Activator Inhibitor 1 – PAI-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patogenia da doença pulmonar obstrutiva crônica 16

Figura 2. Conformações da glicoproteína PAI-1 27

Figura 3. PAI-1 e fibrose 28

Figura 4. Estrutura química da sinvastatina 31

Figura 5. Técnica de administração oral por gavagem 34

Figura 6. Instilação intranasal de elastase 38

Figura 7. Aparato para pletismografia 44

Figura 8. Retículo de Weibel 45

Figura 9. Desenho Experimental 47

Figura 10. Fotomicrografias de cortes histológicos de pâncreas, pulmão e fígado corados com Hematoxilina-Eosina: 49

Figura 11. Eletroforese das amostras de RNA dos tecidos dos animais expostos a diferentes doses de sinvastatina: 50

Figura 12. Expressão relativa do PAI-1 após administração de sinvastatina: 52

Figura 13. Western Blotting para detecção do PAI-1 no plasma sanguíneo de animais após administração de diferentes doses de sinvastatina: 53

Figura 14. Fotomicrografias representativas do ensaio de padronização de migração: 54

Figura 15. Fotomicrografias representativas do ensaio de migração celular: 55

Figura 16. Ensaio colorimétrico de atividade da elastase: 55

Figura 17. Fotomicrografias das CTM $EGFP^{+}$: 56

Figura 18. Pletismografias resultante do ensaio piloto de enfisema pulmonar: 57

Figura 19. Fotomicrografias do tecido pulmonar resultante do ensaio piloto de enfisema: 58

Figura 20. Células isoladas da medula óssea e tecido adiposo de animais FVB/Luc^{+}:..... 59

Figura 21. Luminescência das CTM derivadas da medula óssea e tecido adiposo:..... 60

Figura 22. Gráfico comparativo da luminescência das CTM derivadas de tecido adiposo

em relação às derivadas de medula óssea:..... 61

Figura 23. Ensaio de diferenciação das CTM: 62

Figura 24. Eletroforese das amostras de RNA das células expostas a diferentes doses de sinvastatina: 63

Figura 25. Expressão relativa do PAI-1 em células expostas a diferentes doses sinvastatina *in vitro*:..... 63

Figura 26. Peso dos animais ao longo do experimento: 64

Figura 27. Pletismografias dos grupos terapia celular e sinvastatina:..... 65

Figura 28. Detecção por luminescência as células infundidas nos animais receptores:..... 66

Figura 29. Gráfico da luminescência nos animais receptores: 68

Figura 30. Fotomicrografias do tecido pulmonar dos grupos terapia celular e sinvastatina: ... 69

Figura 31. Gráfico da análise comparativa do diâmetro alveolar médio:..... 70

Figura 32. Gráfico da análise comparativa do diâmetro alveolar médio (direito x esquerdo): 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos Experimentais 46

Tabela 2. Análise das amostras de RNA por Bioanalyszer®. 51

Tabela 3. Dosagem de proteínas totais no plasma sanguíneo dos animais submetidos a diferentes doses de sinvastatina. 53

Tabela 4. Fótons por segundo por célula mesenquimal derivada de tecido adiposo 60

Tabela 5. Fótons por segundo por célula mesenquimal derivada de medula óssea 61

Tabela 6. Fótons por segundo por animal do grupo normal-controle 66

Tabela 7. Fótons por segundo por animal do grupo normal-sinvastatina 67

Tabela 8. Fótons por segundo por animal do grupo enfisema-controle 67

Tabela 9. Fótons por segundo por animal do grupo enfisema-sinvastatina 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP –	“Adenosine Tri-Phosphate”
CEUA –	Comissão de Ética no Uso de Animais
cDNA –	DNA complementar
CCK –	“Cholecystokinin”
CFU-F –	“Colony Forming Units – Fibroblast”
CMMO –	Células Mononucleares da Medula Óssea
CT –	Célula–tronco
CTA –	Células-Tronco Adultas
CTE –	Células-Tronco Embrionárias
CTH –	Células-Tronco Hematopoéticas
CTM –	Células estromais Mesenquimais
CTM MO –	Células estromais Mesenquimais derivadas da Medula Óssea
CTM TA –	Células estromais Mesenquimais derivadas do Tecido Adiposo
DAC –	Doença Arterial Coronariana
DNA –	“Desoxyribonucleic Acid”
DECH –	Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro
DPOC –	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DTT –	DL - Dithiothreitol
EGFP –	“Enhanced Green Fluorescent Protein”
EGF -	“Epidermal Growth Factor”
EPP –	Elastase Porcina Pancreática
FISH –	“Fluorescent In-Situ Hibridization”
FPP –	Farnesil Pirofosfato
GGPP –	Geranilgeranil Pirofosfato
HE –	Hematoxilina-Eosina
HMG-CoA –	3-hidroxi-3metil-glutaril-coenzima A
IMC –	Índice de Massa Corporal

IPSc –	“Induced Pluripotent Stem Cells”
ISCT –	“International Society for Cellular Therapy”
LD50 –	Dose Letal 50
LDL –	“Low Density Lipoproteins”
MSC –	“Mesenchymal Stromal Cells”
NF-κß –	“Nuclear Factor kappa beta (κß)”
PAI-1 –	“Plasminogen Activator Inhibitor 1”
PBS –	“Phosphate Buffered Saline”
PLATINO –	“Proyecto Latinoamericano de Investigacion en Obstrucción Pulmonar”
Plg –	Plasminogênio
RCL –	“Reactive Center Loop”
RIN –	“RNA Integrity Number”
RNA –	“Ribonucleic Acid”
RT qPCR –	“Real-Time quantitative Polimerase Chain Reaction”
SFB –	Soro Fetal Bovino
SC –	“Stem Cell”
Serpin –	“Serine protease inhibitor”
SREBPs –	“Sterol Regulatory Element-Binding Proteins”
TA –	Tecido Adiposo
TAE –	Tris-Acetato-EDTA
TBS/T –	“Tris HCl Balanced Saline/Tween 20
TC –	Terapia Celular
TCHT –	Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas
TGF-β1 –	“Tumor Growth Factor -β1
tPA –	“tissue-Type Plasminogen Activator”
uPA –	“urokinase Plasminogen Activator”
VLDL –	“Very Low Density Lipoproteins”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica 15
1.2 Células-tronco 19
1.3 Terapia celular 22
1.4 Terapia celular em Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica/Enfisema pulmonar 24
1.5 Inibidor do Ativador de Plasminogênio 1 e migração celular 26
1.6 Sinvastatina e PAI-1 29

2 OBJETIVOS 32
2.1 Objetivo Geral 32
2.2 Objetivos Específicos 32

3 MATERIAIS E MÉTODOS 33
3.1 Animais 33
3.2 Gavagem 33
3.3 Avaliação da expressão gênica 34
3.3.1 Extração de RNA 34
3.3.2 Real Time quantitative Polimerase Chain Reaction (RT qPCR) 35
3.3.3 Dosagem de proteínas 35
3.3.4 Western Blotting 35
3.4 Ensaio de Migração 36
3.5 Ensaio de Atividade da Elastase 37
3.6 Modelo experimental de enfisema pulmonar 37
3.7 Obtenção e cultivo de CTM 39
3.7.1 CTM GFP^+ 39
3.7.2 CTM Luc^+ derivadas da medula óssea 39
3.7.3 CTM Luc^+ derivadas do tecido adiposo 40
3.8 Caracterização das CTM – ensaio de diferenciação 42
3.9. Terapia celular 42
3.10 Detecção do transplante celular (“homing”) por bioluminescência 43
3.11 Avaliação do enfisema pulmonar 44
3.11.1 Pletismografia 44

3.11.2 Morfometria 44
3.12 Avaliação do efeito da sinvastatina na expressão de PAI-1 *in vitro* 45
3.13 Resumo dos Grupos Experimentais 46
3.14 Análise Estatística 46
3.15 Aspectos Éticos 47
3.16 Desenho Experimental 47

4 RESULTADOS 48
4.1 Determinação da dose de sinvastatina 48
4.2 Modelo animal de terapia celular para o enfisema pulmonar 55
4.3 Terapia celular e sinvastatina 62

5 DISCUSSÃO 71

6 CONCLUSÃO 79

7 REFERÊNCIAS 80

8 ANEXOS 93
8.1 Anexo A: Certificado Comitê de Ética 93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Define-se como Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica – DPOC o grupo de patologias que têm como característica comum a obstrução progressiva e não reversível das vias aéreas. Relaciona-se à DPOC a perda de função do tecido pulmonar decorrente de uma síndrome inflamatória crônica do tecido em resposta a partículas e gases nocivos (1, 2). Como consequência, ocorrem mudanças estruturais e funcionais das vias aéreas e do parênquima pulmonar (1–4).

Duas entidades nosológicas podem ser associadas à DPOC, a bronquite crônica e o enfisema pulmonar. A bronquite crônica pode ser definida como o aumento das secreções brônquicas por um período de, ao menos, três meses por ano, durante dois anos sucessivos. Decorre da inflamação das vias aéreas, com formação de plugues luminais, fibrose e aumento da resistência das vias aéreas (2, 5). Por sua vez, o enfisema pulmonar apresenta como principal característica o aumento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal decorrente da destruição das paredes alveolares sem fibrose aparente (1, 3). A presença e intensidade de ambas variam de paciente para paciente, bem como sua contribuição na presença de comorbidades associadas.

Quanto à etiopatogenia, pode-se afirmar que a DPOC tem um caráter multifatorial resultante da exposição a poluição, gases tóxicos e fumaça de cigarro, dentre outros fatores agressores, associados a uma predisposição genética, que resultam em uma resposta inflamatória exacerbada e crônica do tecido pulmonar (1, 6). Este processo inclui diversas células inflamatórias tanto da imunidade inata quanto adaptativa, bem como seus respectivos mediadores. Esta resposta está estreitamente ligada ao desequilíbrio do processo de reparo e remodelação estrutural extremamente dinâmico do tecido pulmonar (1, 2, 7, 8).

Pacientes com DPOC apresentam níveis exacerbados de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar, tais como elastase neutrofílica, catepsinas G, B, K, L e S, metaloproteinases 8, 9 e 12, bem como proteinase 3. Também apresentam expressão diminuída de fatores protetores, como alfa-1 antitripsina, antiquimiotripsina, inibidores de leucoproteinase secretória e inibidores de metaloproteinases 1-4 (1, 9–13). Desta forma, um desequilíbrio entre o processo inflamatório e fatores protetores promoveria a destruição dos septos e vasos

alveolares, bem como produção de muco e obstrução das vias aéreas. Este processo inflamatório leva a eventos irreversíveis, tais como apoptose de células epiteliais, proteólise do espaço aéreo terminal e de componentes da matriz extracelular, dentre outros. Assim, têm papel fundamental na patogenia da DPOC células como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, bem como suas respectivas citocinas pró-inflamatórias e enzimas, como a elastase neutrofílica. (1, 2, 7, 14).

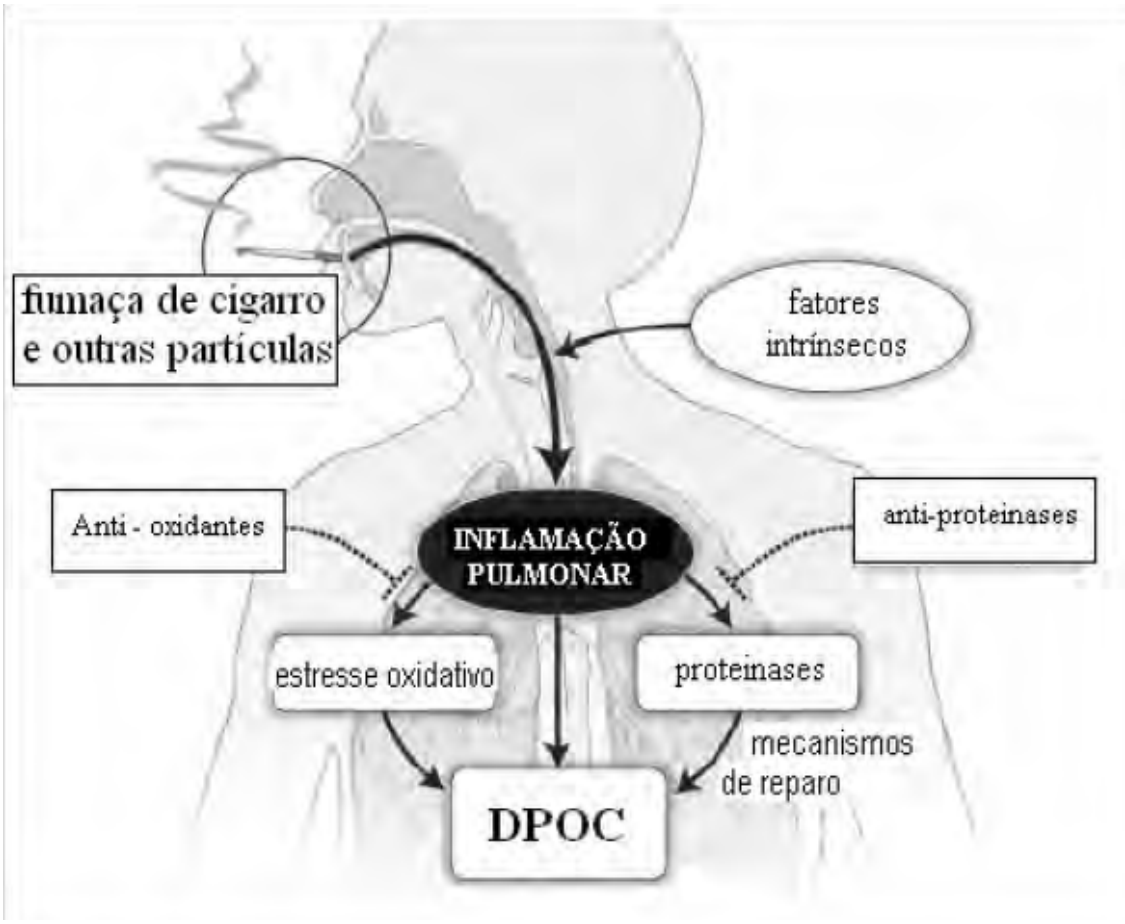


Figura 1. Patogenia da doença pulmonar obstrutiva crônica
Fonte: Faria, 2012 (15) .

A destruição do tecido causada pelo processo inflamatório exacerbado reduz a capacidade de troca gasosa e elástica do tecido pulmonar, resultando em dispneia progressiva crônica e irreversível, principal sintoma relacionado à DPOC. Também é responsável pela produção de muco e tosse crônica. Em pacientes fumantes de longa data, ou expostos a fatores de risco adicionais, os sintomas originam-se por volta dos 40 anos de idade (1, 13). Um estudo em cidades latino-americanas intitulado PLATINO – Proyecto Latinoamericano de Investigacion en Obstrucción Pulmonar relacionou à DPOC uma diminuição do Índice de

Massa Corporal – IMC dos pacientes (1, 16). A tendência atual que se apreende da literatura é considerar a DPOC como uma doneça sistêmica associada a várias comorbidades como, perda da massa muscular, caquexia, doença isquêmica cardíaca, osteoporose, anemia normocítica, diabetes, síndrome metabólica e depressão (1).

Para realização do diagnóstico, os sintomas são divididos em quatro categorias de acordo com critérios clínicos e laboratoriais: no primeiro grau, leve, estão presentes tosse e catarro recorrente. No segundo grau, moderado, há um agravamento da obstrução do fluxo aéreo, exigindo maior esforço respiratório e dispneia a grandes e médios esforços, como subir escadas e caminhadas. No terceiro grau, severo, a restrição do fluxo aéreo agrava-se, com resultante piora na qualidade de vida do paciente devido a fadiga e dificuldade em atividades diárias, como tomar banho e vestir-se. No quarto e último grau, muito severo, o paciente apresenta grave limitação do fluxo aéreo e *cor pulmonale*, sendo frequentemente necessária oxigenoterapia (1).

Em decorrência de seu caráter crônico e sintomatologia que afeta severamente a qualidade de vida, a DPOC é considerada um grave problema de saúde pública. Por seu caráter debilitante, aumenta as chances de morte prematura, é responsável por longos períodos de ausência no trabalho e aumenta o número e duração de internações hospitalares, tendo portanto alto custo socioeconômico (1, 17).

A prevalência, morbidade e mortalidade da DPOC variam entre os países e entre diferentes grupos no mesmo país. Por ser resultado de exposição cumulativa durante décadas, frequentemente a DPOC está diretamente relacionada ao hábito tabágico e também, em vários países, à exposição ocupacional e à poluição atmosférica, resultantes da queima de madeira e outros combustíveis de biomassa, sendo estes portanto os principais fatores de risco, em conjunto com a predisposição genética (1, 2, 7, 18).

Em síntese, a DOPC resulta da interação entre genoma e fatores ambientais. Dentre as pessoas com o mesmo histórico de fumo, nem todas desenvolvem DPOC devido a diferenças na predisposição genética à doença ou idade. Os fatores de risco interagem entre si de forma complexa, por exemplo, o sexo pode influenciar a exposição ocupacional a partículas e gases nocivos, ou a adoção ou não do hábito tabágico. O status socioeconômico pode relacionar-se com o peso ao nascer de uma criança, impactando o crescimento e desenvolvimento pulmonar, e por consequência, suscetibilidade à doença. O status socioeconômico pode também relacionar-se a uma maior expectativa de vida, permitindo um maior tempo de exposição a fatores de risco ambientais. O fator de risco genético mais bem documentado é a deficiência de alfa-1 antitripsina, um fator circulante inibidor de proteases séricas. Apesar de

responsável por apenas uma pequena parte do total de casos de DPOC, ilustra a interação entre exposição ambiental e genética na etiopatogenia da DPOC, bem como o papel do desequilíbrio entre fatores agressores e protetores (proteases versus antiproteases) na etiopatogenia da DPOC (1, 2, 9, 18–20).

Em 2013, estimou-se que a prevalência de DPOC estaria ao redor de 300 milhões de indivíduos ao redor do planeta. Atualmente a DPOC é considerada a quarta causa de mortalidade mundial e calcula-se que em 2020 poderá se tornar a terceira. Espera-se que o custo social, bem como impacto financeiro, aumentem em consequência do envelhecimento da população (1, 3, 7, 21).

Apesar de prevenível e tratável, ainda não se logrou até o presente uma forma de tratamento que resulte na cura completa, ou que possa reverter a perda de função pulmonar associada à DPOC. Desta forma, a terapêutica atual baseia-se no controle dos sintomas e melhora da qualidade de vida do paciente, incluindo: i) medicações, como broncodilatadores, corticoesteroides ou anticolinérgicos, visando melhora parcial e transitória da dispneia; ii) terapia de reabilitação, promovendo utilização mais eficaz da musculatura respiratória, com menor gasto de oxigênio, permitindo a execução de pequenos afazeres diários e melhora na qualidade de vida; iii) oxigenoterapia, buscando o aumento da expectativa de vida, principalmente dos pacientes em estágios mais avançados, e iv) controle do *cor pulmonale*, utilizando terapias cardiovasculares e ventilação assistida durante crises de dispneia e broncoespasmo (1, 7, 22, 23).

Técnicas invasivas e radicais, como cirurgia redutora do volume pulmonar e transplante pulmonar, podem ser empregadas com relativo sucesso, porém a complexidade dos recursos necessários, os riscos inerentes, bem como escassez de doadores, limitam seriamente seu emprego (1, 7, 9, 24).

Considerando o insucesso da terapêutica atual a longo prazo e a necessidade de um melhor entendimento da etiopatogenia da DPOC para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, diferentes modelos animais têm sido propostos por diversos grupos de pesquisa (2, 8, 19, 25).

Os trabalhos com modelos animais de DPOC iniciaram-se com Gross e colaboradores na década de 1960, quando os autores verificaram destruição significativa do tecido alveolar em ratos após instilação de papaína (26). Após estes trabalhos, diferentes modelos animais vêm sendo desenvolvidos. De forma geral, a indução é realizada pela instilação intranasal ou intratraqueal de agentes exógenos como proteases, principalmente elastase porcina

pancreática, papaína e elastase neutrofílica humana. A indução por exposição à fumaça de cigarro e a criação de animais transgênicas e/ou "knockout" também são utilizadas (2, 19).

A elastase pancreática porcina – EPP, ao ser administrada no tecido pulmonar por instilação intratraqueal ou intranasal, acarreta aumento significativo dos espaços aéreos em roedores, cobaias, cães e primatas, além de atrair ao pulmão células inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos. Assim, resulta em lesão estrutural e resposta inflamatória semelhante ao enfisema pulmonar em modelo animal. A instilação de proteases apresenta como vantagens a rapidez e praticidade em relação aos modelos gerados por fumaça de cigarro e transgênicos (2, 7, 19).

Buscando elucidar o papel das proteases e metaloproteinases na etiopatogenia da DPOC, Churg e colegas, em 2007, submeteram cobaias à exposição à fumaça de cigarro e administraram a estes animais inibidores seletivos das metaloproteinases 9 e 12. Os animais que receberam os inibidores não desenvolveram enfisema, diferentemente do grupo apenas exposto à fumaça de cigarro (27).

Wilson e colaboradores em 2008 verificaram que a transdução lentiviral de células da medula óssea de camundongos foi capaz de produzir *in vivo* alfa-1-antitripsina humana em camundongos receptores. Os camundongos que receberam as células mostraram menor propensão ao desenvolvimento da DPOC, tornando-se ferramentas valiosas no estudo do papel de anti-proteases no processo de mobilização de células progenitoras da medula óssea e sua habilidade na prevenção do enfisema pulmonar (28).

Embora os modelos animais não mimetizem exatamente o quadro de DPOC observado em humanos, representam uma ferramenta de grande valor para o estudo da fiosiopatologia e etiopatogenia da doença, bem como na busca de novas alternativas terapêuticas, como a terapia celular com células-tronco (2, 7, 19).

1.2 Células-tronco

Células-tronco (CT) são células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação e diferenciação em tipos celulares especializados (29). Melton e Cowan propuseram, em 2004, uma "working definition" para as CT "… uma entidade clonal autorrenovável que é multipotente e pode dar origem a vários tipos de células diferenciadas" (30). Apesar das variações conceituais há dois aspectos comuns que caracterizam as CT: i) a capacidade de

autorrenovação por divisão celular e ii) não são diferenciadas e, portanto, sob condições fisiológicas ou experimentais específicas, podem assumir características de células especializadas (2, 7, 31).

As características atribuídas às células-tronco foram propostas pela primeira vez *in vivo* por Maximov no início do século XX. Ao estudar o tecido hematopoético, o autor propôs que leucócitos migrariam por entre os tecidos dando origem aos componentes do sistema circulatório. Desde então muitos avanços foram alcançados no entendimento da fisiologia do tecido hematopoético e das CT, porém o tecido hematopoético permanece como modelo mais estudado de CT *in vivo* (32).

As células-tronco podem ser classificadas quanto a seu potencial de diferenciação ou ao tecido de origem. Quanto ao potencial de diferenciação, podem ser classificadas em: i) totipotentes – com capacidade para originar os tecidos embrionários e seus anexos, exemplo: célula-ovo ou zigoto; ii) pluripotentes – podem gerar diferentes tipos celulares pertencentes a diferentes folhetos embrionários, exemplo: células da massa celular interna do blastocisto; iii) multipotentes – precursoras de diferentes tipos celulares pertencentes a mesma linhagem do seu tecido de origem, exemplo: células do tecido hematopoético. Há também células que originam apenas um tipo celular, apresentando função repositora, como as células-tronco da epiderme (31, 33, 34). Quanto ao tipo, as CT podem ser embrionárias ou adultas.

As células-tronco denominadas embrionárias (CTE) correspondem às células da massa celular interna de blastocisto. Apresentam capacidade de auto-renovação e manutenção do estado indiferenciado *in vitro*. São pluripotentes, qual seja, podem originar, virtualmente, todos os tecidos de um indivíduo, exceto a placenta e anexos embrionários (31).

As CTE foram, pioneiramente isoladas, em 1981, por dois grupos independentes de pesquisadores. O grupo liderado por Martin J. Evans em colaboração com Mathew Kaufman e paralelamente, no mesmo ano de 1981, por Gail R. Martin, que obteve uma linhagem de células pluripotentes a partir da massa celular interna de blastocisto de camundongos (35, 36). Abriram-se com estes trabalhos novas vias de pesquisa em estudos de desenvolvimento, diferenciação celular e testes de teratógenos in vitro.

Apesar dos avanços nas pesquisas e do grande potencial de diferenciação das CTE, o emprego deste tipo celular encontra restrições de ordem ética e religiosas, além de limitações técnicas. As restrições de ordem ética e religiosas decorrem da possibilidade do emprego de embriões no estágio de blastocisto como fonte de CTE. As implicações de ordem técnica, mais pragmáticas e objetivas, decorrem do potencial ou capacidade de diferenciação das CTE, uma vez ainda não se dispõe de conhecimento técnico que permita o controle da diferenciação

das CTE, que sendo pluripotentes poderiam, quando infundidas num organismo receptor, se diferenciar em qualquer tecido derivado dos folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme) e, como consequência, dar origem a teratomas ou teratocarcinomas (31, 37–39). Desta forma, a possível tentativa de terapia com CTE poderia implicar numa condição patológica de maior gravidade do que a própria doença de base para a qual se pretendia um possível efeito benéfico com as CTE. Em função desses aspectos a células-tronco adultas (CTA) representam uma alternativa terapêutica ao uso de embriões, bem como, por uma série de características, uma alternativa interessante em terapia celular (37, 39).

As CTA podem ser definidas como um grupo celular que apresenta o potencial de auto-renovação, por longos períodos de tempo e capacidade de originar todos os tipos celulares especializados do tecido do qual se originaram (31). De acordo com o tecido de origem, as células-tronco adultas apresentam algumas especificidades e por isso são divididas em 2 grandes grupos gerais distintos: Células-tronco Hematopoéticas (CTH) e células estromais mesenquimais (CTM) (40).

Os trabalhos de Till e McCulloch, em 1961, foram determinantes para estabelecer o conceito de células-tronco. Os autores identificaram uma população de células capazes de formar colônia no baço de camundongos submetidos à radiação ionizante após transplante de medula (41). Posteriormente, verificou-se que estas células eram oriundas de células fenotipicamente distintas, capazes de repovoar o sistema hematopoético por longo período (42). Em indivíduos adultos, estas células estariam quiescentes na maior parte do tempo e seriam responsáveis por manter a população de células progenitoras do tecido hematopoético durante a vida do indivíduo, por isso foram chamadas células-tronco hematopoéticas (43, 44). Funcionalmente, as células-tronco hematopoéticas têm a capacidade de reconstituir o sistema hematopoético em animais imunodeficientes ou de iniciar e sustentar por longo período e hematopoese em cultura. Fenotipicamente, são definidas como apresentando os marcadores de superfície CD34, CD49f, CD90, CD117 e CD133 e sendo negativas para marcadores de linhagens específicas (45). Células-tronco hematopoéticas também pode ser isoladas a partir do cordão umbilical (46). Constituem o modelo de células-tronco mais estudado até o presente e o único utilizado na prática clínica, considerando-se o transplante de medula óssea (47).

As células estromais mesenquimais multipotentes, ou células-tronco mesenquimais (CTM) foram primeiramente identificadas por Friendenstein e colegas, durante os trabalhos realizados ao longo das décadas de 60 e 70, do século passado. Os autores identificaram células fusiformes, aderentes ao plástico, com capacidade de originar osso e cartilagem e que

formavam colônias (48). Inicialmente, essas células foram denominadas como Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos (Colony-forming Units-fibroblast – CFU-F) (48, 49). A partir dos trabalhos iniciais de Friedenstein foram implementados vários estudos com a finalidade de caracterizar e identificar o grupo de células aderentes de origem mesenquimal (50, 51).

