RENATO GONÇALVES FELIX

**Modulação do microambiente periférico pelas
células-tronco mesenquimais e meio condicionado
na fibrose pulmonar experimental**

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

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Felix, Renato Gonçalves

Modulação do microambiente periférico pelas
células-tronco mesenquimais e meio condicionado na
fibrose pulmonar experimental / Renato Gonçalves
Felix. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Patologia.

Orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Descritores: 1.Células-tronco 2.Tecido adiposo
3.Modelo experimental animal 4.Transplante de
células-tronco mesenquimais 5.Fibrose pulmonar

USP/FM/DBD-163/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

*Dedico este trabalho a **Deus**: o médico dos médicos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todos aqueles que me apoiaram e participaram desta maravilhosa etapa da minha vida, em especial:

À minha amada esposa, Natália Regina Gerlin Felix, por todo amor, pela compreensão e pelo companheirismo.

À minha dedicada mãe, Marlene Gonçalves Felix, e a meu irmão, Adriano Gonçalves Felix, por todo incentivo, pelo apoio e pelo enorme afeto.

À Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi, por ter aceitado o desafio de orientar meu trabalho, e por ter tanta paciência e determinação para transferir seu conhecimento.

À Profa. Dra. Elenice Deffune, por ter aceitado dar continuidade ao meu aprendizado, e orientar meu desenvolvimento acadêmico e humano.

Ao Prof. Dr. Alexandre Todorovic Fabro, por ter aceitado orientar minha pesquisa e por ser um exemplo de lealdade, determinação e perseverança.

À Profa. Dra. Giesela Fleischer Ferrari, por ter me preparado, me incentivado e me ensinado muito do que aprendi no caminho da docência.

À Dr^a. Marjorie de Assis Golim, por todo o apoio e pelos conhecimentos transmitidos, e, sobretudo, pela dedicação demonstrada.

À Sra. Ondina Silvia Cotrim, pela pró-atividade, impressionante dedicação e pronta ajuda sempre que necessário.

À Srta. Ana Livia de Carvalho Bovolato, pelo apoio, pela parceria, pela importantíssima ajuda durante esta jornada e por sua grande dedicação.

Ao Bioterista Paulo César, pela experiência, pela dedicação e pelo carinho no cuidado com nossos animais no biotério.

As Srtas. Patricia Leão e Juliana Machado, pela colaboração e pela dedicação demonstradas.

Aos demais amigos e funcionários dos laboratórios de Engenharia Celular e de Patologia que tive a honra de conviver e trabalhar no período de 2015 a 2018.

Muito obrigado!

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	3
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1	Patogenia.....	9
2.2	Morfologia	11
2.3	Quadro clínico.....	11
2.4	Tratamento	12
2.4.1	Terapia anti-inflamatória	12
2.4.2	Terapia antioxidante	13
2.4.3	Terapia antifibrótica.....	14
2.4.4	Tratamento paliativo.....	14
2.4.5	Transplante pulmonar	15
2.5	Modelos experimentais	15
2.5.1	Modelo animal.....	16
2.5.2	Bleomicina e indução de fibrose pulmonar	16
2.5.3	Mecanismos e vias da lesão	17
2.5.4	Células-tronco e terapia celular	19
2.5.5	Diferentes tipos de colágeno	21
3	OBJETIVOS	27
3.1	Geral.....	27
3.2	Específicos.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	Animais.....	31
4.2	Desenho experimental.....	31
4.3	Aprovação do comitê de ética	33
4.4	Indução experimental da fibrose pulmonar	33

4.5	Obtenção, processamento e caracterização de células-tronco mesenquimais	34
4.6	Padronização das células-tronco mesenquimais	35
4.7	Infusão das células-tronco ou de meio condicionado	36
4.8	Biomarcadores séricos	37
4.9	Microscopia óptica	38
4.10	Imuno-histoquímica.....	39
4.11	Imunofluorescência	39
4.12	Morfometria	40
4.13	Análise estatística.....	41
5	RESULTADOS	45
5.1	Caracterização e validação das células-tronco mesenquimais.....	45
5.2	Recuperação clínica após tratamento	50
5.3	Biomarcadores.....	51
5.3.1	Fibrinogênio	51
5.3.2	Fator von Willebrand (vWF)	52
5.3.3	Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).....	53
5.3.4	Células-tronco e meio condicionado induzem a reversão da inflamação e de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina	54
5.3.5	Células-tronco e meio condicionado induzem reversão da arteriopatia no parênquima pulmonar distal	55
5.3.6	Células-tronco e meio condicionado induzem diminuição da expressão de enzimas oxidantes	56
5.3.7	Células-tronco e meio condicionado induzem diminuição da expressão de endotelina-1	59
5.3.8	Células-tronco e meio condicionado modulam a expressão da proteína de remodelamento IL-17, a ativação dos fibroblastos TGF- β e a síntese de colágeno.....	60
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÃO.....	77
8	ANEXOS.....	81
8.1	ANEXO A – Aprovações dos Comitês de Ética em Pesquisa do HC/FMUSP e UNESP	81
9	REFERÊNCIAS	85
10	APÊNDICES	
10.1	APÊNDICE A – Submissão do artigo referente a tese	
10.1	APÊNDICE B – Artigo referente a tese	

LISTA DE ABREVIATURAS

BLM	Bleomicina
Cols. ou <i>et al.</i>	Colaboradores
CTM/ MSC:	Célula-tronco mesenquimal/mesenchymal stem cells
CTM-TA /AD-MSC	Célula-tronco mesenquimal derivada de tecido adiposo/adipose derived mesenchymal stem cells
CTR	Controle
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DP	Desvio padrão
DPI	Doença pulmonares intersticiais
Fig.	Figuras
FPI/IPF	Fibrose Pulmonar Idiopática/ <i>Idiopathic Pulmonar Fibrosis</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
IL	Interleucina
ISSCR	<i>International Society for Stem Cell Research</i>
LMN	Linfomononuclear
MC/CM	Meio Condicionado/ <i>Conditioned Medium</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> /tampão fosfato-salino
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PINE	Pneumonia intersticial não especificada
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
SFB/FBS	Soro fetal bovino/ <i>bovine fetal serum</i>
TA/AT	Tecido adiposo/ <i>adipose tissue</i>
TGF-β	Fator de transformação do crescimento – Beta
Th	Linfócito T helper
TNF-Alfa	Fator de necrose tumoral – alfa
VEGF	Fator de crescimento vaso endotelial
vWF	Fator de von Willebrand

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** A = Início da adesão plástica, presença de células fibroblastoides no 7º dia de cultura (ampliação 20x). Em B, presença de colônias fibroblastoides de células aderentes com confluência a 70% no 14º dia de cultura (ampliação 10x). 46
- Figura 2 -** Análise do perfil fenotípico de CTM-TA, 3ª passagem. a= gráfico de dispersão e *gating* das CTM; b= controle negativo; c= CD71-FITC positivo fraco; d= CD106 PE positivo; e =controle isotípico, negativo; f= CD40 PE positivo; g= CD45 PE negativo. 46
- Figura 3 -** Análise do perfil fenotípico de CTM-TA, 3ª passagem. h= CD40 FITC positivo; i=CD45PE negativo; j= CD90-PERCP positivo; k = CD11b APC negativo; l= CD44 FITC negativo; m= CD31PE positivo fraco. 47
- Figura 4 -** Fotomicrografias de cultura de CTM no 21º dia sem diferenciação. Microscopia invertida por contraste de fase (ampliação de 40X). Colônia de células de fibroblastos em aderência ao plástico 48
- Figura 5 -** Fotomicrografias da cultura CTM no 21º dia de diferenciação adipogênica. Microscopia de contraste de fase invertida (ampliação 20X). A = Adipócitos com grande quantidade de lipídios no interior. Fibroblastos e células epitelioides também podem observados.. 48
- Figura 6 -** Fotomicrografias de cultura de CTM no 21º dia de diferenciação osteogênica corada com Alizarin Red (ampliação 20X). A coloração vermelha identifica as deposições de cálcio das trabéculas ósseas..... 49
- Figura 7 -** Fotomicrografias da cultura de CTM no 21º dia de diferenciação condrogênica. Microscopia de contraste de fase invertida (ampliação 20X). Coloração de azul de toluidina. 49
- Figura 8 -** (A) Principais características histológicas dos pulmões na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratados com células-tronco após 14 e 21 dias. Histoarquitetura pulmonar preservada nos controles e BLM-MSc e BLM-CM após 21 dias de tratamento. Fibrose e infiltrado inflamatório septal nos pulmões BLM. Hematoxilina & Eosina, aumento 100X (BLM- bleomicina; BLM-MSc, bleomicina- células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura). 55

- Figura 9 -** Principais características da arteriopatia pulmonar na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. A) Espessamento concêntrico laminar da artéria intra-acinar no grupo BLM 14 e 21 dias; reversão do espessamento nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. B) Gráficos em box-plots exibindo significativa reversão do espessamento concêntrico das artérias intra-acinares nos grupos BLM-MSC e BLM-CM comparados ao grupo BLM ($P<0.05$; ANOVA teste). Masson+Verhoeff, aumento 400X (BLM-bleomicina; BLM-MSC, bleomicina-células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura). 56
- Figura 10 -** Imunoexpressão da NOS1 no endotélio das artérias pulmonares intra-acinares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. A) Espessamento concêntrico laminar da artéria intra-acinar no grupo BLM 14 e 21 dias; reversão do espessamento nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. B) Gráficos em box-plots exibindo significativa redução da expressão da NOS1 nos grupos BLM-MSC e BLM-CM comparados ao grupo BLM ($P<0.05$; ANOVA teste). Imuno-histoquímica, aumento 400X (BLM-bleomicina; BLM-MSC, bleomicina- células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura). 57
- Figura 11 -** Imunoexpressão da NOS2 no endotélio das artérias pulmonares intra-acinares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. A) Espessamento concêntrico laminar da artéria intra-acinar no grupo BLM 14 e 21 dias; reversão do espessamento nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. B) Gráficos em box-plots exibindo significativa redução da expressão da NOS2 nos grupos BLM-MSC e BLM-CM comparados ao grupo BLM ($P<0.05$; ANOVA teste). Imuno-histoquímica, aumento 400X (BLM-bleomicina; BLM-MSC, bleomicina -células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura). 58
- Figura 12 -** Imunoexpressão da NOS3 no endotélio das artérias pulmonares intra-acinares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. A) Espessamento concêntrico laminar da artéria intra-acinar no grupo BLM 14 e 21 dias; reversão do espessamento nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. B) Gráficos em box-plots exibindo significativa redução da expressão da NOS3 nos grupos BLM-MSC e BLM-CM comparados ao grupo BLM ($P<0.05$; ANOVA teste). Imuno-histoquímica, aumento 400X (BLM-bleomicina; BLM-MSC, bleomicina- células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura). 59

- Figura 13 -** Imunoexpressão da endotelina-1 no endotélio das artérias pulmonares intra-acinares e capilares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com célula tronco. A) Expressão aumentada no grupo BLM 14 e 21 dias; diminuição da expressão nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. B) Gráficos em box-plots exibindo significativa redução da expressão da endotelina-1 nos grupos BLM-MSC e BLM-CM comparados ao grupo BLM ($P<0.05$; ANOVA teste). Imuno-histoquímica, aumento 400X (BLM-bleomicina; BLM-MSC, bleomicina-células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura). 60
- Figura 14 -** (A-B) Imunoexpressão da IL-17 nos miofibroblastos dos septos alveolares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. A) Expressão aumentada nos grupos BLM-MSC e BLM-CM nos 14 e 21 dias; diminuição da expressão nos grupos-controle e BLM. B) Gráficos em box-plots exibindo significativo aumento da expressão da IL-17 nos grupos BLM-MSC e BLM-CM comparados ao grupo BLM e controle ($P<0.05$; ANOVA teste). Imuno-histoquímica, aumento 400X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina-células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura). 61
- Figura 15 -** (A-B) Imunoexpressão do TGF- β nos miofibroblastos dos septos alveolares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. A) Expressão aumentada do TGF- β no grupo BLM nos 14 e 21 dias; diminuição da expressão nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. B) Gráficos em box-plots exibindo significativo aumento da expressão do TGF- β no grupo BLM comparados ao grupo BLM-MSC e BLM-CM ($P<0,05$; ANOVA teste). Imuno-histoquímica, aumento 400X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina-células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina-meio de cultura)..... 62
- Figura 16 -** (A-B). Imunoexpressão do VEGF nos miofibroblastos dos septos alveolares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. A) Expressão aumentada do VEGF no grupo BLM nos 14 e 21 dias; diminuição da expressão nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. B) Gráficos em box-plots exibindo significativo aumento da expressão do VEGF no grupo BLM comparados ao grupo BLM-MSC e BLM-CM ($P<0.05$; ANOVA teste). Imuno-histoquímica, aumento 400X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina- células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina-meio de cultura)..... 63

Figura 17 - (A-B) Imunofluorescência para o colágeno I nos septos alveolares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. A) Aumento da birrefringência e irregularidade das fibras do colágeno I no grupo BLM nos 14 e 21 dias; diminuição da birrefringência e irregularidade nos septos alveolares nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. B) Gráficos em box-plots exibindo significativo aumento da deposição de fibras do colágeno I no grupo BLM comparados ao grupo BLM-MSC e BLM-CM ($P < 0.05$; ANOVA teste). Imunofluorescência, aumento 200X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina-células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura). 64

Figura 18 - (A-B). Imunofluorescência para o colágeno V nos septos alveolares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. A) Aumento da birrefringência e irregularidade das fibras do colágeno V no grupo BLM nos 14 e 21 dias; diminuição da birrefringência e irregularidade nos septos alveolares nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. B) Gráficos em box-plots exibindo significativo aumento da deposição de fibras do colágeno V no grupo BLM comparados ao grupo BLM-MSC e BLM-CM ($P < 0.05$; ANOVA teste). Imunofluorescência, aumento 200X (BLM-bleomicina; BLM-MSC, bleomicina-células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura). 65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características das subfamílias de colágeno correlacionado com o respectivo tipo.	22
Quadro 2 – Desenho experimental do estudo.....	32
Quadro 3 – Descrição do biomarcador utilizado e sua respectiva função, segundo Vanni (2016)	38

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Diferença de peso entre dois pontos de sacrifício D14 e D21, juntamente com estatísticas. * $P < 0,05$ em comparação com BLM grupo de 14 dias; ** $p < 0,05$ em comparação com BLM grupo de 21 dias..... 50
- Gráfico 2** Representação das concentrações de fibrinogênio plasmático nos animais de controle (CTR); com fibrose pulmonar induzida por bleomicina não tratada (BLM); no grupo tratado com células-tronco mesenquimais (MSC) e no grupo tratado com meio condicionado (CM). 51
- Gráfico 3** - Representação da concentração do fator de von Willebrand, em nanogramas/ml, nos animais de controle (CTR); com fibrose pulmonar induzida por bleomicina não tratada (BLM); no grupo tratado com células-tronco mesenquimais (BLM MSC) e no grupo tratado com meio condicionado (BLM CM) em D14 e D21. 52
- Gráfico 4** - Representação da concentração de PDGF-AA nos animais de controle (CTR); com fibrose pulmonar induzida por bleomicina não tratada (BLM); no grupo tratado com células-tronco mesenquimais (BLM MSC) e no grupo tratado com meio condicionado (BLM CM) em D14 e D21. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Peso em gramas de tecido adiposo, número total de células após dissociação por collagenase tipo 1 e viabilidade celular 45
-------------------	--

RESUMO

Felix RG. *Modulação do microambiente periférico pelas células-tronco mesenquimais e meio condicionado na fibrose pulmonar experimental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é definida como um tipo de doença fibrosante intersticial crônica de etiologia desconhecida limitada aos pulmões e que apresenta padrão histológico de pneumonia intersticial usual. A prevalência de FPI é estimada em, aproximadamente, 20/100.000 em homens e em 13/100.000 em mulheres, sendo que a idade média do diagnóstico é 67 anos e a sobrevivência média é 2 a 5 anos. Estima-se que 5 milhões de pessoas sejam afetadas em todo o mundo. O tratamento clínico atual está associado com melhora parcial e transitória, com resultados duvidosos ou insatisfatórios. Na abordagem cirúrgica da FPI, tem destaque o transplante pulmonar, cuja realização é rara, devido à escassez de doadores e à limitação das equipes capazes de realizar tais procedimentos. A terapia celular é uma alternativa terapêutica com grande potencial de aplicabilidade na fibrose pulmonar.

Objetivos: Utilizar um modelo de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina em ratos para investigar os efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) e o meio condicionado no remodelamento pulmonar com objetivo de elucidar o mecanismo de ação das CTM e meio condicionado, na reversão da fibrose pulmonar. Para tanto, buscamos: 1) padronizar a cultura de células-tronco mesenquimais e meio de cultura; 2) caracterizar o modelo experimental de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina por microscopia óptica antes e após o tratamento com CTM e meio de cultura; 3) avaliar a expressão de biomarcadores sorológicos (Fibrinogênio, Fator von Willebrand e PDGF); 4) quantificar a expressão de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo (NOS), citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas (IL-17 e TGF- β) e pró-angiogênicas (VEGF e endotelina) por imuno-histoquímica; e 5) quantificar a deposição de fibras do colágeno I e V por imunofluorescência. **Materiais e Métodos:** Utilizou-se um total de 44 ratos Wistar machos albinos com peso médio de 250-300g e 8 semanas de idade. Quatro grupos experimentais foram compostos de 10 animais, que participaram do experimento divididos em três momentos: D0, D10 e eutanásia (D14 ou D21). Em D0, foi realizada a instilação orotraqueal de bleomicina na dose de 1,5 U/kg; em D10, foi realizada a infusão em veia caudal de células-tronco mesenquimais na dose de 10^6 CTM/Kg ou 200 μ l de meio condicionado. Para o preparo das CTM, foi obtido, em média, 1,2 g de tecido adiposo, procedida a dissociação com collagenase tipo I, sendo que a contagem média de células foi de $3,05 \times 10^6$ células linfomononucleares/g de tecido adiposo. Estas células foram cultivadas durante 21 dias em meio Knockout DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os seguintes três critérios foram utilizados para comprovar o perfil das células-tronco mesenquimais: aderência plástica, expressão de CD90 por citometria de fluxo (> 90%) e capacidade de diferenciação em três linhagens mesodérmicas. Em D10,

um *pool* destas células alogênicas foi infundido intravenosamente, na veia caudal, a uma concentração de 1×10^6 células/ animal num volume de 200 μ l de solução salina. Em D14 ou D21, os animais foram eutanasiados e analisados quanto ao peso e conforme análises microscópico-laboratoriais. As análises histológicas foram realizadas por dois especialistas diferentes em estudo duplo-cego. Os parâmetros de ganho de peso e recuperação microscópica do tecido pulmonar foram analisados em cada grupo. **Resultados:** Nossos dados mostram que as células-tronco mesenquimais oriundas do tecido adiposo abdominal de ratos Wistar tiveram seu perfil fenotípico, capacidade de adesão plástica e diferenciação em 3 linhagens mesodérmicas estabelecidas inequivocamente, conforme estabelecido internacionalmente pela ISSCR. As células-tronco mesenquimais e o meio condicionado induziram: a recuperação clínica após tratamento; a reversão da inflamação e de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina; a reversão da arteriopatia no parênquima pulmonar distal; a redução das concentrações de fibrinogênio, fator von Willebrand e PDGF (marcadores sorológicos); a diminuição da expressão de enzimas oxidantes; a diminuição da expressão de endotelina e a modulação da expressão da proteína de remodelamento (IL-17), da ativação dos fibroblastos TGF-B e da síntese de colágeno. **Conclusão:** Neste estudo, comprovamos que as terapias com células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo e com o meio condicionado foram eficazes na modulação dos processos inflamatórios e fibrogênicos no modelo induzido por bleomicina, agindo na ativação miofibroblástica, e, também, na restauração tecidual e endotelial. Além disso, o meio condicionado se mostrou tão eficiente quanto as células-tronco propriamente ditas, no efetivo remodelamento pulmonar, devendo ser considerado como uma proposta terapêutica viável e inovadora.

Descritores: células-tronco; tecido adiposo; modelo experimental animal; transplante de células-tronco mesenquimais; fibrose pulmonar.