Ao longo dos anos, as células aderentes de origem mesenquimal identificadas por Friedenstein receberam diferentes denominações, tais como Células Progenitoras Mesenquimais e Células Estromais de Medula Óssea (50, 52). Em 1991, Arnold Caplan propôs a denominação Células-tronco Mesenquimais (53). Buscando uniformizar a nomenclatura mesenquimal, um grupo de especialistas, durante a reunião da Sociedade Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy – ISCT), em 2005, propôs a denominação células estromais mesenquimais multipotentes (Multipotent Mesenchymal Stromal Cells) para se referir à população de células-tronco aderentes não hematopoiéticas, recomendando, no entanto, que se mantivesse o acrônimo CTM (54).

Segundo a ISCT há 3 critérios mínimos para que uma célula seja considerada mesenquimal: capacidade de aderência à superfície plástica; presença (≥ 95%) de marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e ausência (≤ 2) dos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA classe II; potencial de diferenciação em osso, cartilagem e tecido adiposo, sob determinadas condições de indução *in vitro* (55).

Embora a médula óssea tenha sido o primeiro órgão identificado como fonte de CTM, outros órgãos e tecidos têm sido apontados como fontes potenciais dessas células, como o cordão umbilical, placenta e, mais recentemente, o tecido adiposo (19, 56, 57). O tecido adiposo (TA) representa atualmente uma importante fonte de CTM, em função de uma série de características, tais como: obtenção por meio de procedimentos pouco invasivos, com baixa incidência de morbi-mortalidade e com grande disponibilidade de material para pesquisas básicas e terapia celular (57).

1.3 Terapia celular

A Terapia Celular (TC) pode ser conceituada, de forma ampla e genérica, como o emprego de células para o tratamento de doenças. Considerada nesta perspectiva ampla, a terapia celular representa uma antiga prática terapêutica, iniciada com a transfusão sangue

total ou concentrado de plaquetas em diferentes situações clínicas, agudas ou crônicas (2, 7, 18). Diversos tipos celulares têm sido investigados quanto ao seu potencial de utilização para TC, destacando-se células-tronco hematopoéticas (CTH) e CTM (7, 18, 58, 59).

Como referido anteriormente, Till e McCulloch realizaram, em 1961, o primeiro transplante de medula em ratos, que permitiu a reconstituição do sistema hematopoético de animais submetidos a doses letais de irradiação. O trabalho desses autores foi fundamental para estabelecer o conceito de célula-tronco hematopoética (41). O primeiro transplante de medula, ou transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH), bem sucedido em humanos, foi realizado entre gêmeos monozigóticos pela equipe de Edward D. Thomas, em 1956 (60). No entanto, por questões não bem compreendidas à época, os transplantes de medula eram apenas bem sucedidos entre gêmeos monozigóticos. O avanço no conhecimento sobre os antígenos de histocompatibilidade humana (sistema HLA), decorrentes dos trabalhos desenvolvidos por Jean Dausset, em 1952 permitiu estabelecer critérios racionais de seleção e compatibilidade entre doadores e receptores de medula óssea (61). A partir desses avanços, Edward D Thomas realizou, em 1969, o primeiro transplante de medula alogênico em pacientes humanos (62).

Desde então, diversos trabalhos vem sendo realizados com o emprego da terapia celular com CTH, principalmente em doenças relacionadas ao tecido hematopoético e ao músculo cardíaco. O primeiro trabalho de terapia celular em cardiologia foi conduzido pela equipe do Prof. Philippe Menasché, da Universidade de Paris. Os autores realizaram transplante de mioblastos de músculo esquelético autólogos em pacientes com disfunção ventricular esquerda, após infarto do miocárdio (63).

Além das CTH e CTM, outras fontes potenciais de células para terapia celular tem sido investigadas, dentre as quais encontram-se as células pluripotentes induzidas (IPSc). Em 2006, Takahashi e Yamanaka estabeleceram uma cultura de células a partir de fibroblastos murinos que demonstraram ser pluripotentes. Por meio de reprogramação gênica utilizando vetores virais, os autores ativaram nestes fibroblastos os fatores Oct3/4, Sox2, Nanog e c-Myc. As células transformadas mostraram-se capazes de dar origem a células dos três folhetos embrionários e apresentaram características morfológicas e perfil de expressão gênico semelhantes a células naturalmente pluripotentes, as células da massa celular interna do blastocisto. Assim, os autores denominaram estas células como pluripotentes induzidas (64). Apesar de apresentarem diferenças em relação às células embrionárias com relação ao imprinting genético e epigenética, a técnica de indução de pluripotência foi utilizada com

sucesso por outros autores em diferentes tipos celulares tanto de modelos animais quanto culturas de células humanas (65–70).

Para as células pluripotentes induzidas serem utilizadas na terapia celular ainda existem dificuldades a serem superadas, como o fato de as células serem geneticamente transformadas, além do potencial tumorigênico devido ao fato de serem pluripotentes, fazendo-se necessários vários estudos de segurança (71). De forma pioneira, Takahashi e colaboradores desenvolveram uma linhagem de células pluripotentes induzidas e posteriormente estimularam a diferenciação em células da retina para posterior implante em paciente com degeneração macular. Um estudo minucioso da caracterização das células a serem utilizadas foi publicado em 2014 (72), porém os resultados da terapia ainda não foram publicados.

Vários aspectos da terapia celular ainda precisam ser elucidados. Um dos principais desafios no estabelecimento de novos grupos celulares para terapia é a caracterização e seleção de populações responsáveis pela remodelação durante o processo de reparo após a injúria(73, 74). Além desses aspectos, as baixas taxas de sobrevivência das células transplantadas dificultam ao sucesso da terapia celular (2, 73–75).

Divisão, diferenciação e migração celular são processos críticos para o sucesso da terapia celular. Desta forma, a matriz extracelular e moléculas de adesão capazes de regular a proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência das CT são fatores cruciais para a compreensão do mecanismo de ação das células-tronco e cujo avanço no conhecimento deverá concorrer para o sucesso e reprodutibilidade dos procedimentos de terapia celular em medicina humana e veterinária (76).

1.4 Terapia celular em Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica/Enfisema pulmonar

Os primeiros relatos de terapia celular em pulmão remontam ao ano de 1995, quando Pereira e colaboradores, pioneiramente, verificaram por meio de PCR a migração de CT derivadas da medula óssea para o tecido pulmonar de camundongos receptores. As células puderam ser observadas por um período de até 5 meses, indicando que teriam se incorporado ao tecido receptor e se difundido pelo parênquima pulmonar (77).

A seguir, Krause e colaboradores, em 2001, por meio da técnica de FISH – Fluorescent In-Situ Hibridization, detectaram a presença de células positivas para o cromossomo Y no

tecido pulmonar de fêmeas receptoras de células de doadores machos (78). Da mesma forma, a migração de células para o tecido pulmonar, após transplante, foi observada por Kotton e colaboradores em 2001 utilizando células marcadas com Lac-Z após incubação com X-Gal (79).

Em humanos, a presença de células oriundas da medula óssea no tecido pulmonar de receptores após transplante foi observada por Surrat e colaboradores em 2003. Os autores detectaram a presença de células positivas para o cromossomo Y no tecido pulmonar de pacientes do sexo feminino após terem recebido, por diversas razões, transplante de medula óssea de doadores do sexo masculino (80).

Jungebluth e colaboradores em 2011 observaram que a terapia celular com CTM da medula óssea poderia reestabelecer a função pulmonar em ratos portadores de hipertensão pulmonar tromboembólica crônica - HPTE. Ao infundir por via intratraqueal CTM da medula óssea em ratos portadores de HPTE, os autores verificaram a melhora significativa e duradoura de parâmetros clínicos e mudanças nos padrões de expressão de proteínas nos tecidos pulmonar e hepático dos animais tratados. Os autores postularam então que os efeitos terapêuticos das CTM estariam relacionados ao estímulo parácrino de processos reconstrutores do próprio tecido receptor (81).

Desta forma, a terapia celular com CTM têm se mostrado uma ferramenta promissora no tratamento de doenças degenerativas, principalmente de caráter inflamatório, como a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (2, 25, 73). Assim, trabalhos envolvendo a terapia celular em modelo animal de DPOC foram realizados por diferentes autores. A melhora de padrões histomorfológicos do tecido pulmonar foi observada em modelo animal de DPOC induzida por instilação intranasal de protease ou fumaça de cigarro seguida de infusão intravenosa ou intratraqueal de CTM derivadas da medula óssea ou do tecido adiposo (2, 25, 82–85). Estudos em modelos animais e em humanos têm demonstrado que a administração de CTM é um processo seguro e potencialmente promissor (7, 9, 18, 25, 86–90).

Os resultados prévios obtidos em modelos animais com CTM e/ou “pool” de células mononucleares da medula óssea (CMMO) forneceram o embasamento para a proposição de um protocolo e aplicação clínica de CMMO em pacientes humanos com enfisema pulmonar. Em 2009 foi publicado o primeiro artigo com o emprego de CMMO autólogas para o tratamento de pacientes com enfisema pulmonar em grau avançado. Os resultados mostraram que a terapia celular com CMMO para o tratamento do enfisema é um procedimento seguro, sem efeitos adversos significativos (9). O seguimento dos pacientes por um período de até 30

meses mostrou uma melhora dos parâmetros laboratoriais, bem como uma queda na velocidade de progressão da doença. Os pacientes relataram, ainda, melhora na qualidade de vida (91).

Em outro estudo, realizado por Weiss *et al.*, 2013, foram incluídos 62 pacientes que receberam CTM de um "pool" de doadores de medula óssea, comercialmente registradas como Prochymal (Osiris Therapeutics Incorporated, Columbia, MD, EUA). As células foram cultivadas até a quinta passagem e os pacientes receberam quatro infusões (0, 30, 60 e 90 dias). Neste estudo não houve registro de efeitos adversos, porém não se constatou melhora clínica e laboratorial dos pacientes (88).

Após esses trabalhos pioneiros de terapia celular em pacientes com DPOC/enfisema pulmonar, novos protocolos clínicos com novas abordagens terapêuticas têm sido propostos. A plataforma Clinical Trials do National Institutes of Health – NIH, EUA, registra atualmente 16 estudos com terapia celular com células-tronco em DPOC, que se desenvolvem em diferentes regiões do planeta, sendo deste total 2 estudos realizados no Brasil: um deles já completado e um novo protocolo clínico em desenvolvimento, recrutando pacientes (ClinicalTrials.gov).

1.5 Inibidor do Ativador de Plasminogênio 1 e migração celular

Um importante mediador da sobrevivência de CTM pós-transplante é a glicoproteína Inibidora do Ativador de Plasminogênio 1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1 – PAI-1). Copland e colaboradores, em 2009, verificaram que a sobrevivência das células infundidas no tecido transplantado é aumentada na presença de anticorpos neutralizadores de PAI-1 (9, 91, 92).

PAI-1 é um regulador chave do sistema de ativação do plasminogênio. Foi descrito pela primeira vez por Erickson e colaboradores em 1984 (75). Trata-se de uma glicoproteína de cadeia única de mais de 40 proteínas com aproximadamente 35% de homologia, membro do clado E da superfamília de inibidores de proteases séricas (Serpin), por isso também chamada SerpinE-1. É composta por três folhas beta (A, B e C) e nove alfa-hélices (A – I), com um peptídeo-sinal N-terminal e um loop de centro reativo (RCL) C-terminal. É sintetizada em sua conformação ativa, mas converte-se espontaneamente em uma forma latente com meia vida de 1 a 2 horas, podendo estender-se até dez vezes quando ligada a vitronectina (93).

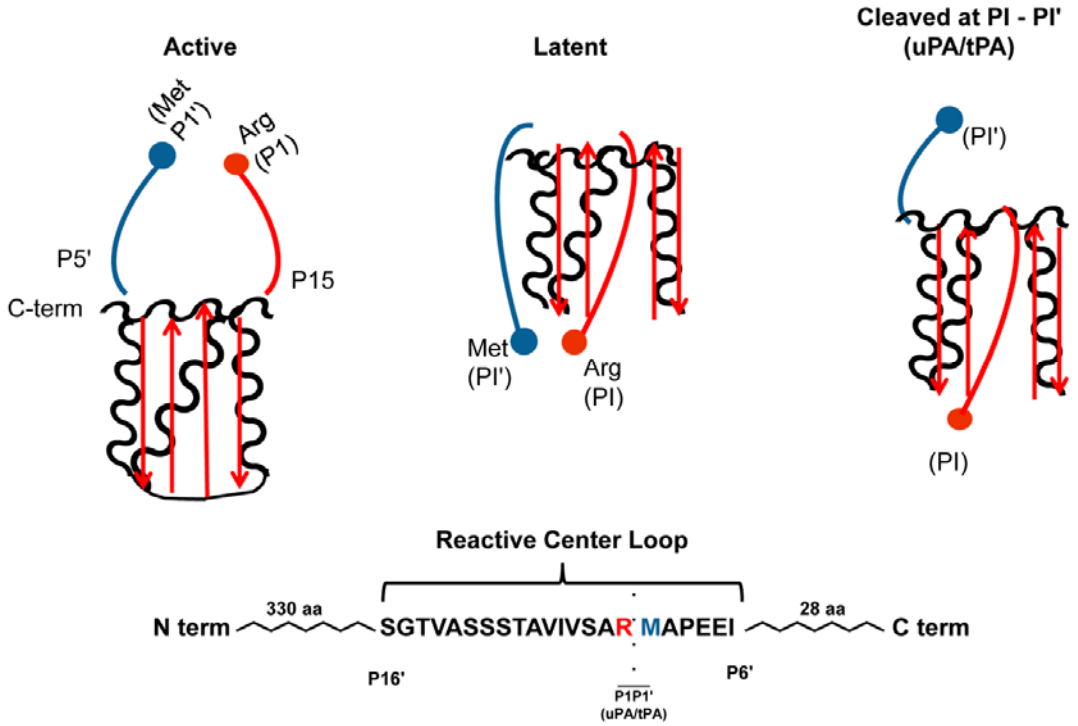


Figura 2. Conformações da glicoproteína PAI-1
Ativa (Active), com a região de "looping" do centro reativo (Reactive Center Loop), latente (Latent) e clivada na região PI-PI' (Cleaved at PI-PI'). Fonte: Simone e Higgins, 2015 (94)

Na sua conformação ativa, no centro reativo encontra-se uma região de "looping" (Arg^{346}/Met^{347}) que atua como "isca" para os ativadores de protease sérica uroquinase (urokinase Protease Activator - uPA) e "tissue-type" (tissue-type Protease Activator – tPA). Esta ligação é então clivada ao interagir com a protease-alvo formando uma ligação éster covalente entre o grupo hidroxil da serina da enzima e o grupo carboxil do PAI-1. Como resultado, há uma separação dos resíduos P1 e P1' deformando a protease e PAI-1, tornando ambos inativos. Trata-se portanto de um "inibidor suicida" (94)

Por sua vez, a uPA catalisa a clivagem do plasminogênio (Plg) em uma protease ativa, a plasmina, que atua sobre proteínas da matriz extracelular, degrada a fibrina e ativa metaloproteinases latentes na matriz extracelular, atuando desta forma sobre processos como adesão celular, proliferação e motilidade (94). Relaciona-se, portanto, a uma cascata proteolítica envolvida em vários processos fisiopatológicos importantes, como a trombólise vascular, migração celular durante a inflamação, invasão tumoral e neovascularização (95). Assim, o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), além de afetar a fibrinólise, regulando a plasminogênese, também modula a migração celular, especificamente a deposição de vitronectina em locais de injúria, ao modular a ligação da vitronectina ao receptor do uPA, inibindo a migração celular ao bloquear o receptor RGD (96).

PAI-1 está envolvida na resposta rápida (aguda) a injúrias, sendo sua expressão modulada por diferentes fatores de crescimento e citocinas. É um membro altamente expresso do grupo de genes responsivos ao fator de crescimento de tumor -β1 (TGF-β1) e participa no controle espacial e temporal do reparo de feridas. (97).

Imediatamente após a injúria, citocinas liberadas no local, como TGF-β e EGF, induzem a expressão de PAI-1 nos queratinócitos limítrofes à lesão, estimulando a migração e re-epitelização. A expressão continuada de PAI-1 contribui para a migração de fibroblastos e, em última instância, para a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (94, 98).

Sabe-se que plasmina está envolvida na apoptose de fibroblastos (94, 98), porém não se sabe se este processo é mediado por níveis diminuídos de atividade de PAI-1. É possível que ao manter-se em níveis elevados devido a ciclos contínuos de reparo, PAI-1 estimule a diferenciação de miofibroblastos, levando ao espessamento do tecido e deposição de matriz. Isto explicaria os achados de níveis elevados de PAI-1 em queloides, sugerindo seu envolvimento no fenótipo de cicatrização hipertrófica, bem como na patofisiologia de desordens como anomalias de reparo de lesão, câncer e fibrose de diferentes tecidos (99).

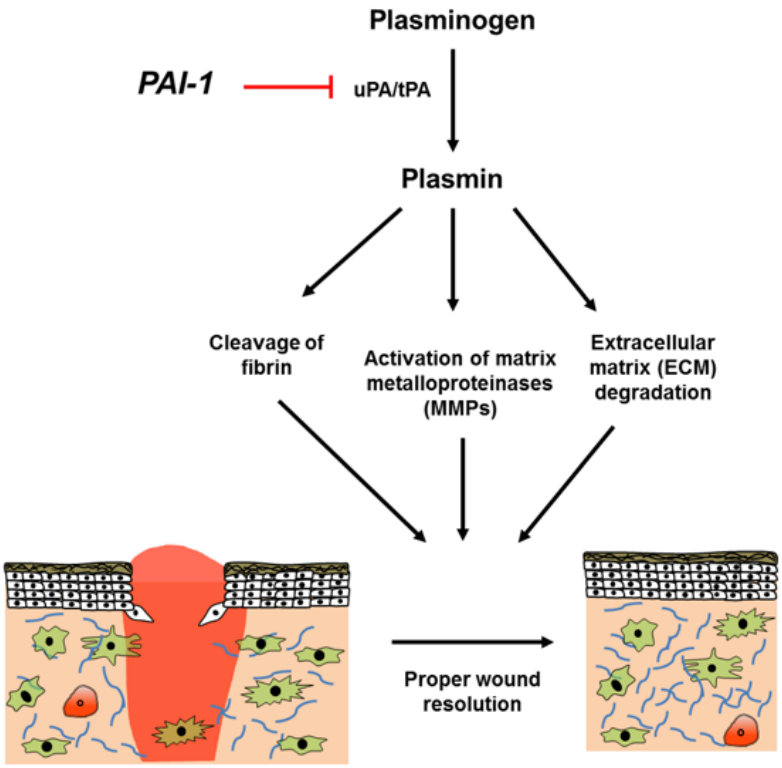


Figura 3. PAI-1 e fibrose

O PAI-1, ao clivar-se em (urokinase Protease Activator - uPA) e "tissue-type" (tissue-type Protease Activator – tPA) promove a ativação do plasminogênio (Plasminogen) em plasmina (Plasmin), protease envolvida na clivagem da fibrina, ativação de metaloproteinases de matriz (Matrix Metalloproteinases – MMPs) e degradação da matriz extracelular, processos envolvidos na resolução de injúria e fibrose tecidual. Fonte: Simone e Higgins, 2015 (94,98,100,101).

O PAI-1 está também associado à regulação de vias sinalizadoras como a PI3-k/Akt e Jack/Stat, envolvidas na manutenção da integridade de células endoteliais, regulando portanto a morte celular (94). Fleetwood e colaboradores, 2014, descrevem o PAI-1 como um regulador-chave do processo inflamatório ao controlar o processo de invasão, adesão e remodelamento da matriz extracelular em macrófagos, devido ao seu importante papel em na cascata proteolítica relacionada a processos celulares como adesão, motilidade e quebra da matriz extracelular, coordenada pela uroquinase ativadora de plasminogênio uPA, e seu receptor (100). Hogan e colaboradores, 2013, apresentam o PAI-1 como importante mediador no processo de migração de células de câncer de colo retal (95). De forma semelhante, Hazra e colaboradores, 2013, verificaram que a diminuição dos níveis de PAI-1 promoveu a proliferação e migração *in vitro* de células $CD34^+$ por meio da produção aumentada de cGMP e aumento da atividade da PI (3) K (102)

Desta forma, a diminuição dos níveis de PAI-1 possui um potencial terapêutico interessante, ao modular os principais processos envolvidos na criação de um ambiente inóspito durante o processo de injúria (fibrose e migração celular).

1.6 Sinvastatina e PAI-1

As estatinas são uma classe de fármacos amplamente utilizados no tratamento de hiperlipidemias em prevenção primária e secundária. São capazes de mimetizar o substrato natural da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A – HMG-CoA redutase. Esta enzima catalisa a produção de mevalonato, presente no passo inicial da via biossintética do colesterol. Desta forma, ao mimetizar seu substrato, as estatinas promovem a diminuição dos níveis séricos de colesterol inibindo sua síntese no fígado e outros tecidos. Assim, diminuem os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol, reduzindo os riscos de Doença Arterial Coronariana – DAC (103).

Ao interferir na produção do mevalonato, intermediários na via biossintética do colesterol também são afetados pelas estatinas, como o Farnesil Pirofosfato – FPP e o Geranilgeranil Pirofosfato - GGPP. Estes são chamados isoprenóides e atuam como adjuvantes na prenilação. Trata-se de um processo de modificação pós-transcricional baseado na adição de um grupo fenil lipofílico às proteínas, permitindo-as ligar-se à membrana celular. Ao aderir à membrana, as proteínas preniladas podem participar de vários processos

essenciais de sinalização celular. A prenilação ocorre principalmente em proteínas contendo motivo carboxi-terminal como, por exemplo, proteínas envolvidas no controle do ciclo celular. Exemplos de proteínas que sofrem prenilação são: CDC42, RAC, Proteinas-G relacionadas com o RAS, etc. Ao interferir com estas proteínas, as estatinas podem influenciar várias vias de sinalização, principalmente as envolvidas na resposta imune. Desta forma, as estatinas diminuem efetivamente processos inflamatórios, têm efeito inibitório na multiplicação celular e modulam negativamente a proliferação endometrial e angiogênese (104, 105).

As estatinas classificam-se em naturais e sintéticas, diferindo com relação ao perfil farmacocinético, interação farmacológica, potência e efeitos colaterais relacionados a miotoxicidade (105, 106). Os medicamentos da classe das estatinas também são utilizados no tratamento da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH) devido à sua atividade imunomoduladora (107–109).

Faz parte da classe das estatinas a sinvastatina, medicamento empregado no tratamento de dislipidemias capaz de inibir HMG-CoA redutase. É pouco solúvel em água por possuir grupos lipofílicos ligados a uma cadeia lateral comum (Figura 4). Assim, possui baixa penetração em células não hepáticas, apresentando seletividade na inibição de HMG-CoA redutase hepática e início rápido de ação, sendo atingidos os picos de concentração em aproximadamente uma hora. (100, 110). As concentrações plasmáticas da sinvastatina ficam em torno de 5% após administração de doses terapêuticas por via oral devido à ação enzimática mediada no fígado e intestino, pelo citocromo P450 (109, 111).

É administrada na forma de lactona farmacologicamente inativa, sendo considerada um pró-fármaco. Sua conversão ocorre principalmente no fígado, onde é hidrolisada em seu β-hidroxiácido correspondente, um potente inibidor de HMG-CoA redutase. Esta conversão ocorre pela ação de carboxiesterases inespecíficas presentes no fígado, intestino e, em baixas quantidades, no plasma. O extenso metabolismo oxidativo da sinvastatina no fígado é mediado por enzimas do citocromo P450, principalmente CYP 3A4 e CYP 3A5 (112).

Ao inibir a colesterologênese no fígado, a sinvastatina promove a diminuição dos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (Low Density Lipoproteins – LDL) e de muito baixa densidade (Very Low Density Lipoproteins - VLDL), colesterol e triglicerídios plasmáticos, aumentando a expressão do gene receptor de LDL. Resumidamente, em reposta a níveis reduzidos de colesterol livre, os fatores de transcrição aumentam a síntese de receptores de LDL, reduzindo sua degradação. Um número maior de receptores na superfície de hepatócitos resulta na diminuição dos níveis séricos de LDL (112, 113).

Há ainda evidências de que a sinvastatina inibe a apoptose das CTM submetidas à hipóxia, melhorando sua ação regenerativa em infarto do miocárdio (109, 111).

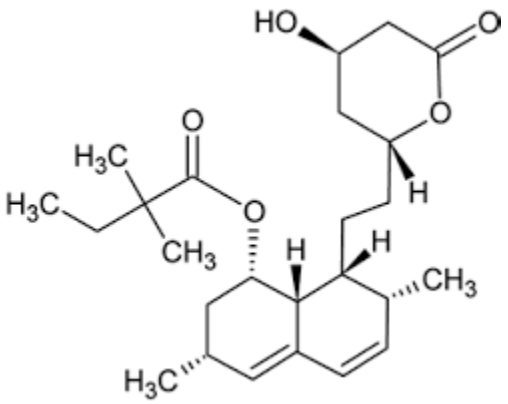


Figura 4. Estrutura química da sinvastatina
Fonte: Lacerda e Lionzo, 2011 (110)

Relatos anteriores da literatura apontam a sinvastatina como redutora dos níveis de PAI-1, fibrinogênio e de fator VIII de coagulação, em pacientes afetados por disfunções no metabolismo da glicose (107), bem como no tecido pulmonar de pacientes com câncer de pulmão (100, 114) e em diferentes tecidos, com pâncreas e fígado (115). A supressão da via sinalizadora do PAI-1 pelas estatinas ocorre pela inibição do fator nuclear κß (Nuclear Factor - κß – NF-κß). O NF κß tem atividade importante na inflamação, proliferação celular, aterosclerose e angiogênese. A ativação do NF κß é associada com disfunção endotelial, enquanto as estatinas são parcialmente anti-inflamatórias por meio da inibição do NF κß. Ni e colaboradores em 2013 propõem que a via RhoA/ROCK tem um importante papel na atuação das estatinas sobre o PAI-1 (116).

Adicionalmente, trabalhos anteriores do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto identificaram o PAI-1 como um dos genes modulados pela sinvastatina que, diminuindo a expressão do PAI-1 em CTM, aumenta sua atividade proliferativa *in vitro* (114, 116). Desta forma, propõe-se neste trabalho o estudo da atividade *in vivo* da sinvastatina sobre a expressão do PAI-1, bem como sua influência no “homing” e “engrafment” das células infundidas em modelo animal de terapia celular com CTM em modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da sinvastatina sobre a expressão do gene PAI-1 e sua influência na terapia celular em modelo experimental de DPOC/enfisema pulmonar.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o modelo animal de DPOC/enfisema pulmonar a ser utilizado
- Avaliar os efeitos da administração oral de sinvastatina na expressão do PAI-1 em diferentes órgãos de camundongos.
- Avaliar a capacidade de migração das células da medula óssea dos animais expostos a diferentes doses de sinvastatina
- Caracterizar as CTM a serem utilizadas.
- Avaliar *in vitro* a bioluinescência das CTM a serem utilizadas.
- Avaliar os efeitos da sinvastatina sobre a expressão do PAI-1 em cultura de CTM.
- Avaliar os efeitos da alteração dos níveis de expressão do gene PAI-1 causadas pela administração de sinvastatina em modelo animal de terapia celular com CTM do tecido adiposo em modelo animal de DPOC/enfisema pulmonar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram empregados neste estudo 39 camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6 de aproximadamente 8 semanas de vida, 32 camundongos fêmeas da linhagem FVB de aproximadamente 12 semanas e 3 camundongos machos da linhagem FVB/Luc^{+} de aproximadamente 7 semanas. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno forradas com serragem, em sala com condições controladas de temperatura e luminosidade (22°C e 12 h – luz e 12 h – escuro) no Laboratório de Estudo Experimentais em Animais – LEEA da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto. Durante todo o período, receberam dieta sólida (ração NuvilabCR1R – Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, PR, Brasil) e água filtrada e autoclavada *ad libitum*.