ABSTRACT

Felix RG. *Modulation of the peripheral microenvironment by mesenchymal stem cells and conditioned medium in experimental lung fibrosis* [thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2018.

Introduction: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is defined as a type of chronic interstitial fibrosing disease of unknown etiology limited to the lungs and presenting a histological pattern of usual interstitial pneumonia. The prevalence of IPF is estimated at approximately 20/100,000 in men and 13/100,000 in women, with the mean age of diagnosis being 67 years and the average survival is 2 to 5 years. It is estimated that 5 million people are affected worldwide. The current clinical treatment is associated with partial and transient improvement, with dubious or unsatisfactory results. In the surgical approach to IPF, pulmonary transplantation is a prominent feature, which is rare because of the scarcity of donors and the limitation of the teams capable of performing such procedures. Cell therapy is a therapeutic alternative with great potential for applicability in pulmonary fibrosis. **Objectives:** To use a model of bleomycin-induced lung fibrosis in rats to investigate the effects of mesenchymal stem cell (MSC) therapy and conditioned medium on lung remodeling in order to elucidate the mechanism of action of MSC and conditioned medium, in the reversion of pulmonary fibrosis. To do so, we aim to: 1) standardize the culture of mesenchymal stem cells and conditioned medium; 2) characterize the experimental model of lung fibrosis induced by bleomycin by optical microscopy before and after treatment with MSC and conditioned medium; 3) to evaluate the expression of serological biomarkers (Fibrinogen, Factor von Willebrand and PDGF); 4) to quantify the expression of proteins related to oxidative stress (NOS), pro-inflammatory and pro-fibrotic (IL-17 and TGF- β) and pro-angiogenic cytokines (VEGF and endothelin) by immunohistochemistry; and 5) to quantify the deposition of collagen I and V fibers by immunofluorescence. **Materials and methods:** A total of 44 male albino Wistar rats weighing 250-300g and 8 weeks of age were used. Four experimental groups were composed of 10 animals, which participated in the experiment divided in three moments: D0, D10 and euthanasia (D14 or D21). In D0, orotracheal instillation of bleomycin at the dose of 1.5 U/ kg was performed; in D10 caudal vein infusion of mesenchymal stem cells at the dose of 10^6 MSC/ kg or 200 μ l of conditioned medium was performed. To prepare the MSC, a mean of 1.2 g of adipose tissue was obtained, dissociated with type I collagenase and the mean cell count was 3.05×10^6 lymphomonuclear cells / g of adipose tissue. These cells were cultured for 21 days in DMEM-F12 Knockout medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The following three criteria were used to prove the profile of mesenchymal stem cells: plastic adherence, expression of CD90 by flow cytometry (> 90%) and differentiation capacity in three mesodermal lines. In D10, a pool of these allogeneic cells was infused intravenously into the caudal vein at a concentration of 1×10^6 cells / animal in a volume of 200 μ l of saline. In D14 or D21 the animals were euthanized and

analyzed for weight and microscopic-laboratory analyzes. Histological analyzes were performed by two different specialists in a double-blind study. The parameters of weight gain and microscopic recovery of lung tissue were analyzed in each group. **Results:** Our data show that the mesenchymal stem cells derived from the abdominal adipose tissue of Wistar rats had their phenotypic profile, plastic adhesion capacity and differentiation in 3 mesodermal lines established unequivocally, as established internationally by ISSCR. Mesenchymal stem cells and conditioned medium induced: clinical recovery after treatment; bleomycin-induced reversal of inflammation and pulmonary fibrosis; the reversal of arteriopathy in the distal pulmonary parenchyma; the reduction of fibrinogen, von Willebrand factor and PDGF concentrations (serologic markers); decreased expression of oxidizing enzymes; the reduction of endothelin expression and the modulation of the expression of the remodeling protein (IL-17), the activation of TGF- β fibroblasts and the synthesis of collagen. **Conclusion:** In this study we demonstrated that therapies with mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and conditioned medium were effective in the modulation of inflammatory and fibrogenic processes in the bleomycin-induced model, acting to modulate myofibroblastic activation and also in tissue restoration and endothelial cells. In addition, the conditioned medium proved to be as efficient as the stem cells themselves, in effective pulmonary remodeling, and should be considered as a viable and innovative therapeutic proposal.

Descriptors: stem cells; adipose tissue; experimental animal model; mesenchymal stem cell transplantation; pulmonary fibrosis.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Um grande desafio para o pneumologista é o diagnóstico das doenças pulmonares intersticiais (DPI) por apresentarem uma difícil abordagem e uma imensa variedade de patologias com quadros clínicos, aspectos radiológicos e disposição histológicas diversas, sendo importante uma adequada participação de equipe multidisciplinar em tal situação (Baldi; Castro Pereira, 2012).

A apresentação clínica semelhante entre as várias doenças intersticiais acaba retardando e dificultando o rápido diagnóstico, o que acarreta consequências tanto na escolha do melhor tratamento quanto na evolução clínica da patologia (Antó, 2001).

Além disso, o diagnóstico é frequentemente tardio devido a diversos fatores tais como a ausência de suspeita clínica precoce e a demora no encaminhamento a centros de referência, além da dificuldade de diferenciação clínica entre as doenças intersticiais e, também, da limitação para obter exames específicos como as biópsias e o exame tomográfico (Baldi; Castro Pereira, 2012).

Em geral, as doenças pulmonares intersticiais têm baixa casuística, à exceção de um pequeno grupo representado pela pneumonia intersticial não específica (PINE), a pneumonia de hipersensibilidade (PH), a sarcoidose e a fibrose pulmonar idiopática (FPI) (Thomeer *et al.*, 2001; Xaubet *et al.*, 2004).

As pesquisas envolvendo DPI se tornam necessárias, tendo em vista a falta de tratamento clínico, farmacológico ou cirúrgico realmente resolutivos. A principal opção de tratamento nos quadros avançados e terminais, o transplante pulmonar, apresenta ainda dificuldades de logística e suporte, faltando equipes treinadas e capacitadas para a segura realização dos procedimentos, além disso, existe uma baixa sobrevida dos transplantados (Baldi; Castro Pereira, 2012).

Dentre as DPI, uma das mais frequentes é a fibrose pulmonar idiopática (FPI) que, após o seu efetivo diagnóstico, apresenta baixa sobrevida média dos pacientes (Thabut *et al.*, 2009).

A Fibrose Pulmonar Idiopática é uma doença pulmonar progressiva crônica com alta morbidade e mortalidade, e nenhum tratamento efetivo para esta doença foi identificado (Noth; Martinez, 2007). Atualmente, uma das principais hipóteses é que a FPI seja desencadeada por vias pró-inflamatórias e não inflamatórias que levam à lesão epitelial crônica. Isso desencadeia a apoptose celular e uma resposta imune desregulada caracterizada pela ativação das subpopulações de linfócitos Th2 e Th17 (Marshall; Shaw, 2000; Thannickal *et al.*, 2003), responsáveis pela produção de uma gama importante de citocinas, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, interagindo com interferon γ , sendo que os linfócitos Th17 são responsáveis pela produção da IL-17, IL-22 e IL-26 fortemente relacionadas com a inflamação e a produção de colágeno.

Diante do exposto, o transplante de pulmão continua a ser a única opção para muitos pacientes e os demais tratamentos são apenas paliativos. Além disso, há uma grave deficiência de doadores de pulmão e, portanto, a maioria dos pacientes em listas de espera morre antes do transplante. Além disso, após o transplante de pulmão a mortalidade nos primeiros cinco anos de pacientes é de, aproximadamente, 50% (Seiler *et al.*, 2016). Novas opções terapêuticas são necessárias e desejadas. Neste sentido, desponta o uso de células-tronco mesenquimais (CTM) como uma oportunidade no campo da terapia celular.

As células-tronco mesenquimais estão sendo avaliadas quanto ao seu potencial terapêutico em várias doenças pulmonares, incluindo fibrose pulmonar (Ortiz *et al.*, 2003) e, em alguns casos, acredita-se que adquiram características epiteliais (Grove *et al.*, 2002). Após a lesão pulmonar, a contribuição das células-tronco para o reparo pulmonar tem sido relatada em diferentes modelos de lesão, como a lesão pulmonar induzida por Lipopolissacarídeos (Yamada *et al.*, 2004), fibrose cística (Bruscia *et al.*, 2006), pneumonite por radiação (Theise *et al.*, 2002) e fibrose pulmonar induzida por amianto (Spees *et al.*, 2007). O efetivo potencial das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e de outras fontes, para tratamento da fibrose pulmonar, tem sido explorado como alternativa, existindo a possibilidade de servirem como veículos úteis para expressar genes que podem alterar o epitélio pulmonar, independentemente da sua capacidade de se diferenciar em tipos de células pulmonares e modularem a inflamação tecidual (Augustine *et al.*; LaRocca *et al.*; De Mendonça *et al.*;

Hostettler *et al.*; El Agha *et al.*; Geiger *et al.*; Zhang *et al.*, 2017; Willis *et al.*, 2018).

Numerosos modelos animais foram desenvolvidos para estudar a fisiopatologia e a patogênese das doenças pulmonares fibróticas humanas (Moore; Hogaboam, 2008), sendo o modelo de bleomicina o mais bem caracterizado de fibrose pulmonar. O fármaco foi originalmente utilizado como agente antineoplásico, apesar de sua utilização ter sido restringida pela toxicidade pulmonar e pelo desenvolvimento de fibrose pulmonar (Moore; Hogaboam, 2008). O modelo murino que tem sido mais amplamente avaliado quanto aos efeitos protetores ou terapêuticos de células-tronco na doença pulmonar fibrótica é a administração intratraqueal de bleomicina. A fibrose pulmonar induzida por bleomicina está associada a um aumento das citocinas pró-inflamatórias clássicas, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6, seguida de mudança para marcadores pró-fibróticos (Chapman, 2004; Laurent *et al.*, 2008).

As alterações pulmonares geradas pela fibrose são baseadas na deposição de colágeno I, III e V, que se reúnem em uma única macromolécula para formar fibras heterotípicas (Birk *et al.*, 1990; Gelse *et al.*, 2003). O colágeno V é o menor componente dessas fibras e é encontrado entre as fibras de colágeno I e colágeno III. Somente sua porção amino-terminal, que regula o diâmetro das fibras heterotípicas, projeta-se para a superfície externa, contribuindo para o desenvolvimento das propriedades funcionais dos tecidos conectivos (Roulet *et al.*, 2007). O Colágeno V está presente na membrana basal das vias aéreas e paredes alveolares sintetizadas pelo músculo liso e por células endoteliais (Konomi *et al.*, 1984). A alta deposição desta proteína foi associada com reduzida capacidade vital e capacidade de difusão de monóxido de carbono, indicando que esta proteína tem um papel nos distúrbios fibróticos do tecido pulmonar (Parra *et al.*, 2009; Parra *et al.*, 2010). Mais recentemente, Fabro *et al.* (2015) relataram que a via Th17 no microambiente pulmonar periférico interage com a expressão do colágeno V na etapa tardia da fibrose pulmonar experimental, sendo a IL-17 uma glicoproteína secretada de células Th17, uma citocina pró-fibrótica relacionada recentemente à síntese de colágeno V e fibrose pulmonar.

O presente estudo utilizou um modelo em ratos de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina para investigar os efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) e seu meio condicionado no remodelamento pulmonar com objetivo de elucidar o mecanismo de ação das CTM e seu meio condicionado na fibrose pulmonar, por meio das análises de biomarcadores sorológicos, proteínas do estresse oxidativo, expressão de citocinas, pró-inflamatórias, pró-fibróticas e pró-angiogênicas, além dos colágenos I e V.

A partir de revisão de literatura atualizada dos principais artigos relacionados a esta doença nos bancos de dados do Scielo, PubMed e LILACS, além de capítulos de livros específicos do tema, com ênfase na utilização de terapia celular com células-tronco e seus benefícios na reparação e regeneração do tecido pulmonar; estabeleceu-se o embasamento teórico para a realização do experimento com o objetivo de analisar uma nova e adequada proposta terapêutica para o tratamento da Fibrose Pulmonar Idiopática.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é uma doença de acometimento pulmonar exclusivo, definida como doença intersticial fibrosante crônica, com etiologia desconhecida e padrão histológico de pneumonia intersticial usual (Raghu *et al.*, 2011). Em países europeus, é denominada como alveolite fibrosante criptogênica (Collard; King, 2003; *American Thoracic Society*, 2002).

A prevalência dessa doença é de 13/100000 no sexo feminino e 20/100000 no sexo masculino, sendo o diagnóstico realizado com uma média de 67 anos de idade, tal doença apresenta uma sobrevida média de 2 a 5 anos (Pereira *et al.*, 2006). Este tipo de fibrose acomete 5 milhões de indivíduos no mundo (Meltzer; Noble, 2008).

Alguns fatores de risco estão ligados à ocorrência da fibrose pulmonar idiopática, tais como: diabetes mellitus, refluxo gastroesofágico, infecções pelos vírus da hepatite C, citomegalovírus e Epstein-Barr, além de exposição à sílica, à poeira de rochas, à poeira de metais e ao pó de madeira (Raghu *et al.*, 2011; Taskar; Coultas, 2006).

2.1 Patogenia

A fibrose pulmonar idiopática continua com etiologia desconhecida, porém os conceitos da patogenia da doença continuam a sofrer modificações. A ideia apresentada nos primórdios de que tal doença era desencadeada por um processo inflamatório crônico subsequente a uma agressão não identificada foi descartada quando se verificou que o tratamento com anti-inflamatórios potentes não gerava resposta importante na evolução da doença (Kumar, 2010).

A teoria mais aceita atualmente indica que a fibrose pulmonar idiopática é causada por ciclos repetitivos de lesão no epitélio pulmonar provocados por um agente desconhecido, proporcionando, assim, um processo inflamatório e resposta por parte de linfócitos T helper 2 com participação de eosinófilos,

mastócitos e interleucinas, principalmente IL-4 e IL-13, conquanto a importância deste processo inflamatório permanece desconhecida (Kumar, 2010). Tal processo é um evento precoce durante o desenvolvimento da fibrose pulmonar (Kandhare *et al.*, 2015).

Recentemente, foi proposto por King (2011) que a etiopatogenia da doença apresenta um processo de ativação epitelial fibroblasto dependente e que uma resposta anômala amplificada das células epiteliais alveolares induz à liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células-tronco mesenquimais (CTM); sendo que tais citocinas induzem a formação de miofibroblastos, a proliferação de tais células residentes e a transformação dos fibroblastos em fibrócitos. Grande quantidade de proteínas da matriz extracelular e colágeno é formada por este conjunto de células secretoras e produzem um resistente processo cicatricial no tecido pulmonar, o que acaba por determinar sua deformidade arquitetural.

A proliferação fibroblástica excessiva acaba sendo gerada quando da tentativa anormal de reparação do epitélio pulmonar, tal quadro ocasiona a formação de “focos fibroblásticos”, que são característicos da fibrose pulmonar idiopática (Kumar, 2010).

Uma exata identificação de quais mecanismos propiciam este reparo epitelial anormal ainda não existe, entretanto, temos evidências de que produtos de células epiteliais trabalham como iniciadores de todo este processo, como é o caso do TGF- β . Recentemente, outros elementos foram aventados, também, como determinantes na etiopatogenia: agressões pela inalação de micropartículas, fumaça do cigarro, infecções virais de repetição e fatores epigenéticos.

A liberação de um elemento fibrogênico como o TGF- β quando da lesão das células epiteliais alveolares tipo I favorece a ativação de fibroblastos formando miofibroblastos, os quais promovem o acúmulo de inúmeras moléculas, dentre elas, temos o colágeno sobre a matriz extracelular (Kumar, 2010).

A participação genética deve ser lembrada nos casos de fibrose pulmonar familiar, que ocorre em até 5% dos casos (Steele; Brown, 2007). Nestes casos, ocorrem mutações que causam encurtamento dos telômeros, que são responsáveis pelo controle da replicação celular e, como consequência disso, as

células alveolares sofrem rápida senescência e consequente processo de apoptose (Armanios *et al.*; Tsakiri *et al.*, 2007).

Também o TGF- β causa a redução da telomerase e facilita o processo de apoptose celular, inibindo a caveolina-1, que é um inibidor endógeno de fibrose pulmonar, com isso, perpetuando o processo de reparo epitelial alveolar, que leva ao acúmulo de colágeno e à alteração arquitetural do pulmão pelo processo de fibrose (Kumar, 2010).

2.2 Morfologia

Ao analisarmos a macroscopia da superfície da pleura pulmonar, nos deparamos com o aspecto de “pedra de calçamento” propiciado pela retração das cicatrizes nos septos interlobulares. No parênquima pulmonar, aparecem, quando do corte superficial, áreas rígidas e esbranquiçadas de aspecto fibrótico com predominância em lobos inferiores e diferente distribuição nas regiões subpleurais (Singh *et al.*, 2005; Hubner *et al.*, 2008).

Na análise microscópica, observamos fibrose intersticial irregular, sendo que as lesões mais jovens apresentam excessiva proliferação fibroblástica (focos fibroblásticos). As lesões tardias apresentam menor densidade celular e são colagenosas. Conforme temos um aumento da densidade da fibrose, ocorre a destruição da arquitetura alveolar e surgimento de espaços císticos recobertos por pneumócitos tipo II, células hiperplásicas ou epitélio bronquiolar (aspecto de fibrose em “favo de mel”). Surge, ainda, processo inflamatório discreto nas áreas fibróticas, com participação de plasmócitos, neutrófilos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos (Visscher; Myers, 2006).

2.3 Quadro clínico

O quadro inicial da doença é marcado, predominantemente, por pacientes adultos com idade entre 40 a 70 anos e que apresentam tosse seca, dispneia

gradual e crescente, sendo o diagnóstico frequentemente desconhecido (Noth; Martinez, 2007).

Ao exame físico, presenciamos baqueteamento digital em 30 a 40% dos casos e estertores crepitantes em até 90% dos doentes. O tempo de sobrevida é inversamente proporcional à gravidade da dispneia no quadro inicial. Já a hipertensão pulmonar é detectada em pacientes em fase tardia da doença (Ley *et al.*, 2011).

Apesar da imprevisibilidade da progressão da doença, a maioria dos pacientes tem deterioração pulmonar gradual, independente da terapêutica medicamentosa adotada, sendo o transplante a única terapêutica definitiva no momento (Noth; Martinez, 2007).

2.4 Tratamento

O avanço na compreensão da patogenia da doença ainda não conseguiu gerar opções de tratamento eficazes para a fibrose pulmonar idiopática. Frente à grande variedade de células participantes do processo de agressão ao parênquima pulmonar, a terapia celular tem se destacado dentro da medicina regenerativa/translacional.

A terapia anti-inflamatória liderou as indicações terapêuticas por várias décadas, posteriormente, surgiram as terapias antioxidantes, antifibróticas, além das medidas paliativas e da opção de transplante pulmonar, sendo que, mais recentemente, surgiram citações quanto à utilização de terapia celular.

2.4.1 Terapia anti-inflamatória

Inicialmente, as drogas anti-inflamatórias foram amplamente utilizadas tendo em vista a hipótese original de que a inflamação era determinante na fisiopatologia da fibrose pulmonar idiopática. O acompanhamento da evolução dos pacientes, entretanto, não registrou melhora clínica ou redução nas taxas de morbidade desses, após isso, tal terapêutica passou a ser contraindicada como

tratamento exclusivo para indivíduos com fibrose pulmonar idiopática (Raghu *et al.*, 2011).

Imunossuppressores, como a ciclofosfamida e a azatioprina, chegaram a ser empregadas em associação com corticoides, porém, como não lograram êxito quanto à melhora clínica ou de função pulmonar dos pacientes, também caíram em desuso (Raghu *et al.*, 1991).

Outra terapêutica utilizada foi a implementação de terapia com altas doses de prednisolona, porém não se mostrou viável tendo em vista os efeitos secundários do tratamento, como: hipertensão, hiperglicemia, osteoporose e miopatia (Gross; Hunninghske, 2001).

2.4.2 Terapia antioxidante

O estresse oxidativo é marcado pela diminuição da capacidade antioxidante ou pelo aumento da exposição aos agentes oxidativos e, por isso, tem destaque na fibrose pulmonar idiopática, em que encontramos compostos oxidantes em grande quantidade. Os antioxidantes são substâncias protetoras dos sistemas biológicos perante os efeitos agressores das reações oxidativas do processo inflamatório (Swigris; Brown, 2006).