3.2 Gavagem

Os animais foram submetidos à administração oral diária por gavagem de 100µl de veículo (água/etanol 1%) contendo ou não sinvastatina em diferentes doses, por um período de 15 dias. Utilizou-se uma cânula curva (agulha de aço inox BD-10 de comprimento 31 mm e diâmetro de 1,00 mm com esfera de 1,7mm e 40 mm de raio na ponta – Insight, Ribeirão Preto, São Paulo Brasil). As doses empregadas foram: 10 mg/kg (aproximadamente 0,250mg por animal), 15 mg/kg (aproximadamente 0,375mg por animal) e 25mg/kg de sinvastatina (aproximadamente 0,625mg por animal), definidas de acordo com estudo prévio da literatura caracterizando as doses utilizadas por pacientes. As doses utilizadas estão dentro da janela terapêutica e bem abaixo da dose letal 50 (LD50) para camundongos (3800 mg/kg) (105). Em todos os grupos, as doses foram administradas diariamente por um período de 15 dias, no mesmo período do dia.

Figura 5. Técnica de administração oral por gavagem
Utilizou-se uma cânula curva (agulha de aço inox BD-10 de comprimento 31 mm e diâmetro de 1,00 mm com esfera de 1,7mm e 40 mm de raio na ponta) para depositar volume de 100µl de veículo (água/etanol 1%), contendo ou não sinvastatina em diferentes doses, no esôfago dos animais através da boca.

3.3 Avaliação da expressão gênica

3.3.1 Extração de RNA

Foi extraído RNA dos tecidos ou células utilizando-se Trizol Reagent® (Life Technologies, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) de acordo com as especificações do fabricante. Em suma, os tecidos foram banhados em nitrogênio líquido e macerados até a obtenção de um pó. As células foram cultivadas em placa de 24 poços (TPP – Techo Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) e, após período apropriado de cultivo, removeu-se o meio de cultura. Acrescentou`-se ao tecido pulverizado ou ao poço da placa de cultivo 500 µL de Trizol Reagent®. O RNA foi separado por centrifugação com clorofórmio e glicogênio e lavadas com isopropanol e etanol 70%. As amostras de RNA obtidas foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de TAE/Agarose 1.2% (80 volts por 30 minutos) corado com brometo de etídio e por meio de eletroforese microfluídica por meio do sistema Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), utilizando-se o chip "Eukaryote Total RNA Nano", conforme as especificações do fabricante.

3.3.2 Real Time quantitative Polimerase Chain Reaction (RT qPCR)

Aproximadamente 500 ng de RNA total obtido de cada amostra foram submetidos à transcrição reversa por meio do Kit cDNA High Capacity (Applied Byossistems, Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil) de acordo com as especificações do fabricante. O cDNA obtido foi diluído 5X em água livre de nucleases e realizou-se a reação de PCR em tempo real semiquantitativa com o kit TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Byossistems, Life Technologies) com a sonda PAI-1-FAM TaqMan® Mm00435860_m1 (Applied Byossistems, Life Technologies) e, como controle endógeno, a sonda Taqman® GAPD-VIC®, NM_008084.2 (Life Technologies), no aparelho FAST 7500 (Life Technologies).

3.3.3 Dosagem de proteínas

Foi utilizado o plasma sanguíneo para avaliação dos níveis de PAI-1 circulante. Sangue foi coletado dos animais imediatamente após eutanásia puncionando-se o ventrículo esquerdo manualmente com agulha 27G e tubo de coleta contendo citrado de sódio (BD - Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jerse, USA). O sangue obtido foi centrifugado a 400 g e temperatura ambiente por 20 minutos e o sobrenadante recolhido. As proteínas solúveis presentes no plasma obtido foram quantificadas por meio do kit para ensaio do ácido bicinconínico - BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scietific Inc., Rockford, IL, EUA) de acordo com as especificações do fabricante e concentrações adquiridas no leitor de absorbância Versa MaxPLUS ROM (Molecular Devices, Sannyvale, CA, EUA).

3.3.4 Western Blotting

Para verificação das proteínas, 100µg de cada amostra previamente fervidas por 5 minutos em tampão de amostra 10% DTT v/v (Thermo Scientific), bem como 15 µl de padrão biotinilado cell signaling #7727 (Cell signaling Technoogies, Danvers, MA, EUA) e 15 µl de

padrão page ruler #26619 (Thermo Scientific), foram submetidos a eletroforese no sistema Armersham ECL gel 10% 10 wells (GE Healthcare, Amersham, São Paulo, SP, Brasil) a 160 volts e 400 milliamperes por 60 minutos em tampão Tris-glicina (Tris 25mM; glicina 187mM e SDS 0,1%). Ao final da corrida, os géis foram submetidos à transferência para membranas de nitrocelulose Hibond-P (Thermo) por 90 minutos a 70V, 300 milliamperes e 4ºC, utilizando-se tampão de transferência (Tris 25mM; glicina 192mM; etanol 18.5% e SDS 0,1%). Após a transferência os sítios inespecíficos foram neutralizados com solução de bloqueio (5% de leite desnatado em pó em TBS/T [Tris HCl 50mM pH8,0; NaCl 150mM e Tween-20 0,05% (v/v)]) sob agitação contínua por 60 minutos.

Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes por 15 minutos com solução TBS/T, sob agitação contínua a temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se a incubação com o anticorpo primário PAI-1 sc-8979 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, EUA) ou endógeno GADPH sc-25778 (Santa Cruz Biotechnology), diluído 1:1000 em TBS/T a 4ºC overnight. Depois de novamente lavada com TBS/T (3 vezes por 15 minutos), a membrana foi incubada por 60 minutos à temperatura ambiente em anticorpo secundário goat anti-rabbit HRP SC-2004 (Santa Cruz Biotechnology Inc) diluído a 1:2000 em TBS/T e anticorpo antibiotina cell signaling #7075 diluído a 1:10000. A revelação será feita com Luminol e imagem captada em câmera CCD com software Image-Quant Mini (GE Healthcare) e avaliada no software Image-Quant 4000 (GE Healthcare).

3.4 Ensaio de Migração

Para o ensaio de migração celular, uma alíquota de 10 µL foi retirada para estimar a concentração celular por câmara de Neubauer corando-se com azul de trypan a 4%. A concentração celular foi ajustada de acordo com o ensaio a ser realizado. Em uma placa de 24 poços, depositou-se 300µl de meio de cultura, correspondente ao utilizado no cultivo das células a serem avaliadas, suplementado com 50% de SFB (Gibco, Life Technologies). Sobre o meio de cultura suplementado, depositou-se um incerto com membrana de poros de 8µm Thincert® Greiner Bio-one (Greiner Bio-one Brasil, Americana, SP, Brasil). Dentro do incerto se depositou 200 µL da suspensão celular. Incubou-se por período apropriado de acordo com o ensaio a 37°C e 5% de CO_2. Removeu-se o incerto da placa de cultura, lavou-se com PBS

1X e corou-se com cristal violeta. Observou-se em microscópio óptico com aumento de 200X para estimar a quantidade de células retidas na membrana do incerto.

3.5 Ensaio de Atividade da Elastase

Realizou-se ensaio colorimétrico de atividade da elastase a ser utilizada na indução do enfisema pulmonar nas fases seguintes do estudo. Para tanto, foi utilizado o substrato N-succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida (Sigma Aldrich) (11.076 µmol em 200 µL de Dimetiformamida) diluído 10X em tampão 0.1 M Hepes (Sigma Aldrich) (pH 7.5, 0.5 M NaCl e 10% Dimetilsulfóxido). Em placa de 96 poços de baixa aderência pipetou-se o substrato diluído e a solução de elastase (Sigma Aldrich) a ser testada na proporção 1% v/v e leu-se a 410nm e 25ºC por 10 minutos em intervalos de 1 minuto. Considerou-se E p-nitroanilina = 8800 em 410 nanômetros, utilizou-se o substrato na concentração 0,5 nmol/µL e considerou-se 1 Unidade Internacional de elastase como a hidrólise de 1 µmol substrato/p-nitroanilida por minuto.

3.6 Modelo experimental de enfisema pulmonar

A fim de se avaliar os efeitos da administração de sinvastatina na terapia celular, foi utilizado o modelo animal de enfisema pulmonar como proposto por Longhini-dos-Santos et al., 2013 (117). Resumidamente, os animais foram submetidos a instilação intranasal de 150 µL de solução fisiológica contendo ou não 4UI de elastase porcina pancreática tipo IV (Sigma-Aldrich), divididos em 3 doses de 50 µL em três dias consecutivos.

Figura 6. Instilação intranasal de elastase
Utilizou-se pipetador automático para depositar um volume de 50μL da solução salina, contendo ou não elastase, nas narinas do animal restringido com as mãos. Por reflexo, a solução foi aspirada atingindo as vias aéreas e parênquima pulmonar.

Realizou-se um ensaio piloto para avaliar o modelo animal de terapia celular para enfisema pulmonar a ser utilizado nas fases posteriores do projeto. Para tanto foram utilizados 16 camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6 de aproximadamente 8 semanas obtidas do biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram divididos em quatro grupos de quatro animais: a) Soro - submetidos à instilação intranasal de 3 doses (três dias consecutivos) de 50 μL de solução fisiológica, totalizando 150 μL de solução fisiológica por animal; b) Elastase – submetidos à instilação intranasal de três doses (três dias consecutivos) de 1,3 UI de elastase porcina pancreática tipo IV (Sigma-Aldrich) diluída em 50 μL de solução fisiológica, totalizando 4UI de elastase em 150 μL de solução fisiológica por animal; c) Soro/Meio: submetidos à instilação intranasal de 3 doses (três dias consecutivos) de 50 μL de solução fisiológica, totalizando 150 μL de solução fisiológica por animal e, após 21 dias, foram submetidos à infusão retro-orbital de 100 μL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) e d) Elastase/CTM - submetidos à instilação intranasal de três doses (três dias consecutivos) de 1,3 UI de elastase porcina pancreática tipo IV (Sigma-Aldrich) diluída em 50 μL de solução fisiológica, totalizando 4UI de elastase em 150 μL de solução fisiológica por animal e, após 21 dias, foram submetidos à infusão retro-orbital de 100 μL de suspensão celular em RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) na concentração de 2,6 x 10^7

CTM/ml, (2,6 x 10^6 CTM no total), sendo 50 µL depositados em cada órbita ocular. Os animais foram sacrificados 21 dias após a terapia celular, ou 42 dias após o início do experimento, e tiveram pulmões removidos para análise histológica.

3.7 Obtenção e cultivo de CTM

3.7.1 CTM GFP^+

As CTM utilizadas foram obtidas do banco de linhagens do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, derivadas de camundongos C57Bl/6 GFP^+ gentilmente cedidos ao Laboratório de Genética e Terapia Celular pelo prof. Dr. Masaro Okabe as Universidade de Osaka, Japão (25).

3.7.2 CTM Luc^+ derivadas da medula óssea

Foram também utilizadas células extraídas da medula óssea e de tecido adiposo de 3 camundongos machos FVB/Luc^+ de aproximadamente 7 semanas de vida. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram tecido adiposo da região inguinal, fêmures e tíbias removidos e lavados em PBS 1X.

Para a obtenção de CTM derivadas da medula óssea, adotou-se, em linhas gerais a metodologia descrita por Longhini-dos-Santos et al., 2013 (118). Em câmara de fluxo laminar, as epífises dos ossos foram removidas e a medula óssea coletada por flushing com meio de cultura Minimum Essential Medium – Mem alpha (Gibco, Life Technologies) suplementado com 15% SFB (Gibco, Life Technologies) e 1% penicilina-streptomicina (Gibco, Life Technologies). A suspensão obtida foi homogeneizada por pipetagem e centrifugada a 500g e 4ºC por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 10 mL de meio de cultura Minimum Essential Medium – Mem alpha (Gibco, Life Technologies) suplementado com 15% SFB (Gibco, Life Technologies) e 1% penicilina-streptomicina (Gibco, Life Technologies) e novamente centrifugou-se a 500 g e 4ºC por 10 minutos. O

sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 20 mL de meio de cultura Minimum Essential Medium – Mem alpha (Gibco, Life Technologies) suplementado com 15% SFB (Gibco, Life Technologies) e 1% penicilina-streptomicina (Gibco, Life Technologies). A suspensão obtida foi depositada em uma garrafa de cultura T25 (TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland). As células foram mantidas em estufa a 37ºC, 5% CO_2 e 85% umidade por 48 horas. Após este período, todo o volume do meio de cultura foi substituído.

As células aderidas ao plástico foram então mantidas em meio de cultura Minimum Essential Medium – Mem alpha (Gibco, Life Technologies) suplementado com 15% SFB (Gibco, Life Technologies) e 1% penicilina-streptomicina (Gibco, Life Technologies) em estufa a 37ºC, 5% CO_2 e 85% umidade, com 50% do volume substituído a cada 48 horas por 4 passagens (aproximadamente 14 dias), para isolamento das CTM. Após este período, as células foram congeladas em SFB/Dimetilsulfóxido 10% em nitrogênio líquido para posterior caracterização e utilização na terapia celular e ensaios *in vitro*.

3.7.3 CTM Luc$^+$ derivadas do tecido adiposo

Para a terapia celular foram utilizadas CTM isoladas de camundongos transgênicos da linhagem FVB/Luc$^+$ (CAG-luc-eGFP). O construto transgênico foi realizado pelo laboratório do Dr. Christopher H. Contag (Faculdade de Medicina da Universidade de Stanford). O transgene consistia em um "enhancer" do promotor do citomegalovírus humano para o promotor híbrido da beta-actina de galinha e beta-globina de coelho (CAG; do vetor Pcaggs) e a upstream, o gene modificado da luciferase de vagalume, 54 bp do vírus FMDV (Foot and Mouth Disease Virus), sequência 2A ribossômica, 24bp polylinker e o gene modificado eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein). Mapeamento realizado no Laboratório Jackson indicou que o transgene foi integrado à porção proximal do Chr. 7, extendendo-se de D7Mit306 (10Mb) a D7Jmp8 (29 Mb). O transgene foi injetado em ovos fertilizados de camundongos FVB. A geração obtida - L2G85 foi cruzada com camundongos FVB não-transgênicos. Os animais transgêncos FVB-L2G85 foram submetidos a retrocruzamentos com a animais FVB por 20 gerações. Os animais transgênicos obtidos (CAG-luc-eGFP) foram então fornecidos ao Jackson Laboratory, onde foram cruzados com animais FVB/NJ isogênicos para

estabelecimento da colônia de uso comercial, adquirida pelo Laboratório de Estudos Experimentais em Animais da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

Para a obtenção de CTM derivadas do tecido adiposo adotou-se, em linhas gerais, a metodologia descrita por Marcelino et al., 2015 (25). Em câmara de fluxo laminar, o tecido adiposo obtido foi fracionado em cortes de aproximadamente $1cm^2$ com bisturi. Os cortes foram depositados em cônico de 50 mL contendo 25 mL de solução de colagenase 1AS (Sigma Aldrich) 1 mg/mL de PBS 1X e incubou-se a 37 ºC por 60 minutos sob agitação manual aproximadamente a cada 10 minutos. Após este período, acrescentou-se 25 mL de meio de cultura Minimum Essential Medium – Mem alpha (Gibco, Life Technologies) suplementado com 15% SFB (Gibco, Life Technologies) e 1% penicilina-streptomicina (Gibco, Life Technologies) para bloqueio da reação de digestão e filtrou-se em Cell Strainer de 70µm (Corning, Sigma Aldrich). Centrifugou-se a suspensão obtida a 500g e 4ºC por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 10 mL de meio de cultura Minimum Essential Medium – Mem alpha (Gibco, Life Technologies) suplementado com 15% SFB (Gibco, Life Technologies) e 1% penicilina-streptomicina (Gibco, Life Technologies) e novamente centrifugado a 500 g e 4ºC por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 20 mL de meio de cultura Minimum Essential Medium – Mem alpha (Gibco, Life Technologies) suplementado com 15% SFB (Gibco, Life Technologies) e 1% penicilina-streptomicina (Gibco, Life Technologies). A suspensão obtida foi depositada em uma garrafa de cultura T25 (TPP – Techno Plastic Products). As células foram mantidas em estufa a 37ºC, 5% CO_2 e 85% umidade por 48 horas. Após este período, todo o volume de meio de cultura foi substituído.

As células aderidas ao plástico foram então mantidas em meio de cultura Minimum Essential Medium – Mem alpha (Gibco, Life Technologies) suplementado com 15% SFB (Gibco, Life Technologies) e 1% penicilina-streptomicina (Gibco, Life Technologies) em estufa a 37ºC, 5% CO_2 e 85% umidade, com 50% do volume substituído a cada 48 horas por 4 passagens (aproximadamente 14 dias), para isolamento das CTM. Após este período, as células foram congeladas em SFB (Gibco, Life Technologies) suplementado com Dimetilsulfóxido 10% v/v (Sigma Aldrich) em nitrogênio líquido para posterior caracterização e utilização na terapia celular e ensaios *in vitro*.

3.8 Caracterização das CTM – ensaio de diferenciação

Para se caracterizar as CTM obtidas, a serem utilizadas na terapia celular e nos ensaios *in vitro*, realizou-se ensaio de diferenciação osteogência, condrogênica e adipogênica. Utilizou-se o kit de diferenciação StemPro® (Gibco, Life technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram cultivadas em placa de 24 poços (TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) em meio de cultivo basal com 10% de suplemento (fornecidos pelo kit) e 1% de penicilina/streptomicina (Gibco, Life Technologies) em estufa a 37ºC, 5% CO_2 e 85% umidade, com troca de 50% do volume do meio a cada 48 horas por um período de aproximadamente 28 dias. Após este período, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma Aldrich). As células foram então coradas com sudan escarlate (Sigma Aldrich) para a diferenciação adipogênica, nitrato de patra (Sigma Aldric) para a diferenciação osteogênica e Alcian Blue (Sigma Aldrich) para diferenciação condrogênica e contra-coradas com hematoxilina férrica de Herris (Sigma Aldrich).

3.9. Terapia celular

Para a terapia celular foram utilizadas CTM derivadas do tecido adiposo de camundongos machos da linhagem FVB/Luc$^+$ (doadores), sendo os animais receptores FVB fêmeas.

As células foram cultivadas conforme descrito no item anterior e descongeladas em meio de cultura Minimum Essential Medium – Mem alpha (Gibco, Life Technologies) suplementado com 15% SFB (Gibco, Life Technologies) e 1% penicilina-streptomicina (Gibco, Life Technologies). A suspensão obtida foi depositada em uma garrafa de cultura T75 (TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland). As células foram mantidas em estufa a 37ºC, 5% CO_2 e 85% umidade, com troca de 50% do volume do meio a cada 48 horas, por 2 passagens. As células obtidas foram então destacadas das garrafas de cultivo utilizando-se TrypLE® Express (Thermo Fisher), conforme indicação do fabricante. A concentração da suspensão celular foi então estimada utilizando-se corante azul de trypan e ajustada para 2 x 10^7 células/mL em meio de cultura Minimum Essential Medium – Mem

alpha (Gibco, Life Technologies) suplementado com 15% SFB (Gibco, Life Technologies) e 1% penicilina-streptomicina (Gibco, Life Technologies).

Transcorridos 21 dias após a instilação de elastase ou solução fisiológica, necessários para o estabelecimento do enfisema pulmonar, os animais foram submetidos à terapia celular. A infusão das células foi realizada por via retro-orbital. Em suma, cada animal foi sedado utilizando-se Isofluorano 4% (Cristalia, Itapira, SP, Brasil) e o sistema VisualSonics Vevo Compact Anesthesia System (Fujifilm Visual Sonics Inc., Toronto, Ontario, Canadá). Após a sedação, 0,2 ml de suspensão celular em meio de cultura Minimum Essential Medium – Mem alpha (Gibco, Life Technologies) suplementado com 15% SFB (Gibco, Life Technologies) e 1% penicilina-streptomicina (Gibco, Life Technologies) na concentração de 2×10^7 células/ml (4×10^6 células no total), foram depositados na região retro-orbital de cada animal.

3.10 Detecção do transplante celular (“homing”) por bioluminescência

A bioluminescência pode ser descrita como a geração enzimática de luz visível por organismos vivos. Muitos organismos são capazes de produzir uma reação bioluminescente, como bactérias, fungos, seres marinhos e insetos, como o vaga-lume. No caso do vaga-lume, é expresso gene que codifica a proteína luciferase, capazes de atuar sobre a D-luciferina. A luciferase oxida a D-luciferina na presença de ATP (Adenosine Tri-Phosphate) e oxigênio, formando oxy-luciferina em estado eletronicamente excitado. Uma luz visível amarelo-esverdeada a amarelo-alaranjada é emitida quando a oxy-luciferida reduz-se a seu estado não excitado (119–122).

Para a detecção das células transplantadas que expressam luciferase nos tecidos do receptor, foi fornecido o substrato da luciferase, na forma de injeção intraperitoneal de solução salina contendo D-Luciferina 150 mg/kg (Perking Elmer) e mantidos sob sedação com isofluorano 4% (Cristalia) em oxigênio.

Para detecção da atividade da luciferase nas células em cultivo a serem utilizadas na terapia celular, estas foram expostas à luciferina na concentração de 1mM no meio de cultivo.

As imagens foram então captadas utilizando In Vivo Imaging System (IVIS 100) (Perkin Elmer, São Paulo, SP, Brasil). Quando a intensidade do sinal atingiu seus níveis máximos, quantificou-se os fótons emitidos pelo tecido receptor ou placa de cultura.

3.11 Avaliação do enfisema pulmonar

3.11.1 Pletismografia

A fim de se avaliar o enfisema pulmonar no modelo animal de terapia celular e tratados ou não com sinvastatina, foram realizadas análises funcionais e morfométricas. Para tanto, 4 animais de cada grupo expostos ou não à elastase foram submetidos à pletismografia por meio do aparelho Powerlab/SP4 Gas Analyser modelo ML206 (Adinstruments, Austrália).

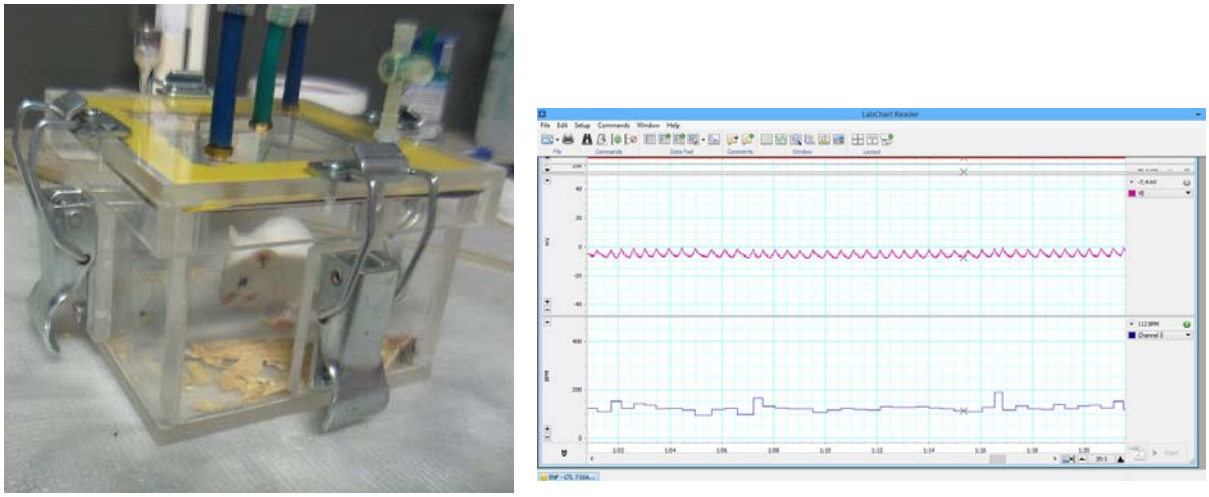


Figura 7. Aparato para pletismografia
Na pletismografia de corpo inteiro, os animais são colocados em uma câmara hermeticamente fechada com fluxo de ar controlado e as flutuações de pressão referentes ao ciclo respiratório são registradas por eletrodo transdutor de pressão.

3.11.2 Morfometria

Após a análise mecânica e 21 dias após a terapia celular, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram os pulmões perfundidos com solução fixadora (paraformaldeído 4%), e seguiram para rotina histológica. Cortes de 7 µm foram obtidos corados com Hematoxilina/Eosina (HE) e realizadas análises morfométricas. As análises foram realizadas por um único investigador, em teste cego. Foram avaliados dez campos aleatórios não coincidentes das lâminas do tecido pulmonar de cada animal em aumento de

400 vezes para a medida do intercepto linear médio em microscópio óptico de campo claro da marca Zeiss modelo axioskop 2 plus. A análise morfométrica do enfisema foi feita por intermédio do LM (em micrômetros), indicador do diâmetro alveolar médio, conforme proposto por Weibel em 1963. Esta técnica consiste na determinação do diâmetro alveolar médio utilizando-se o número de vezes que estruturas do parênquima de troca gasosa interceptam um conjunto de retas coerentes por meio de um retículo junto à lente ocular do microscópio com sistema de 50 linhas e 100 pontos (123).

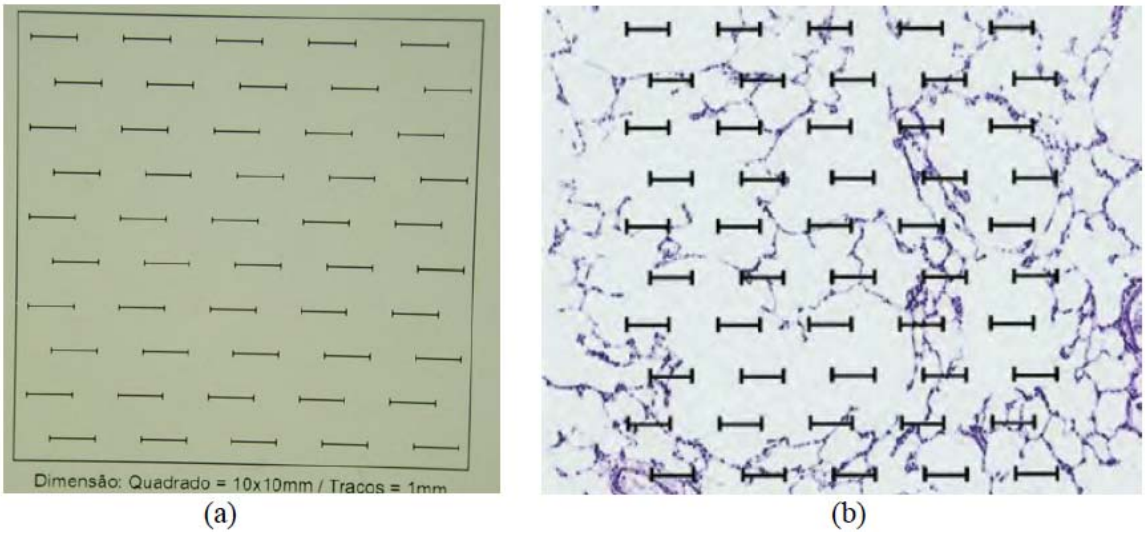


Figura 8. Retículo de Weibel
(a) Fotomicrografia do Retículo de Weibel; (b) Retículo de Weibel sobreposto a uma lâmina de tecido pulmonar de camundongo (Aumento de 100X). Fonte: Faria, 2012 (124)

3.12 Avaliação do efeito da sinvastatina na expressão de PAI-1 *in vitro*

Plaqueou-se aproximadamente $5x10^4$ CTM derivadas da medula óssea ou do tecido adiposo por poço em placa de 24 poços (TPP – Techno Plastic Products) e ultivou-se por 24 horas conforme descrito anteriormente. Após este período, o meio de cultura foi substituído por meio contendo 0μM, 0.5μM, 1μM ou 5μM de sinvastatina (Merck-Millipore, Calbiochen, Darmstadt, Alemanha). O estímulo foi mantido por 24, 48 ou 72 horas. O RNA das células foi então extraído e realizou-se eletroforese para avaliação da qualidade geral, conforme descrito anteriormente.

3.13 Resumo dos Grupos Experimentais

Tabela 1. Grupos Experimentais

Grupo	N	Gavagem (100 µL)*	Instilação	Infusão (200 µL)	Eutanásia
SORO	4	--	Solução fisiológica Intranasal (150 µL)	--	42º dia
ELASTASE	4	--	4UI de elastase Intranasal (150 µL)	--	42º dia
SORO/MEIO	4	--	Solução fisiológica Intranasal (150 µL)	Meio de cultura	42º dia
ELASTASE/ CTM	4	--	4UI de elastase Intranasal (150 µL)	2,6 x 10^6 células	42º dia
SINVA 1	6	10 mg/kg de sinvastatina	--	--	15º dia
SINVA 2	6	15 mg/Kg de sinvastatina	--	--	15º dia
SINVA 3	5	25 mg/kg de sinvastatina	--	--	15º dia
CONTROLE	6	Solução fisiológica/etanol 1%	--	--	15º dia
Normal-Controle	8	Solução fisiológica/etanol 1%	Solução fisiológica Intranasal (150 µL)	4 x 10^6 células	42º dia
Normal-Sinvastatina	8	Sinvastatina 15 mg/Kg	Solução fisiológica Intranasal (150 µL)	4 x 10^6 células	42º dia
Enfisema-Sinvastatina	8	Sinvastatina 15 mg/Kg	4UI de elastase Intranasal (150 µL)	4 x 10^6 células	42º dia
Enfisema-Controle	8	Solução fisiológica/etanol 1%	4UI de elastase Intranasal (150 µL)	4 x 10^6 células	42º dia

* 100µl de veículo (água/etanol 1%) contendo ou não sinvastatina nas diferentes doses indicadas.

3.14 Análise Estatística

Os dados obtidos foram comparados aplicando-se análises de variância considerando-se nível de significância de 5% utilizando-se o GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California EUA, www.graphpad.com.

3.15 Aspectos Éticos

Todos os experimentos foram realizados seguindo-se normas éticas, visando a utilização do menor número de animais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto, sob o protocolo 14.1.447.53.1.

3.16 Desenho Experimental

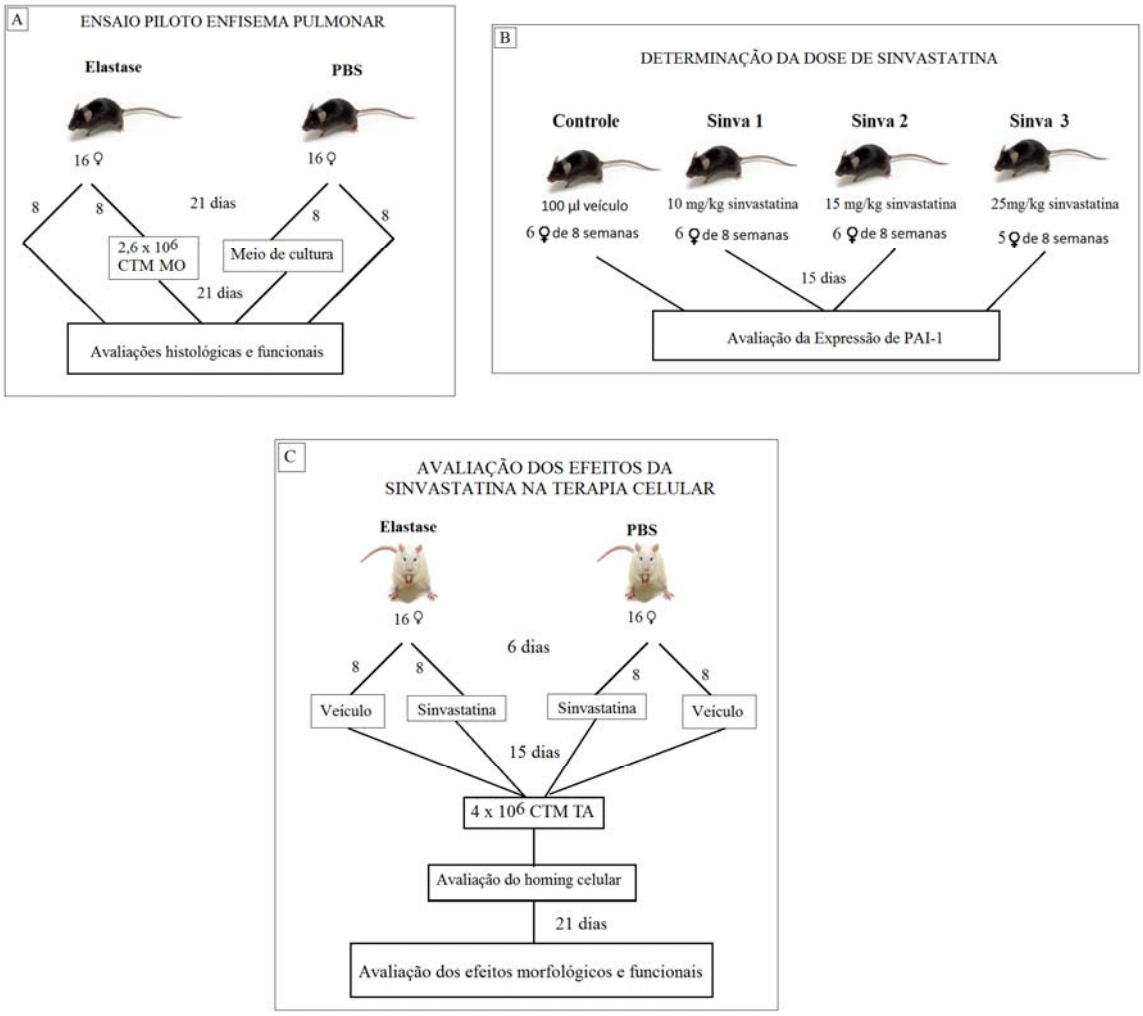


Figura 9. Desenho Experimental

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da dose de sinvastatina

A fim de se estabelecer a dose necessária de sinvastatina para a modulação do gene PAI-1, 23 camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6 de aproximadamente 8 semanas de vida, foram divididos em quatro grupos conforme detalhado na Tabela 1.

As doses de sinvastatina empregadas foram definidas de acordo com estudo prévio da literatura caracterizando as doses utilizadas por pacientes. As doses utilizadas estão dentro da janela terapêutica e bem abaixo da dose letal 50 (LD50) para camundongos (3800 mg/kg) (15). Em todos os grupos, as doses foram administradas diariamente por um período de 15 dias, no mesmo período do dia. No décimo quinto dia, aproximadamente uma hora após a administração da última dose de sinvastatina ou veículo, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e tiveram os fêmures e tíbias extraídos para obtenção das células mononucleares da medula óssea para ensaio de migração, os pulmões, fígado e pâncreas foram removidos para extração de RNA e sangue periférico coletado para avaliação da presença de PAI-1.

Parte dos órgãos seguiu para rotina histológica e parte foi congelada em nitrogênio líquido para extração de RNA. Para a rotina histológica, foram fixados em formaldeído 4% e cortes de 5 μm foram obtidos e corados com Hematoxilina-Eosina para avaliação qualitativa. A Figura 10 apresenta algumas amostras de Pâncreas Pulmão e Fígado obtidas. Conforme pode ser observado, não verificou-se qualquer alteração morfológica ou estrutural importante dos órgãos pertencentes aos animais que receberam sinvastatina em relação ao grupo controle, indicando ausência de toxicidade importante.

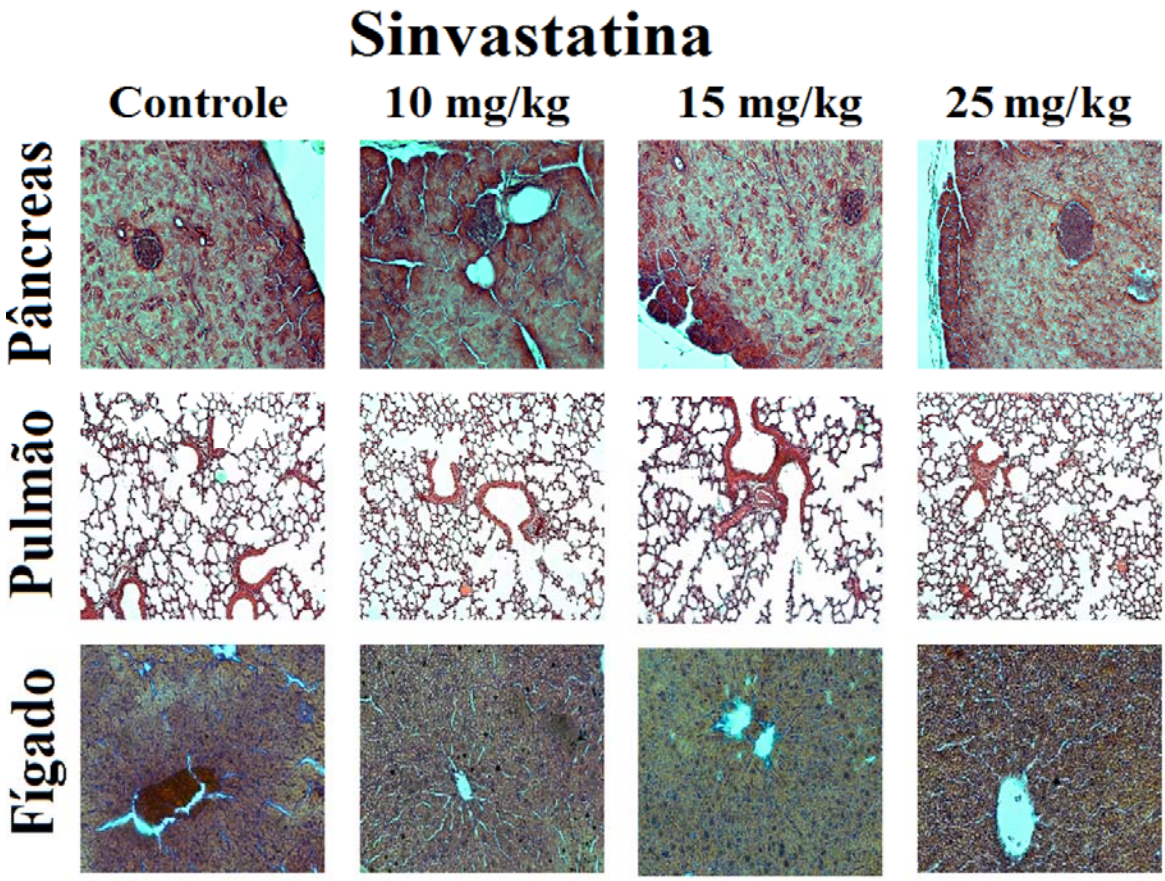


Figura 10. Fotomicrografias de cortes histológicos de pâncreas, pulmão e fígado corados com Hematoxilina-Eosina:
Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de pulmão, fígado (aumento de 200X) e pâncreas (aumento de 400X) corados com HE, dos camundongos que receberam somente veículo (controle), ou sinvastatina em doses diárias de 10mg/kg (Sinva 1), 15mg/kg (Sinva 2) ou 25 mg/kg (Sinva 3).

O RNA foi extraído, conforme instruções do fabricante, utilizando-se Trizol Reagent®, (Invitrogen, Life Techonologies) e diluído em água livre de endonucleases. As amostras de RNA obtidas foram quantificadas por espectrofotometria. Uma alíquota de aproximadamente 500 ng de cada amostra de RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose/TAE 1,2% corado com brometo de etídio, para avaliação da pureza e qualidade geral das amostras. Conforme se observa na Figura 11, a maior parte das amostras provenientes de fígado e pulmão concentrou-se nas bandas 28S e 18S, indicando que a qualidade geral das amostras era aceitável. Porém, as amostras provenientes de pâncreas mostraram-se degradadas, concentrando-se na banda 5S, referente a pequenos fragmentos de RNA.

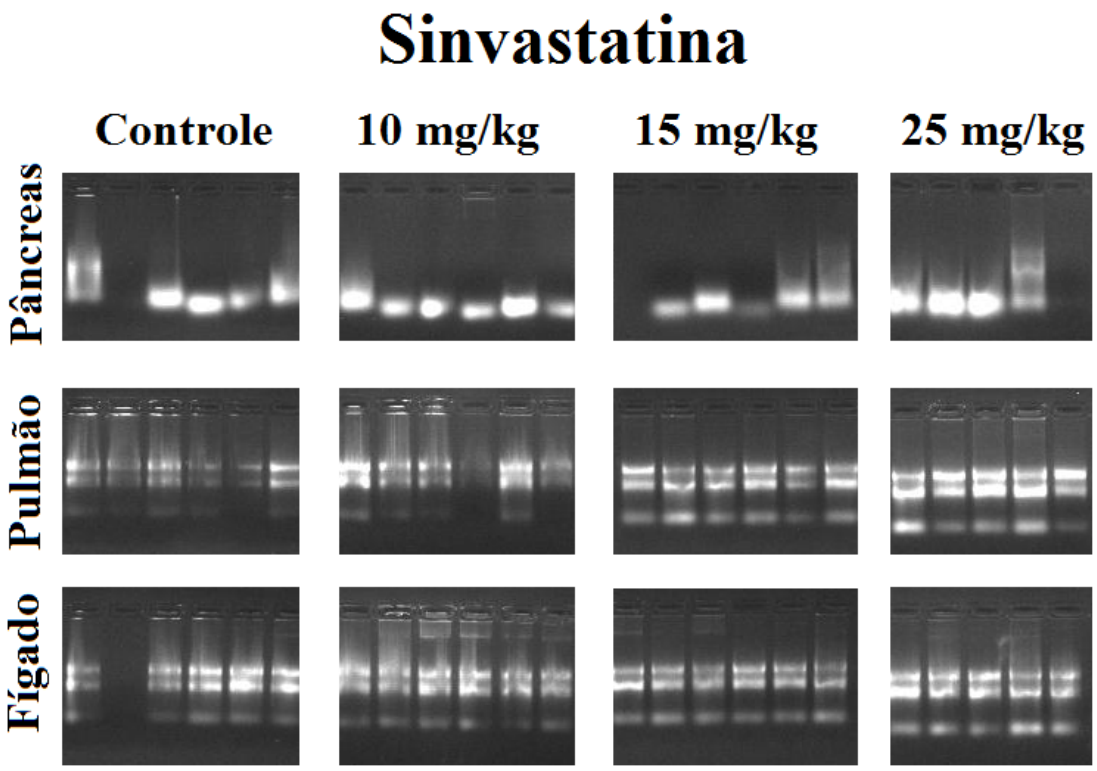


Figura 11. Eletroforese das amostras de RNA dos tecidos dos animais expostos a diferentes doses de sinvastatina:
Eletroforese em gel de agarose/TAE 1,2% corado com brometo de etídeo de 500 ng de RNA obtido de pâncreas, pulmão e fígado de cada um dos animais pertencentes ao grupo que recebeu apenas veículo (grupo Controle), 10 mg/kg de sinvastatina (grupo Sinva 1); 15 mg/kg de sinvastatina (grupo Sinva 2) e 25 mg/kg de sinvastatina (grupo Sinva 3).

Para uma avaliação mais completa da qualidade das amostras de RNA obtidas, 3 amostras de cada grupo foram submetidas ao ensaio de eletroforese microfluídica pelo sistema Bioanalyzer®, utilizando-se o chip "Eukaryote Total RNA Nano". Semelhantemente ao ensaio de eletroforese, as amostras de RNA provenientes de pulmão e fígado apresentaram boa qualidade, com RIN (RNA Integrity Number) entre 6.20 e 8.30, porém as amostras de RNA de pâncreas apresentaram-se degradadas, com RIN entre 2.20 e 2.80, conforme apresentado na Tabela 2. Devido à baixa qualidade das amostras de RNA obtidas de pâncreas, decidiu-se não realizar as análises de expressão nestas amostras.

Tabela 2. Análise das amostras de RNA por Bioanalyzer®.

Amostra	Grupo	Concentração (ng/µl)	RIN
Pâncreas	Controle	1373	2.80
Pulmão	Controle	515	8.30
Fígado	Controle	345	7.10
Pâncreas	SINVA 1	313	2.40
Pulmão	SINVA 1	647	8.20
Fígado	SINVA 1	1007	7.40
Pâncreas	SINVA 2	267	2.60
Pulmão	SINVA 2	493	6.20
Fígado	SINVA 2	1128	7.80
Pâncreas	SINVA 3	1050	2.20
Pulmão	SINVA 3	890	7.00
Fígado	SINVA 3	1298	6.90

Após verificar-se a qualidade geral do RNA, aproximadamente 500 ng de cada amostra de RNA de pulmão e fígado foram utilizadas para a síntese de cDNA por meio do kit cDNA High Capacity (Applied Byossistems). O produto da reação foi então diluído cinco vezes em água livre de endonucleases (25 µL de produto + 100 µL de água). O cDNA diluído foi então utilizado para a PCR quantitativa em tempo real com sonda Taqman® (Applied Biosystems). Esta reação permite quantificar a presença de um mRNA específico em relação a outro mRNA, sabidamente expresso de forma constitutiva. Comparou-se então a presença do PAI-1 em relação ao endógeno GAPD no pulmão e fígado dos animais controle e submetidos a diferentes doses de sinvastatina.

Os resultados comparativos da presença do PAI-1 nos diferentes tecidos após administração da sinvastatina são apresentados na Figura 12.

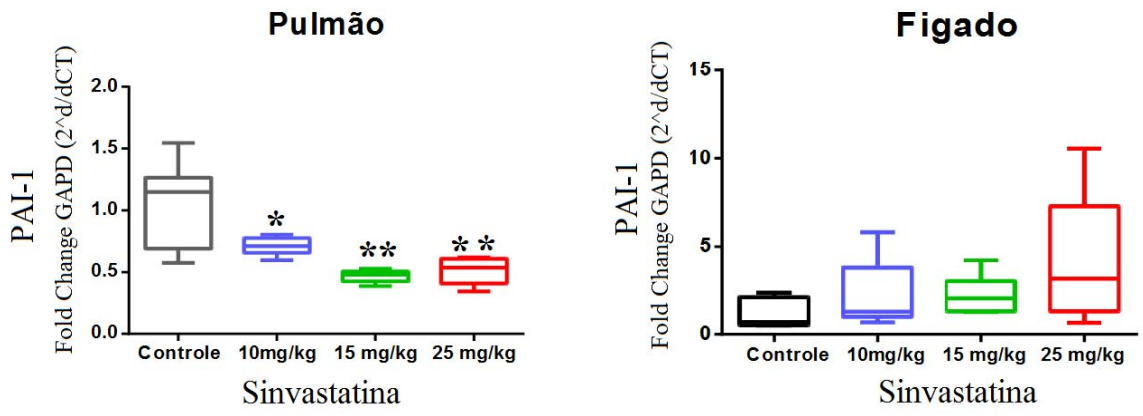


Figura 12. Expressão relativa do PAI-1 após administração de sinvastatina:
Quantificação PAI 1, expressa em níveis relativos à expressão do gene endógeno GAPD no pulmão e fígado de camundongos que receberam somente veículo (controle), ou sinvastatina em doses diárias de 10mg/kg (Sinva 1), 15mg/kg (Sinva 2) ou 25 mg/kg (Sinva 3).

Ao realizar-se análise de variância (ANOVA – Kruscal Wallis com post-hoc de Dunn), as amostras provenientes de fígado não apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação à expressão do PAI 1 entre o grupo controle e os grupos que receberam diferentes doses de sinvastatina e apresentaram alto desvio padrão. É possível verificar uma diminuição relativa da expressão do PAI-1 no pulmão dos animais que receberam doses de 10 mg/kg ($p = 0,0167$), 15mg/kg ($p = 0,0001$) e 25 mg/kg ($p = 0,0005$) de sinvastatina comparando-se com os animais do grupo controle que receberam apenas o veículo. Desta forma, estabeleceu-se a dose de 15 mg/kg de sinvastatina como suficiente para modular a expressão do PAI 1 no tecido pulmonar de camundongos para as próximas fases do estudo.

Para se verificar a administração oral de sinvastatina ocasionaria mudanças nos níveis circulantes de PAI-1, o plasma dos animais submetidos a diferentes doses de sinvastatina foi coletado e as proteínas totais obtidas e quantificadas por ensaio do ácido bicinconínico, conforme descrito, conforme descrito em materiais e métodos.

A Tabela 3 apresenta os valores obtidos para as concentrações de proteínas totais nas amostras em ng/ml.

Tabela 3. Dosagem de proteínas totais no plasma sanguíneo dos animais submetidos a diferentes doses de sinvastatina.

Dose sinvastatina	animal	proteínas totais (µg/ml)
0	1	27,848
0	2	39,905
0	3	40,345
0	4	41,501
10 mg/kg	1	48,008
10 mg/kg	2	43,727
10 mg/kg	3	39,351
10 mg/kg	4	52,892
15 mg/kg	1	38,016
15 mg/kg	2	45,512
15 mg/kg	3	45,486
15 mg/kg	4	35,34
25 mg/kg	1	34,535
25 mg/kg	2	63,303
25 mg/kg	3	47,365
25 mg/kg	4	35,601

Após quantificação, alíquota de 50 µg de uma amostra de cada grupo foram submetidas a western blotting, conforme descrito anteriormente.

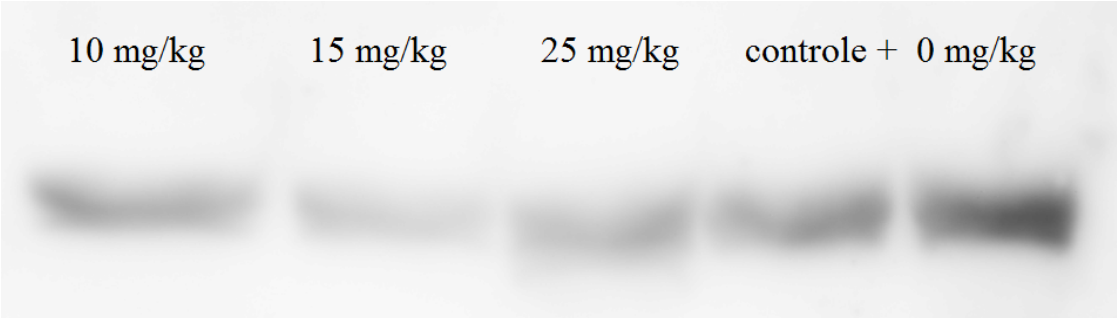


Figura 13. Western Blotting para detecção do PAI-1 no plasma sanguíneo de animais após administração de diferentes doses de sinvastatina:
Fotografia da membrana de western blotting marcada com anticorpo para PAI-1 contendo amostras de proteínas totais do plasma sanguíneo de camundongos que receberam somente veículo (controle), ou sinvastatina em doses diárias de 10mg/kg (Sinva 1), 15mg/kg (Sinva 2) ou 25 mg/kg (Sinva 3), juntamente com o controle positivo da reação.

A fim de avaliar se a modulação do PAI-1 ocasionaria mudanças no padrão de migração das células mononucleares da medula óssea (CMMO), realizou-se ensaio de migração celular com as CMMO dos animais submetidos ou não à diferentes doses de sinvastatina. Na determinação da quantidade inicial de células e tempo ideais para realização

de ensaio de migração utilizou-se CTM derivadas da medula óssea. Os ensaios foram realizados em triplicata e as concentrações testadas foram: 500, 5000, 10000 e 40000 células/poço. As células presentes no incerto foram fixadas com paraformaldeído 4% (Sigmal Aldrich) e coradas com cristal violeta 2% (Sigma Aldrich) após 24 ou 48 horas. Como é possível observar na Figura 14, os resultados mais visíveis foram com concentração inicial de 40000 células por um período de 24 horas.

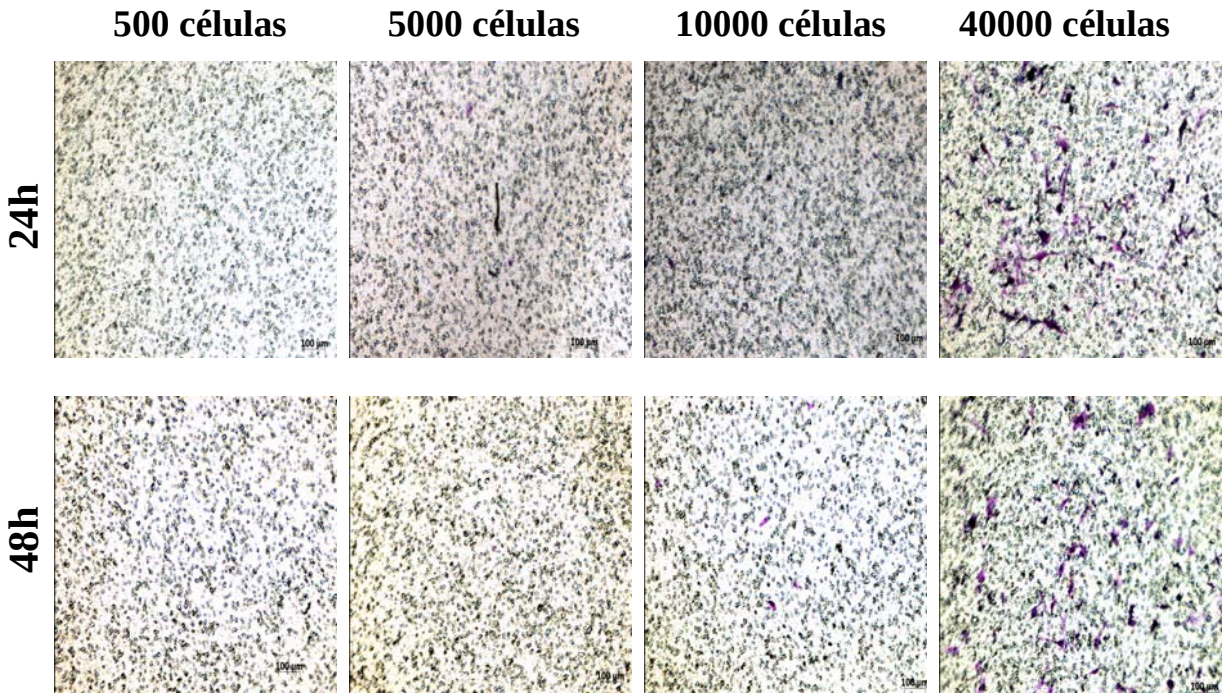


Figura 14. Fotomicrografias representativas do ensaio de padronização de migração: Ensaio de migração com CTM da medula óssea de camundos, em membrana de 8µm e meio de cultura α-Mem, para a determinação da quantidade inicial de células e tempo de migração. Coloração de cristal violeta e aumento de 100x.