A glutathiona é um importante composto antioxidante e confere proteção ao pulmão de indivíduos saudáveis e se apresenta diminuído em indivíduos com fibrose pulmonar idiopática. Tal decréscimo ganha importância pelo fato do estresse oxidativo acelerar a formação de fibrose pulmonar e o próprio processo inflamatório (Selman *et al.*, 2001; Harari; Caminati, 2010).

A utilização de um precursor da glutathiona, a N-acetilcisteína, também foi realizada pela sua potente ação antioxidante (Demedts *et al.*, 2005). A ação da N-acetilcisteína, apesar de relacionada à modulação da produção das citocinas pelos macrófagos alveolares, em especial o TNF e o TGF- β , apresentou resultados pouco expressivos na FPI (Tomiooka, 2009).

2.4.3 Terapia antifibrótica

A utilização de terapêutica antifibrótica tem como objetivo controlar a fibroproliferação na fibrose pulmonar idiopática. Tal proposta gerou o desenvolvimento e a aplicação de inúmeras medicações, como a bosentana, a pirfenidona, o etanercepte e o gama-interferon (Baldi; Castro Pereira, 2012).

A bosentana como antagonista da endotelina não se mostrou eficiente no tratamento da fibrose pulmonar idiopática (King *et al.*, 2008; King *et al.*, 2011). A pirfenidona, apesar de vários estudos e de seu efeito antioxidante, antifibrótico e anti-inflamatório, apresentou resultados pouco conclusivos (Noble *et al.*, 2011).

O etanercepte teve seus resultados terapêuticos avaliados por meio das alterações de função pulmonar dos pacientes e os parâmetros indicaram não ter ocorrido qualquer melhora (Raghu *et al.*, 2008).

O gama-interferon não gerou nenhum ganho na sobrevida média dos pacientes, apesar de seu efeito na supressão da produção de fatores pró-fibróticos (King *et al.*, 2009).

2.4.4 Tratamento paliativo

A diretriz norte-americana recomenda o tratamento imediato da doença do refluxo gastroesofágico quando detectada em pacientes com fibrose pulmonar idiopática (Raghu *et al.*, 2011).

O tratamento da tosse com corticoide (Hope-Gill *et al.*, 2003), a reabilitação pulmonar com suplementação de oxigênio (Holland *et al.*, 2008), e o fornecimento de morfina e oxigênio a pacientes com dispneia mostraram uma resposta discreta e melhora passageira, sem eficácia duradoura (Allen *et al.*, 2005). Já a oxigenioterapia para doentes com hipoxemia em repouso tem, também, indicação pela diretriz norte-americana (Raghu *et al.*, 2011).

2.4.5 Transplante pulmonar

A realização do transplante pulmonar representa a única opção viável atualmente, aumentando comprovadamente a sobrevida dos pacientes (Thabut *et al.*, 2003). O transplante pulmonar surgiu em 1983 e, desde então, passou a ter indicação cirúrgica progressiva, tendo em vista que a mortalidade no primeiro ano na fila de espera do transplante chega a 40% dos pacientes. Este fato ocorre em razão da curta sobrevida dos doentes após o diagnóstico, em média, 5 anos (Bjorker *et al.*, 1998; O'Beirne *et al.*, 2010).

A indicação de transplante pulmonar pelas diretrizes utilizadas atualmente versa sobre a necessidade de imediata inclusão do paciente na lista de espera para transplante, independente do nível de avanço da doença ou do grau de comprometimento clínico (Orens *et al.*, 2006), salvo em casos que contraindiquem o procedimento, como insuficiência renal, obesidade, uso de corticoterapia em altas doses, infecção por HIV ou alguma comorbidade que impeça o ato cirúrgico (Lynch *et al.*, 2006; Kreider; Kotloff, 2009).

Os pacientes transplantados nos Estados Unidos, com fibrose pulmonar idiopática, apresentam sobrevida média de 4 anos de vida (Thabut *et al.*, 2009). No Brasil, os maiores problemas, no que tange o transplante pulmonar, são o pequeno número de equipes treinadas/aptas a realizar o procedimento e o baixo aproveitamento dos pulmões de doadores de múltiplos órgãos, pelo cuidado precário com os doadores nos hospitais brasileiros (Afonso Junior *et al.*, 2015).

2.5 Modelos experimentais

A utilização de modelos experimentais permite compreender os mecanismos das doenças fibrosantes que acometem o pulmão por meio da obtenção de informações quanto a alterações bioquímicas, morfológicas e funcionais, sendo que a possibilidade de estudo controlado e sua reprodutividade gera um melhor entendimento do processo patogênico (Gauldie; Kolb; Moore; Hogaboam, 2008).

2.5.1 Modelo animal

Existe necessidade de um modelo animal ideal para investigação de doenças, principalmente pulmonares. Todavia, as doenças pulmonares apresentam limitações quando da reprodução experimental independente do modelo utilizado, tendo em vista que, em muitas doenças, como a fibrose pulmonar idiopática, a etiologia permanece desconhecida (Moeller *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, inúmeros modelos de indução de fibrose pulmonar foram propostos, mas nenhum teve correspondência fisiopatológica com a Fibrose Pulmonar Idiopática. Contudo, pela necessidade de se compreender melhor o mecanismo de fibrose pulmonar, utiliza-se, frequentemente, o modelo de instilação de bleomicina para a indução experimental do processo de fibrose pulmonar (Moeller *et al.*, 2008).

2.5.2 Bleomicina e indução de fibrose pulmonar

O Antibiótico Bleomicina é utilizado, frequentemente, em pacientes em quimioterapia, sendo extraído como resultado do processo fermentativo do fungo “*Streptomyces verticillus*”, e seu emprego ganhou destaque no tratamento clínico oncológico de diversos sarcomas e linfomas (Da Silva; Prolla, 1995).

A implementação da bleomicina no modelo experimental residiu na percepção de que, durante o tratamento quimioterápico, 4 a 10% dos indivíduos apresentavam toxicidade à medicação e desenvolviam um processo de fibrose pulmonar subsequente (Umerazawa *et al.*, 1996).

A primeira descrição da utilização experimental da bleomicina para indução de fibrose pulmonar ocorreu em 1971 (Fleischman *et al.*, 1971). Entretanto, a utilização por instilação intratraqueal em ratos remonta o final da década de 70 (Thrall *et al.*, 1979) e proporcionou um modelo confiável, tendo em vista a possibilidade de desenvolvimento de processo de fibrose pulmonar de modo previsível e rápido (Ferreira, 1996). Além disso, os roedores são os animais preferidos para os estudos em fibrose pulmonar, devido a seu fácil manuseio, à formação de colônias e à alta sensibilidade pulmonar (Chen *et al.*, 1997).

Neste modelo, após a instilação intratraqueal de dose única de bleomicina, podemos acompanhar 3 fases diferentes da evolução: a primeira fase (etapa aguda da inflamação) se estende pelos primeiros sete dias após a aplicação por instilação e é quando acontece a migração de células inflamatórias, edema de alvéolos e interstício, além da ação de mediadores inflamatórios. Na segunda fase (etapa subaguda), que se desenvolve do sétimo ao décimo quinto dia após a instilação, nota-se uma inflamação intensa com incremento de células epiteliais cuboides com o intuito de promover a reparação do tecido agredido e percebe-se, também, a presença de fibrose pulmonar. Já na terceira fase (etapa de resolução), que corresponde ao período de décimo quinto ao trigésimo dia após a instilação, ocorre diminuição da inflamação e reepitelização alveolar, além do depósito de colágeno no tecido de granulação com a formação de fibrose pulmonar (Rossari, 2004).

A melhor data para quantificar o processo de fibrose é o 14º dia, em razão do extenso quadro de fibrose instalado e da menor variabilidade na resposta fibrótica (Özyurt *et al.*, 2004).

O uso da bleomicina induz ao aumento de expressão do fator de crescimento pró-fibrótico TGF- β , produzido por miofibroblastos e fibroblastos, e considerado indispensável na fibrogênese (Cutroneo *et al.*, 2006).

2.5.3 Mecanismos e vias da lesão

Existe, na fibrose pulmonar experimental, um comprometimento tanto epitelial quanto de capilares e do interstício septal (Costabel; King, 2001). Sendo que o mecanismo de desenvolvimento das lesões se apresenta em três etapas: na primeira, o tecido é danificado pelo agente lesivo, neste caso, a bleomicina, o que resulta em um segundo momento na inflamação das paredes alveolares e, finalmente, em uma terceira etapa, temos a instalação de processo fibrótico no interstício pulmonar. Tais etapas consecutivas geram decréscimo de distensibilidade, diminuição de volumes pulmonares e da troca gasosa, além de redução da capacidade de difusão pela barreira alvéolo-capilar mais espessada (Fabro, 2012).

As doenças pulmonares fibrosantes remodelam a arquitetura pulmonar e afetam diferentes estruturas, o que gera alterações quantitativas e qualitativas funcionais, de acordo com a via de lesão, que pode ser epitelial, vascular, imunocelular ou matriz extracelular (Fabro, 2012).

A via epitelial é marcada pela lesão das células epiteliais alveolares, que apresenta uma difícil restauração adequada e acaba por comprometer a integridade do parênquima alveolar (Selman; Pardo, 2006). A resposta pró-fibrótica gerada pela ativação das células alveolares epiteliais é marcada pela liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento transformador (TGF- β), fator de necrose tumoral (TNF- α), endotelina-1, osteoponina e interleucinas (IL-4, IL-13), que podem contribuir decisivamente no surgimento de processo fibrosante e na formação de cicatriz fibrótica irreversível com perda de função pulmonar (Atamas; White, 2003; Selman; Pardo, 2006; Murray *et al.*, 2008).

A via vascular merece destaque, tendo em vista que a lesão de células endoteliais pode ativar a resposta inflamatória, contribuindo para o processo fibrosante pela indução da proliferação de fibroblastos, tal remodelamento vascular é perfeitamente observado em modelos de fibrose pulmonar induzidos pela bleomicina (Hamada *et al.*, 2005). Nesta via de lesão, devemos destacar a ocorrência de um desequilíbrio na produção de oxidantes e antioxidantes, em especial, um aumento de produção de oxidantes, que gera um acréscimo na expressão de NOS (nitric oxide synthase) nas células endoteliais (Saleh *et al.*, 1997).

Um ponto crucial na fibrogênese pulmonar é a descontrolada e excessiva deposição de proteínas da matriz extracelular (Fukuda *et al.*, 1995), sobretudo dos colágenos I, III e V (Fabro, 2012).

O colágeno V participa ativamente nos processos de proliferação e reparação tecidual, tendo papel fundamental na interação dos componentes da matriz extracelular e entre os colágenos I, III e IV no interstício do pulmão (Aumailley; Timpl, 1986; Adachi, 1997). Nesta via de lesão, a digestão da matriz extracelular pode liberar fatores de crescimento presentes no microambiente, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além disso, algumas citocinas, como TGF- β , fator de crescimento de plaquetas (PDGF), endotelina-

1, IL4 e IL6 ganham destaque por regularem a proliferação de fibroblastos e o depósito de matriz extracelular (Lokeshwar; Selzer, 2000; Silvera *et al.*, 1994).

Na via Imunocelular, percebemos que o processo inflamatório crônico, no qual existe predomínio de linfócitos, nem sempre garante persistência da inflamação e este fato se deve, principalmente, ao desenvolvimento de resposta celular mediada por TH2 (Wynn, 2008; Fernandez; Eickelberg, 2012).

Além disso, em estudo recente, o mecanismo paralelo que envolve TH17 e a secreção por estas de IL-17 mostrou-se relacionado com a síntese de colágeno I e V, e, conseqüentemente, com a perpetuação do processo de fibrose pulmonar, sendo tal mecanismo de atividade paralela ou subjacente a TH2, ainda alvo de estudo (Fabro, 2012).

2.5.4 Células-tronco e terapia celular

Segundo Bogliolo (2012), as células-tronco são células dotadas de autorrenovação e com capacidade de diferenciação em, pelo menos, três linhagens celulares diferentes oriundas de um mesmo folheto embrionário.

Sendo células progenitoras pluripotentes, as células-tronco embrionárias possuem a capacidade de gerar células das 3 camadas germinativas. Tais células necessitam de fatores de transcrição que promovem a regulação de uma rede de genes que controlam sua manutenção e proliferação (Mitsui *et al.*, 2003).

Com a descoberta de que a terapia utilizando células-tronco embrionárias poderia gerar teratomas e linfomas, pesquisas foram estabelecidas para induzir células-tronco adultas, que apresentam comportamento semelhante às embrionárias, porém sem os riscos da utilização destas últimas. O emprego de terapia com células-tronco pluripotentes induzidas tem inúmeras vantagens quando comparadas às células-tronco embrionárias, sendo a principal o fato das primeiras serem derivadas do próprio paciente e, por isso, terem uma menor rejeição imunológica quando comparadas a aloenxertos ou xenoenxertos de células-tronco embrionárias (Kim *et al.*, 2010; Bar-Nur *et al.*, 2011).

Do ponto de vista ético, é mais aceitável a obtenção de precursores de células-tronco pluripotentes induzidas a partir de células do próprio paciente em

comparação às oriundas de células embrionárias. Além disso, é importante o fato das células-tronco pluripotentes induzidas possuírem a predisposição de diferenciação no seu próprio tipo celular de origem, fato esse impossível quando trabalhamos com células-tronco embrionárias (Kim *et al.*, 2010; Bar-Nur *et al.*, 2011).

Neste contexto, um grande número de trabalhos foi confeccionado com o objetivo de verificar a eficácia e segurança da terapia com os variados tipos de células-tronco, entre elas, as células-tronco mesenquimais (Gonçalves, 2015; Lim *et al.*; Abreu *et al.*; Xiang *et al.*; Lan *et al.*; Reddy, *et al.*, 2017).

Já em meados dos anos 50, as células-tronco hematopoiéticas passaram a ser usadas em experimentos terapêuticos e tratamentos de doenças, como as leucemias e o mieloma múltiplo (Thomas *et al.*, 1957; Fernand *et al.*, 1995).

As células-tronco hematopoiéticas também foram testadas em doenças de depósito metabólico, como a síndrome de Hurler e melhoraram os índices de sobrevivência dos doentes (Wynn *et al.*, 2009). As aplicabilidades das células-tronco hematopoiéticas foram ainda descritas em áreas da dermatologia, cardiologia, cirurgia vascular e infectologia, sendo que, neste último caso, um transplante de medula óssea resultou na cura de um paciente HIV positivo e renovou o interesse da busca de tratamento eficaz para esta epidemia (Cohen, 2011).

O primeiro sucesso com a utilização de células-tronco adultas foi com mesenquimais derivadas de medula óssea em pesquisas de terapia regenerativa para obtenção de células ósseas e de cartilagem (Caplan, 1991). Desde então, outras fontes de obtenção de células-tronco têm sido utilizadas (Fikry *et al.*, 2015; Xiang *et al.*; Zhang *et al.*, 2017).

A utilização de tecido adiposo para obtenção de células progenitoras tem se destacado na medicina regenerativa na última década (Gimble *et al.*, 2010). A escolha do tecido adiposo para a retirada da fração vascular estromal e células-tronco foi descrita inicialmente por Zuk (2002) e levou em conta algumas condições, como a fácil obtenção, a ausência de problemas éticos e a mínima expressão de antígenos de histocompatibilidade classe II. Além disso, as células de tal tecido são imunomoduladoras, crescem facilmente em meio de cultura e apresentam poucas alterações cromossômicas (Gimble *et al.*, 2010).

Um elemento importante no uso de células-tronco mesenquimais quando comparadas com as células-tronco embrionárias, e mesmo com as induzidas, reside no fato de que o emprego das primeiras descarta a formação de teratomas (Knoepfler, 2009).

A obtenção de células-tronco mesenquimais pode ocorrer a partir de tecido adiposo, sangue periférico, tecido muscular e material do cordão umbilical (Zhang *et al.*, 2012). O tecido adiposo é fornecedor importante de células mesenquimais, amplamente usadas na regeneração de cartilagens e estruturas ósseas em humanos (Pak, 2011).

A fácil extração por lipoaspiração de células mesenquimais de tecido adiposo torna seu uso bastante viável (Schreml *et al.*, 2009). Além do papel regenerativo em ossos e cartilagem, estudos indicam segurança e eficácia terapêutica na utilização em pacientes com esclerose múltipla, transplante renal e diabetes, entre outras doenças (Siatskas *et al.*, 2010).

Já em 2001, tivemos um marco da terapia celular aplicada ao tecido pulmonar quando se evidenciou que a infusão de células-tronco hematopoiéticas adultas repopoa em até 20% o parênquima pulmonar (Krause *et al.*, 2001).

2.5.5 Diferentes tipos de colágeno

O colágeno é a maior família de proteínas insolúveis, de fundamental importância na constituição da matriz extracelular, sendo o responsável por várias das propriedades físicas teciduais, sua organização em macromoléculas determina as características biomecânicas dos tecidos. Participando da adesão, diferenciação, migração e proliferação celular, exerce, ainda, atividade antigênica de acordo com o órgão envolvido (Gelse *et al.*, 2003).

Em vertebrados, já foram descritos 28 tipos de colágeno (Ricard-Blum, 2011), sendo que as moléculas desta glicoproteína são formadas por 3 cadeias polipeptídicas entrelaçadas, denominadas cadeias alfas e arranjadas em tripla hélice estabilizada por pontes de hidrogênio (D'Arcangelo *et al.*, 1994), mas, fundamentalmente, as subfamílias de colágeno tipo I, II e III correspondem a 80% de todo colágeno do organismo (Ricard-Blum, 2011).

Conforme descrito por Achilleas (2016) com base na estrutura supramolecular, os colágenos podem ser divididos em fibrilares (tripla hélice ininterrupta); os formadores de rede; os associados a fibrilas com tripla hélice interrompida; os associados à membrana com tripla hélice interrompida; os com fibrilas de ancoragem; os com filamentos bandeados e os Multiplexins, conforme descrito no quadro a seguir:

Quadro 1 - Características das subfamílias de colágeno correlacionado com o respectivo tipo

Subfamílias de Colágeno	Tipos
Fibrilares (tripla hélice ininterrupta)	I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII
Formadores de rede	IV, VIII, X
Associados a fibrilas com tripla hélice interrompida (FACITs)	IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII
Associados à membrana com tripla hélice interrompida (MACITs)	XIII, XVII, XXIII, XXV
Fibrilas de ancoragem	VII
Filamentos bandeados	VI, XXVI, XXVIII
Multiplexins	XV, XVIII

Na fibrose pulmonar idiopática, os tipos de colágeno com maior relevância são I, III, IV e V (Saldiva; Carvalho, 1985).

O colágeno I representa 90% do colágeno total dos mamíferos e é sintetizado por odontoblastos, osteoblastos e fibroblastos, sendo composto por uma cadeia alfa-2 e duas alfa-1, organizada em feixes grossos, o que gera resistência às estruturas (Calvi *et al.*, 2012).

O colágeno III é composto a partir de três cadeias alfa-1, sintetizado por células reticulares e fibroblastos, formando fibras mais finas e curtas, em geral, em associação com colágeno I. Está presente em tecidos com certa elasticidade, como músculos, pele e ligamentos (Calvi *et al.*, 2012).

O colágeno IV é abundante na estrutura da membrana basal, gerando sua força mecânica. Consiste de moléculas não organizadas em fibrilas, mas sim anexadas de ponta a ponta em formação em rede. É encontrado associado a vários componentes não fibrosos da matriz extracelular, formando uma membrana contínua que separa alguns tecidos. Tal tipo de colágeno é produzido

por células musculares, células epiteliais e células endoteliais de capilares sanguíneos (Calvi *et al.*, 2012).

O colágeno V é responsável por regular o diâmetro das fibras colágenas e desempenha papel fundamental em reparos teciduais e na proliferação celular, apesar de representar apenas 2 a 5% do total das fibras de colágeno. Sua presença na membrana basal de vasos e em certos tecidos mesenquimais é de valorosa importância para a ligação do colágeno IV da membrana basal com o tecido conjuntivo dos órgãos. Além disso, participa ativamente da interação entre componentes da matriz extracelular e de outros tipos de colágeno, como o I e o III (Oliveira *et al.*, 2006).

Este tipo de colágeno representa entre todos os tipos de colágeno, o que tem maior imunogenicidade e o torna fundamental em processos patológicos associados à autoimunidade como rejeição a transplante pulmonar, à aterosclerose, à asma por hipersensibilidade e à fibrose pulmonar idiopática (Atayde, 2016).

Assim, ficam evidentes as múltiplas funções dos tipos de colágeno e sua importância no processo de fibrose pulmonar, de acordo com suas configurações e associações, sendo necessário investigar as mudanças em suas quantidades relativas e na distribuição tecidual.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Utilizar um modelo em ratos de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina para investigar os efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) e seu meio condicionado no remodelamento pulmonar com objetivo de elucidar o mecanismo de ação das CTM e seu meio condicionado, na reversão da fibrose pulmonar.

3.2 Específicos

- a) Padronizar a cultura de células-tronco mesenquimais e seu meio de cultura;
- b) Caracterizar o modelo experimental de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina por microscopia óptica antes e após o tratamento com CTM e seu meio de cultura;
- c) Avaliar a expressão de biomarcadores sorológicos (Fibrinogênio, Fator von Willebrand e PDGF);
- d) Quantificar a expressão de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo (NOS), citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas (IL-17 e TGF- β), e pró-angiogênicas (VEGF e endotelina) por imunohistoquímica;
- e) Quantificar a deposição de fibras do colágeno I e V por imunofluorescência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para o presente estudo, foram utilizados 44 ratos machos Wistar com 8 semanas de idade, pesando entre 250-300g, oriundos do Centro Multidisciplinar de Pesquisas Biológicas da Unicamp. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno revestidas com serragem estéril, e sistema de ventilação filtrada em salas com temperatura e luminosidade controladas (22°C e 12h- luz e 12h- escuro, respectivamente). Durante o período experimental, os ratos receberam dieta sólida e água suplementada ad libitum.

4.2 Desenho experimental

Os animais foram distribuídos em 4 grupos de 10 animais e + 4 animais para obtenção de gordura abdominal para síntese de células-tronco mesenquimais, tais animais foram mantidos sob controle estrito do bioterista e do veterinário responsável da Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu, conforme descrito abaixo:

- a) G1: Salina-salina = animais do grupo-controle: Animais instilados com solução salina endotraqueal no primeiro dia da experiência (D0) e tratados com solução salina infundida em veia caudal no décimo dia da experiência (D10);
- b) G2: Bleo-Salina = controle da fibrose: Animais instilados com bleomicina (BLM) endotraqueal em D0 e tratados com solução salina infundida em veia caudal em D10;

- c) G3: Bleo-MSc = grupo de estudo de células-tronco: Animais instilados com BLM endotraqueal em D0 e tratados com células-tronco mesenquimais obtidas a partir de tecido adiposo (MSC) infundidas em veia caudal em D10;
- d) G4: Bleo-CM = Grupo de estudo do efeito parácrino: Animais instilados com BLM endotraqueal em D0 e tratados com meio de cultura onde as células-tronco mesenquimais foram cultivadas a partir de tecido adiposo (CM) infundido em veia caudal em D10.

Estes grupos e etapas estão resumidos no Quadro 2, a seguir:

Quadro 2 – Desenho experimental do estudo

	Dia da Instilação	Solução Instilada	Dia da Infusão	Solução Infundida	Dia do Sacrifício (5 animais)	Dia do Sacrifício (5 animais)
G1: Salina-salina (CTR)	0	Solução salina	10	Solução salina	14	21
G2: Bleo-Salina (BLM)	0	Bleomicina	10	Solução salina	14	21
G3: Bleo-MSc (MSC)	0	Bleomicina	10	Células- tronco mesenquimais	14	21
G4: Bleo Meio (CM)	0	Bleomicina	10	Meio condicionado	14	21

A justificativa para o pequeno número de animais em cada grupo está relacionada à adesão de nossa pesquisa a uma recomendação de norma internacional adotada a partir de Guideline da *International Society for Stem Cell Research* (Kimmelman *et al.*, 2016) sobre o bem-estar animal. Tal normatização considera que a pesquisa pré-clínica com terapias baseadas em células-tronco faz uso intenso de modelos animais, a partir daí, orienta que os pesquisadores devem aderir ao princípio dos três “Rs” (*Reduce Numbers, Refine Protocols and Replace Animals*): reduzir números, refinar protocolos e substituir animais com plataformas experimentais *in vitro* ou não animais, quando possível. Esta

recomendação, entretanto, não é incompatível com realização de experimentos de replicação ou poder estatístico adequado. Na verdade, estes são os principais passos para assegurar que as experiências com animais obtenham conclusões robustas, com adequada amostragem. Esta recomendação também não deve ser interpretada como sugestão que experimentos *in vitro* ou por plataformas não animal sejam suficientes para apoiar investigações clínicas.

4.3 Aprovação do comitê de ética

O estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, sob Protocolo nº 530/13, de 02.06.2014.

4.4 Indução experimental da fibrose pulmonar

Para indução de fibrose pulmonar em ratos, utilizou-se o modelo experimental proposto por Punithavathi, 2000.

Os animais foram sedados com xilazina (0,5 ml/kg) e ketamina (1 ml/kg), seguida de antissepsia e tricotomia dos pelos do pescoço, numa extensão de 2-3 cm na pele para visualização e exposição da traqueia, em seguida, foi realizada a canulação da traqueia com *angiocath* 22 BD® (0,9x25mm) por meio da qual se instilou bleomicina numa dose de 1,5 U (0,3 mg / kg) + 0,2 ml de solução salina ou solução salina pura, dependendo do grupo experimental.

Após a instilação, o cateter foi removido e suturada a pele dos animais com fio reabsorvível. Os animais foram colocados, em seguida, em gaiolas nas quais receberam analgésicos e outros cuidados necessários.

4.5 Obtenção, processamento e caracterização de células-tronco mesenquimais

Levando em consideração as características das células-tronco mesenquimais alogênicas de tecido adiposo e do seu meio condicionado, como descrito pela literatura (Bertanha *et al.*, 2013), como o bom desempenho e fácil amplificação em cultura; a baixa expressão de antígenos HLA tipo II e a sua capacidade imunomoduladora, optamos, neste experimento, pelo uso de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo.

O tecido adiposo emergiu, nos últimos 5 anos, como uma fonte promissora de células-tronco mesenquimais para terapia celular. O local de coleta do tecido adiposo foi definido com base nos resultados preliminares do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu, que demonstrou que as células-tronco obtidas a partir da gordura do abdome apresentavam uma curva de crescimento superior às obtidas em outras partes do corpo animal (Freitas *et al.*, 2015).

Para a obtenção de tecido adiposo abdominal, foram utilizados quatro animais machos Wistar, com o mesmo peso e idade, mas não pertencentes a nenhum dos quatro grupos de trabalho. Após anestesia intraperitoneal dos animais com 30 mg/kg de tiopental de sódio a 2,5%, eles foram colocados em fluxo laminar com filtro Hepa para remover o fragmento de tecido adiposo. Foi realizada antissepsia da pele numa área de 2-3 cm em abdome, com identificação e remoção de fragmentos com peso médio de 1,2 g por animal.

O fragmento de tecido adiposo foi lavado abundantemente com solução salina a 0,9% (100-200ml) e, depois, colocado num tubo cônico estéril contendo meio de transporte HEPES com antibióticos. O material foi embalado em caixa de isopor e transportado para o Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu. Após a recepção do material, o tecido sofreu lavagem em tampão PBS e foi submetido à incubação com Colagenase tipo I Invitrogen® durante 12 horas em repouso em estufa a 37°C.

A ação enzimática foi bloqueada com a adição de soro fetal bovino (SFB) durante 5 minutos. O conjunto foi transferido para tubo Falcon de 15 ml. O material foi centrifugado durante 10 minutos, o sobrenadante foi aspirado, o

sedimento foi redissolvido em PBS e centrifugado a 1200 rpm durante 10 min para remoção completa da enzima.

Em câmara de Neubauer, a viabilidade e a contagem de células foram determinadas pela exclusão do corante azul de tripan. Uma alíquota das células foi encaminhada para caracterização por citometria de fluxo utilizando os marcadores: CD44, CD90, CD73, CD105 (marcadores positivos) e CD11b, CD45 e CD31 (marcadores negativos). As células foram colocadas em placas em frascos T de 25 cm² mantendo-as em meio seletivo Mesencult Invitrogen® e em observação microscópica utilizando o microscópio invertido Axiovert 200, Zeiss®. A cultura foi mantida sob condições específicas de incubadora de CO₂, com jaqueta de água a 37 °C, Thermo®. Após, aproximadamente, 4 dias, tivemos o estabelecimento de colônias de células fibroblastoides aderentes, sendo o meio de cultura DMEM Knockout Invitrogen® (5 ml) trocado a cada dois dias.

Depois de observar a confluência celular, as células foram, novamente, submetidas a processamento enzimático para desprendimento da placa de cultura e nova alíquota foi processada por citometria de fluxo utilizando os marcadores mencionados. A análise foi realizada no citômetro de fluxo FACS Calibur BD® por meio da leitura no *Software Cell Quest Pro*®. É importante notar que as células-tronco mesenquimais plaqueadas foram amplificadas até a 4ª passagem para se obter o número adequado de células para o experimento, sendo as mesmas armazenadas congeladas em nitrogênio líquido. No momento da utilização, o descongelamento e o agrupamento das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo foram realizados para subsequente infusão intravenosa (veia caudal) nos animais.

4.6 Padronização das células-tronco mesenquimais

O peso médio de tecido adiposo removido foi 1,2 g e, após dissociação com o uso de collagenase tipo I, a contagem celular média foi de $3,05 \times 10^6$ células/g de tecido adiposo, quantidade considerada suficiente para as necessidades do experimento, tendo em vista as fases subsequentes de amplificação em cultura.

As células plaqueadas foram expandidas até a quarta passagem em meio de Knockout DMEM, mantidas sob condições de cultura estéreis.

Para confirmar o padrão das células-tronco mesenquimais obtidas a partir do tecido adiposo, foi seguida a orientação da *International Society for Stem Cell Research* (ISSCR). O ISSCR destaca 4 métodos para a caracterização de células-tronco mesenquimais, sendo, pelo menos, 3 necessários para confirmar o perfil das células. Os 4 critérios são: 1) adesão ao plástico e formação de colônias de fibroblastos; 2) análise do perfil celular por citometria de fluxo usando marcadores positivos e negativos; 3) diferenciação em 3 linhagens teciduais de origem mesodermal (condrogênica, osteogênica e adipogênica); e 4) análise da expressão gênica por biologia molecular. Neste protocolo, foram utilizados os 3 primeiros critérios, seguindo os procedimentos operacionais de padronização do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu, baseados nos padrões atuais adotados no Guideline do ISSCR (2016).

4.7 Infusão das células-tronco ou de meio condicionado

Para entender melhor como as células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo modulam a fibrose pulmonar e qual o papel do meio condicionado obtido a partir da cultura de células-tronco mesenquimais entre a terceira e a quarta passagem, optamos por explicar tais situações separadamente. Depois de se plaquear 1×10^5 células na presença de meio de Knockout DMEM, aguardamos que a cultura alcance 100% de confluência, sem troca de meio de cultura. O sobrenadante da cultura (meio condicionado) foi removido esterilizado e congelado a -80°C no volume de infusão (200 μl), e uma alíquota foi utilizada para medir os fatores de crescimento. As células-tronco mesenquimais foram tripsinizadas e congeladas em nitrogênio líquido à concentração de $1,5 \times 10^6$ células até ao momento da utilização. Seis horas antes do uso, as células foram descongeladas, quantificadas e a viabilidade determinada. Depois disso, analisou-se o conjunto de células e ajustou-se a concentração para infusão em 1×10^6 células viáveis, diluídas em solução salina 200 μl . Injeções intravenosas foram administradas na veia caudal em todos os animais do estudo experimental:

G1 (controle) e G2 (Bleomicina) receberam injeções com solução salina a 0,9%, o que só serviu para simular o mesmo estresse dos grupos de animais tratados com células-tronco mesenquimais (Grupo 3) e meio condicionado (grupo 4). O volume infundido nos animais dos grupos 1 e 2 foi de 0,2 ml de solução salina a 0,9% e, no grupo 3, a quantidade de 1×10^6 células foi diluída em 0,2 ml de solução salina a 0,9%, o grupo 4 recebeu 500 µl de meio condicionado diluído em 0,2 ml de solução salina a 0,9%. Depois de receber as injeções, os animais foram devolvidos às caixas e retornados ao seu alojamento no biotério, em que foram acompanhados pelo bioterista quanto a possíveis alterações clínicas.

4.8 Biomarcadores séricos

As plaquetas contêm grânulos considerados reservatórios biológicos de fatores de crescimento, os quais são muito importantes na angiogênese, cicatrização e regeneração tecidual.

As concentrações séricas destes fatores de crescimento foram medidas em duplicata utilizando o kit comercial *Luminex/MagPix Milliplex, MAGNETIC BEAD (Millipore,EUA)/Millipore High-Sensitivity Milliplex Assay*, sendo um sistema de detecção com curvas próprias de calibração no equipamento MagPix™, a alta sensibilidade do teste, muito superior aos clássicos testes de imunoenensaio enzimático, são capazes de detectar concentrações menores que 0,13pg/dl. Foram analisados os sobrenadantes de cultura das células-tronco mesenquimais e amostra de soro de animais dos grupos-controle e tratados, por meio do sistema de dados multiplex. A análise dos dados foi realizada com *software* integrado ao equipamento MILLIPLEX® Analyst 5.1, que permite a aquisição e análise de dados perfeitamente integrados com MAGPIX®. Este *software* possui algoritmo de ajuste de curva bastante avançado usando conjuntos de dados de amostras reais, além do controle interno do kit. Os biomarcadores (fatores de crescimento) presentes no Kit Luminex® - Millipore® utilizado em nossa pesquisa foram: Fibrinogênio, Fator von Willebrand, PDGF-AA e RANTES, sendo estes já padronizados e utilizados em nosso laboratório de Engenharia celular na UNESP (Vanni, 2016).

Quadro 3 – Descrição do biomarcador utilizado e sua respectiva função, segundo Vanni (2016)

Fator de crescimento (Biomarcador)	Função desempenhada
Fibrinogênio	Atua diretamente na ativação da fibrina no local da lesão
Fator de von Willebrand	Atua na ativação plaquetária a fim de aderir as plaquetas à parede do vaso, formando o tampão plaquetário
PDGF	Induz a migração celular no local da lesão (Quimiotaxia)
RANTES	Desempenha papel de recrutamento de leucócitos para o local da inflamação

4.9 Microscopia óptica

Após o 14º ou 21º dias do experimento, os animais foram eutanasiados com Ketamina (10mg/kg) intraperitoneal, sendo, em seguida, realizadas uma toracotomia de linha média e canulação da traqueia; os pulmões foram fixados por instilação de formalina a 10% tamponada, a uma pressão de 18-22 cm H₂O. A traqueia foi, então, ligada e os pulmões, separados do coração, foram imersos em solução tamponada de formalina (10%) durante 6 horas. O pulmão esquerdo foi seccionado perpendicularmente à base pulmonar (eixo apico-basal) originando 2 segmentos, um contendo o lobo superior e outro contendo a língua e o lobo inferior. A seguir, foram seccionados em cortes 1 x 0.5 cm desidratados por concentrações crescentes de álcool, diafanizados pelo xilol e incluídos em parafina. Lâminas contendo cortes de 5µm foram corados pela hematoxilina-eosina (H & E) e tricrômio de Masson+Verhöff, e silanizadas para realização da Imuno-histoquímica e imunofluorescência.

4.10 Imuno-histoquímica

A expressão proteica das enzimas oxidantes, citocinas pró-inflamatórias, pró-fibróticas e pró-angiogênicas foi determinada por Imuno-histoquímica. Os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados e as lâminas foram incubadas com citrato de sódio. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3%. As lamelas foram lavadas em PBS com Tween-20 a 0,05% (Sigma, St. Louis, MO), bloqueadas com bloco de proteína livre de soro (Dako, Carpinteria, CA) e imunocoradas com EasyLink One, Immunobioscience Corp. EUA e ImmPRESS, Reagente, Vector Laboratories, Inc., Burlingame. Após padronização das diluições, os seguintes anticorpos foram utilizados: CA Anticorpo para NOS1 (Sc-1025), NOS2 (sc-651), NOS3 (sc-654) (Santa Cruz, diluição 1: 1000); TGF- β 1 (Sc-146) (Santa Cruz, diluição 1: 500); VEGF (sc-152) (Santa Cruz, diluição 1: 100); Endotelina-1 (Sc-21625) (diluição de Santa Cruz 1: 100) e IL-17 (sc-7927) (Santa Cruz, diluição 1: 100) e incubadas durante a noite a 4°C. Utilizou-se, ainda, uma imunoglobulina G do isotipo (IgG) como controle negativo.

No caso das NOS, foram analisados os 3 anticorpos em razão das diferentes atuações dessas no processo inflamatório: NOS1 (nNOS) – atua como elemento de sinalização, atuando como fator crítico para a iniciação da inflamação sistêmica, além de poder influenciar a produção de NOS2. Já a NOS2 (iNOS) é associada à resposta proliferativa dos miofibroblastos após estímulos de citocinas, além disso, é, também, produzida por fibroblastos em condições de lesão pulmonar. A NOS3 (eNOS) é expressa pelos pneumócitos e relaciona-se com a regulação da hipóxia, além disso, é essencial para expressar NOS2 em condições inflamatórias (Liu *et al.*, 2005; Duma *et al.*, 2011; Filipczak *et al.*, 2015).

4.11 Imunofluorescência

A expressão proteica do colágeno I e V foi realizada por imunofluorescência. As secções de parafina foram lavadas em xileno e desidratadas em etanol graduado. A recuperação do antígeno foi realizada por

tratamento enzimático de pulmões com pepsina bovina (10000 UTD) (*Sigma Chemical Co*). Em tampão de ácido acético (pH = 2,2) (4 mg/ml), durante 30 minutos a 37° C e, subsequentemente, foi realizada incubação com 5% Leite em PBS. As lâminas foram, então, incubadas de um dia para o outro, a 4° C com anticorpo policlonal de rato para colágeno V (1: 2000) e colágeno I (1: 1000), obtido a partir de placenta humana. Para os controles negativos, as secções foram incubadas com soro fetal bovino ao invés do anticorpo primário. Finalmente, as secções foram incubadas com uma imunoglobulina de cabra antirrato e anticoelho conjugada com FITC (*Sigma Chemical Co*TM, Saint Louis, MO, EUA, diluição 1:50) como um anticorpo secundário e montada com um meio de montagem aquoso.

4.12 Morfometria

Para avaliação das células imunocoradas para NOS1, NOS2, NOS3, TGF- β 1, VEGF, Endotelina-1 e IL-17; os cortes histológicos do pulmão foram analisados com aumento de 400X utilizando a técnica do “point-counting” padronizada em nosso laboratório (Parra *et al.*, 2006; Fabro *et al.*, 2012). Um retículo de 100 pontos e 50 retas foi acoplado à ocular do microscópio. Procedeu-se, então, à contagem do número de pontos que incidiram sobre as células positivas dentro do campo do retículo e o número de pontos que coincidiram com a área do tecido presente no mesmo campo do retículo. Essa avaliação foi realizada em 10 campos não coincidentes no parênquima pulmonar. Os resultados foram expressos células positivas por unidade de área ($10^3 \mu\text{m}^2$).

A avaliação das fibras do colágeno coradas por tricrômio Masson+Verhoef e imunofluorescência foi realizada por análise digital por meio da densidade óptica. As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio de fluorescência OLYMPUS e uma câmera digital (OLYMPUS) conectados a um computador e ampliadas 400X. Dez campos de parênquima pulmonar foram fotografados. O *software* ImageProPlus informa um limiar de tons de cores que representam as áreas positivas de modo a permitir a quantificação da área pré-determinada. Foi definido um limiar de cor azul e verde birrefringente para o cálculo das fibras do

colágeno respectivamente coradas pelo Masson+Verhoeff e imunofluorescência no parênquima pulmonar. Assim, a fração de volume das fibras do colágeno no parênquima pulmonar foi determinada. Os resultados foram expressos em porcentagem de área positiva (fração de volume).