Obteve-se as células da medula óssea dos animais expostos a diferentes doses de sinvastatina foram obtidas e cultivadas conforme descrito anteriormente e submetidas ao ensaio de migração. Após o período de incubação, as células aderidas à parte inferior da membrana foram fixadas com paraformaldeído e coradas com cristal violeta. Ao observar-se a membrana em microscópio óptico em aumento de 200X, não se verificou a presença de células aderidas, indicando que não houve migração celular em nenhum dos grupos nas condições estudadas (Figura 15).

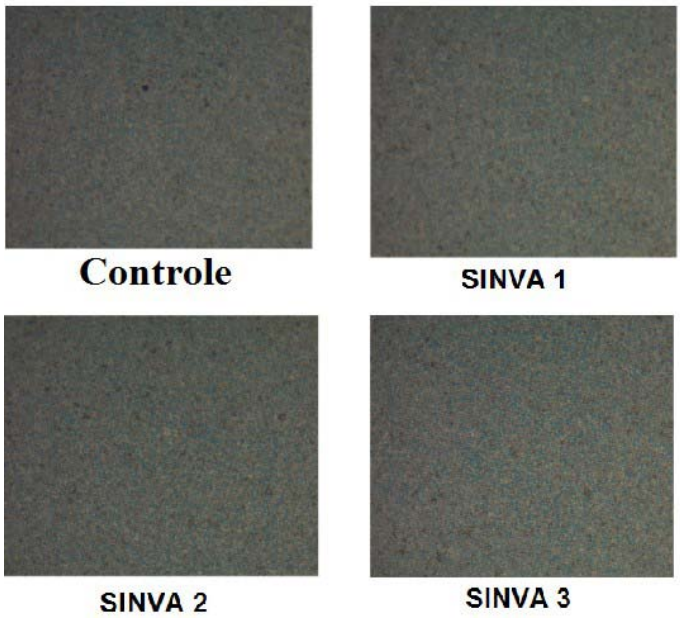
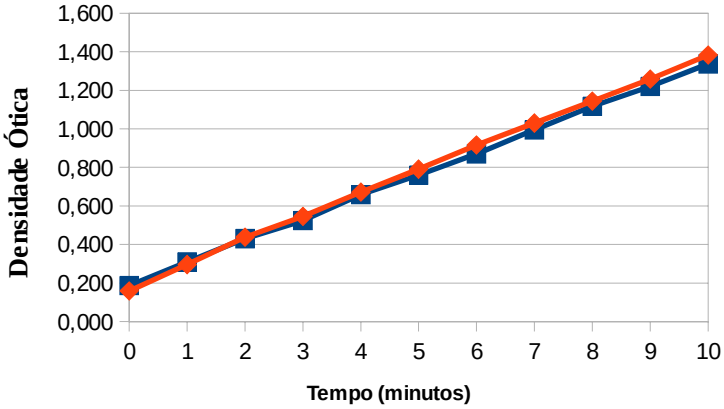


Figura 15. Fotomicrografias representativas do ensaio de migração celular:
Fotomicrografias representativas (aumento de 200X) de membranas do ensaio de migração com células mononucleares da medula óssea de camundongos submetidos a administração oral de diferentes doses diárias de sinvastatina (controle=0; Sinva1= 10 mg/kg; Sinva2 = 15 mg/kg e Sinva 3 = 25mg/kg). Nota-se a ausência de células em todas as membranas

4.2 Modelo animal de terapia celular para o enfisema pulmonar

A fim de se induzir o enfisema pulmonar em modelo animal (camundongo) utilizou-se a instilação intranasal de protease (elastase porcina pacreática – Sigma Aldrich). Para se avaliar a atividade da enzima a ser utilizada, realizou-se ensaio colorimétrico com p-nitroanilina (N-succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida - Sigma Aldrich). Utilizando-se regressão linear, determinou-se então a concentração da solução de elastase utilizada como aproximadamente 6.75 U/µL (Figura 16).



	Ensaio 1	Ensaio 2
ΔDO/E (substrato)	13,07	13,91
nmol/µL substrato	0,5	0,5
nmol/µL enzima	6,5	7

Figura 16. Ensaio colorimétrico de atividade da elastase:
Utilizou-se o substrato N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilina na concentração 0,5 nmol/µL em ensaio colorimétrico de atividade da elastase. Considerou-se E p-nitroanilina = 8800 em 410 nanômetros e 1 Unidade Internacional de elastase como a hidrólise de 1 µmol substrato/p-nitroanilida por minuto.

Após verificar-se a atividade e concentração da elastase, realizou-se ensaio piloto para avaliar o modelo animal de terapia celular para o enfisema pulmonar, conforme descrito anteriormente (Item 3.6 e Tabela 1). As CTM utilizadas foram derivadas da medula óssea de camundongos C57Bl/6 EGFP$^+$ provenientes do Laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTe Cel, Unesp – FCL Assis), descongeladas e mantidas em cultura para a obtenção da quantidade suficiente de células para a terapia celular. A cultura foi observada em microscópio de fluorescência para verificação da expressão da proteína fluorescente verde – GFP (Figura 17).

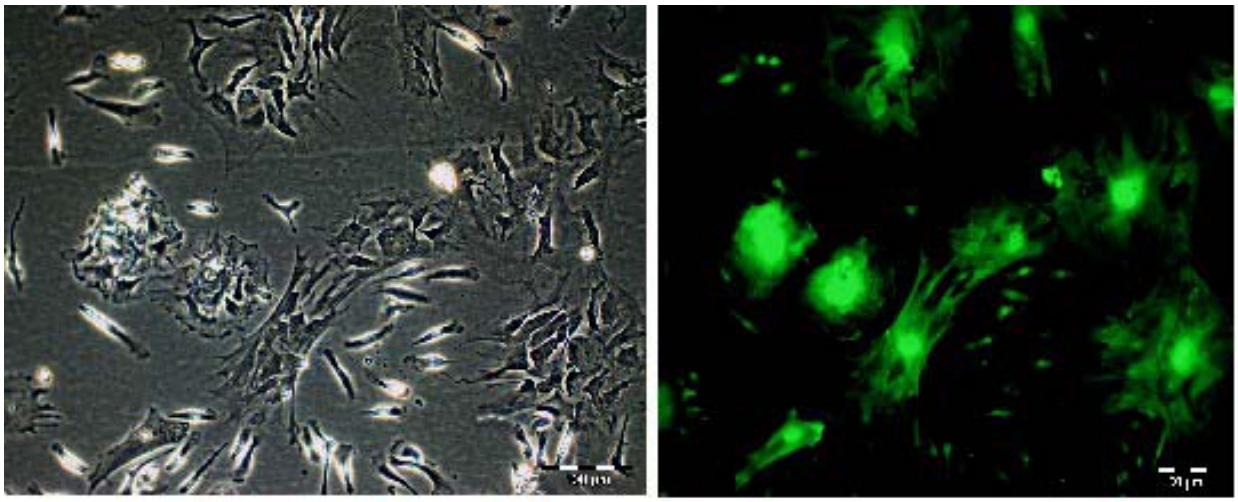


Figura 17. Fotomicrografias das CTM EGFP$^+$:
Fotomicrografia representativa da cultura de CTM obtidas a partir da medula óssea camundongos C57Bl/6 EGFP$^+$ gentilmente cedidas pelo Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel – aumento de 400X, campo claro (à esquerda) e luz ultravioleta com filtro de 480 nm (à direita).

A fim de se avaliar os efeitos da terapia celular com CTM derivadas da medula óssea em modelo animal de enfisema pulmonar induzido por elastase, a função pulmonar dos animais foi avaliada por meio de pletismografia. Verifica-se, pela análise da Figura 18 uma tendência à diminuição da frequência respiratória e do volume expiratório nos animais submetidos à indução do enfisema pulmonar por instilação intranasal de elastase, porém, ao realizar-se análise de variância, não detectou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

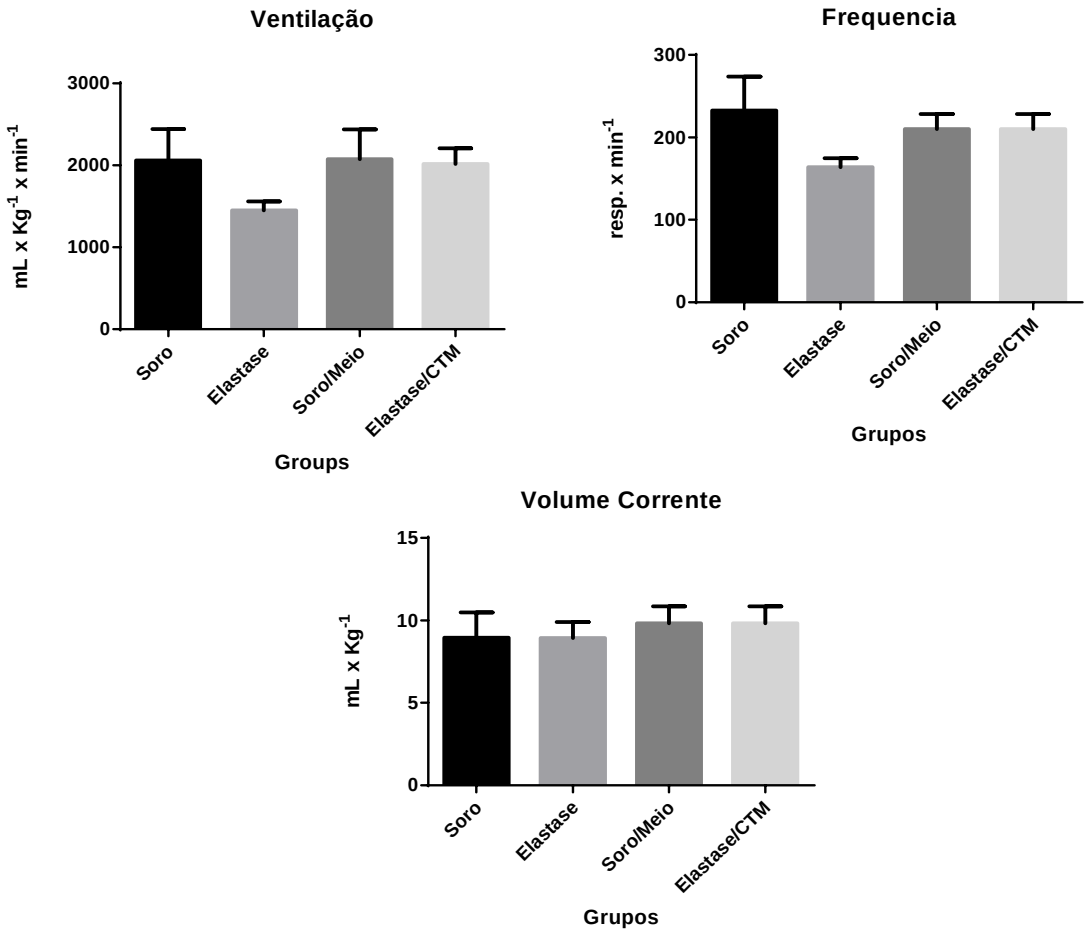


Figura 18. Pletismografias resultante do ensaio piloto de enfisema pulmonar:
Avaliação comparativa da função pulmonar dos animais dos grupos controle, submetidos à instilação intranasal de solução fisiológica (Soro) e tratados com veículo meio de cultura RPMI (Soro/Meio) e dos grupos experimentais enfisematosos, submetidos à instilação intranasal de elastase (Elastase) e tratados com infusão retro-orbital de 2,6 x 10^6 CTM (Elastse/CTM).

Após a avaliação da função pulmonar, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram o pulmão removido para análise histológica. Os tecidos foram fixados e incubados em parafina e foram cortes de 7 µm e corados com Hematoxilina-Eosina. Verificou-se nos cortes histológicos do tecido pulmonar do grupo que recebeu apenas elastase mudanças no parênquima pulmonar consistentes com o enfisema pulmonar, ou seja, destruição dos septos alveolares, aumento dos espaços aéreos e presença de infiltrado de células inflamatórias. O grupo submetido à indução do enfisema com elastase e tratado com CTM apresentou um padrão histomorfológico semelhante aos apresentados pelos grupos controle (Figura 19).

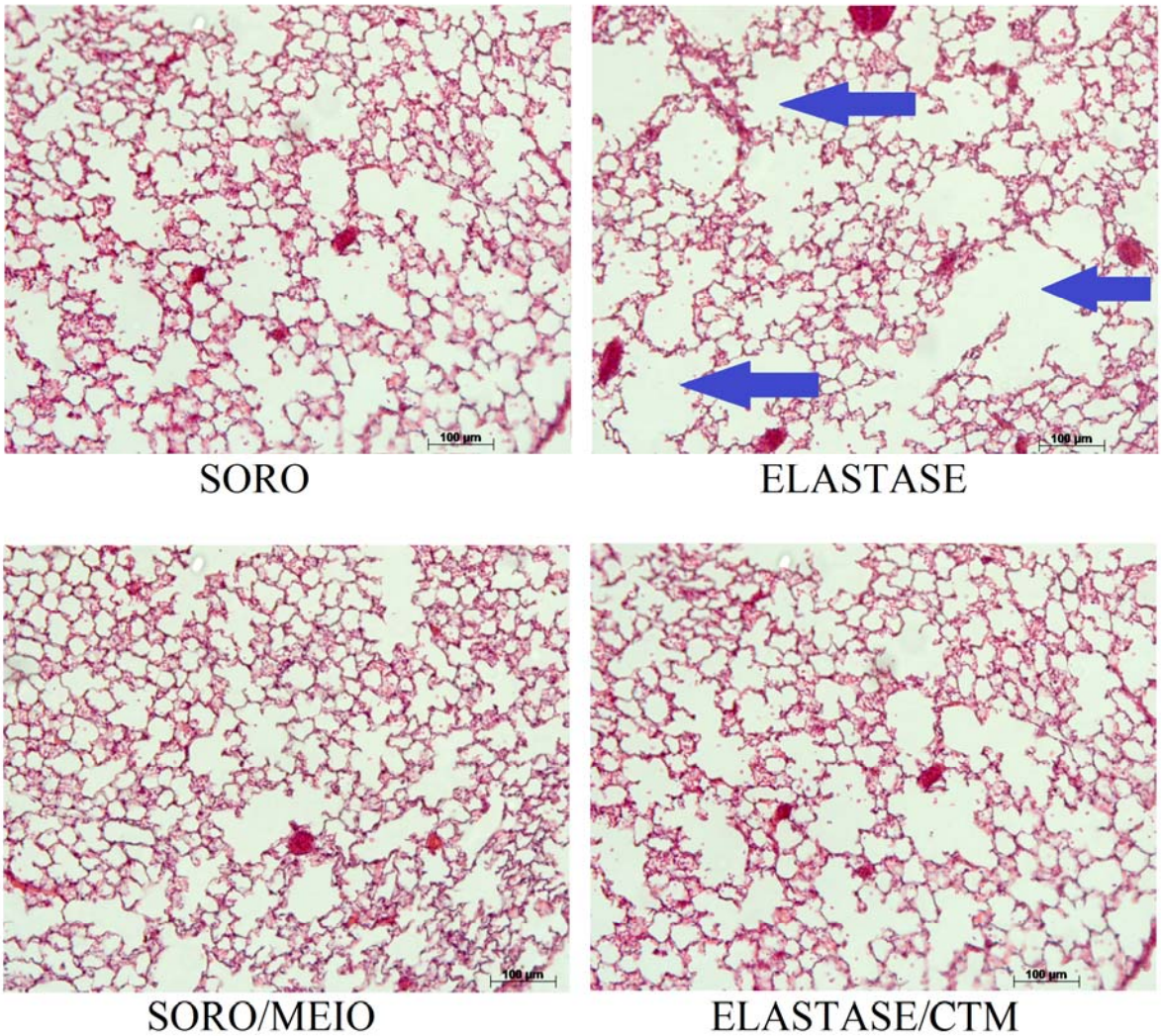


Figura 19. Fotomicrografias do tecido pulmonar resultante do ensaio piloto de enfisema: Fotomicrografias representativas em aumento de 40X de cortes histológicos do tecido pulmonar corados com HE – Hematoxilina-Eosina dos animais dos grupos controle, submetidos apenas à instilação intranasal de solução fisiológica (soro) e submetidos à instilação intranasal de solução fisiológica e infusão de meio de cultura RPMI (soro/meio) e animais dos grupos experimentais, submetidos à instilação de elastase (Elastase) e submetidos à instilação intranasal de elastase e infusão de CTM (Elastase/CTM). As setas azuis indicam regiões de degradação dos septos alveolares, caracterizadas pelo aumento dos espaços aéreos e ausência de células epiteliais.

Após a verificação dos resultados do modelo de enfisema pulmonar, seguiu-se para a próxima fase do estudo a fim de se avaliar o efeito da sinvastatina no "homing" e "engraftment" na terapia celular com CTM. Porém, para o ensaio de captação de imagem *in vivo*, a fluorescência das células GFP^+ mostrou-se insuficiente para obtenção de sinal claro e distinto da auto-fluorescência presente nos tecidos. Desta forma, decidiu-se utilizar o modelo de luminescência. Para tanto, extraiu-se CTM do tecido adiposo e da medula óssea de 3 camundongos machos de aproximadamente 7 semanas da linhagem FVB/Luc^+ conforme descrito anteriormente. Como é possível verificar na Figura 20, após 72 horas de cultura, ao

remover-se todo o meio de cultura, foram observadas células aderidas ao plástico. Após 7 dias de cultivo, estas células morfologia fibroblastóide. As células foram cultivadas, conforme descrito, até a sexta passagem para os experimentos que se seguiram.

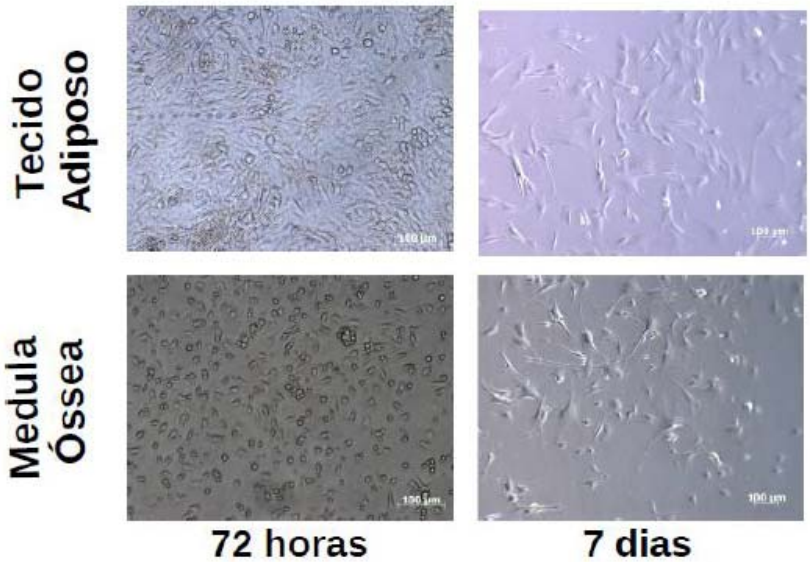


Figura 20. Células isoladas da medula óssea e tecido adiposo de animais FVB/Luc^{+}: Fotomicrografias representativas das células isoladas do tecido adiposo e medula óssea de camundongos FVB/Luc+ 72 horas e 7 dias após extração.

A fim de se verificar se estas CTM derivadas do tecido adiposo e da medula óssea expressavam luciferase, depositou-se em placa 24 poços (TPP – Techno Plastic Products) alíquota de $2x10^4$, $4x10^4$, $8x10^4$ e $1x10^5$ células em duplicata das. As amostras foram então expostas à luciferina (Perkin Elmer) e imagens foram obtidas no In Vivo Imaging System (IVIS 100) (Perkin Elmer), conforme descrito anteriormente. O sinal foi comparado. Como se observa nas Figuras 21 e 22 e Tabelas 4 e 5, a média de fótons captados em relação às células derivadas do tecido adiposo (681,213) foi aproximadamente 2.3 vezes maior que a média de fótons captados em relação às CTM derivadas da medula óssea. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p<0.0001$) segundo o teste “two-tailed t-test”.

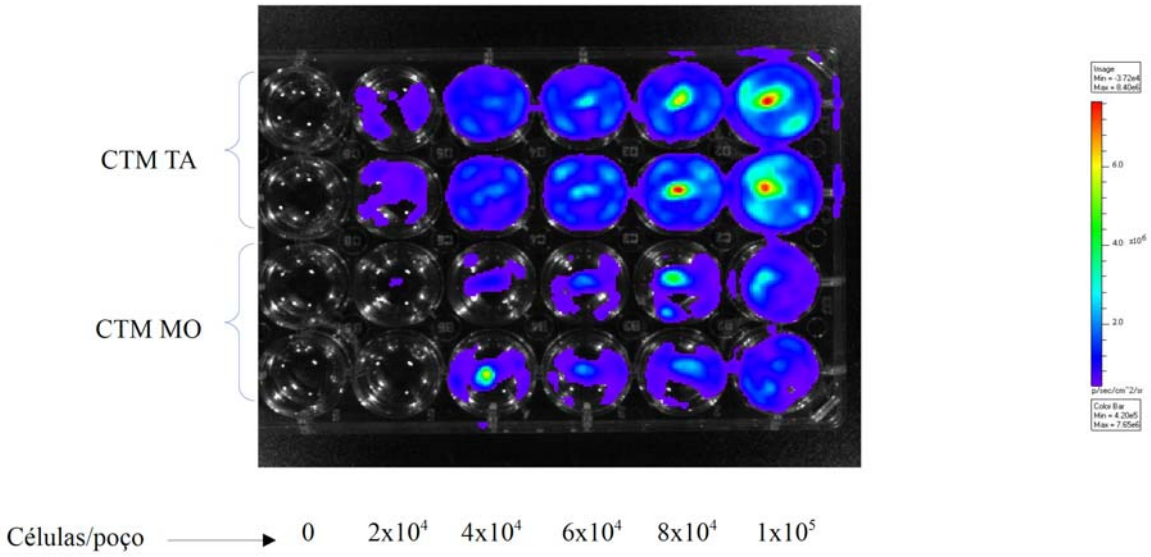


Figura 21. Luminescência das CTM derivadas da medula óssea e tecido adiposo:
Comparação da luminescência no InVivo Image System (fótons captados em relação ao número de células) das CTM luciferase positivas derivadas da medula óssea (CTM MO) em comparação às derivadas do tecido adiposo CTM TA.

Tabela 4. Fótons por segundo por célula mesenquimal derivada de tecido adiposo

Células por poço	fotons/s A	fotons/s B	Média	Fotons/s/celula
0	6,22E+05	6,13E+05	6,18E+05	-
2,00E+04	1,40E+07	1,49E+07	1,45E+07	722,50
4,00E+04	3,52E+07	3,09E+07	3,31E+07	827,00
6,00E+04	3,46E+07	3,80E+07	3,63E+07	604,50
8,00E+04	4,51E+07	5,07E+07	4,79E+07	598,56
1,00E+05	6,52E+07	6,55E+07	6,54E+07	653,50
			Média Geral	681,213

Tabela 5. Fótons por segundo por célula mesenquimal derivada de medula óssea

Células por poço	fotons/s A	fotons/s B	Média	Fotons/s/celula
0	4,29E+05	4,15E+05	4,22E+05	-
2,00E+04	5,49E+06	5,38E+06	5,44E+06	271,83
4,00E+04	1,15E+07	1,97E+07	1,56E+07	389,63
6,00E+04	1,48E+07	1,55E+07	1,51E+07	251,92
8,00E+04	2,21E+07	2,12E+07	2,16E+07	270,44
1,00E+05	2,58E+07	2,67E+07	2,62E+07	262,45
			Média Geral	289,251

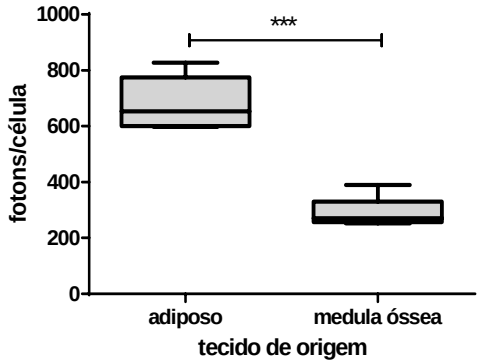


Figura 22. Gráfico comparativo da luminescência das CTM derivadas de tecido adiposo em relação às derivadas de medula óssea:
Comparação da luminescência no InVivo Image System (fótons captados em relação ao número de células) das CTM luciferase positivas derivadas da medula óssea em comparação às derivadas do tecido adiposo.

Devido ao fato das CTM derivadas de tecido adiposo apresentarem maior sinal no ensaio de captação de imagem *in vivo*, decidiu-se utilizar estas células nas próximas fases do estudo. Para tanto, procedeu-se à caracterização funcional pelo ensaio de diferenciação.

Para o ensaio de diferenciação, utilizou-se o kit StemPro® (Gibco, Life technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Na Figura 23, apresenta-se em A a diferenciação osteogênica para as CTM derivadas do tecido adiposo e da medula óssea, e respectivo controle. A osteogênese pode ser confirmada pela presença de depósitos de cálcio na matriz extracelular corados em preto com nitrato de prata. Em B está representada a diferenciação adipogênica comprovada pela presença de gotículas de lipídeos, coradas em vermelho com Sudan Escarlate. Finalmente, em C apresenta-se a diferenciação condrogênica confirmada pela coloração azul, indicativa da síntese de proteoglicanas pelos condrócitos.