4.13 Análise estatística

As amostras obtidas a partir da análise quantitativa foram expressas como média $\pm$ desvio padrão (DP) e foram avaliadas de acordo com a distribuição das alterações morfológicas dos animais do experimento e também dos controles. A análise descritiva foi demonstrada pelo teste ANOVA, que foi aplicado para verificar as diferenças entre os grupos. Quando necessário, o teste de Turkey aplicado foi utilizado para identificar as diferenças entre as medidas. Quando $p < 0,05$, os resultados foram considerados indicativos de significância estatística.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização e validação das células-tronco mesenquimais

Quatro animais foram utilizados para a remoção de fragmentos de tecido adiposo abdominal, a gordura retirada era relativamente homogênea e com peso médio de 1,2 g por fragmento coletado. Após dissociação com a collagenase tipo I, realizou-se a contagem celular e o número médio de células obtido foi de $3,05 \times 10^6$ (Tabela 1), com uma viabilidade média de 89,93%. As células foram colocadas em placas em frascos T aderentes na presença de meio DMEM-Knockout com 10% de soro bovino fetal para amplificação das células-tronco mesenquimais. Estas, com a capacidade de adesão ao plástico, começaram a assumir um aspecto fibroblastoide típico, como pode ser visto na Figura 1 em **A**. Na mesma figura em **B**, observa-se a confluência das células com aparência típica, sendo configurada a verificação do primeiro critério determinado pela ISSCR.

Tabela 1 -Peso em gramas de tecido adiposo, número total de células após dissociação por collagenase tipo 1 e viabilidade celular

Animal	Peso da gordura (g)	Total de células (Amostra x 10^6)	Viabilidade (%)
01	1,16	2,8	93,33
02	1,1	2,8	88,89
03	1,55	4	90,9
04	1	2,6	86,6
Média	1,20	3,05	89,93

Figura 1 - **A** = Início da adesão plástica, presença de células fibroblastoides no 7º dia de cultura (ampliação 20x). **B** = presença de colônias fibroblastoides de células aderentes com confluência a 70% no 14º dia de cultura (ampliação 10x).

Após atingir confluência superior a 90%, as células foram expandidas para superfícies maiores até a 4ª passagem, quando seu perfil fenotípico foi estabelecido com diferentes marcadores por citometria de fluxo.

Figura 2 - Análise do perfil fenotípico de CTM-TA, 3ª passagem. **a** = gráfico de dispersão e *gating* das CTM; **b** = controle negativo; **c** = CD71-FITC positivo fraco; **d** = CD106 PE positivo; **e** = controle isotópico, negativo; **f** = CD40 PE positivo; **g** = CD45 PE negativo.

Figura 3 - Análise do perfil fenotípico de CTM-TA, 3ª passagem. h= CD40 FITC positivo; i=CD45PE negativo; j= CD90-PERCP positivo; k = CD11b APC negativo; l= CD44 FITC negativo; m= CD31PE positivo fraco.

Dos oito marcadores utilizados para imunofenotipagem, naqueles negativos (CD11b-APC, CD44-FITC e CD45-PE), a média da intensidade de fluorescência (MIF) foi inferior a 2%, enquanto que, para outros dois, CD71-FITC e CD 31 PE, as médias foram de 12,44 e 15,7%, respectivamente, considerados positivos fracos. Para os marcadores CD40-FITC, CD 90-PERCP e CD 106 PE, as MIF são muito superiores, de acordo com o esperado (Ramos *et al.*, 2016).

Após a caracterização por citometria de fluxo (2º critério), o terceiro indicador de verificação MSC foi estabelecido seguindo os critérios ISSCR: a diferenciação.

As Figuras de 4 a 7 indicam aspectos da cultura celular e desempenho de diferenciação. Ressalta-se, na Figura 4, a adesão ao plástico, citoplasma abundante e fibrilar, na Figura 5, nota-se a exuberância da diferenciação

adipogênica. Na Figura 6, observamos a diferenciação osteogênica corada por Alizarin Red e, na Figura 7, temos a diferenciação condrogênica, corada por azul de toluidina.

Figura 4 - Fotomicrografias de cultura de CTM no 21º dia sem diferenciação. Microscopia invertida por contraste de fase (ampliação de 40X). Colônia de células de fibroblastos em aderência ao plástico.

Figura 5 - Fotomicrografias da cultura CTM no 21º dia de diferenciação adipogênica. Microscopia de contraste de fase invertida (ampliação 20X). A = Adipócitos com grande quantidade de lipídios no interior. Fibroblastos e células epitelioides também podem observados.

Figura 6 - Fotomicrografias de cultura de CTM no 21º dia de diferenciação osteogênica corada com Alizarin Red (ampliação 20X). A coloração vermelha identifica as deposições de cálcio das trabéculas ósseas.

Figura 7 - Fotomicrografias da cultura de CTM no 21º dia de diferenciação condrogênica. Microscopia de contraste de fase invertida (ampliação 20X). Coloração de azul de toluidina.

Tendo confirmado o perfil fenotípico, a capacidade de adesão plástica e a diferenciação em 3 linhagens mesodérmicas, a identidade das CTM cultivadas foi estabelecida inequivocamente.

Depois disso, essas foram separadas para a criopreservação de 25 ampolas contendo células 1×10^6 para o procedimento terapêutico. Um conjunto das 4 amostras diferentes foram separadas e recharacterizadas por citometria de fluxo confirmando o perfil novamente. Todo o sobrenadante de cultura, isto é, o

meio de cultura rico em fatores de crescimento secretados pelas CTM foi recolhido e condicionado para a dosagem de fatores e subsequente utilização terapêutica. A técnica de esferas fluorescentes foi utilizada no sistema Luminex/Millipore®, conforme padronização.

5.2 Recuperação clínica após tratamento

A variação de peso pode ser apreciada no Gráfico 1. Uma diferença significativa foi encontrada entre os dois pontos de sacrifício D14 e D21. No dia 21, os animais tratados com CTM (MSC) e MC (CM) apresentaram um aumento significativo de peso em comparação com os animais aos 14 dias.

Gráfico 1 - Diferença de peso entre dois pontos de sacrifício D14 e D21, juntamente com estatísticas

*p < 0,05 em comparação com BLM grupo de 14 dias;

**p < 0,05 em comparação com BLM grupo de 21 dias.

5.3 Biomarcadores

5.3.1 Fibrinogênio

Como pode ser observado no Gráfico 2, nos grupos de controle, a concentração de fibrinogênio **(A)** é relativamente estável e reflete a dosagem normal desta proteína de fase aguda, que diminui no plasma nas agressões ao organismo visando manter a hemostasia e evitar sangramento. Dentre os grupos tratados, a dosagem foi mais expressiva para os animais que receberam células-tronco mesenquimais, sendo que, no grupo de animais infundidos com o meio condicionado à manutenção dos níveis de fibrinogênio, foi menos significativa, mostrando uma tendência de menor controle de consumo desta proteína de fase aguda, em razão da manutenção do processo inflamatório visando à reparação tecidual, como destacado nos grupos MSC e CM em D14 e D21.

Gráfico 2 Representação das concentrações de fibrinogênio plasmático nos animais de controle (CTR); com fibrose pulmonar induzida por bleomicina não tratada (BLM); no grupo tratado com células-tronco mesenquimais (MSC) e no grupo tratado com meio condicionado (CM)

5.3.2 Fator von Willebrand (vWF)

Fator von Willebrand (vWF) é uma proteína de fase aguda cujos níveis de concentração **(B)** aumentam nos processos inflamatórios, sendo liberada pelo endotélio e plaquetas. Os níveis tidos como normais são expressos pelos grupos de controle tanto em D14 quanto em D21. Tais concentrações foram significativamente mais altas para os grupos não tratados (BLM) em D14 e D21. Para os grupos tratados MSC e CM, a regularização dos níveis de concentração foi creditada ao consumo do vWF após a inflamação causada pela bleomicina, o que manteve os níveis próximos do normal e similares aos apresentados pelos grupos-controle em D14 e D21, o que indica reparação tecidual. Já os grupos que receberam bleomicina e não foram tratados (BLM) tiveram acúmulo do vWF em razão da não mais ocorrência de reparação pela implementação de processo fibrótico.

Gráfico 3 - Representação da concentração do fator de von Willebrand, em nanogramas/ml, nos animais de controle (CTR); com fibrose pulmonar induzida por bleomicina não tratada (BLM); no grupo tratado com células-tronco mesenquimais (BLM MSC) e no grupo tratado com meio condicionado (BLM CM) em D14 e D21

5.3.3 Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

No gráfico a seguir, nota-se que as concentrações de fator de crescimento derivado de plaquetas (**C**) tidas como normais são expressas pelo grupo-controle tanto em D14 quanto em D21. Tais concentrações foram significativamente mais altas para o grupo de fibrose induzida não tratada (BLM) em D14 e D21. Para os grupos tratados MSC e CM, o consumo de PDGF foi evidente após a inflamação causada pela bleomicina, o que manteve os níveis próximos do normal e similares aos apresentados pelo grupo-controle em D14 e D21, o que indica reparação tecidual. Já os grupos agredidos pela utilização de bleomicina e não tratados (BLM) passam a acumular PDGF em razão de não mais ocorrer estímulo à angiogênese ou reepitelização pulmonar pela fibrose instalada.

Gráfico 4 - Representação da concentração de PDGF-AA nos animais de controle (CTR); com fibrose pulmonar induzida por bleomicina não tratada (BLM); no grupo tratado com células-tronco mesenquimais (BLM MSC) e no grupo tratado com meio condicionado (BLM CM) em D14 e D21

Um fato a ser registrado é que RANTES (“Regulada por ativação, normal da célula T expressa e segregada”), uma proteína que desempenha o papel de recrutar leucócitos para o local da inflamação, também fazia parte do kit de biomarcadores utilizados, entretanto, não teve suas análises publicadas, tendo em vista que seu estudo indicou resultados inconclusivos.

5.3.4 Células-tronco e meio condicionado induzem a reversão da inflamação e de fibrose pulmonar induzida pela bleomicina

Comparado aos pulmões controles, pulmões do grupo BLM exibem proeminente deposição de matriz extracelular nos eixos broncovasculares com extensão para os septos alveolares associada a moderado infiltrado inflamatório linfocitário. Destaca-se, ainda, a distorção histoarquitetural com bronquiectasias de tração. O quadro morfológico é similar entre 14 e 21 dias após indução, com discreta reversão neste último (Figura 7A). Após 14 dias de tratamento, pulmões dos grupos BLM-MSC e BLM-CM exibem após moderada reversão da fibrose pulmonar em comparação ao grupo BLM, predominando, ainda, a distorção arquitetural e expansão da matriz extracelular. Em contraste, ao 21º dia após tratamento nota-se quase completa reversão da fibrose e discreto processo inflamatório associado.

A

HEMATOXILINA & EOSINA

Figura 8 - (A) Principais características histológicas dos pulmões na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratados com células-tronco após 14 e 21 dias. Histoarquitetura pulmonar preservada nos controles e BLM-MSC e BLM-CM após 21 dias de tratamento. Fibrose e infiltrado inflamatório septal nos pulmões BLM. Hematoxilina & Eosina, aumento 100X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina- células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura).

5.3.5 Células-tronco e meio condicionado induzem reversão da arteriopatia no parênquima pulmonar distal

Sob coloração com Masson+Verhöff, observa-se uma marcante expansão da matriz extracelular na adventícia de pequenos vasos (< 50 micrômetros) no grupo BLM, tanto no 14º como 21º dias (Figura 8A). Houve, ainda, uma redução significativa nos animais tratados com MSC e CM em 14 e 21 dias quando comparados aos animais do grupo BLM no mesmo período ($P < 0.05$; Figura 8B).

Figura 9 - Principais características da arteriopatia pulmonar na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. **A)** Espessamento concêntrico laminar da artéria intra-acinar no grupo BLM 14 e 21 dias; reversão do espessamento nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. **B)** Gráficos em box-plots exibindo significativa reversão do espessamento concêntrico das artérias intra-acinares nos grupos BLM-MSC e BLM-CM comparados ao grupo BLM ($P < 0.05$; ANOVA teste). Masson+Verhoeff, aumento 400X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina-células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura).

5.3.6 Células-tronco e meio condicionado induzem diminuição da expressão de enzimas oxidantes

Houve significativa aumento da expressão da NOS1 no endotélio das artérias pulmonares intra-acinares no grupo BLM nos dias 14 e 21 em comparação com os respectivos grupos de controle ($P < 0.05$; Figura 9A e 9B). Houve significativa reversão da expressão da NOS2 no endotélio das artérias intra-acinares nos grupos tratados MSC e CM quando comparados ao grupo BLM ($P < 0.05$; Figura 10A e 10B). A reversão do espessamento concêntrico nas artérias intra-acinares foi mais proeminente no grupo MSC.

Figura 10 - Imunoexpressão da NOS1 no endotélio das artérias pulmonares intra-acinares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. **A)** Espessamento concêntrico laminar da artéria intra-acinar no grupo BLM 14 e 21 dias; reversão do espessamento nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. **B)** Gráficos em box-plots exibindo significativa redução da expressão da NOS1 nos grupos BLM-MSC e BLM-CM comparados ao grupo BLM ($P < 0.05$; ANOVA teste). Imuno-histoquímica, aumento 400X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina- células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura).

Figura 11 - Imunoexpressão da NOS2 no endotélio das artérias pulmonares intra-acinares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. **A)** Espessamento concêntrico laminar da artéria intra-acinar no grupo BLM 14 e 21 dias; reversão do espessamento nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. **B)** Gráficos em box-plots exibindo significativa redução da expressão da NOS2 nos grupos BLM-MSC e BLM-CM comparados ao grupo BLM ($P < 0.05$; ANOVA teste). Imuno-histoquímica, aumento 400X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina -células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura).

Figura 12 - Imunoexpressão da NOS3 no endotélio das artérias pulmonares intra-acinares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. **A)** Espessamento concêntrico laminar da artéria intra-acinar no grupo BLM 14 e 21 dias; reversão do espessamento nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. **B)** Gráficos em box-plots exibindo significativa redução da expressão da NOS3 nos grupos BLM-MSC e BLM-CM comparados ao grupo BLM ($P < 0.05$; ANOVA teste). Imuno-histoquímica, aumento 400X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina- células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura).

5.3.7 Células-tronco e meio condicionado induzem diminuição da expressão de endotelina-1

Na análise de endotelina-1, observou-se um aumento significativo da expressão da endotelina nas artérias intra-acinares e capilares do parênquima pulmonar no grupo BLM, sendo tal fato observado tanto em 14 quanto em 21 dias ($P < 0.05$; Figura 12A e 12B).

Figura 13 - Imunoexpressão da endotelina-1 no endotélio das artérias pulmonares intra-acinares e capilares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com célula tronco. **A)** Expressão aumentada no grupo BLM 14 e 21 dias; diminuição da expressão nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. **B)** Gráficos em box-plots exibindo significativa redução da expressão da endotelina-1 nos grupos BLM-MSC e BLM-CM comparados ao grupo BLM ($P < 0.05$; ANOVA teste). Imuno-histoquímica, aumento 400X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina-células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura).

5.3.8 Células-tronco e meio condicionado modulam a expressão da proteína de remodelamento IL-17, a ativação dos fibroblastos TGF- β e a síntese de colágeno

Houve aumento significativo da expressão da interleucina 17 ($P < 0.05$; Fig. 13 A-B) nos miofibroblastos dos septos alveolares dos grupos tratados (MSC e CM) nos dias 14 e 21 em relação ao grupos-controle. Igualmente significativa, foi a redução da expressão de TGF- β e VEGF nos grupos tratados 14 e 21 dias em relação ao grupo BLM ($P < 0.05$; Figuras 14A e 14B e Figuras 15A e 15B).

Na Figura 16 (A e B), observa-se o depósito das fibras do colágeno I nos grupos BLM, BLM-MSC e BLM-CM. Nota-se aumento significativo da birrefringência e espessamento do colágeno I ao redor das artérias intra-acinares

e septos alveolares significativo no grupo BLM, tanto aos 14 como aos 21 dias em comparação com os respectivos grupos de controle ($P < 0,05$). Houve redução significativa da birrefringência e irregularidade das fibras do colágeno I nos grupos tratados em relação ao grupo BLM ($P < 0,05$). Igualmente significativa, foi a redução da birrefringência e irregularidade das fibras do colágeno V nos grupos BLM-MSC e BLM-CM aos 14 e 21 dias em comparação ao grupo BLM ($P < 0,05$; Figuras 17A e 17B).

Figura 14 - Imunoexpressão da IL-17 nos miofibroblastos dos septos alveolares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. **A)** Expressão aumentada nos grupos BLM-MSC e BLM-CM nos 14 e 21 dias; diminuição da expressão nos grupos-controle e BLM. **B)** Gráficos em box-plots exibindo significativo aumento da expressão da IL-17 nos grupos BLM-MSC e BLM-CM comparados ao grupo BLM e controle ($P < 0,05$; ANOVA teste). Imuno-histoquímica, aumento 400X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina-células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura).

Figura 15 - Imunoexpressão do TGF- β nos miofibroblastos dos septos alveolares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. **A)** Expressão aumentada do TGF- β no grupo BLM nos 14 e 21 dias; diminuição da expressão nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. **B)** Gráficos em box-plots exibindo significativo aumento da expressão do TGF- β no grupo BLM comparados ao grupo BLM-MSC e BLM-CM ($P < 0,05$; ANOVA teste). Imuno-histoquímica, aumento 400X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina-células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura).

Figura 16 - Imunoexpressão do VEGF nos miofibroblastos dos septos alveolares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. **A)** Expressão aumentada do VEGF no grupo BLM nos 14 e 21 dias; diminuição da expressão nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. **B)** Gráficos em box-plots exibindo significativo aumento da expressão do VEGF no grupo BLM comparados ao grupo BLM-MSC e BLM-CM ($P < 0.05$; ANOVA teste). Imuno-histoquímica, aumento 400X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina- células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura).

Figura 17 - Imunofluorescência para o colágeno I nos septos alveolares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. **A)** Aumento da birrefringência e irregularidade das fibras do colágeno I no grupo BLM nos 14 e 21 dias; diminuição da birrefringência e irregularidade nos septos alveolares nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. **B)** Gráficos em box-plots exibindo significativo aumento da deposição de fibras do colágeno I no grupo BLM comparados ao grupo BLM-MSC e BLM-CM ($P < 0.05$; ANOVA teste). Imunofluorescência, aumento 200X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina- células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura).

Figura 18 - Imunofluorescência para o colágeno V nos septos alveolares na fibrose pulmonar induzida pela bleomicina e tratada com células-tronco. **A)** Aumento da birrefringência e irregularidade das fibras do colágeno V no grupo BLM nos 14 e 21 dias; diminuição da birrefringência e irregularidade nos septos alveolares nos grupos BLM-MSC e BLM-CM. **B)** Gráficos em box-plots exibindo significativo aumento da deposição de fibras do colágeno V no grupo BLM comparados ao grupo BLM-MSC e BLM-CM ($P < 0.05$; ANOVA teste). Imunofluorescência, aumento 200X (BLM- bleomicina; BLM-MSC, bleomicina-células-tronco mesenquimais; BLM-CM, bleomicina- meio de cultura).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, analisamos os efeitos diretos das células-tronco mesenquimais e seus efeitos indiretos por meio de fatores parácrinos, presentes no meio condicionado destas células, no tratamento da fibrose pulmonar induzida pela instilação intratraqueal de bleomicina.

Para tanto, as células-tronco mesenquimais oriundas do tecido adiposo abdominal de ratos Wistar tiveram seu perfil fenotípico, capacidade de adesão plástica e diferenciação em 3 linhagens mesodérmicas estabelecidas inequivocamente, conforme estabelecido internacionalmente pela ISSCR e já padronizado em nosso laboratório de engenharia celular (Dominici *et al.*, 2006; Bertanha *et al.*; Felix, 2013; Felix *et al.*, 2016).

As lesões no tecido pulmonar geradas pela bleomicina, bem como, os resultados do tratamento com células-tronco ou meio condicionado, foram mensurados por meio da evolução de peso e de análise morfológica, histoquímica, imuno-histoquímica, imunofluorescência, e quantificação por histomorfometria.