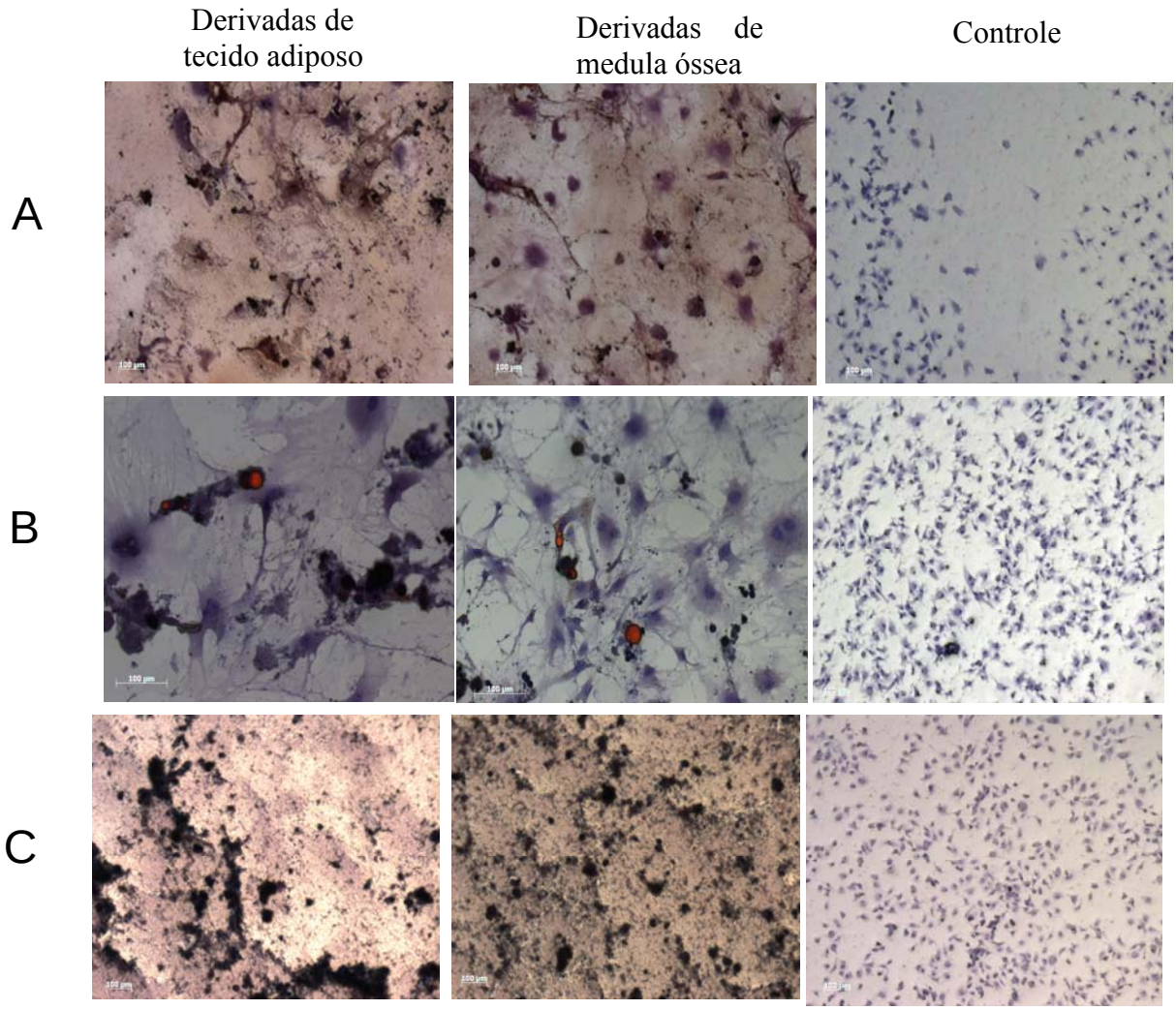


Figura 23. Ensaio de diferenciação das CTM:
A - Diferenciação osteogênica das CTM derivadas de medula óssea e de tecido adiposo. Coloração com nitrato de prata e contra-coloração com hematoxilina. Depósitos de cálcio na matriz extracelular corados em preto. B - Diferenciação adipogênica das CTM derivadas de medula óssea e de tecido adiposo. Coloração com sudan escarlate e contra-coloração com hematoxilina. Gotículas de liídeos coradas em vermelho. C - Diferenciação condrogênica das CTM derivadas de medula óssea e de tecido adiposo. Coloração com alcian blue e contra-coloração com hematoxilina. Depósitos de proteoglicanas na matriz extracelular corados em azul. Aumento de 100x.

4.3 Terapia celular e sinvastatina

Após a caracterização das CTM, buscou-se avaliar o efeito da sinvastatina na expressão do PAI-1 nestas células. As células foram plaqueadas e expostas à sinvastatina conforme descrito em material e métodos no item 3.12. Como apresentado na Figura 24, a qualidade do RNA mostrou-se aceitável.

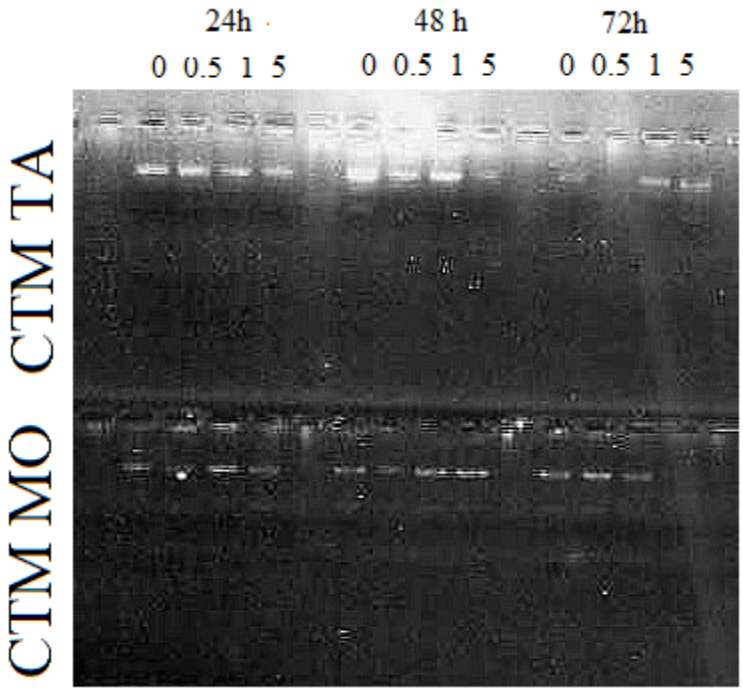


Figura 24. Eletroforese das amostras de RNA das células expostas a diferentes doses de sinvastatina:
Eletroforese em gel de agarose/TAE 1,2% corado com brometo de etídeo de 500 ng de RNA obtido das CTM derivadas do tecido adiposo (CTM TA) e CTM derivadas da medula óssea (CTM MO)expostas a diferentes doses de sinvastatina (0µM, 0.5µM, 1µM ou 5µM) por 24, 48 ou 72 horas.

Sintetizou-se então o cDNA e realizou-se RT qPCR para detecção do PAI-1, conforme descrito anteriormente. Como é possível observar na Figura 25, os níveis de PAI-1 diminuíram mais expressivamente nas células derivadas da medula óssea após um período de 48 horas e dose de 1µM de sinvastatina.

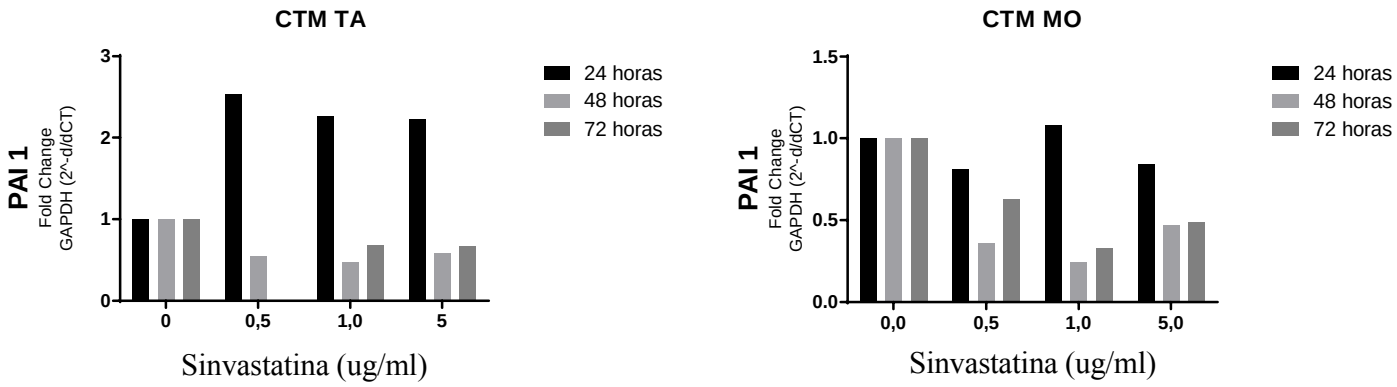


Figura 25. Expressão relativa do PAI-1 em células expostas a diferentes doses sinvastatina *in vitro*:
Quantificação PAI 1, expressa em níveis relativos à expressão do gene endógeno GAPD nas células meseqnuimais derivadas de tecido adiposo (CTM TA) ou de medula óssea (CTM MO) expostas a diferentes doses de sinvastatina (0, 0.5, 1 ou 5µM) por 24, 48 ou 72 horas.

Após determinação das células a serem utilizadas, seguiu-se para a avaliação em modelo animal de terapia celular para o enfisema pulmonar, conforme descrito anteriormente.

Durante todo o experimento os animais tiveram o peso aferido a cada semana. Como pode ser observado na Figura 26, o peso dos animais se manteve estável durante o experimento e entre os grupos, não havendo diferença estatística ao realizar-se o teste oneway ANOVA – Tukey com nível de significância de 5%.

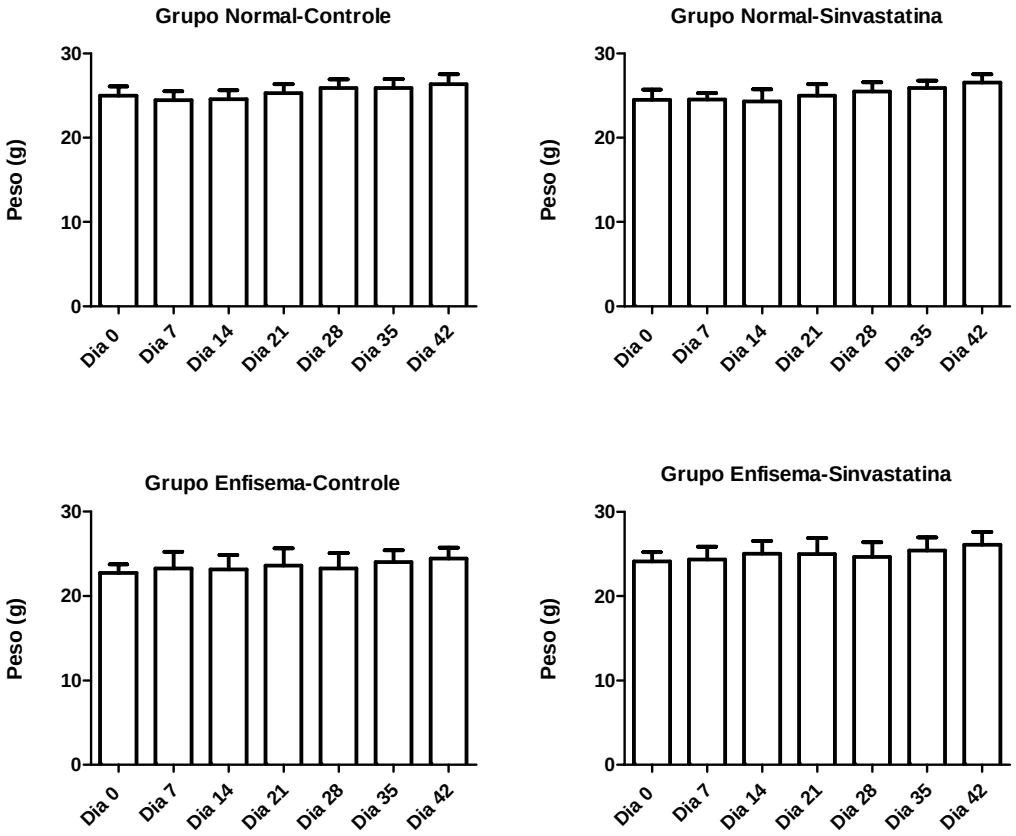


Figura 26. Peso dos animais ao longo do experimento:
Gráficos representativos das médias dos pesos dos animais em gramas ao longo do experimento, sendo considerado o dia zero o dia da instilação intranasal. O grupo Normal-Controle recebeu instilação intranasal de solução fisiológica e gavagem de veículo, o grupo Normal-Sinvastatina recebeu instilação intranasal de solução fisiológica e gavagem de veículo contendo 15mg/kg de sinvastatina. O grupo Enfisema-Controle recebeu instilação intranasal de solução fisiológica contendo 4UI de elastase e gavagem de veículo. O grupo Enfisema-Sinvastatina recebeu instilação intranasal de solução fisiológica contendo 4UI de elastase e gavagem de veículo contendo 15mg/kg de sinvastatina.

A fim de se avaliar a mecânica ventilatória dos animais enfisematosos ou não submetidos à terapia celular e que receberam ou não sinvastatina, três semanas após a instilação intranasal, antes da terapia celular, foram submetidos a pletismografia. As medidas foram repetidas uma e duas semanas após a terapia celular. Conforme pode ser observado na

Figura 27, não houve diferença entre os grupos ou ao longo do experimento ao realizar-se o teste oneway ANOVA - Tukey.

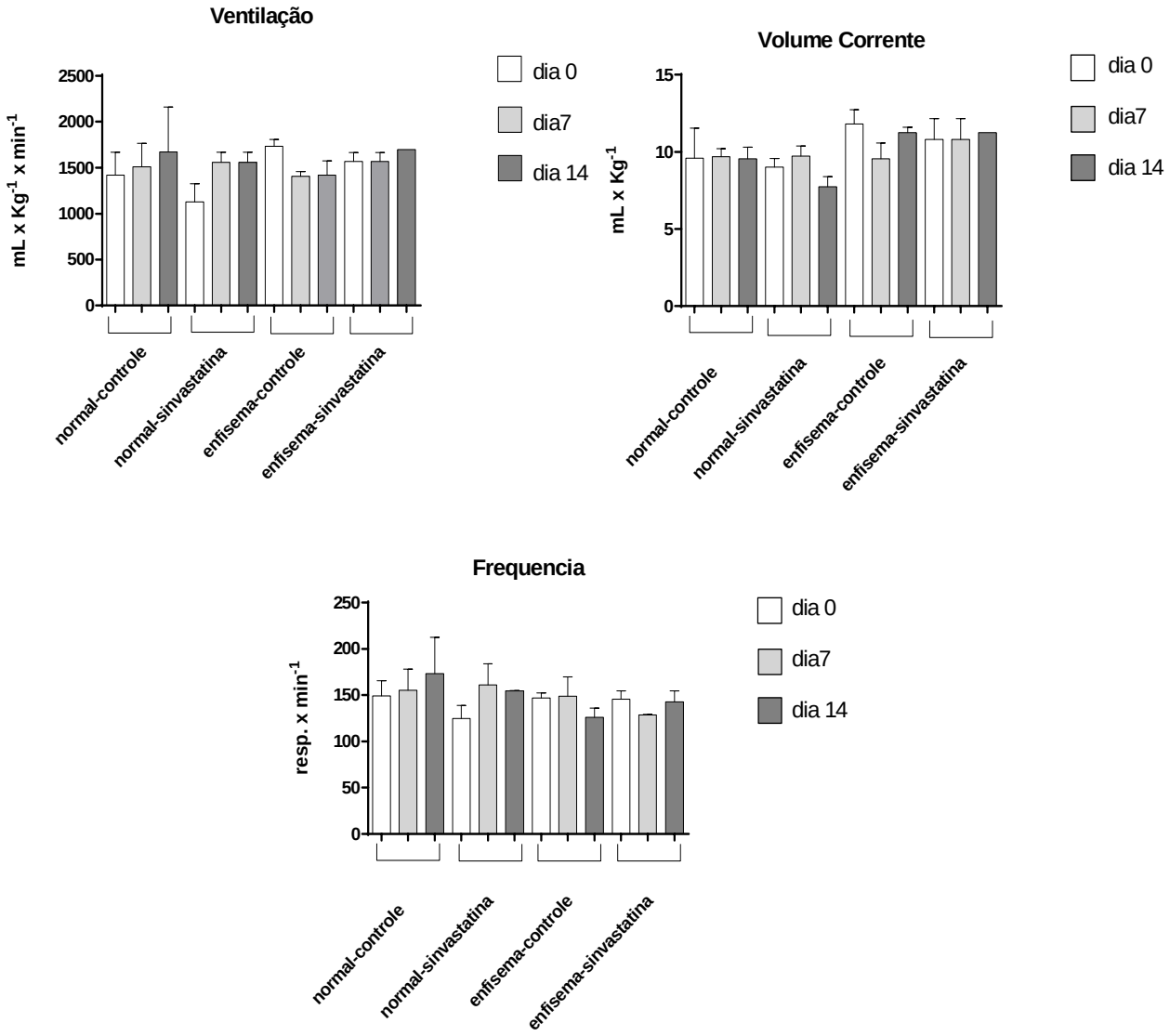
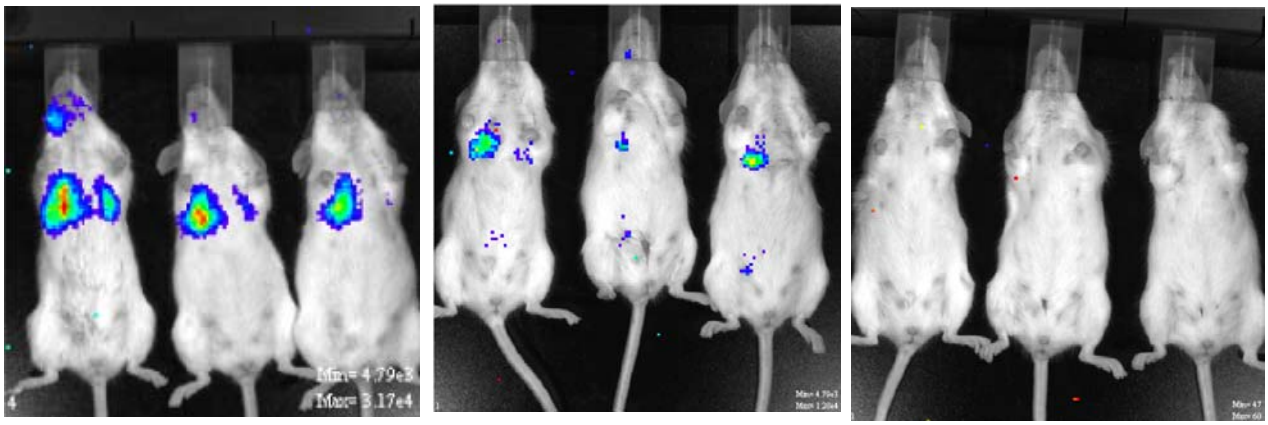


Figura 27. Pletismografias dos grupos terapia celular e sinvastatina:
Gráfico representativo dos resultados das pletismografias dos animais uma semana antes e duas semanas após a terapia celular, sendo considerado o dia zero o dia da instilação intranasal. O grupo Normal-Controle recebeu instilação intranasal de solução fisiológica e gavagem de veículo, o grupo Normal-Sinvastatina recebeu instilação intranasal de solução fisiológica e gavagem de veículo contendo 15mg/kg de sinvastatina. O grupo Enfisema-Controle recebeu instilação intranasal de solução fisiológica contendo 4UI de elastase e gavagem de veículo. O grupo Enfisema-Sinvastatina recebeu instilação intranasal de solução fisiológica contendo 4UI de elastase e gavagem de veículo contendo 15mg/kg de sinvastatina.

Após a terapia celular, avaliou-se a presença das células infundidas no tecido pulmonar dos camundongos receptores. Para tanto, determinou-se a luminescência emitida pelas células infundidas utilizando-se In Vivo Imaging System (IVIS 100) (Perkin Elmer Para

as imagens, os animais foram submetidos à injeção intraperitoneal de 150 mg/kg de luciferina (Perking Elmer) e mantidos sob sedação com isofluorano 4% (Cristalia) em oxigênio. As imagens foram obtidas logo após, 24 horas e 48 horas após a terapia celular. A Figura 28 apresenta algumas das imagens analisadas. É possível observar que houve predominância das células infundidas no lado direito do pulmão dos animais e que as células permaneceram no tecido pulmonar dos receptores até 24 horas após a infusão.



0 horas **24 horas** **48 horas**

Figura 28. Detecção por luminescência as células infundidas nos animais receptores: Fotografias representativas da detecção de luminescência nos animais receptores 0, 24 e 48 horas após a terapia celular. O grupo Normal-Controle recebeu instilação intranasal de solução fisiológica e gavagem de veículo, o grupo Normal-Sinvastatina recebeu instilação intranasal de solução fisiológica e gavagem de veículo contendo 15mg/kg de sinvastatina. O grupo Enfisema-Controle recebeu instilação intranasal de solução fisiológica contendo 4UI de elastase e gavagem de veículo. O grupo Enfisema-Sinvastatina recebeu instilação intranasal de solução fisiológica contendo 4UI de elastase e gavagem de veículo contendo 15mg/kg de sinvastatina.

Tabela 6. Fótons por segundo por animal do grupo normal-controle

Grupo	normal-controle		
animal	0h	24h	48h
1	178000	403000	599000
2	425000	350000	514000
3	415000	303000	563000
4	806000	147000	165000
5	516000	113000	144000
6	843000	142000	165000
7	290000	216000	124000
8	536000	207000	130000

Tabela 7. Fótons por segundo por animal do grupo normal-sinvastatina

Grupo	Normal-sinvastatina		
animal	0h	24h	48h
1	1180000	258000	141000
2	1210000	171000	107000
3	1210000	152000	80000
4	507000	264000	119000
5	418000	152000	106000
6	1790000	191000	102000
7	556000	128000	106000

Tabela 8. Fótons por segundo por animal do grupo enfisema-controle

Grupo	enfisema-controle		
animal	0h	24h	48h
1	1850000	297000	122000
2	789000	160000	86200
3	771000	130000	84600
4	1030000	185000	126000
5	849000	149000	119000
6	531000	120000	94500
7	756000	148000	127000

Tabela 9. Fótons por segundo por animal do grupo enfisema-sinvastatina

Grupo	enfisema-sinvastatina		
animal	0h	24h	48h
1	982000	62900	129000
2	775000	152000	133000
3	471000	136000	109000
4	882000	167000	157000
5	718000	130000	119000
6	692000	187000	110000
7	534000	117000	119000
8	543000	124000	118000

A Figura 29 apresenta o gráfico referente à quantificação das imagens, considerando-se fótons por segundo por animal, como apresentado nas Tabelas 6, 7, 8 e 9. É possível observar que houve uma forte queda da presença do sinal nas primeiras 24 horas e que após 48 horas o sinal já não foi mais detectável. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos considerando o mesmo tempo de análise e teste oneway ANOVA – Tukey com nível de significância de 5%.

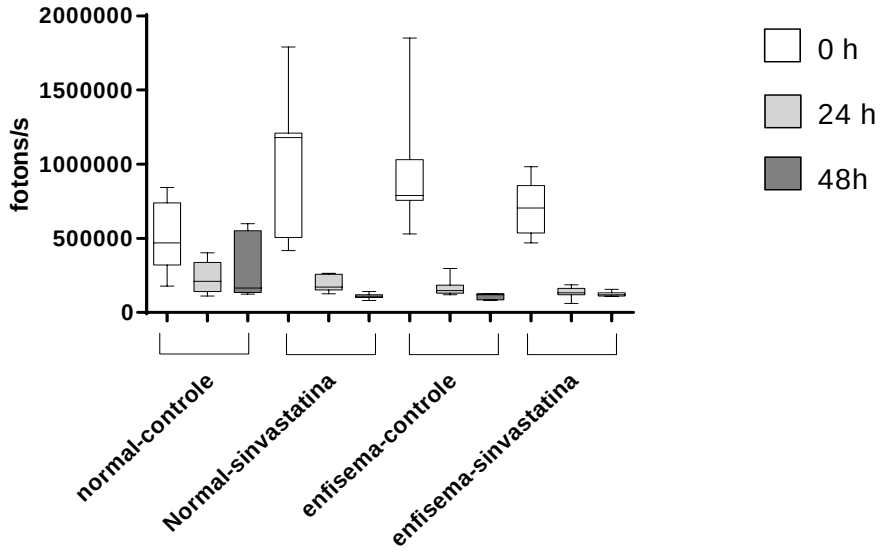


Figura 29. Gráfico da luminescência nos animais receptores:
Gráfico representativo da detecção da luminescência no tecido pulmonar dos animais receptores 0, 24 e 48 horas após a terapia celular. O grupo Normal-Controle recebeu instilação intranasal de solução fisiológica e gavagem de veículo, o grupo Normal-Sinvastatina recebeu instilação intranasal de solução fisiológica e gavagem de veículo contendo 15mg/kg de sinvastatina. O grupo Enfisema-Controle recebeu instilação intranasal de solução fisiológica contendo 4UI de elastase e gavagem de veículo. O grupo Enfisema-Sinvastatina recebeu instilação intranasal de solução fisiológica contendo 4UI de elastase e gavagem de veículo contendo 15mg/kg de sinvastatina.

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical 21 dias após a infusão de células e tiveram pulmão removido para avaliação histo-morfológica do enfisema pulmonar. A Figura 30 apresenta fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido pulmonar corados com HE. Como é possível observar, os grupos submetidos à instilação intranasal de elastase apresentam lesões mais evidentes dos septos alveolares, e os grupos que receberam sinvastatina apresentam maior espessamento dos septos e presença de infiltrado celular.

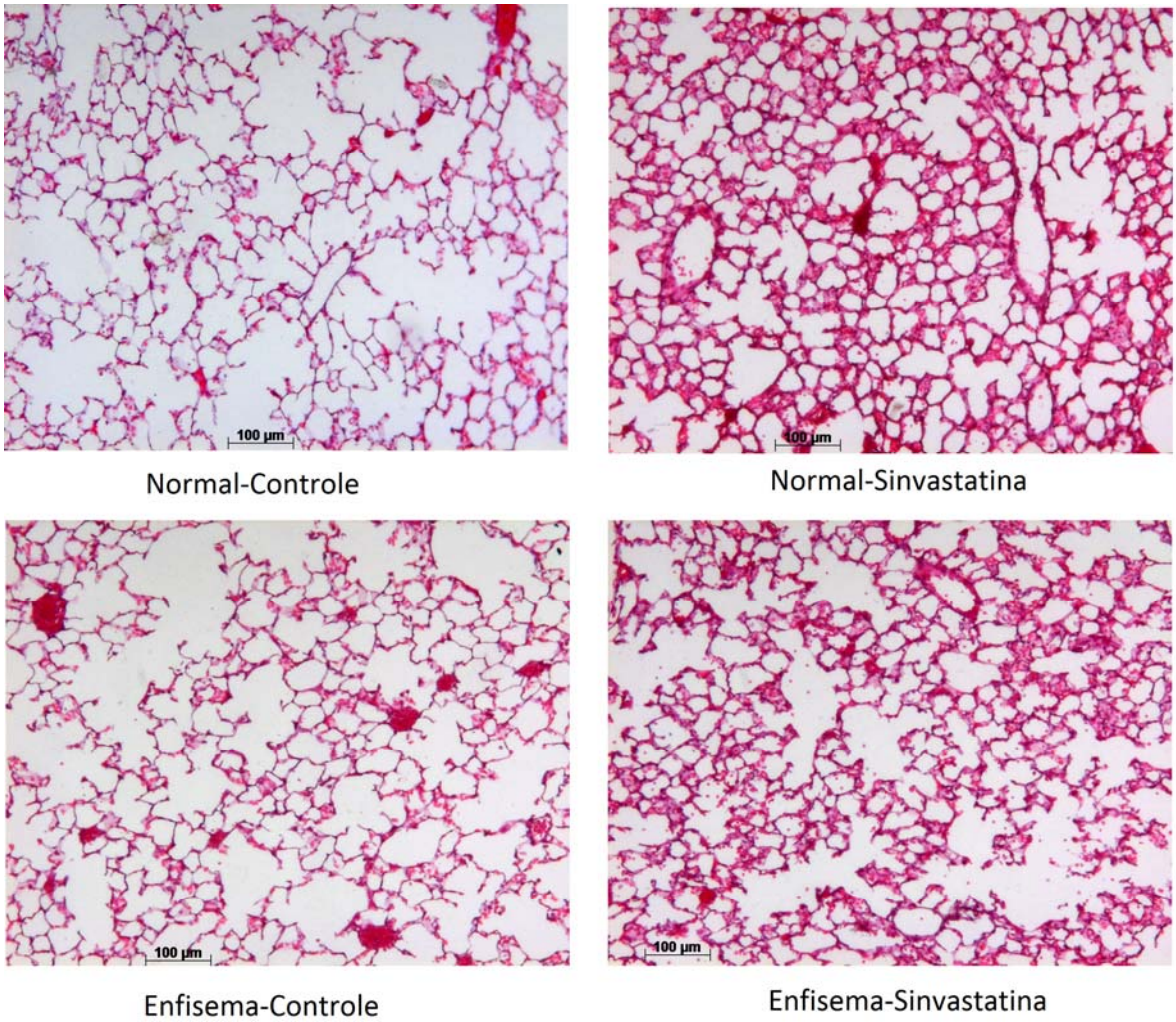


Figura 30. Fotomicrografias do tecido pulmonar dos grupos terapia celular e sinvastatina:
Fotomicrografias representativas em aumento de 400X de cortes histológicos do tecido pulmonar corados com HE – Hematoxilina-Eosina. O grupo Normal-Controle recebeu instilação intranasal de solução fisiológica e gavagem de veículo, o grupo Normal-Sinvastatina recebeu instilação intranasal de solução fisiológica e gavagem de veículo contendo 15mg/kg de sinvastatina. O grupo Enfisema-Controle recebeu instilação intranasal de solução fisiológica contendo 4UI de elastase e gavagem de veículo. O grupo Enfisema-Sinvastatina recebeu instilação intranasal de solução fisiológica contendo 4UI de elastase e gavagem de veículo contendo 15mg/kg de sinvastatina.

A Figura 31 apresenta gráfico comparativo do diâmetro alveolar médio calculado por meio do LM, conforme descrito anteriormente. É possível observar que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos submetidos à instilação intranasal de elastase que receberam ou não sinvastatina e o grupo controle. Também é possível verificar que não houve diferença entre os grupos submetidos à instilação intranasal de elastase que receberam ou não sinvastatina, de acordo com o teste ANOVA Kruscal Wallis com post-hoc de Dunn e nível de significância de 5%.

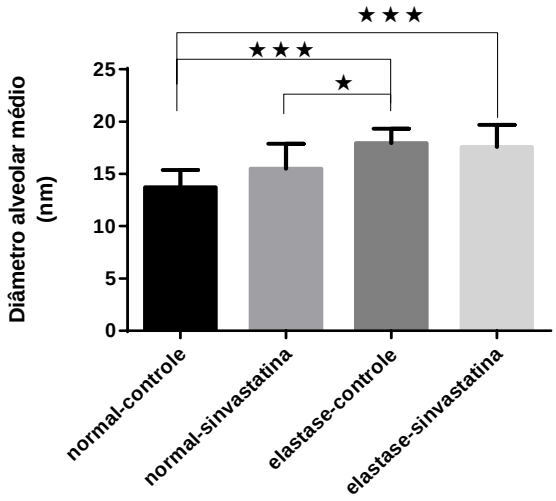


Figura 31. Gráfico da análise comparativa do diâmetro alveolar médio:
Gráfico da análise comparativa do diâmetro alveolar médio. O grupo Normal-Controle recebeu instilação intranasal de solução fisiológica e gavagem de veículo, o grupo Normal-Sinvastatina recebeu instilação intranasal de solução fisiológica e gavagem de veículo contendo 15mg/kg de sinvastatina. O grupo Enfisema-Controle recebeu instilação intranasal de solução fisiológica contendo 4UI de elastase e gavagem de veículo. O grupo Enfisema-Sinvastatina recebeu instilação intranasal de solução fisiológica contendo 4UI de elastase e gavagem de veículo contendo 15mg/kg de sinvastatina.

Ao analisar-se, porém, o diâmetro alveolar médio dos grupos considerando-se os lados direito e esquerdo do pulmão, é possível observar que há diferença estatisticamente significativa dos grupos submetidos à instilação de elastase e o grupo controle, com exceção do grupo referente ao lado direito do pulmão dos animais submetidos à instilação intranasal de elastase e que receberam sinvastatina, de acordo com o teste ANOVA Kruscal Wallis com post-hoc de Dunn e nível de significância de 5%, como apresentado na Figura 32.

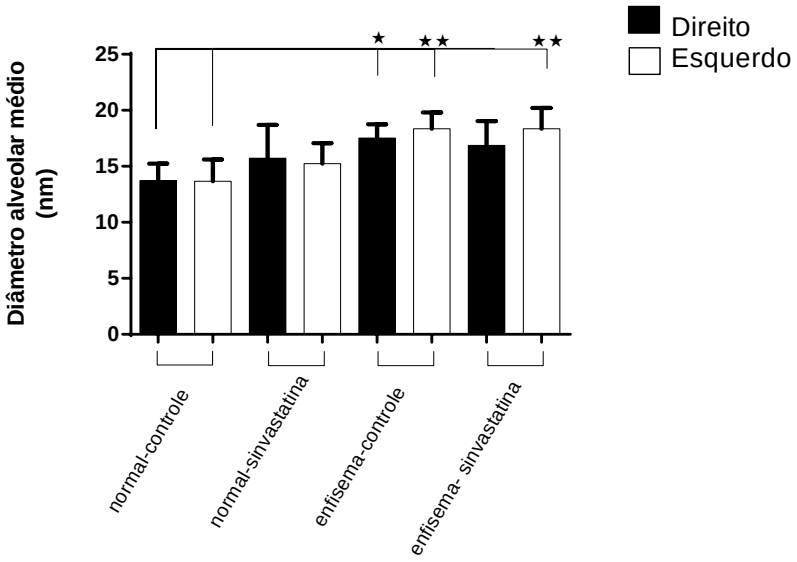


Figura 32. Gráfico da análise comparativa do diâmetro alveolar médio (direito x esquerdo):
Gráfico da análise comparativa do diâmetro alveolar médio considerando-se os lados direito e esquerdo do pulmão. O grupo Normal-Controle recebeu instilação intranasal de solução fisiológica e gavagem de veículo, o grupo Normal-Sinvastatina recebeu instilação intranasal de solução fisiológica e gavagem de veículo contendo 15mg/kg de sinvastatina. O grupo Enfisema-Controle recebeu instilação intranasal de solução fisiológica contendo 4UI de elastase e gavagem de veículo. O grupo Enfisema-Sinvastatina recebeu instilação intranasal de solução fisiológica contendo 4UI de elastase e gavagem de veículo contendo 15mg/kg de sinvastatina.

5 DISCUSSÃO

Dentro do espectro da DPOC, o enfisema, apresenta como principal característica a destruição dos septos alveolares decorrente de processo inflamatório crônico, com consequente dispneia progressiva. Tem papel importante na etiopatogenia da DPOC, mais especificamente do enfisema pulmonar, a elastase neutrofílica. uma enzima proteolítica extremamente ativa, capaz de clivar uma série de substratos, como por exemplo a proteína de matriz extracelular elastina, daí o nome elastase. Pode degradar estruturas importantes da matriz extracelular, como fibronectina e colágeno, bem como proteínas exógenas, como da parede celular de bactérias (125, 126).

Modelos animais de DPOC induzido por instilação de proteases, principalmente elastase, têm sido amplamente empregados devido à fácil aplicação, alta reprodutibilidade e rápido desenvolvimento. Mudanças morfológicas consistentes com o enfisema, como destruição do parênquima pulmonar, inflamação e consequente limitação do fluxo aéreo, são apresentadas 21 dias após a instilação intranasal de elastase em modelo murino, sendo utilizado aproximadamente 4UA de elastase por animal (127).

A fim de se avaliar a elastase a ser empregada neste trabalho, utilizou-se ensaio colorimétrico. A elastase mostrou-se ativa e eficaz na clivagem de seu substrato N-succcinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilina, como pode ser observado na Figura 16. O ensaio também permitiu determinar a concentração da enzima na solução utilizada como 6.75 U/µL. Portanto, a elastase utilizada mostrou-se adequada para o estabelecimento de modelo animal de DPOC.

Após a determinação da atividade da elastase, buscou-se caracterizar o modelo animal de DPOC a ser utilizado. Para este fim, avaliou-se comparativamente camundongos submetidos ou não à instilação intranasal de elastase, conforme descrito em material e métodos.

Ao avaliar-se o modelo animal de terapia celular para o enfisema pulmonar, é possível verificar que os animais submetidos à instilação intranasal de elastase desenvolveram padrões histomorfológicos condizentes com o enfisema pulmonar 21 dias após a instilação intranasal de elastase. Os animais expostos à elastase apresentaram regiões de alargamento dos espaços alveolares decorrentes da proteólise dos septos alveolares, como pode ser observado na Figura 19. Também é possível observar que o padrão histomorfológico foi recuperado no grupo exposto à elastase e submetido à infusão de CTM. Estes dados estão em consonância com relatos prévios da literatura que reportam a indução do enfisema pulmonar em camundongos

após a instilação intranasal de uma dose de elastase, bem como a recuperação dos padrões morfológicos 21 a 28 dias após terapia celular (2, 8, 19, 25, 73).

Após as análises histológicas, seguiu-se para a análise funcional do modelo empregado por meio de pletismografia de corpo inteiro sem restrição. Medidas dos efeitos de drogas e agentes infecciosos no sistema respiratório, bem como avaliação da função pulmonar em situação fisiológica normal, são de grande interesse no avanço do conhecimento da fisiologia respiratória, bem como doenças pulmonares. No entanto, o tamanho reduzido dos camundongos apresenta um desafio e limitações técnicas à avaliação das funções pulmonares neste modelo (128–130).

A análise dos dados apresentados na Figura 18 permite observar uma tendência à diminuição da frequência respiratória e volume expiratório apresentada pelos animais submetidos à indução do enfisema pulmonar por instilação intranasal de elastase em relação aos controles e aos submetidos a terapia celular. Porém não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos submetidos à instilação de elastase para indução do enfisema que receberam ou não infusão de CTM e os grupos controle. Porém, não é possível concluir se a falta de diferença estatisticamente significativa deve-se à ausência de efeito funcional do tratamento ou devido a limitações técnicas da metodologia empregada.

Algumas metodologias têm sido empregadas para análise da fisiologia respiratória em camundongos. Destacam-se entre estas técnicas as análises de mecânica ventilatória e pletismografia. No entanto, é preciso reconhecer que, devido aos efeitos contraditórios entre precisão e não-invasão, os dados obtidos apresentam certo grau de incerteza quanto aos parâmetros respiratórios. Como resultado, existe uma correlação entre precisão e invasão. Ou seja, quanto menos invasiva a medida, menores as chances de obtenção de dados consistentes, reprodutíveis e significativos, principalmente em modelo de tamanho reduzido como os camundongos (128–130). Apesar de a maioria destas metodologias serem, de forma geral, bem estabelecidas, ainda há questões importantes a serem definidas, principalmente em relação a valores de referência, em como garantir que os dados sejam obtidos de forma padronizada e como estes valores devem ser interpretados para melhor suportar pesquisas científicas e decisões clínicas (131).

Apesar das limitações inerentes à experimentação animal, que não mimetiza exatamente os aspectos patofisiológicos da doença humana, o modelo adotado neste estudo permite a análise comparativa de padrões mensuráveis e inferências lógicas sobre aspectos patológicos e terapêuticos do enfisema pulmonar e, portanto, apresenta-se adequado para

avaliar os efeitos da sinvastatina sobre a terapia celular em modelo animal de enfisema pulmonar.

A terapia celular com células-tronco adultas apresenta-se, como uma ferramenta promissora no tratamento de doenças degenerativas, principalmente as de caráter inflamatório e autoimune (2, 15, 19, 25, 132, 133). Conceitualmente, a terapia celular tem evoluído de uma premissa inicial de que células exógenas regenerariam o tecido lesado para uma hipótese mais ampla, de que facilitariam aspectos complementares e cruciais do processo endógeno de regeneração tecidual (2, 73, 74). Estudos recentes mostraram que CTM são capazes de proteger o tecido pulmonar por meio da supressão de citocinas pró-inflamatórias e induzindo a produção de fatores de crescimento (1, 134). As CTM parecem atuar nos aspectos complementares do processo regenerativo. Estes aspectos podem incluir aumento das taxas de sobrevivência celular por meio de liberação de fatores parácrinos, melhora na oxigenação do tecido por neoangiogênese, bem como recuperação funcional pela indução de remodelação (2, 7, 75, 135).

Um dos principais desafios ao sucesso da terapia celular são as baixas taxas de sobrevivência das células infundidas ("homing"), devido principalmente ao microambiente pouco favorável à proliferação celular encontrado nos tecidos-alvo (47, 75). Dua possíveis formas de abordar este problema incluem a manipulação das células antes do transplante, ou a modulação de processos como a migração celular e inflamação do tecido receptor antes da infusão, aumentando as chances de sobrevivência das células transplantadas (2, 73–75).

Copland e colaboradores, em 2009, observaram que a administração de anticorpos neutralizadores de inibidor do ativador de plasminogênio – PAI-1 em camundongos receptores aumenta as taxas de sobrevivência de CTM no tecido-alvo após transplante. Desta forma, definiram o PAI-1 como um importante mediador da sobrevivência das CTM no tecido alvo após terapia celular (94–96).

O PAI-1 influencia vários processos, como trombólise, inflamação, reparo tecidual, migração, invasão tumoral e neovascularização. É o principal inibidor de uPA (urokinase-type Plasminogen Activator) que transforma o plasminogênio (Plg) na sua forma ativa, plasmina. PAI-1 (47, 136).

A administração da sinvastatina atuaria em diferentes níveis nas cascatas proteicas reguladoras dos níveis de PAI-1. Para avaliar os efeitos da sinvastatina na expressão de PAI-1 em diferentes tecidos, foram analisados comparativamente animais expostos ou não a diferentes doses de sinvastatina, conforme descrito em material e métodos. Os resultados obtidos no presente estudo mostraram, por meio da técnica de PCR em tempo real, a

diminuição da presença do PAI-1 em pulmão de animais submetidos a doses de 10 mg/kg ($p < 0,05$), 15mg/kg e 25 mg/kg ($p < 0,01$) de sinvastatina, em relação aos animais que receberam apenas veículo (Figura 12). Foi possível também a verificar a diminuída de presença de PAI-1 no plasma sanguíneo destes animais por meio de western blotting, conforme apresentado na Figura 13.

Avaliou-se também os níveis de PAI-1 em cultura de CTM derivadas da medula óssea e do tecido adiposo expostas a doses de 0,5, 1 e 5 μM de sinvastatina, conforme descrito em material e métodos. Como pode ser observado na Figura 25, houve redução dos níveis de PAI-1 48 e 72 horas após a exposição das células às diferentes doses sinvastatina, sendo a redução mais pronunciada 48 horas após a exposição dose de 1μM de sinvastatina em ambas as células (CTM TA e CTM MO).

Em concordância com estes resultados, Sato e colaboradores verificaram que o pré-tratamento com sinvastatina diminuiu os níveis de PAI-1 em cultura de células HepG2 aumentados por indução pela insulina (6). A sinvastatina é um fármaco da classe das estatinas capaz de baixar os níveis séricos de colesterol, ao mimetizar o substrato da enzima HMG-CoA redutase (137). Níveis diminuídos de colesterol intracelular induzidos pela inibição da HMG-CoA redutase provocam a translocação na membrana nuclear de proteínas transmembrana responsáveis pelo transporte de esteróis reguladores da expressão gênica (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins – SREBPs). SREBPs pertencem à mesma família de fatores transcricionais que regulam a expressão de PAI-1, bem como outros fatores estimuladores, que ligam-se ao DNA aumentando a transcrição (107). A competição entre os diferentes fatores estimuladores e SREBP's poderia explicar a diminuição dos níveis de PAI-1 pela sinvastatina (138).

A HMG-CoA redutase é uma enzima que catalisa a produção do mevalonato, presente na via biossintética do colesterol. Desta forma, ao inibir a HMG-CoA redutase, a sinvastatina também afeta moléculas presentes na via do mevalonato, como farnesil pirofosfato – FPP e geranilgeranil pirofosfato – GGPP. Ambas são isoprenóides adjuvantes na modificação pós-traducional, mais especificamente prenilação, de proteínas, sendo importantes em diversas vias, como RhoA/ROCK e NF-κβ. Embora não se conheça maiores detalhes sobre a interação entre as vias RhoA/ROCK e NF-κβ e os níveis de expressão de PAI-1, diferentes autores verificaram que a inibição da via RhoA/ROCK e NF-κβ resulta em níveis diminuídos de PAI-1 (137). Em síntese, a sinvastatina atua em diversos níveis na cascata proteica reguladora dos níveis de PAI-1.

Após verificar-se que a sinvastatina foi capaz de inibir PAI-1 *in vivo* e *in vitro*, buscou-se avaliar os efeitos desta diminuição na migração celular em ensaio *in vitro*. Para tanto,

extraiu-se as células mononucleares da medula óssea dos animais expostos às diferentes doses de sinvastatina, conforme descrito anteriormente. Imediatamente após isolamento, as células foram submetidas ao ensaio de migração conforme descrito em material e métodos. Para este ensaio, padronizou-se um período de 24 horas e uma concentração mínima de 40000 células, como apresentado na Figura 14. Verifica-se, porém, na Figura 15 que não houve migração celular em nenhum dos grupos analisados. Não há dados na literatura que permitam uma comparação desses resultados ao de outros autores. Pode-se, porém, formular a hipótese de que o período de 24 horas não foi suficiente para que ocorressem a adesão e migração.

Após determinação dos efeitos da sinvastatina na expressão do PAI-1 *in vivo* e *in vitro*, buscou-se caracterizar as células a serem utilizadas para a terapia celular.

Pretendia-se utilizar CTM derivadas da medula óssea de camundongos C57Bl/6 $EGFP^+$ provenientes do Laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTe Cel, Unesp – FCL Assis). Estas células, conforme pode ser observado na Figura 17, expressam uma proteína verde que fluoresce sob luz ultravioleta, que poderiam ser utilizadas em modelo murino de enfisema pulmonar para se avaliar se a presença das células infundidas no tecido pulmonar dos animais receptores. Porém, ao tentar-se avaliar estas células *in vivo*, não se obteve uma imagem na qual fosse possível distinguir claramente entre o sinal fluorescente proveniente das células transplantadas (475-500nm) e o sinal referente à autofluorescência dos tecidos do animal receptor. Questões envolvendo a autofluorescência dos tecidos e a detecção de marcadores fluorescentes *in vivo* têm sido discutidas em diferentes trabalhos (82, 139–143). Assim, para avaliação do "homing" celular optou-se por utilizar o modelo de bioluminescência.

As técnicas de imagem *in vivo* por bioluminescência baseiam-se na detecção e quantificação da quimioluminescência gerada internamente, permitindo um estudo não-invasivo de processos biológicos em pequenos animais, e tem sido largamente utilizadas em estudos pré-clínicos, principalmente relacionados ao câncer (119, 144). Foram utilizadas neste trabalho CTM mesenquimais derivadas do tecido adiposo e da medula óssea de 3 camundongos machos de aproximadamente 7 semanas da linhagem FVB/Luc^+. As células foram cultivadas até a sexta passagem para os experimentos que se seguiram, conforme detalhadamente descrito em material e métodos.

A fim de se verificar a expressão da luciferase nas células a serem utilizadas, estas foram expostas a luciferina e a bioluminescência captada e quantificada pelo sistema IVIS. Como observa-se nas Figuras 21 e 22 e Tabelas 4 e 5, a média de fótons captados em relação às células derivadas do tecido adiposo foi aproximadamente 2.3 vezes maior que a média de

fótons captados em relação às CTM derivadas da medula óssea. Estes resultados são inesperados, para os quais não se tem até o momento, uma explicação consistente, uma vez o que promotor utilizado na confecção do transgene foi o promotor da beta-actina, que se expresssa costitutivamente em todos os tecidos.

A fim de proceder à caracterização das CTM a serem empregadas na terapia celular utilizou-se ensaio de diferenciação, conforme descrito em material e métodos. A Figura 20 apresenta fotomicrografias representativas das culturas de CTM TA e CTM MO 72 horas e 7 dias após o isolamento das células, evidenciando o processo de adesão das células ao plástico e sua morfologia fibroblastóide. Na Figura 23 apresenta-se o resultado da diferenciação das CTM TA e das CTM MO em osteócitos, condrócitos e adipócitos. Estes resultados estão em acordo e preenchem dois dos 3 requisitos mínimos necessários para caracterização e para validar que as células empregadas correspondem realmente a uma população de células estromais mesnquimais,conforme preconizado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (55).

Devido ao fato de as CTM derivadas de tecido adiposo apresentarem maior sinal no ensaio de captação de imagem *in vivo*, e terem passado por caracterização por ensaio de diferenciação, decidiu-se utilizar estas células nas próximas fases do estudo. Após determinação das células a serem utilizadas, seguiu-se para a avaliação dos efeitos da sinvastatina em modelo animal de terapia celular para o enfisema pulmonar. Para tanto foram comparados animais que receberam terapia celular após serem expostos ou não à indução do enfisema com elastase e submetidos ou não ao tratamento com sinvastatina, conforme descrito em material e métodos.

Durante todo o experimento os animais tiveram o peso aferido a cada semana. Esperava-se que os animais tratados com elastase apresentassem menor ganho de peso, uma vez que atualmente considera-se a DPOC uma doença sistêmica com várias comorbidades associadas decorrentes de mediadores inflamatórios circulantes que podem contribuir para perda da musculatura esquelética e caquexia, e podem, além disso, precipitar ou acentuar comorbidades como doença cardíaca isquêmica, osteoporose, anemia, diabetes, síndrome metabólica e depressão (1). A perda de peso é comumente observada em modelos animais de DPOC (1, 8, 19). Como pode ser observado na Figura 26, o peso dos animais se manteve estável durante o experimento, não havendo diferença estatisticamente significativa detectável entre os grupos que receberam terapia celular e foram expostos ou não à elastase e submetidos ou não ao tratamento com sinvastatina. Este resultado pode ser decorrente do efeito regenerativo e melhora da função pulmonar da terapia celular com CTM TA isoladamente ou

como um efeito adjuvante da sinvastatina. O efeito benéfico das CTM associado ou não à sinvastatina atuaria no desenvolvimento da DPOC e suas comorbidades associadas.

A fim de se avaliar os parâmetros respiratórios esses animais foram submetidos a pletismografia três semanas após a instilação intranasal, antes da terapia celular,. As medidas foram repetidas uma e duas semanas após a terapia celular. Como se observa na Figura 27, não houve diferença entre os grupos controle e tratados ao longo do experimento. Conforme discutido anteriormente, devido às dificuldades técnicas de obtenção e análise de dados precisos relativos à fisiologia em animais de pequeno porte, como os camundongos empregados neste estudo, não se pode concluir de forma consistente se o fato de não haver diferença estatística significativa entre os grupos analisados deve-se limitações técnicas ou não resposta ao tratamento.

Após a terapia celular, avaliou-se a presença das células infundidas no tecido pulmonar dos camundongos receptores. Para tanto, determinou-se a luminescência emitida pelas células infundidas utilizando-se In Vivo Imaging System (IVIS 100) conforme descrito anteriormente. As imagens foram obtidas 0, 24 horas e 48 horas após a terapia celular. A Figura 28 apresenta algumas das imagens analisadas. As Tabelas 4 e 5 apresentam os valores relativos à quantificação dos fótons emitidos por segundo por animal avaliado. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados. É possível observar que as células permaneceram no tecido pulmonar dos receptores até 24 horas após a infusão e que houve predominância das células infundidas no lado pulmão direito.

Apesar do camundongo ser bastante utilizado como modelo animal de doenças humanas, deve-se levar em consideração que existem diferenças importantes a serem ponderadas. Por exemplo, diferenças anatômicas no trato respiratório que podem ter impacto importante na localização e deposição de partículas e gases no parênquima pulmonar. Devido ao fato do brônquio principal ser mais largo, mais curto e mais vertical no lado direito do que no esquerdo do pulmão em camundongos, espera-se que o lado direito seja mais afetado durante procedimentos experimentais que envolvem as vias intranasal e intratraqueal (119, 120). Desta forma, é possível aventar a hipótese de que a elastase tenha se depositado de forma mais concentrada no lado direito durante a indução da DPOC nos camundongos, o que levaria a um processo inflamatório e injúria mais acentuados neste local. Assim, haveria também no lado direito maior presença de quimioatrativos, o que poderia, também, explicar a maior deposição de células.

Após as análises funcionais e de bioluminescência, 21 dias após a terapia celular, os animais foram eutanasiados e os pulmões foram removidos para análise histológica e

morfométrica, conforme descrito em material e métodos. A Figura 30 apresenta fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido pulmonar corados com HE. Como é possível observar, os grupos submetidos à instilação intranasal de elastase apresentam lesões mais evidentes dos septos alveolares, e os grupos que receberam sinvastatina apresentam maior espessamento dos septos e presença de infiltrado celular.

As análises morfométricas foram realizadas segundo a metodologia proposta por Ewald R. Weibel em 1963. Um método pioneiro e com fundamentação matematicamente sofisticada, mas simples na sua execução. O autor desenvolveu um retículo com um conjunto de retas paralelas desenhado na ocular do microscópio, conforme apresentado na Figura 8. Este recurso permite a determinação do intercepto Linear Médio – LM, por meio do qual é possível determinar o diâmetro alveolar médio. O emprego do LM é considerado, até hoje, uma técnica eficiente para análise do parênquima pulmonar e determinação quantitativa do enfisema pulmonar, uma vez que o LM é diretamente proporcional ao aumento dos espaços aéreos do pulmão (124).

A Figura 31 apresenta gráfico comparativo do diâmetro alveolar médio dos animais calculado por meio do LM. É possível observar que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos submetidos à instilação intranasal de elastase que receberam ou não sinvastatina e os grupos controles. Também é possível verificar que não houve diferença entre os grupos submetidos à instilação intranasal de elastase que receberam ou não sinvastatina. Desta forma, considerando-se ambos os pulmões (direito e esquerdo), não foi possível observar efeito morfológico da terapia celular ou da sinvastatina, separadamente ou em conjunto, em modelo animal de enfisema pulmonar.

Diferenças anatômicas, como discutido anteriormente, levaram a uma maior deposição de células no pulmão direito, como evidenciado pelos resultados obtidos nos ensaios de bioluminescência. Dessa forma, pode-se propor que o pulmão direito recebeu uma maior proporção de células e sinvastatina. Portanto decidiu-se analisar o diâmetro alveolar médio dos grupos considerando-se separadamente os pulmões direito e esquerdo. Como é possível observar na Figura 32, constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e os resultados referentes aos pulmões direitos dos animais tratados com elastase e que receberam sinvastatina e infusão de CTM. Pode-se, portanto inferir que a recuperação morfológica pulmão direito de animais com DPOC/enfisema poderia ser decorrente de um efeito regenerativo parácrino das CTM associadas à sinvastatina.

6 CONCLUSÃO

A metodologia adotada e os resultados obtidos permitem concluir que:

- foi possível induzir e caracterizar morfologica e funcionalmente o enfisema pulmonar por instilação intranasal de elastase em camundongos da linhagem C57Bl/6.

- a administração oral de sinvastatina promoveu diminuição da expressão do PAI-1 no tecido pulmonar e fígado de camundongos.

- as células isoladas da medula óssea e tecido adiposo apresentaram aderência à superfície plástica das garrafas de cultura e potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, de acordo com os critérios para caracterização das CTM como preconizado pela Associação Internacional de Terapia Celular (ISCT).

- as CTM isoladas a partir de medula óssea e tecido adiposo de camundongos da linhagem FVB/Luc^{+} emitiram bioluminescência após exposição à luciferina in vitro e no tecido pulmonar de camundongos receptores.

- a sinvastatina promoveu a diminuição dos níveis de expressão de PAI-1 em cultura de CTM.

- não houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros funcionais avaliados por análise de pletismografia de corpo inteiro nos animais submetidos à terapia celular com CTM em relação aos grupos controle.