Especificamente, as células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e seu meio condicionado foram eficazes na fase tardia da fibrose pulmonar induzida pela bleomicina. Promoveram a reversão da esclerose vascular e do remodelamento do parênquima pulmonar relacionado à modulação progressiva pela inflamação e por mediadores profibróticos no interstício pulmonar. Resultados semelhantes foram também previamente apresentados por Matthay *et al.* (2010) e Fabro *et al.* (2012).

Além disso, houve impacto da administração de células-tronco mesenquimais e do meio condicionado na fisiopatologia do componente fibroplásico. Neste contexto, todas as vias determinantes de lesão pulmonar foram ativadas (transformação miofibroblástica, deposição de matriz extracelular e remodelamento pulmonar), ao invés de vias específicas de lesão ou reparo, alinhando-nos com a literatura (Hinz *et al.*, 2007; Jayaraman *et al.*, 2013). Estes resultados foram obtidos por meio de um pequeno grau de enxerto pulmonar,

sugestivos de proeminente efeito parácrino, como previamente relatado por Linero e Chaparro (2014) e Vizoso (2017).

A análise dos biomarcadores séricos nos grupos tratados MSC e CM revelou consumo de fibrinogênio e redução dos níveis de concentração tanto do fator von Willebrand quanto do PDGF em fase tardia, o que indica a ocorrência de manutenção do processo inflamatório visando à reparação tecidual, conforme indicado em literatura por Balbino *et al.*, 2005.

De fato, no estágio tardio dos grupos tratados com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo e seu meio condicionado, verificou-se significativa diminuição da expressão de fibras do colágeno I, diminuição dos miofibroblastos na camada periadventicial de pequenos vasos, e aumento da expressão de IL-17. Tais resultados indicaram, novamente, convergência com a descrição da literatura (Fabro *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2016; Urvashi *et al.*, 2017).

Conforme esperado, nesta pesquisa, tivemos uma coletânea de resultados que demonstraram efeito terapêutico similar ou superior no grupo tratado com meio condicionado quando comparado ao grupo que recebeu tratamento com células-tronco mesenquimais. Tais resultados sugerem que as propriedades imunomoduladoras do meio condicionado de célula-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo são tão eficazes quanto as ações diretas das próprias células, coincidindo com resultados inovadores anteriormente descritos por Li *et al.* (2015) e Linero e Chaparro (2014).

Adicionalmente, estudos experimentais anteriores (Yamada *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2010) investigaram a capacidade restauradora das células-tronco de medula óssea, mostrando uma redução na taxa de mortalidade, melhora nas alterações histológicas pulmonares, e das respostas sistêmicas e inflamatórias locais. Contudo, as células-tronco mesenquimais apresentam algumas desvantagens, como, por exemplo, as condições de cultura em laboratório, que podem prejudicar a utilização terapêutica caso não ocorra um processamento adequado, pois existe o risco de contaminação e reações imunológicas.

Com base nessas limitações, alguns pesquisadores viram na aplicação do meio condicionado uma opção terapêutica viável por oferecer vantagens

importantes em relação às aplicações baseadas em células-tronco propriamente ditas. Apresentam maior segurança quando comparada à aplicação de células vivas e proliferativas, no tangente à imunocompatibilidade, a ocorrência de embolia, a tumorigenicidade e a transmissão de infecções. Além disso, seu armazenamento pode ser feito por um longo período sem perda de potência do material e sua ministração é mais econômica para a aplicação clínica, tendo em vista a não necessidade de procedimentos invasivos de coleta de células. Tais terapias com meio condicionado podem ser imediatamente disponibilizadas para o tratamento de condições agudas e o produto biológico obtido pode ser modificado para efeitos específicos de células desejadas (Ionescu *et al.*; Osugi *et al.*, 2012; Bermudez *et al.*, 2016). Tal contexto foi mandatório na construção de nossa proposta temática.

Em modelos murinos de fibrose induzida por bleomicina, por via intravenosa (Aguilar *et al.*, 2009) ou instilação intrapulmonar (Ortiz *et al.*, 2003), as células-tronco mesenquimais reduziram a resposta inflamatória e a análise ultraestrutural mostrou reparo de pulmões danificados, sugerindo a liberação parácrina de fatores tróficos por, ou induzida por, células-tronco mesenquimais (Gupta *et al.*, 2007). Neste contexto, a literatura e os resultados encontrados em nosso trabalho apresentaram, novamente, convergência, sendo que o tratamento com as células-tronco mesenquimais e o meio condicionado determinaram: 1) diminuição das citocinas pró-inflamatórias, tais como NOS-2 e Fibrinogênio; 2) redução nos fatores de crescimento (Endotelina), contribuindo para o reparo endotelial; e 3) redução do TGF- β , PDGF, VEGF e fator von Willebrand, envolvidos no processo fibroproliferativo que contribui para o reparo epitelial.

Houve maior expressão da proteína VEGF na fibrose induzida por BLM, o que pode ter contribuído para o aumento da permeabilidade vascular e edema pulmonar na fase aguda de lesão induzida por bleomicina, conforme descrito em literatura (Thichett *et al.*, 2001). A terapia com células-tronco mesenquimais e com meio condicionado levou a uma diminuição significativa da expressão de VEGF, promovendo efeito protetor e regenerativo nas células endoteliais pulmonares, ao reduzir o número de capilares e a permeabilidade vascular. Resultados semelhantes foram descritos por Zhao *et al.* (2005). Durante a

recuperação, o VEGF pode participar na angiogênese, um componente importante da reparação pulmonar (Mura *et al.*, 2004).

O fator de von Willebrand e a endotelina são marcadores da ativação e lesão endotelial. Ware *et al.* (2004) levantaram a hipótese de que os níveis plasmáticos do fator von Willebrand (vWF) estariam associados aos desfechos clínicos na lesão pulmonar aguda. Estes autores relataram que os níveis basais de vWF foram semelhantes em pacientes com e sem sepse, e significativamente maiores em não sobreviventes comparados aos sobreviventes, mesmo quando se controlava a gravidade da doença, a septicemia e parâmetros de ventilação. Eles concluíram que o grau de ativação e lesão endotelial está fortemente associado aos desfechos na síndrome do desconforto respiratório agudo, independentemente da presença ou ausência de sepse, e que isto não era modulado por uma estratégia ventilatória protetora. Visando a melhorar ainda mais os resultados, foram investigadas novas estratégias de tratamento dirigidas também ao endotélio.

Tal problemática descrita foi preponderante na análise da endotelina e do fator de von Willebrand em nossa pesquisa, sendo que nossos resultados indicaram concordância com a literatura, em que, no grupo BLM, ou seja, no grupo não tratado, tivemos uma maior expressão tanto na quantificação da endotelina quanto do fator de von Willebrand, o que reflete a não ocorrência de reparação e a implementação de processo fibrótico neste grupo.

No que tange a concentração de fibras de colágeno, esta foi maior na fibrose induzida no grupo BLM, o que pode ser atribuído ao maior grau de lesão epitelial e ao aumento da expressão de TGF- β , PDGF e fator de von Willebrand (Ware *et al.*, 2004; Pelosi; Rocco, 2008). Os animais tratados com células-tronco mesenquimais tiveram uma redução acentuada na quantidade de fibras do colágeno no parênquima pulmonar, provavelmente relacionada à diminuição no processo inflamatório e dos fatores de crescimento (TGF- β , PDGF e VEGF). Além disso, o reparo epitelial alveolar eficiente pode reduzir o desenvolvimento da fibrose, porque a presença de uma camada epitelial alveolar intacta suprime a proliferação de fibroblastos e deposição de matriz (Adamson *et al.*, 1988). Segundo esses autores, nos grupos tratados com células-tronco mesenquimais e com meio condicionado, a análise por microscopia eletrônica demonstrou um

aumento nas células epiteliais de tipo II e reparação de epitélio alveolar com células de fenótipo não definitivo.

No presente estudo, a expressão do colágeno V foi progressivamente aumentada entre os grupos CTR, BLM, MSC e CM, respectivamente. A expressão anormal e irregular do colágeno V pode ter promovido o reconhecimento do epítipo imunogênico do colágeno V, conforme anteriormente proposto em doenças pulmonares intersticiais humanas (Parra *et al.*, 2006; Parra *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2010; Tiriveedhi *et al.*, 2012).

Recentemente, muitas dessas doenças têm sido relacionadas à resposta Th17 (Burlingham *et al.*, 2007; Khoury, 2011). De modo interessante, demonstramos que a expressão de IL-17 foi igualmente superior em grupos tratados com células-tronco mesenquimais e com meio condicionado em comparação com o grupo BLM. Juntos, esses achados sugerem um “feedback” positivo desencadeado pelo tratamento, entre o colágeno V, resposta de Th17 e ativação não miofibroblástica, em que o desequilíbrio entre o colágeno I e V favorece a resposta ao colágeno V via Th17 mediação, bloqueia a ativação miofibroblástica e, posteriormente, a recuperação da lesão pulmonar, conforme descrito por Fabro *et al.* (2015).

O mecanismo exato de modulação de miofibroblastos por células-tronco mesenquimais ou seu efeito parácrino ainda não é totalmente conhecido na fibrose pulmonar (Li *et al.*, 2015). No entanto, a regulação do receptor IL-17 pode estar intimamente envolvida neste processo. A ausência de receptor de IL-17 está associada à manutenção da fibrose pulmonar periférica numa resposta ao colágeno V via Th17 (Fabro *et al.*, 2015). Neste ponto, os receptores de IL-17 podem contribuir diferencialmente para modular a produção de colágeno I e V, no entanto, o objetivo do estudo não foi incluir esta abordagem inicial e investigá-la.

A recuperação do remodelamento parenquimatoso é um passo crítico para a melhora clínica e de sobrevida de nossos pacientes. Independentemente da causa, a ativação miofibroblástica é o ponto central da produção anômala e exarcebada de matriz extracelular com consequente distorção arquitetural parenquimatosa e perda funcional.

Nossos resultados indicam uma perspectiva real de modulação deste componente fibroplásico dos pacientes a partir da utilização de células-tronco mesenquimais e, principalmente, de seu meio condicionado. Todavia, uma melhor compreensão dos fatores de crescimento e das citocinas presentes no meio condicionado de células-tronco mesenquimais é crucial., além disso, esse conhecimento pode persuadir os profissionais, acadêmicos e cientistas em viabilizar um caminho que possibilite a ampla utilização terapêutica do meio condicionado. Portanto, novos estudos de aplicabilidade dessa opção terapêutica no tratamento da fibrose pulmonar se mostram necessários e devem ser realizados.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, a terapia com células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo e com o seu meio condicionado reverteu a inflamação e fibroplasia no parênquima pulmonar no modelo murino induzido por bleomicina. Demonstramos que elas agem para modular a ativação miofibroblástica, restauração tecidual e endotelial. Além disso, o meio condicionado se mostrou tão eficiente quanto as células-tronco propriamente ditas no efetivo remodelamento pulmonar, possivelmente por seu efeito parácrino.

Entendemos, portanto, que futuros estudos devem se centrar na elucidação dos mecanismos de modulação responsáveis pelos efeitos benéficos das células-tronco mesenquimais e seu meio condicionado, bem como, na busca de respostas de questões práticas envolvidas no desenvolvimento de uma terapia adequada para os doentes, como a dose ótima e a melhor via de entrega celular.

8 ANEXOS

8 ANEXOS

8.1 ANEXO A – Aprovações dos Comitês de Ética em Pesquisa do HC/FMUSP e UNESP

A **CEUA** do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em de 06/02/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **530/13** intitulado: **“Modulação do microambiente periférico pelas células tronco mesenquimais e meio condicionado na fibrose pulmonar experimental”** que utilizará **94** animais da espécie **Ratos Wistars**, apresentado pelo **Departamento de Patologia**.

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

Pesquisador (a) Responsável: Vera Luiza Capelozzi

Pesquisador(a) Executante : Renato Gonçalves Felix

CEP-FMUSP, 06 de fevereiro de 2014.

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

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

UNESP

Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1059/2013-CEUA

CERTIFICAMOS que o Projeto de pesquisa "Modulação do microambiente periférico pelas células tronco mesenquimais e meio condicionado na fibrose pulmonar experimental", a ser conduzido por **Renato Gonçalves Felix**, orientado pela **Profª. Drª Vera Luiza Capelozzi**, Co-orientado pelo **Prof. Dr. Alexandre Todorovic Fabro** com a colaboração da **Profª. Drª Elenice Deffune** e Apoio Técnico de **Igor Otávio Minatel**, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - **CONCEA**, com a ressalva de que os "ratos wistar" são provenientes de Biotério Convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

CERTIFICAMOS, ainda que foi autorizada a utilização de "94 ratos wistar". Caso seja necessária a utilização de mais animais deverá ser comunicado a esta CEUA.

Prof. Adjunto Katashi Okoshi
Presidente da CEUA

Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEUA

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 31/10/2013

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Abreu SC, Antunes MA, Xisto DG, Cruz FF, Branco VC, Bandeira E, et al. Bone marrow, adipose, and lung tissue-derived murine mesenchymal stromal cells release different mediators and differentially affect airway and lung parenchyma in experimental asthma. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Jun;6:1557-67.
2. Achilleas D, Theocharis A, Spyros S, Skandalis A, Chrysostomi B, Nikos K. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Delivery Reviews.* 2016;97:4-27.
3. Adachi E, Hopkinson I, Hayashi T. Basement-membrane stromal relationships: Interactions between collagen fibrils and the lamina densa. *Int Rev Cytol.* 1997;173:73-156.
4. Adamson IY, Young L, Bowden DH. Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 1988;130:377-83.
5. Afonso Junior JE, Werebe EC, Carraro RM, Teixeira RHOB, Fernandes LM, Abdalla LG, et al. Transplante pulmonar. *Einstein.* 2015;13:297-304.
6. Aguilar S, Scotton CJ, McNulty K, Nye E, Stamp G, Laurent G, et al. Bone marrow stem cells expressing keratinocyte growth factor via an inducible lentivirus protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *PloS one.* 2009;4:e8013.
7. Allen S, Raut S, Woollard J, Vassallo M. Low dose diamorphine reduces breathlessness without causing a fall in oxygen saturation in elderly patients with end stage idiopathic pulmonary fibrosis. *Palliat Med.* 2005;19:128-30.
8. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary. Consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:277.
9. Antó JM, Cullinan P. Clusters, classification and epidemiology of interstitial lung diseases: concepts, methods and critical reflections. *Eur Respir J.* 2001;32:101-6.
10. Araújo IM, Abreu SC, Maron-Gutierrez T, Cruz F, Fujisaki L, Carreira H Jr, et al. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy in experimental pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *Crit Care Med.* 2010;38:1733-41.

11. Colenci R, da Silva Assunção LR, Mogami Bomfim SR, de Assis Golim M, Deffune E, Penha Oliveira SH. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulated by bFGF up-regulated protein expression in comparison with periodontal fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol*. 2014 Mar;59(3):268-76.
12. Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2007;356:1317.
13. Atamas SP, White B. Cytokine regulation of pulmonary fibrosis inscleroderma. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14:537-50.
14. Athayde SR. *Influência da suplementação de colágeno V bovino na inflamação e remodelamento da matriz extracelular na artrite induzida em ratos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2016.
15. Augustine S, Avey MT, Harrison B, Locke T, Ghannad M, Moher D, Thébaud B. Mesenchymal stromal cell therapy in bronchopulmonary dysplasia: systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(12):2079-93.
16. Aumailley M, Timpl R. Attachment of cells to basement membrane collagen type IV. *J Cell Biol*. 1986;103:1569-75.
17. Baer P. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells*. 2014 Jul 26;6(3):256-65.
18. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int*. 2012;2012:812693.
19. Balbino C, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farm*. 2005;41:27-51.
20. Baldi B, Castro Pereira CA. *Diretrizes de doenças pulmonares intersticiais da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia- SBPT*. 2012.
21. Bar-Nur O, Russ HA, Efrat S, Benvenisty N. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell*. 2011;9:17-23.
22. Bermudez MA, Sendon-Lago J, Seoane S, Eiro N, Gonzalez F, Saa J, Vizoso F, Perez-Fernandez R. Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. *Exp Eye Res*. 2016;149,84–92.

23. Bertanha M, Moroz A, Almeida R, Alves FC, Acorci Valério MJ, Moura R, et al. Tissue-engineered blood vessel substitute by reconstruction of endothelium using mesenchymal stem cells induced by platelet growth factors. *J Vasc Surg*. 2014 Jun;59(6):1677-85.
24. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci*. 1990;95(Pt 4): 649-57.
25. Bjoraker JA, Ryu JH, Edwin MK, Myers JL, Tazelaar HD, Schroeder DR, et al. Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(1):199-203.
26. Brasileirinho Filho, G. *Bogliolo, patologia*. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. p. 383-442.
27. Bruscia EM, Price JE, Cheng EC, Weiner S, Caputo C, Ferreira EC, et al. Assessment of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity in CFTR-null mice after bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:2965-70.
28. Burlingham WJ, Love RB, Jankowska-Gan E, Haynes LD, Xu Q, Bobadilla JL, et al. IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *J Clin Invest*. 2007;117:3498-506.
29. Calvi E, Nahas F, Barbosa M, Calil JA, Ihara S, Silva M, Franco M, Ferreira L. An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. *Acta Cir Bras*. 2012;27(10):681-6.
30. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
31. Chapman HA. Disorders of lung matrix remodeling. *J Clin Invest*. 2004;113:148-57.
32. Chen J, Ziboh V, Giri SN. Up-regulation of platelet-activating factor receptors in lung and alveolar macrophages in the bleomycin-hamster model of pulmonary fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;280:1219-27.
33. Cohen J. The emerging race to cure HIV infections. *Science*. 2011;332(6031):784-89.
34. Collard H, King T, Bartelson, Vourlekis JS, Schwarz MI, Brown KK. Changes in clinical and physiologic variables predict survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(5):538-542.
35. Costabel U, King TE. International consensus statement on idiopathic pulmonary fibrosis. *J Eur Soc Clin Resp Physiol*. 2001;17:163-7.

36. Cutroneo KR. Evidence for TGF-beta1 and bleomycin intracellular signaling through autocrine regulation of Smad 3 binding to the proximal promoter of the Smad 7 gene. *J Cell Biochem.* 2006;97(5):933-9.
37. D'Arcangelo G, Miao GG, Shu-Cheng C. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*. *Nature.* 1994;374:719-23.
38. Da Silva VD, Prolla JC. *Estudo comparativo entre microscopia ótica convencional e imagens microscópicas digitalizadas de derrames serosos* [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1995.
39. De Mendonça L, Felix NS, Blanco NG, Da Silva JS, Ferreira TP, Abreu SC, et al. Mesenchymal stromal cell therapy reduces lung inflammation and vascular remodeling and improves hemodynamics in experimental pulmonary arterial hypertension. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Oct 3;8(1):220.
40. Demedts M, Behr J, Buhl R, Costabel U, Dekhuijzen R, Jansen HM, et al. IFIGENIA Study Group. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2005;353(21):2229-42.
41. 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.* 2006;8:315-7.
42. Duma D, Fernandes D, Bonini M, Stadler K, Mason R, Assreuy J. NOS-1-derived NO is an essential triggering signal for the development of systemic inflammatory responses. *Eur J Pharmacol.* 2011;668(1-2):285-92.
43. El Agha E, Kramann R, Schneider RK, Li X, Seeger W, Humphreys BD, Bellusci S. Mesenchymal stem cells in fibrotic disease. *Cell Stem Cell.* 2017 Aug 3;21(2):166-77.
44. Fabro AT. *Remodelamento parenquimatoso pulmonar em dois modelos experimentais de fibrose* [Tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2012.
45. Fabro AT, da Silva PH, Zocolaro WS, de Almeida MS, Rangel MP, de Oliveira CC, et al. The Th17 pathway in the peripheral lung microenvironment interacts with expression of collagen V in the late state of experimental pulmonary fibrosis. *Immunobiology.* 2015;220:124-35.
46. Felix R. *Contribuição da terapia celular com células-tronco em fibrose em ratos*. [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2013.