- as análises por meio do LM não mostraram diferença estatisticamente significativa quanto aos parâmetros morfológicos dos animais dos grupos controle e submetidos a terapia celular e tratamento com sinvastatina, considerando-se o pulmão como um todo (pulmões direito e esquerdo).

-houve recuperação morfológica estatisticamente significativa quando analisou-se separadamente o pulmão direito dos animais submetidos a terapia celular e tratamento com sinvastatina.

7 REFERÊNCIAS[1]

1. GOLD. the Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease [Internet]. 2015 [citado 25 de novembro de 2014]. Recuperado de: http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2015_Feb18.pdf

2. de Faria CA, de las Heras Kozma R, Stessuk T, Ribeiro-Paes JT. Experimental basis and new insights for cell therapy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Stem Cell Rev. dezembro de 2012;8(4):1236–44.

3. Terzikhan N, Verhamme KMC, Hofman A, Stricker BH, Brusselle GG, Lahousse L. Prevalence and incidence of COPD in smokers and non-smokers: the Rotterdam Study. Eur J Epidemiol. 5 de março de 2016;

4. Mannino DM. The natural history of chronic obstructive pulmonary disease. Pneumonol Alergol Pol. janeiro de 2011;79(2):139–43.

5. Allinson JP, Hardy R, Donaldson GC, Shaheen SO, Kuh D, Wedzicha JA. The Presence of Chronic Mucus Hypersecretion across Adult Life in Relation to Chronic Obstructive Pulmonary Disease Development. Am J Respir Crit Care Med. 15 de março de 2016;193(6):662–72.

6. Schuliga M, Westall G, Xia Y, Stewart AG. The plasminogen activation system: new targets in lung inflammation and remodeling. Curr Opin Pharmacol. junho de 2013;13(3):386–93.

7. Ribeiro-Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Alves-de-Moraes LBC, Faria CA, et al. Terapia celular em doenças pulmonares: existem perspectivas? Rev Bras Hematol Hemoter. maio de 2009;31:140–8.

8. Kozma R de las H, Alves EM, Barbosa-de-Oliveira VA, Lopes FDTQ dos S, Guardia RC, Buzo HV, et al. A new experimental model of cigarette smoke-induced emphysema in Wistar rats. J Bras Pneumol publicaça□o Of da Soc Bras Pneumol e Tisilogia. janeiro de ;40(1):46–54.

9. Ribeiro-Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Marcelino MY, Stessuk T, et al. Unicentric study of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease/pulmonary emphysema. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. janeiro de 2011;6:63–71.

1 De acordo com o Estilo Vancouver.

10. Abraham T, Hogg J. Extracellular matrix remodeling of lung alveolar walls in three dimensional space identified using second harmonic generation and multiphoton excitation fluorescence. J Struct Biol. agosto de 2010;171(2):189–96.

11. Lucattelli M, Cicko S, Müller T, Lommatzsch M, De Cunto G, Cardini S, et al. P2X7 receptor signaling in the pathogenesis of smoke-induced lung inflammation and emphysema. Am J Respir Cell Mol Biol. março de 2011;44(3):423–9.

12. Mortaz E, Folkerts G, Nijkamp FP, Henricks PAJ. ATP and the pathogenesis of COPD. Eur J Pharmacol. 25 de julho de 2010;638(1-3):1–4.

13. Taylor JD. COPD and the response of the lung to tobacco smoke exposure. Pulm Pharmacol Ther. outubro de 2010;23(5):376–83.

14. Hackett TL, Scarci M, Zheng L, Tan W, Treasure T, Warner JA. Oxidative modification of albumin in the parenchymal lung tissue of current smokers with chronic obstructive pulmonary disease. Respir Res. janeiro de 2010;11:180.

15. Faria CA de. Experimental therapy with bone marrow mononuclear cells in animal model of pulmonary emphysema. Universidade de São Paulo; 2012.

16. Montes de Oca M, Tálamo C, Perez-Padilla R, Jardim JRB, Muiño A, Lopez MV, et al. Chronic obstructive pulmonary disease and body mass index in five Latin America cities: the PLATINO study. Respir Med. maio de 2008;102(5):642–50.

17. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 15 de dezembro de 2012;380(9859):2095–128.

18. Ribeiro-Paes JT, Stessuk T, Kozma R de las H. Cell Therapy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: State of the Art and Perspectives. In: Ong K-C, organizador. Chronic Obstructive Pulmonary Disease - Current Concepts and Practice. InTech; 2012. p. 455–74.

19. Marcelino MY, Fuoco NL, de Faria CA, Kozma R de LH, Marques LF, Ribeiro-Paes JT. Animal models in chronic obstructive pulmonary disease-an overview. Exp Lung Res. agosto de 2014;40(6):259–71.

20. Conese M, Piro D, Carbone A, Castellani S, Di Gioia S. Hematopoietic and mesenchymal stem cells for the treatment of chronic respiratory diseases: role of plasticity and heterogeneity. ScientificWorldJournal. janeiro de 2014;2014:859817.

21. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet. 5 de junho de 2015;386(9995):743–800.

22. Raghavan N, Webb K, Amornputtisathaporn N, O'Donnell DE. Recent advances in pharmacotherapy for dyspnea in COPD. Curr Opin Pharmacol. junho de 2011;11(3):204–10.

23. Laveneziana P, Guenette JA, Webb KA, O'Donnell DE. New physiological insights into dyspnea and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease patients. Expert Rev Respir Med. dezembro de 2012;6(6):651–62.

24. Fusco LB, Fonseca MH, Pêgo-Fernandes PM, Pazetti R, Capelozzi V, Jatene FB, et al. Cirurgia de redução do volume pulmonar em modelo experimental de enfisema em ratos. J Bras Pneumol. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia; fevereiro de 2005;31(1):34–40.

25. Longhini-Dos-Santos N, Barbosa-de-Oliveira VA, Kozma RH, Faria CA de, Stessuk T, Frei F, et al. Cell therapy with bone marrow mononuclear cells in elastase-induced pulmonary emphysema. Stem Cell Rev. abril de 2013;9(2):210–8.

26. Gross P, Pfitzer EA, Tolker E, Babyak MA, Kaschak M. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. Arch Environ Health. julho de 1965;11:50–8.

27. Churg A, Wang R, Wang X, Onnervik P-O, Thim K, Wright JL. Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs. Thorax. agosto de 2007;62(8):706–13.

28. Wilson AA, Kwok LW, Hovav A-H, Ohle SJ, Little FF, Fine A, et al. Sustained expression of alpha1-antitrypsin after transplantation of manipulated hematopoietic stem cells. Am J Respir Cell Mol Biol. agosto de 2008;39(2):133–41.

29. Isola LM, Scigliano E, Skerrett D, Shank B, Ross V, Najfeld V, et al. A pilot study of allogeneic bone marrow transplantation using related donors stimulated with G-CSF. Bone Marrow Transplant. dezembro de 1997;20(12):1033–7.

30. Melton DA, Cowen C. Essentials of Stem Cell Biology. Elsevier; 2009. xxiii-xxix.

31. Health NI of. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. 2004.

32. Forraz N, McGuckin CP. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. Cell Prolif. abril de 2011;44 Suppl 1:60–9.

33. Teo AKK, Vallier L. Emerging use of stem cells in regenerative medicine. Biochem J. 15 de maio de 2010;428(1):11–23.

34. Watt FM, Driskell RR. The therapeutic potential of stem cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 12 de janeiro de 2010;365(1537):155–63.

35. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 9 de julho de 1981;292(5819):154–6.

36. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. dezembro de 1981;78(12):7634–8.

37. Silva Barbosa A, Anjos Lima de Carvalho P, Nery Ferreira L, Narriman Silva de Oliveira Boery R, Lago da Silva Sena E. Implicações bioéticas na pesquisa com células-tronco embrionárias. Acta Bioeth. Universidad de Chile. Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética; junho de 2013;19(1):87–95.

38. Brignier AC, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. J Allergy Clin Immunol. fevereiro de 2010;125(2 Suppl 2):S336–44.

39. Rossant J. Handbook of Stem Cells. Handbook of Stem Cells. Elsevier; 2013. 27-28 p.

40. Goldenberg RCDS, Carvalho ACC De. Celulas-tronco Mesenquimais: Conceitos, métodos de obtenção e aplicações. Carvalho ACC De, Goldenberg RCDS, organizadores. São Paulo: Atheneu; 2012. 208 p.

41. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res. fevereiro de 1961;14:213–22.

42. Abramson S, Miller RG, Phillips RA. The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. J Exp Med. 1 de junho de 1977;145(6):1567–79.

43. Drize N, Petinati N. What do we know about the participation of hematopoietic stem cells in hematopoiesis? F1000Research. janeiro de 2015;4.

44. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. Blood. American Society of Hematology; 23 de abril de 2015;125(17):2605–13.

45. Flores-Guzmán P, Fernández-Sánchez V, Mayani H. Concise review: ex vivo expansion of cord blood-derived hematopoietic stem and progenitor cells: basic principles, experimental approaches, and impact in regenerative medicine. Stem Cells Transl Med. novembro de 2013;2(11):830–8.

46. Koestenbauer S, Zisch A, Dohr G, Zech NH. Protocols for hematopoietic stem cell expansion from umbilical cord blood. Cell Transplant. janeiro de 2009;18(10):1059–68.

47. Daley GQ, Scadden DT. Prospects for stem cell-based therapy. Cell. 22 de fevereiro de 2008;132(4):544–8.

48. Friedenstein AJ, Petrakova K V, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. março de 1968;6(2):230–47.

49. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol. setembro de 1976;4(5):267–74.

50. Owen M. Marrow stromal stem cells. J Cell Sci Suppl. janeiro de 1988;10:63–76.

51. Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, van Vliet E, Brakel-van Peer KM, Visser PJ. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. Exp Hematol. maio de 1985;13(4):237–43.

52. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science. 4 de abril de 1997;276(5309):71–4.

53. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. setembro de 1991;9(5):641–50.

54. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. janeiro de 2005;7(5):393–5.

55. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. janeiro de 2006;8(4):315–7.

56. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. abril de 2001;7(2):211–28.

57. Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. Mol Biol Cell. 1 de junho de 2010;21(11):1783–7.

58. Prockop DJ, Youn Oh J. Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs): Role as Guardians of Inflammation. Mol Ther. Nature Publishing Group; janeiro de 2012;20(1):14–20.

59. Iyer SS, Co C, Rojas M. Mesenchymal stem cells and inflammatory lung diseases. Panminerva Med. março de 2009;51(1):5–16.

60. THOMAS ED, LOCHTE HL, LU WC, FERREBEE JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. N Engl J Med. 12 de setembro de 1957;257(11):491–6.

61. DAUSSET J. [Presence of A & B antigens in leukocytes disclosed by agglutination tests]. Comptes rendus des séances la Société Biol ses Fil. outubro de 1954;148(19-20):1607–8.

62. Thomas ED. Landmarks in the development of hematopoietic cell transplantation. World J Surg. julho de 2000;24(7):815–8.

63. Menasché P, Hagège AA, Vilquin J-T, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol. 2 de abril de 2003;41(7):1078–83.

64. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 25 de agosto de 2006;126(4):663–76.

65. Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. Cell Stem Cell. 2 de julho de 2009;5(1):111–23.

66. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 30 de novembro de 2007;131(5):861–72.

67. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science. 21 de dezembro de 2007;318(5858):1917–20.

68. Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. Nature. 31 de julho de 2008;454(7204):646–50.

69. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. Cell. 6 de fevereiro de 2009;136(3):411–9.

70. Prasad A, Manivannan J, Loong DT, Chua SM, Gharibani PM, All AH. A review of induced pluripotent stem cell, direct conversion by trans-differentiation, direct reprogramming and oligodendrocyte differentiation. Regen Med. 9 de fevereiro de 2016;11(2):181–91.

71. Zomer HD, Vidane AS, Gonçalves NN, Ambrósio CE. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. Stem Cells Cloning. janeiro de 2015;8:125–34.

72. Kamao H, Mandai M, Wakamiya S, Ishida J, Goto K, Ono T, et al. Objective evaluation of the degree of pigmentation in human induced pluripotent stem cell-derived RPE. Invest Ophthalmol Vis Sci. dezembro de 2014;55(12):8309–18.

73. João Tadeu Ribeiro-Paes TS and R de las HK. Chronic Obstructive Pulmonary Disease - Current Concepts and Practice. Ong K-C, organizador. chronic obstructive pulmonary disease current-oncepts-and-practiceoncepts-and-practice. InTech; 2012. 474 p.

74. Agostini C. Stem cell therapy for chronic lung diseases: hope and reality. Respir Med. julho de 2010;104 Suppl :S86–91.

75. Copland IB, Lord-Dufour S, Cuerquis J, Coutu DL, Annabi B, Wang E, et al. Improved Autograft Survival of Mesenchymal Stromal Cells by Plasminogen Activator Inhibitor 1 Inhibition AND. 2009;467–77.

76. Bing W, Pang X, Qu Q, Bai X, Yang W, Bi Y, et al. Simvastatin improves the homing of BMSCs via the PI3K/AKT/miR-9 pathway. J Cell Mol Med. maio de 2016;20(5):949–61.

77. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 23 de maio de 1995;92(11):4857–61.

78. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell. 4 de maio de 2001;105(3):369–77.

79. Kotton DN, Ma BY, Cardoso W V, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. Development. dezembro de 2001;128(24):5181–8.

80. Suratt BT, Cool CD, Serls AE, Chen L, Varella-Garcia M, Shpall EJ, et al. Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. Am J Respir Crit Care Med. 1 de agosto de 2003;168(3):318–22.

81. Jungebluth P, Luedde M, Ferrer E, Luedde T, Vucur M, Peinado VI, et al. Mesenchymal stem cells restore lung function by recruiting resident and nonresident proteins. Cell Transplant. janeiro de 2011;20(10):1561–74.

82. D'Agostino B, Sullo N, Siniscalco D, De Angelis A, Rossi F. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. Expert Opin Biol Ther. maio de 2010;10(5):681–7.

83. Feizpour A, Boskabady MH, Ghorbani A. Adipose-derived stromal cell therapy affects lung inflammation and tracheal responsiveness in guinea pig model of COPD. PLoS One. janeiro de 2014;9(10):e108974.

84. Ghorbani A, Feizpour A, Hashemzahi M, Gholami L, Hosseini M, Soukhtanloo M, et al. The effect of adipose derived stromal cells on oxidative stress level, lung emphysema and white blood cells of guinea pigs model of chronic obstructive pulmonary disease. Daru. janeiro de 2014;22(1):26.

85. Peron JPS, de Brito AA, Pelatti M, Brandão WN, Vitoretti LB, Greiffo FR, et al. Human Tubal-Derived Mesenchymal Stromal Cells Associated with Low Level Laser Therapy Significantly Reduces Cigarette Smoke-Induced COPD in C57BL/6 mice. PLoS One. janeiro de 2015;10(8):e0136942.

86. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. Am J Respir Cell Mol Biol. agosto de 2005;33(2):145–52.

87. Hu KX, Sun QY, Guo M, Ai HS. The radiation protection and therapy effects of mesenchymal stem cells in mice with acute radiation injury. Br J Radiol. janeiro de 2010;83(985):52–8.

88. Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, LeRoux-Williams M, Tashkin DP. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. Chest. junho de 2013;143(6):1590–8.

89. Tzouvelekis A, Ntolios P, Bouros D. Stem cell treatment for chronic lung diseases. Respiration. janeiro de 2013;85(3):179–92.

90. Lipsi R, Rogliani P, Calzetta L, Segreti A, Cazzola M. The clinical use of regenerative therapy in COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. janeiro de 2014;9:1389–96.

91. Stessuk T, Ruiz MA, Greco OT, Bilaqui A, Ribeiro-Paes MJ de O, Ribeiro-Paes JT. Phase I clinical trial of cell therapy in patients with advanced chronic obstructive pulmonary disease: follow-up of up to 3 years. Rev Bras Hematol Hemoter. janeiro de 2013;35(5):352–7.

92. Ribeiro-Paes JT, Stessuk T, Marcelino M, Faria C, Marinelli T, Ribeiro-Paes MJ. A protocol proposition of cell therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. Rev Port Pneumol. janeiro de 2014;20(2):84–91.

93. Erickson LA, Ginsberg MH, Loskutoff DJ. Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelets. J Clin Invest. outubro de 1984;74(4):1465–72.

94. Simone T, Higgins P. Inhibition of SERPINE1 Function Attenuates Wound Closure in Response to Tissue Injury: A Role for PAI-1 in Re-Epithelialization and Granulation Tissue Formation. J Dev Biol. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2 de março de 2015;3(1):11–24.

95. Fleetwood AJ, Achuthan A, Schultz H, Nansen A, Almholt K, Usher P, et al. Urokinase Plasminogen Activator Is a Central Regulator of Macrophage Three-Dimensional Invasion, Matrix Degradation, and Adhesion. 2014;

96. Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C, Bajou K, Masson V, Gerard RD, et al. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. FASEB J. 2002;16(2):147–54.

97. Brown NJ, Brown NJ. Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease. 2010;

98. Ghosh AK, Murphy SB, Kishore R, Vaughan DE. Global gene expression profiling in PAI-1 knockout murine heart and kidney: molecular basis of cardiac-selective fibrosis. PLoS One. janeiro de 2013;8(5):e63825.

99. Horowitz JC, Rogers DS, Simon RH, Sisson TH, Thannickal VJ. Plasminogen activation induced pericellular fibronectin proteolysis promotes fibroblast apoptosis. Am J Respir Cell Mol Biol. janeiro de 2008;38(1):78–87.

100. Balsara RD, Ploplis VA. Plasminogen activator inhibitor-1: the double-edged sword in apoptosis. Thromb Haemost. dezembro de 2008;100(6):1029–36.

101. Wang L, Ly CM, Ko C-Y, Meyers EE, Lawrence DA, Bernstein AM. uPA binding to PAI-1 induces corneal myofibroblast differentiation on vitronectin. Invest Ophthalmol Vis Sci. janeiro de 2012;53(8):4765–75.

102. Hogan NM, Joyce MR, Murphy JM, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ, et al. Impact of mesenchymal stem cell secreted PAI-1 on colon cancer cell migration and proliferation. Biochem Biophys Res Commun. 14 de junho de 2013;435(4):574–9.

103. Hazra S, Stepps V, Bhatwadekar AD, Caballero S, Boulton ME, Higgins PJ, et al. Enhancing the function of CD34(+) cells by targeting plasminogen activator inhibitor-1. PLoS One. janeiro de 2013;8(11):e79067.

104. Ghittoni R, Napolitani G, Benati D, Ulivieri C, Uliveri C, Patrussi L, et al. Simvastatin inhibits the MHC class II pathway of antigen presentation by impairing Ras superfamily GTPases. Eur J Immunol. novembro de 2006;36(11):2885–93.

105. Zanette DL, Lorenzi JCC, Panepucci RA, Palma PVB, Dos Santos DF, Prata KL, et al. Simvastatin modulates mesenchymal stromal cell proliferation and gene expression. PLoS One. janeiro de 2015;10(4):e0120137.

106. Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. Nat Rev Immunol. maio de 2006;6(5):358–70.

107. Lacerda D dos S, Lionzo M. Aspectos atuais da biodisponibilidade de fármacos com baixa solubilidade: um enfoque sobre a sinvastatina. Infarma - Ciências Farmacêuticas. 2013. p. 3–9.

108. Nogueira Neto J, Torres OJM, Borges MO da R, Coelho TM, Nascimento AGP de AC, Nunes Júnior JNN, et al. Modificações do volume e da histologia de focos de endometriose em ratas tratadas com sinvastatina. Rev Bras Ginecol e Obs. Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia; agosto de 2007;29(8):408–14.

109. Campo VL, Carvalho I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. Quim Nova. SBQ; abril de 2007;30(2):425–30.

110. Yang Y-J, Qian H-Y, Huang J, Li J-J, Gao R-L, Dou K-F, et al. Combined therapy with simvastatin and bone marrow-derived mesenchymal stem cells increases benefits in infarcted swine hearts. Arterioscler Thromb Vasc Biol. dezembro de 2009;29(12):2076–82.

111. Batistuzzo JA de O, Itaya M, Eto Y. Formulário médico-farmacêutico. Pharmabooks; 2006. 670 p.

112. Malenovic A, Jancic-Stojanovic B, Medenica M, Ivanovic D. Microemulsion liquid chromatographic screening of Simvastatin and its active metabolite in human plasma. Acta Chromatogr. Akadémiai Kiadó, co-published with Springer Science+Business Media B.V., Formerly Kluwer Academic Publishers B.V.; 2 de dezembro de 2008;20(4):595–607.

113. Tubic-Grozdanis M, Hilfinger JM, Amidon GL, Kim JS, Kijek P, Staubach P, et al. Pharmacokinetics of the CYP 3A substrate simvastatin following administration of delayed versus immediate release oral dosage forms. Pharm Res. julho de 2008;25(7):1591–600.

114. Ni X-Q, Zhu J-H, Yao N-H, Qian J, Yang X-J. Statins suppress glucose-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression by regulating RhoA and nuclear factor-κB activities in cardiac microvascular endothelial cells. Exp Biol Med (Maywood). janeiro de 2013;238(1):37–46.

115. Falcone D, Gallelli L, Di Virgilio A, Tucci L, Scaramuzzino M, Terracciano R, et al. Effects of simvastatin and rosuvastatin on RAS protein, matrix metalloproteinases and NF-κB in lung cancer and in normal pulmonary tissues. Cell Prolif. abril de 2013;46(2):172–82.

116. Kruithof EKO. Regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 gene expression by inflammatory mediators and statins. Thromb Haemost. dezembro de 2008;100(6):969–75.

117. van der Spek E, Bloem AC, van de Donk NWCJ, Bogers LH, van der Griend R, Kramer MH, et al. Dose-finding study of high-dose simvastatin combined with standard chemotherapy in patients with relapsed or refractory myeloma or lymphoma. Haematologica. abril de 2006;91(4):542–5.

118. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. "Green mice" as a source of ubiquitous green cells. FEBS Lett. 5 de maio de 1997;407(3):313–9.

119. O'Neill K, Lyons SK, Gallagher WM, Curran KM, Byrne AT. Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research. J Pathol. fevereiro de 2010;220(3):317–27.

120. Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging. Nat Biotechnol. abril de 2001;19(4):316–7.

121. Contag PR, Olomu IN, Stevenson DK, Contag CH. Bioluminescent indicators in living mammals. Nat Med. fevereiro de 1998;4(2):245–7.

122. Pillon A, Gauthier P, Balaguer P, Pélegrin A, Nicolas J-C. Bioluminescent imaging: applications to cancerology and endocrinology. J la Société Biol. janeiro de 2004;198(2):157–61.

123. Marcelino MY, Fuoco NL, Quaglio AEV, de Camargo Bittencourt RA, Garms BC, da Motta Conceição TH, et al. Cell therapy in experimental model of inflammatory bowel disease. J Coloproctology. Sociedade Brasileira de Coloproctologia; janeiro de 2015;35(1):20–7.

124. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. Lab Invest. fevereiro de 1963;12:131–55.

125. von Nussbaum F, Li VM-J. Neutrophil elastase inhibitors for the treatment of (cardio)pulmonary diseases: Into clinical testing with pre-adaptive pharmacophores. Bioorg Med Chem Lett. 15 de outubro de 2015;25(20):4370–81.

126. Bardoel BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A. The balancing act of neutrophils. Cell Host Microbe. 14 de maio de 2014;15(5):526–36.

127. Ohbayashi H. Neutrophil elastase inhibitors as treatment for COPD. Expert Opin Investig Drugs. julho de 2002;11(7):965–80.

128. Irvin CG, Bates JH. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. Respiratory Research. BioMed Central; 2003. p. 1.

129. Glaab T, Taube C, Braun A, Mitzner W. Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. Respir Res. janeiro de 2007;8:63.

130. Vanoirbeek JAJ, Rinaldi M, De Vooght V, Haenen S, Bobic S, Gayan-Ramirez G, et al. Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases. Am J Respir Cell Mol Biol. janeiro de 2010;42(1):96–104.

131. Ruppel GL, Enright PL. Pulmonary function testing. Respir Care. 1 de janeiro de 2012;57(1):165–75.

132. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Numasaki M, Ueda S, et al. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. FEBS Lett. 2 de janeiro de 2004;556(1-3):249–52.

133. Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, Numasaki M, Ueda S, et al. Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. J Immunol. 15 de janeiro de 2004;172(2):1266–72.

134. Smyth LJC, Starkey C, Vestbo J, Singh D. CD4-regulatory cells in COPD patients. Chest. julho de 2007;132(1):156–63.

135. Caplice NM, Gersh BJ, Alegria JR. Cell therapy for cardiovascular disease: what cells, what diseases and for whom? Nat Clin Pract Cardiovasc Med. janeiro de 2005;2(1):37–43.

136. Mooney DJ, Vandenburgh H. Cell delivery mechanisms for tissue repair. Cell Stem Cell. 6 de março de 2008;2(3):205–13.

137. Sato Y, Dong J, Imagawa S, Ishimori N, Furumoto T, Tsutsui H, et al. Impact of statins on modulation by insulin of expression of plasminogen activator inhibitor type-1. Coron Artery Dis. agosto de 2008;19(5):355–61.

138. Imagawa S, Fujii S, Dong J, Furumoto T, Kaneko T, Zaman T, et al. Hepatocyte growth factor regulates E box-dependent plasminogen activator inhibitor type 1 gene expression in HepG2 liver cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. outubro de 2006;26(10):2407–13.

139. Hoffman RM. Cellular and subcellular imaging in live mice using fluorescent proteins. Curr Pharm Biotechnol. março de 2012;13(4):537–44.

140. Hoffman RM. Live cell imaging in live animals with fluorescent proteins. Methods Enzymol. janeiro de 2012;506:197–224.

141. Hoffman RM. Fluorescent proteins as visible in vivo sensors. Prog Mol Biol Transl Sci. janeiro de 2013;113:389–402.

142. Inoue Y, Izawa K, Kiryu S, Tojo A, Ohtomo K. Diet and abdominal autofluorescence detected by in vivo fluorescence imaging of living mice. Mol Imaging. janeiro de 2008;7(1):21–7.

143. Yukawa H, Watanabe M, Kaji N, Baba Y. Influence of Autofluorescence Derived From Living Body on In Vivo Fluorescence Imaging Using Quantum Dots. Cell Med. 8 de fevereiro de 2015;7(2):75–82.

144. Nakatsu T, Ichiyama S, Hiratake J, Saldanha A, Kobashi N, Sakata K, et al. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. Nature. 16 de março de 2006;440(7082):372–6.

8 ANEXOS

8.1 Anexo A: Certificado Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE ÉTICA
CEUA
NO USO DE ANIMAIS
Campus de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
***Campus* de Ribeirão Preto**
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 14.1.447.53.1), intitulado "Avaliação dos efeitos da sinvastatina via PAI1 sobre a terapia celular com células mesenquimais", de autoria de **Carolina Arruda de Faria e João Tadeu Ribeiro-Paes,** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 28/07/2014.

Colaboradores: Wilson Araújo Silva Júnior; Dalila Luciola Zanetti; Júlio Cesar Cetrullo Lorenzi

This is to certify that the work (Protocol number 14.1.447.53.1), entitled: "Avaliação dos efeitos da sinvastatina via PAI1 sobre a terapia celular com células mesenquimais", by **Carolina Arruda de Faria and João Tadeu Ribeiro-Paes** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, July, 28 2014.

Duração prevista do projeto: 29/07/2014 a 29/08/2015

Ribeirão Preto, 29 de Julho de 2014.

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan
Presidente da CEUA

João Fernando Velho de Andrade Diniz
Secretário da CEUA

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 3526 – Fax: (16) 3602 3526