47. Felix R, Todorovic Fabro A, Vicentini-Oliveira J, Henrique Bianchi E, Assis Golim M, Silvia Cotrim O, et al. Rat mesenchymal stem cells from adipose tissue reduce bleomycin-induced lung remodeling in late stage. *Stem Cell Discovery*. 2016;6:24-38.
48. Fernand JP, Ravaud P, Chevret S, Leblond V, Divine M, Dreyfus F, et al. High-dose therapy and autologous blood stem cell transplantation in multiple myeloma: preliminary results of a randomized trial involving 167 patients. *Stem Cells*. 1995;13(2):156-9.
49. Fernandez IE, Eickelberg O. New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2012;380:680-8.
50. Ferreira Filho AF. *Fibrose pulmonar induzida por bleomicina intratraqueal em ratos Wistar. Descrição do modelo experimental de Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto e uso do polissulfato de pentosan* [Tese]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1996.
51. Fikry E, Safar M, Hasan W, Fawzy H, El-Denshary E. Bone Marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate methotrexate-induced pulmonary fibrosis in rat: comparison with dexamethasone. *J Biochem Mol Toxicol*. 2015 Jul;29(7):321-9.
52. Filipczak P, Senft A, Seagrave J, Weber W, Kuehl P, Fredenburgh L, et al. NOS-2 inhibition in phosgene-induced acute lung injury. *Toxicol Sci*. 2015 Jul 13;146(1):89-100.
53. Fleischman RW, Baker JR, Thompson GR, Schaeppi UH, Illievski VR, Cooney DA, et al. Bleomycin-induced interstitial pneumonia in dogs. *Thorax*. 1971;26:675-82.
54. Freitas AL, Oliveira e Silva MD, Matsumoto MP, Han SW, Ferreira LM. Experimental model of obtaining tissue adipose, mesenchymal stem cells isolation and distribution in surgery flaps in rats. *Acta Cir Bras*. 2014;29:29-33.
55. Fukuda Y, Basset F, Ferrans VJ, Yamanaka N. Significance of early intra-alveolar fibrotic lesions and integrin expression in lung biopsy specimens from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol*. 1995;26:53-61.
56. Gauldie J, Kolb M. Animal models of pulmonary fibrosis: How far from effective reality? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294:L151.
57. Geiger S, Hirsch D, Hermann FG. Cell therapy for lung disease. *Eur Respir Rev*. 2017;26(144):170044.
58. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens - structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55:1531-46.

59. Gimble JM, Guilak F, Bunnell BA. Clinical and preclinical translation of cellbased therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1:19.
60. Gross J and Hunninghake G. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2001;345(7):517-25.
61. Grove JE, Lutzko C, Priller J, Henegariu O, Theise ND, Kohn DB, et al. Marrow-derived cells as vehicles for delivery of gene therapy to pulmonary epithelium. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 2002;27:645-51.
62. Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol.* 2007;179:1855-63.
63. Hamada N, Kuwano K, Yamada M, Hagimoto N, Hiasa K, Egashira K, et al. Anti-vascular endothelial growth factor gene therapy attenuates lung injury and fibrosis in mice. *J Immunol.* 2005;175:1224-31.
64. Harari S, Caminati A. IPF: new insight on pathogenesis and treatment. *Allergy.* 2010;65(5):537-53.
65. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007;170:1807-16.
66. Holland AE, Hill CJ, Conron M, Munro P, McDonald CF. Short term improvement in exercise capacity and symptoms following exercise training in interstitial lung disease. *Thorax.* 2008;63(6):549-54.
67. Hope-Gill BD, Hilddrup S, Davies C, Newton RP, Harrison NK. A study of the cough reflex in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J RespirCrit Care Med.* 2003;168(8):995-1002.
68. 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.* 2005;7:393-5.
69. Hostettler KE, Gazdhar A, Khan P, Savic S, Tamo L, Lardinois D, et al. Multipotent mesenchymal stem cells in lung fibrosis. *PLoS One.* 2017;12(8):e0181946.
70. Hubner RH, Gitter W, El Mokhtari NE, Mathiak M, Both M, Bolte H, et al. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Bio Techniques.* 2008;44(4):507-11.

71. Huleihel L, Sellares J, Cardenes N, Álvarez D, Faner R, Sakamoto K, et al. Modified mesenchymal stem cells using miRNA transduction alter lung injury in a bleomycin model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;313(1):L92-L103.
72. Ionescu L, Byrne RN, van Haaften T, Vadivel A, Alphonse RS, Rey-Parra GJ, et al. Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: In vivo evidence for stem cell paracrine action. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303:L967-77.
73. Jayaraman P, Nathan P, Vasanthan P, Musa S, Govindasamy V. Stem cells conditioned medium: a new approach to skin wound healing management. *Cell Biol Int*. 2013;37:1122-8.
74. Kandhare AD, Bodhankar SL, Mohan V, Thakurdesai, PA. Effect of glycosides based standardized fenugreek seed extract in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats: decisive role of Bax, Nrf2, NF-kappaB, Muc5ac, TNF-alpha and IL-1beta. *Chem Biol Interact*. 2015;237:151-65.
75. Kellman P, Xue H, Olivieri LJ, Cross RR, Grant EK, Fontana M, Ugander M, Moon JC, Hansen MS. Dark blood late enhancement imaging. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2016 Nov 7;18(1):77.
76. Khoury SJ. Th17 and Treg balance in systemic sclerosis. *Clin Immunol*. 2011;139:231-2.
77. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010;467(7313):285-90.
78. Kimmelman J, Heslop H, Sugarman J, Studer L, Benvenisty N, Caulfield T, et al. New ISSCR guidelines: clinical translation of stem cell research. *Lancet*. 2016;387:1979-81.
79. King TE Jr, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Hormel P, Lancaster L, et al. Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2009;374(9685):222-8.
80. King TE Jr, Behr J, Brown KK, du Bois RM, Lancaster L, de Andrade JA, et al. BUILD-1: a randomized placebo-controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(1):75-81.
81. King TE Jr, Brown KK, Raghu G, du Bois RM, Lynch DA, Martinez F, et al. BUILD-3: a randomized, controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(1):92-9.
82. King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2011; 378(9807):1949-61.

83. Knoepfler PS. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells*. 2009;27(5):1050-6.
84. Konomi H, Hayashi T, Nakayasu K, Arima M. Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung, and skin. Immunohistochemical evidence by anti-collagen antibodies characterized by immunoelectroblotting. *Am J Pathol*. 1984;116:417-26.
85. 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*. 2001;105:369-77.
86. Kreider M, Kotloff RM. Selection of candidates for lung transplantation. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6(1):20-7.
87. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins & Cotran, bases patológicas das doenças*. 8a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010, p. 685-746.
88. Lan YW, Theng SM, Huang TT, Choo KB, Chen CM, Kuo HP, et al. Oncostatin M - preconditioned mesenchymal stem cells alleviate bleomycin-induced pulmonary fibrosis through paracrine effects of the hepatocyte growth factor. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Mar;6(3):1006-17.
89. La Rocca G, Aspelund T, Greve AM, Eiriksdottir G, Acharya T, Thorgeirsson G, et al. Fibrosis as measured by the biomarker, tissue inhibitor metalloproteinase-1, predicts mortality in Age Gene Environment Susceptibility-Reykjavik (AGES-Reykjavik) Study. *Eur Heart J*. 2017 38(46):3423-3430.
90. Laurent GJ, McAnulty RJ, Hill M, Chambers R. Escape from the matrix: multiple mechanisms for fibroblast activation in pulmonary fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2008;5:311-5.
91. Ley B, Collard HR, King TE Jr. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(4):431-40.
92. Li X, Zhao H, Qi C, Zeng Y, Xu F, Du Y. Direct intercellular communications dominate the interaction between adipose-derived MSCs and myofibroblasts against cardiac fibrosis. *Protein Cell*. 2015;6:735-45.
93. Lim JY, Ryu DB, Lee SE, Park G, Min CK. Mesenchymal stem cells (MSCs) attenuate cutaneous sclerodermatous graft-versus-host disease (Scl-GVHD) through inhibition of immune cell infiltration in a mouse model. *J Invest Dermatol*. 2017 Sep;137(9):1895-1904.
94. Lin C, Xin Z, Dai J, Lue T. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: limitations and challenges. *Histol Histopathol*. 2013 Sep;28(9):1109-16.

95. Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PloS One*. 2014;9:e107001.
96. Liu R, Evgenov OV, Ichinose F. NOS3 deficiency augments hypoxic pulmonary vasoconstriction and enhances systemic oxygenation during one-lung ventilation in mice. *J Appl Physiol*. 2005 Feb;98(2):748-52.
97. Lokeshwar VB, Selzer MG. Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessel, and vein-derived human endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000;275:27641-9.
98. Lynch JP, Saggarr R, Weigt SS, Ross DJ, Belperio JA. Overview of lung transplantation and criteria for selection of candidates. *Semin Respir Crit Care Med*. 2006;27(5):441-69.
99. Marshall BG, Shaw RJ. T cells and fibrosis. *Chemical immunology*. 2000;78:148-58.
100. Matthay MA, Goolaerts A, Howard JP, Lee JW. Mesenchymal stem cells for acute lung injury: preclinical evidence. *Crit Care Med*. 2010;38(10 Suppl):S569-S573.
101. Meltzer E, Noble PC. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Orph J Rare Dis*. 2008;14:915-6.
102. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003;113(5):631-42.
103. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. The bleomycin animal model: A useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:362-82.
104. Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294:L152-60.
105. Mura M, dos Santos CC, Stewart D, Liu M. Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury. *J Appl Physiol*. 2004;97:1605-17.
106. Murray LA, Argentieri RL, Farrell FX, Bracht M, Sheng H, Whitaker B, et al. Hyperresponsiveness of ipf/uip fibroblasts: Interplay between tgfbeta1, il-13 and ccl2. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:2174-82.
107. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet*. 2011;377(9779):1760-9.
108. Noth I, Martinez FJ. Recent advances in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2007;132:637.

109. O'Beirne S, Counihan IP, Keane MP. Interstitial lung disease and lung transplantation. *Semin Respir Crit Care Med*. 2010;31(2):139-46.
110. Oliveira CC, Teodoro WR, Velosa APP, Yoshinari NH. Autoimunidade e colágeno V. *Rev Bras Reumatol*. 2006;46(3):194-8.
111. Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, Conte JV, Corris P, Egan JJ, et al. International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update – a consensus report from the pulmonary scientific council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2006;25(7):745-55.
112. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8407-11.
113. Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng. Part A*. 2012;18:1479-89.
114. Özyurt H, Söğüt S, Yildirim Z, Kart L, Iraz M, Amutçu F, et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl Ester on bleomycine-induce lung fibrosis in rats. *Clin Chin Acta*. 2004;339(1-2):65-75.
115. Pak J. Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. *J Med Case Rep*. 2011;5:296.
116. Parra ER, Aguiar AC Jr, Teodoro WR, de Souza R, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis. *Clin Respir J*. 2009;3:135-42.
117. Parra ER, Teodoro WR, de Moraes J, Katayama ML, de Souza R, Yoshinari NH, et al. Increased mRNA expression of collagen V gene in pulmonary fibrosis of systemic sclerosis. *Eur J Clin Invest*. 2010;40:110-20.
118. Parra ER, Teodoro WR, Velosa AP, de Oliveira CC, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Interstitial and vascular type V collagen morphologic disorganization in usual interstitial pneumonia. *J Histochem Cytochem*. 2006;54:1315-25.
119. Pelosi P, Rocco PR. Effects of mechanical ventilation on the extracellular matrix. *Int Care Med*. 2008;34:631-9.
120. Pereira CA, Malheiros T, Coletta EM, Ferreira RG, Rubin AS, Otta JS, et al. Survival in idiopathic pulmonary fibrosis-cytotoxic agents compared to corticosteroids. *Respir Med*. 2006;100(2):340-7.
121. Punithavathi D, Venkatesan N, Babu M. Curcumin inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Br J Pharmacol*. 2000;131:169-72.

122. Raghu G, Brown KK, Costabel U, Cottin V, du Bois RM, Lasky JA, et al. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with etanercept: an exploratory, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(9):948-55.
123. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An Official ATS/ERJ/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence based Guidelines for Diagnosis and Management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(6):788-824.
124. Raghu G, Depaso WJ, Cain K, Hammar SP, Wetzel CE, Dreis DF, et al. Azathioprine combined with prednisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144(2):291-6.
125. Ramos T, Sánchez-Abarca LI, Muntión S, Preciado S, Puig N, López-Ruano G, et al. MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell Commun Signal*. 2016 Jan 12;14:2.
126. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011;9:12.
127. Reddy M, Fonseca L, Gowda S, Chougule B, Hari A, Totey S. Human adipose-derived mesenchymal stem cells attenuate early stage of bleomycin induced pulmonary fibrosis: comparison with pirfenidone. *Int J Stem Cells*. 2016;9(2):192-206.
128. Rhieu BH, Epperly MW, Cao S, Franicola D, Shields D, Goff J, Wang H, et al. Increased hematopoiesis in long-term bone marrow cultures and reduced irradiation-induced pulmonary fibrosis in Von Willebrand factor homologous deletion recombinant mice. *In Vivo*. 2014;28(4):449-56.
129. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1).
130. Rossari JRF. *Fibrose pulmonar induzida por bleomicina intratraqueal em ratos wistar: uso do interferon-a-2b em um modelo experimental de síndrome da distrição respiratória aguda - SDRA* [Dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.
131. Roulet M, Ruggiero F, Karsenty G, LeGuellec D. A comprehensive study of the spatial and temporal expression of the col5a1 gene in mouse embryos: a clue for understanding collagen V function in developing connective tissues. *Cell Tissue Res*. 2007;327:323-32.
132. Roy C, Gray C, Ruda L, Bell A, Bolt J. High-Dose, extended-interval gentamicin and tobramycin for pediatric inpatients: a survey of canadian hospital pharmacists. *Can J Hosp Pharm*. 2016;69(5):367-75.

133. Saldiva P, Carvalho C. Fibroses intersticiais pulmonares. *J Bras Pneumol*. 1985;11(3):152-61.
134. Saleh D, Barnes PJ, Giaid A. Increased production of the potent oxidantperoxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med*. 1997;155:1763-9.
135. Schreml S, Babilas P, Fruth S, Orso E, Schmitz L, Mueller MB, Nierlich H, Prantl L. Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction. *Cytotherapy*. 2009;11(7):947-57.
136. Seiler A, Klaghofer R, Ture M, Komossa K, Martin-Soelch C, Jenewein J. A systematic review of health-related quality of life and psychological outcomes after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2016;35:195-202.
137. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypothesis about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*. 2001;134(2):136-51.
138. Selman M, Pardo A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: From innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:364-72.
139. Shen Q, Chen B, Xiao Z, Zhao L, Xu X, Wan X, et al. Paracrine factors from mesenchymal stem cells attenuate epithelial injury and lung fibrosis. *Mol Med Rep*. 2015 Apr;11(4):2831-7.
140. Siatskas C, Payne NL, Short MA, Bernard CCA. A consensus statement addressing mesenchymal stem cell transplantation for multiple sclerosis: it's time! *Stem Cell Rev Rep*. 2010;6(4):500-6.
141. Silvera MR, Sempowski GD, Phipps RP. Expression of tgf-beta isoforms by thy-1+ and thy-1- pulmonary fibroblast subsets: evidence for tgf-beta as a regulator of il-1-dependent stimulation of il-6. *Lymphokine Cytokine Res*. 1994;13:277-85.
142. Singh B, Shinagawa K, Taube C, Gelfand EW, Pabst R. Strain-specific differences in perivascular inflammation in lungs in two murine models of allergic airway inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2005;141(2):223-9.
143. Souza P, Rizzardi F, Noleto G, Atanazio M, Bianchi O, Parra ER, et al. Refractory remodeling of the microenvironment by abnormal type V collagen, apoptosis, and immune response in non-small cell lung cancer. *Human Pathol*. 2010;41:239-48.
144. Spees JL, Pociask DA, Sullivan DE, Whitney BJ, Lasky JA, Prockop DJ, et al. Engraftment of bone marrow progenitor cells in a rat model of asbestos-induced pulmonary fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med*. 2007;176:385-94.

145. Steele MP, Brown KK. Genetic predisposition to respiratory diseases: infiltrative lung diseases. *Respiration*. 2007;74(6):601-8.
146. Steve S. *Measurement of low concentration human serum cytokines using a millipore high-sensitivity milliplex assay*. 2014 [cited 2017 Oct 15]. Available from: <https://www.luminexcorp.com/blog/comprehensive-video-now-available-reviewing-millipores-high-sensitivity-milliplex-assay>.
147. Swigris JJ, Brown KK. Fibrose pulmonar idiopática: uma década de progressos. *J BrasPneumol*. 2006;32(3):249-60.
148. Taskar VS, Coultas DB. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(4):293-8.
149. Thabut G, Christie JD, Ravaud P, Castier Y, Dauriat G, Jebrak G, et al. Survival after bilateral versus single-lung transplantation for idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med*. 2009;151(11):767-74.
150. Thabut G, Mal H, Castier Y, Groussard O, Brugière O, Marrash-Chahla R, et al. Survival benefit of lung transplantation for patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126(2):469-75.
151. Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, et al. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem*. 2003;278:12384-9.
152. Theise ND, Henegariu O, Grove J, Jagirdara J, Kaod PN, Crawford JM, et al. Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow. *Exp Hematol*. 2002;30:1333-8.
153. Thickett DR, Armstrong L, Christie SJ and Millar AB. Vascular endothelial growth factor may contribute to increased vascular permeability in acute respiratory distress syndrome. *Am J Resp Crit Care Med*. 2001;164:1601-5.
154. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *New Engl J Med*. 1957;257(11):491-6.
155. Thomeer MJ, Costabel U, Rizzato G, Poletti V, Demedts M. Comparison of registries of interstitial lung diseases in three European countries. *Eur Respir J Suppl*. 2001;32:114-8.
156. Thrall RS, McCormick JR, Jack RM, McReynolds RA, Ward PA. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: inhibition by indomethacin. *Am J Pathol*. 1979;95(1):117-30.

157. Tiriveedhi V, Angaswamy N, Brand D, Weber J, Gelman AG, Hachem R, et al. A shift in the collagen V antigenic epitope leads to T helper phenotype switch and immune response to self-antigen leading to chronic lung allograft rejection. *Clin Exp Immunol*. 2012;167:158-68.
158. Tomioka H. Antioxidant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. A promising therapeutic prospect. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2009;26:83-4.
159. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler J, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:7552.
160. Umezawa H, Suhara Y, Takita T, Maeda K. New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot*. 1996;19:200-9.
161. Urvashi S, Loic C, Sandrine V, Natacha M, Rainier-Numa G, Frederic D, et al. Structural basis of homo- and heterotrimerization of collagen I. *Nat Commun*. 2017;8:14671.
162. Vanni I. *Obtenção, indicadores de qualidade e propriedades dos hormônios derivados de plaquetas humanas pela técnica de Lisado Plaquetário* [Dissertação]. Bocucatu: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2016.
163. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1852.
164. Visscher DW, Myers JL. Histologic spectrum of idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:322-9.
165. Ware LB, Eisner MD, Thompson BT, Parsons PE, Matthay MA. Significance of von Willebrand factor in septic and nonseptic patients with acute lung injury. *Am J Resp Crit Care Med*. 2004;170:766-72.
166. Willis G, Fernandez-Gonzalez A, Anastas J, Vitali S, Liu X, Ericsson M, et al. Mesenchymal stromal cell exosomes ameliorate experimental bronchopulmonary dysplasia and restore lung function through macrophage immunomodulation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197(1):104-116.
167. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Opathol*. 2008;214:199-210.
168. Wynn RF, Wraith JE, Mercer J, O'Meara A, Tylee K, Thornley M, et al. Improved metabolic correction in patients with lysosomal storage disease treated with hematopoietic stem cell transplant compared with enzyme replacement therapy. *J Pediatr*. 2009;154(4):609–11.

169. Xaubet A, Ancochea J, Morell F, Rodriguez-Arias JM, Villena V, Blanquer R, et al. Report on the incidence of interstitial lung diseases in Spain. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2004;21(1):64-70.
170. Xiang B, Chen L, Wang X, Zhao Y, Wang Y, Xiang C. Transplantation of menstrual blood-derived mesenchymal stem cells promotes the repair of lps-induced acute lung injury. *Int J Mol Sci.* 2017 Mar 27;18(4):E689.
171. Xu J, Woods CR, Mora AL, Joodi R, Brigham KL, Iyer S, et al. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;293:L131-41.
172. 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.* 2004;172:1266-72.
173. Zhang C, Yin X, Zhang J, Ao Q, Gu Y, Liu Y. Clinical observation of umbilical cord mesenchymal stem cell treatment of severe idiopathic pulmonary fibrosis: a case report. *Exp Ther Med.* 2017 May;13(5):1922-6.
174. Zhang Y, Khan D, Delling J, Tobiasch E. Mechanisms underlying the osteo- and adipodifferentiation of human mesenchymal stem cells. *Scient World J.* 2012;2012:1-14.
175. Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, Kugathasan L, Zhang Q, Stewart DJ. Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. *Circulation Research.* 2005;96:442-50.
176. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13:4279-95.

10 APÊNDICES

10 APÊNDICES

10.1 APÊNDICE A – Submissão do artigo referente a tese

11/08/2017

ScholarOne Manuscripts

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine

Home

Author

Review

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine

Manuscript ID

TERM-17-0389

Title

Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and their conditioned medium revert pulmonary and vascular lung remodeling by Collagen V-induced Th17 response modulation

Authors

Felix, Renato
Bovolato, Ana
Cotrim, Ondina
Leão, Patrícia
Batah, Sabrina
Golim, Marjorie
Velosa, Ana Paula
Teodoro, Walcy
Deffune, Elenice
Fabro, Alexandre
Capelozzi, Vera

Date Submitted

11-Aug-2017

[Author Dashboard](#)

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2017. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.
[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

10.2 APÊNDICE B – Artigo referente à Tese

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine

Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and their conditioned medium revert pulmonary and vascular lung remodeling by Collagen V-induced Th17 response modulation

Journal:	<i>Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Felix, Renato; Botucatu Medical School, São Paulo State University, Brazil Bovolato, Ana; Faculty of Medicine, São Paulo State University (UNESP), Blood Transfusion Center, Cell Engineering Lab. Cotrim, Ondina; Botucatu Medical School, São Paulo State University, Brazil Leão, Patrícia; Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo, Pathology and Legal Medicine Batah, Sabrina; Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo, Pathology and Legal Medicine Golim, Marjorie; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Faculdade de Medicina Campus de Botucatu, Hemocentro de Botucatu Velosa, Ana Paula; Faculty of Medicine, University of São Paulo Teodoro, Walcy; Faculty of Medicine, University of São Paulo Deffune, Elenice; Faculty of Medicine, São Paulo State University (UNESP), Blood Transfusion Center, Cell Engineering Lab. Fabro, Alexandre; Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo, Pathology and Legal Medicine; Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo Capelozzi, Vera; Faculty of Medicine, University of São Paulo
Keywords:	adipose-derived mesenchymal stem cells, conditioned medium, growth factors, cytokines, IL-17, bleomycin, collagen V, collagen fibers

SCHOLARONE™
Manuscripts

<http://mc.manuscriptcentral.com/term>

Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and their conditioned medium revert pulmonary and vascular lung remodeling by Collagen V-induced Th17 response modulation

Renato Gonçalves Felix⁽¹⁾, Ana Livia Carvalho Bovolato⁽¹⁾, Ondina Silvia Cotrim⁽¹⁾, Patricia dos Santos Leão⁽²⁾, Sabrina Setembre Batah⁽²⁾, Márjorie de Assis Golim⁽¹⁾, Ana Paula Velosa⁽³⁾, Walcy Teodoro⁽³⁾, Elenice Deffune⁽¹⁾, Alexandre Todorovic Fabro⁽²⁾, Vera Luiza Capelozzi⁽³⁾

⁽¹⁾ Botucatu Medical School, São Paulo State University, Brazil;

⁽²⁾ Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil;

⁽³⁾ Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Short Title: Cellular Therapy for Pulmonary Fibrosis

Correspondence to:

Prof Vera Luiza Capelozzi, Department of Pathology

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Av. Dr. Arnaldo 455, sala 1143, ZIP CODE 01296-903, São Paulo, SP, Brazil

Phone: 55-11 3061-7427; FAX – 55-11 3064-2744

E-mail: vera.capelozzi@fm.usp.br

Abbreviations

AD-MSC, adipose-derived mesenchymal stem cell; CM, conditioned medium in which adipose-derived mesenchymal stem cell were cultured; BLM, bleomycin lung injury.

ABSTRACT

The outcome of many long-term lung diseases may be pulmonary fibrosis, a excessive extracellular matrix deposition without effective treatment. Our aims is to study how adipose-derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) and their conditioned medium (CM) therapy might act on bleomycin model of pulmonary lung injury (BLM). Pulmonary fibrosis was intratracheally induced by bleomycin (1.5 U single dose) (BLM). After 10d BLM animals were further randomized into subgroups receiving saline (0.05mL), AD-MSC (1×10^6 cells in 0,2mL saline) or CM (0,05ml) intravenously. On day 14 and 21, MSC and CM were sacrificed to analyse by immunohistochemistry, immunofluorescence, electronic microscopy and ELISA assay. The AD-MSC and CM induce a dramatic reduced deposition of type I collagenic fibrils frequently seen around myofibroblast. Both decreased proinflammatory (NOS-2, Fibrinogen) cytokines and reduced TGF- β , PDGF, and VEGF and Von Willebrand contribute to endothelial and epithelial repair, respectively. An increased, abnormal and disrupted Collagen V expression in a bundle manner is related to a highlighted Th17 response expression. AD-MSC and CM therapy were effective at modulating the inflammatory and fibrogenic processes in BLM injury by attributing paracrine effects balance. A negative modulation of myofibroblast to produce collagen I related to an exacerbated collagen V-induced Th17 response may be a future therapeutic target to PF treatment.

Key words: adipose-derived mesenchymal stem cells; conditioned medium; collagen fibers; growth factors; cytokines; IL-17; bleomycin; collagen V.

1. INTRODUCTION

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is an overwhelming chronic progressive pulmonary disease with high morbidity and mortality and no effective treatment for this disease has been identified(Noth and Martinez, 2007). Nowadays, IPF is considered to be triggered by pro-inflammatory and noninflammatory pathways that lead to chronic epithelial injury. It may trigger cellular apoptosis and a dysregulated immune response characterized by activation of Th2 and Th17 cytokines(Thannickal, *et al.*, 2003, Willis, *et al.*, 2005). Lung transplantation remains the only option for many patients. Even though the symptomatic care for each of these conditions has improved. In addition, there is a severe deficiency of lungs donors and consequently the majority of patients on waiting lists die prior to transplantation. Moreover, after lung transplantation, the 5-year mortality rate is approximately 50%(Seiler, *et al.*, 2016) and new options are desperately needed.

Stem cells are being evaluated for their therapeutic potential in several lung diseases including pulmonary fibrosis(Ortiz, *et al.*, 2003, Reddy, *et al.*, 2016, Tashiro, *et al.*, 2015) and in some cases they acquires epithelial characteristics(Grove, *et al.*, 2002). After lung injury, the contribution of stem cells to lung repair has been reported in different injury models, such as Lipopolysaccharide-induced lung injury(Yamada, *et al.*, 2004), cystic fibrosis(Bruscia, *et al.*, 2006), radiation pneumonitis(Theise, *et al.*, 2002) and asbestos-induced pulmonary fibrosis(Spees, *et al.*, 2007). Nevertheless, very little is known about the potential of adipose-derived mesenchymal stem cells in bleomycin-induced lung fibrosis, of serving as useful vehicles to express genes that may alter the pulmonary epithelium, regardless of their ability to differentiate into lung cell types.

Numerous animal models have been developed to study the pathophysiology and pathogenesis of human fibrotic lung diseases(Moore and Hogaboam, 2008), and the bleomycin model is the best characterized model of pulmonary fibrosis. The drug was originally used as anti-neoplastic agent nevertheless its use was restricted by pulmonary toxicity and development of

pulmonary fibrosis(Moore and Hogaboam, 2008). The murine model has been most extensively evaluated for the protective or therapeutic effects of stem cells in fibrotic lung disease by intratracheal administration of bleomycin. Bleomycin-induced lung fibrosis is associated with an increase in classical pro-inflammatory cytokines including TNF- α , IL-1 β and IL-6 followed by a switch to pro-fibrotic markers(Laurent, *et al.*, 2008).

The specific properties of the lung replaced by fibrosis are based on the deposition of collagen types I, III and V, which coassemble into a unique macromolecule to form heterotypical fibers(Birk, *et al.*, 1990, Gelse, *et al.*, 2003). Collagen V (Col V) is the minor component of these fibers and is found between collagen I (Col I) and collagen III (Col III) fibrils. Only its amino-terminal portion regulates the diameter of heterotypic fibers, projecting to the outer surface and contributing to the development of functional properties of connective tissues(Roulet, *et al.*, 2007). Col V is present in the basement membrane (BM) of airways and alveolar walls synthesized by smooth muscle and endothelial cells(Konomi, *et al.*, 1984). We previously observed an increased of Col V expression in lungs of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and systemic sclerosis (SSc) patients and, of note, high deposition of this protein was associated with reduced vital capacity and diffusing capacity for carbon monoxide, indicating that this protein has a role in lung tissue fibrotic disorders(Parra, *et al.*, 2009, Parra, *et al.*, 2010). More recently, Fabro *et al.*(Fabro, *et al.*, 2015) reported that Th17 pathway in the peripheral lung microenvironment interacts with expression of collagen V in the late state of experimental pulmonary fibrosis.

To begin to address these issues, we compared the engraftment of systemically administered mesenchymal stem cells (MSCs) and their conditioned medium (CM) in lung tissue of exposed mice to bleomycin (BLM), which represents a well established model of lung injury resulting in pulmonary fibrosis. We also evaluated whether mesenchymal stem cells derived from adipocytes and the administration of their conditioned medium modulate remodeling of peripheral microenvironment by cytokine IL-17, TGF- β , endothelin and collagen V.

2. MATERIAL & METHODS

2.1. Animals

Pathogen-free male 40 Wistar rats, aged 8 weeks old, from the CEMIB - Multidisciplinary Center for Biological Research of Unicamp University were divided into 4 groups (Figure 1A): intratracheal bleomycin-instilled group (1.5U in 0.05mL of saline, single dose) (BLM); intratracheal saline-instilled group (0.05mL) (CTR); intratracheal bleomycin-instilled group and adipose-derived mesenchymal stem cell (1×10^6 cells in 0.5mL saline) (MSC) or their conditioned medium (0.5mL) (CM). The study was reviewed and approved by the Research Ethics Committee of Botucatu Medical School, São Paulo State University, under protocol n° 530/13 of 02.06.2014.

2.2. Experimental pulmonary fibrosis

Bleomycin was intratracheally administered at a 1.5 U single dose in BLM, MSC and CM group (Figure 1A) and saline was used in CTR group as previously described by our laboratory (Fabro, *et al.*, 2015).

2.3. Adipose-derived Mesenchymal stem cells and their conditioned medium treatment

The acquisition, processing, expansion and characterization of allogeneic mesenchymal stem cells of adipose tissue and their conditioned medium was performed as previously described by Bertanha (Bertanha, *et al.*, 2013). Briefly, adipose tissue is digested by collagenases and expanded by specific-medium culture plates. Flow cytometry with positive immunomarker for MSCs and large potential tissue differentiate was performed to characterize the MSCs.

After 10 days, the adipose-derived mesenchymal stem cells and their conditioned medium was infused into the caudal vein in MSC and CM group, respectively (Figure 1A).

After 21 days, all animals were sedated, anesthetized (10mg/Kg intraperitoneal ketamine from Park-Davis and 0,3mg/Kg xylazine from Rompum, Bayer, Brazil) and euthanized.

2.4. Histology

The right lung was fixed in 4% paraformaldehyde-PBS, and 3-mm sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histologic pattern analysis and combined Verhöff-Masson trichrome staining for total collagen evaluation of adventitia. The areal fraction of the total collagen fibers was quantified by image analysis according to the standard protocol of our laboratory, as described in detail by Silva et al (Silva, *et al.*, 2012).

2.5. Immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis was used to evaluate several inflammatory and fibrotic-related markers, as previously described by our research group (Garippo, *et al.*, 2006). We used the following antibodies: NOS2 (Sc-651, 1:1000 dilution); TGF Beta 1 (Sc-146, 1:500 dilution); VEGF (SC-152, 1:100 dilution); Endothelin-1 (Sc-21625, 1:100 dilution) and IL-17 (Sc-7927, dilution 1:100). These biomarkers were quantified using a conventional stereological method, as recommended by the ATS/ERS standards for quantitative assessment of lung structure (Hsia, *et al.*, 2010).

2.6. Immunofluorescence

The protein expression of collagen I and V of pulmonary parenchyma was performed by immunofluorescence. The image analysis was used to quantify the areal fraction occupied by the collagen fibers, as previously described by our research team (Parra, *et al.*, 2010).

2.7. ELISA assay

The plasma was obtained in 14d and 21d of all groups. The Fibrinogen, Von Willebrand Factor and PDGF was quantified by ELISA, as previously described by our laboratory group (Sandrim, *et al.*, 2016).

2.8. Electron microscopy

Ultrastructural immunohistochemical localization of the collagen fibers was performed using immunogold electron microscopy, following the protocol established by our laboratory (Prota, *et al.*, 2010).

2.9. Statistical analysis

The data were expressed as the mean $\pm$ standard deviation, using SPSS software v.13.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, 2004). The data were assessed using the t test and ANOVA with Tukey or Dunnett post hoc tests for multiple comparisons when the data were normal and the variances were homogeneous. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1. BLM-induced acute lung injury is shifted to a profibrotic pulmonary microenvironment

The BLM-induced lung injury is focused on alveolar cell damage and subsequent pulmonary inflammation. Its ability to produce oxygen radicals in the presence of iron and molecular oxygen is related to the fibrosis (Sausville, *et al.*, 1978).

To confirm the early stage of bleomycin induced lung injury characterized by its inflammatory process and alveolar-capillary membrane damage, we evaluate weight loss, a marker of inflammatory status; fibrinogen, a classical positive acute-phase reactant protein; and NOS-2, critical enzyme to the development of the acute inflammatory response to injury and necessary to control the late phase response.

After BLM instillation in the early stage, the weight loss is very expressive in the BLM group (Figure 1.B) and the dosage of fibrinogen in plasma by Elisa shows progressively reduced in BLM group, but it is always increased compared to others (Figure 1.A). In addition, in situ histomorphometry analysis

of NOS-2 by IHC reveals a higher immunoexpression in BLM than in control group (Figure 4-J). Our both findings reflect the turn-on of lung injury into a fibrotic late stage.

3.2. Parenchymal remodeling in late stage is extended into adventitial extracellular matrix deposition

The profibrotic microenvironment promotes the myofibroblastic activation with peripheral deposition of extracellular matrix during the late stage of the bleomycin models, resulting in an imbalance between the neoformation and degradation of collagen fibers (Fabro, *et al.*, 2015).

To determine profibrotic state in the late stage, we study the TGF- β , PDGF and Von Willebrand factor levels in plasma. The critical fibrogenic factors demonstrated higher levels in BLM group compared to control (Figure 2.B and C; Figure 4.A, B, C and G). Consequently, the histomorphology analysis establishes a highlighted broncovascular and extended alveolar septal thickening in the same group. Furthermore, the immunoexpression of collagen I by IF in BLM group indicates its prominent deposition in bronchovascular axis and peripheral septal walls as shown in figure 3-A, B, C and J. Ultrastructurally, these fibers are strongly disarranged and tend to accumulate around myofibroblasts (Figure 3.G, H and I).

Interestingly, parenchymal remodeling extended into adventitia of pulmonary vessels in the late stage due to profibrotic microenvironment triggering myofibroblastic activation. Thereby VEGF and Endothelin, essential mediators to vascular and parenchymal remodeling, are significantly increased in the BLM group in the late stage (Figure 4.I and K). Moreover, we show an intense deposition of extracellular matrix in adventitial layer of small vessels in BLM group (Figure 3.J, K, L and L).

3.3. Cell therapy reverts with efficiency pulmonary and vascular remodeling

Cell therapy can alter the lung microenvironment by secreting several mediators that lead to an attenuation of fibrosis and restoration of the alveolar architecture (Reddy, *et al.*, 2016, Srour and Thebaud, 2015).

To demonstrate the spectrum of effects after adipose-derived mesenchymal stem cells and their conditioned-medium infusion, we evaluated the early and late inflammatory and fibrotic processes and the vascular and parenchymal component. In both treated groups there is a significantly decrease of early inflammatory mediators, as Fibrinogen (Figure 2.A), NOS-2 (Figure 4.J); and late fibrotic mediator, as PDGF (Figure 2.C), TGF- β (Figure 4.A, B, C and G), Von Willebrand Factor (Figure 2.B), Endothelin (Figure 4.I) and VEGF (Figure 4.K). Furthermore they also reduce the vascular and parenchymal remodeling (Figure 3). Taken together, our all findings suggest a pre-immune and pre-myofibroblastic activation modulation to restore the usual lung architecture (Figure 5).

3.4. Collagen V-induced Th17 response is upexpressed by MSC e CM effect

Collagen V is a cryptogenic protein that may trigger a Th17-dependent immune response. A positive feedback loop between the collagen V and IL-17 expression patterns coordinates the maintenance of collagen I in the late stage of BLM model (Fabro, *et al.*, 2015, Parra, *et al.*, 2006, Wilson, *et al.*, 2010).

To investigate the protein expression of collagen V and IL-17, in situ histomorphometry analysis of both by IHC was performed. Surprisingly, Collagen V and IL-17 are upexpressed in both treated groups (Figure 3 and 4). Moreover, there is a significantly increase of collagen V in CM group compared to MSC group, suggesting a negative modulation of myofibroblast to produce collagen I, even with the exacerbated collagen V-induced Th17 response (Figure 5).

4. DISCUSSION

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

In the present study, early AD-MSC and CM venous infusion were effective in late stage of BLM-induced pulmonary fibrosis promoting critical recovery of vascular and parenchymal lung remodeling related to progressive modulation of inflammatory and profibrotic mediators in plasma and lung interstitium. Furthermore, the impact of AD-MSC and CM administration seemed to be diffuse, affecting all aspects of fibrotic lung injury (myofibroblastic activation, extracellular matrix deposition and lung remodeling), rather than specific pathways of injury or repair. These results were achieved despite a small degree of pulmonary engraftment, suggesting a prominent role of paracrine effects. In fact, we found a dramatic decrease of collagen I expression, the major myofibroblast-produced collagen fiber, and high IL-17 expression in late stage of MSC and CM group, as previously described (Reddy, *et al.*, 2016, Tashiro, *et al.*, 2015). Furthermore, AD-MSC and their CM reduced myofibroblast-produced collagen I in adventitial layers of small vessels, demonstrating a general pathophysiological process.

Unexpectedly, we demonstrated a better effect in group CM compared to MSC, indicating that immunomodulatory properties of adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned media are more effective than direct intercellular communications of AD-MSC (Li, *et al.*, 2015, Linero and Chaparro, 2014). Additionally, ultrastructural features of myofibroblastic activation (Eyden, 2008, Hinz, *et al.*, 2007), including fibronexus, rough endoplasmic reticulum and mitochondria, were not seen in MSC and CM compared to BLM, supporting the positive therapeutic effects found above. Previous experimental studies (Gupta, *et al.*, 2007, Xu, *et al.*, 2007, Yamada, *et al.*, 2004) have investigated the restorative capacity of bone marrow MSCs, showing a reduction in mortality rate and improvement in lung histology and systemic and local inflammatory responses. However, CM present disadvantages, such as culture conditions, that are detrimental for cell transplantation and risk of contamination and immunologic reactions. Based on these limitations, some investigators chose MSC, which can be easily and safely administered on the day of harvesting, and it can also express several genes involved in inflammatory response and chemotaxis, and present lower cost (Araujo, *et al.*, 2010, Ohnishi, *et al.*, 2007).

In murine models of BLM-induced fibrosis, venous infusion(Aguilar, *et al.*, 2009) or intrapulmonary instillation(Ortiz, *et al.*, 2003) of MSC reduced inflammatory response and ultrastructural analysis showed repair of damaged lungs(Ortiz, *et al.*, 2003), suggesting paracrine release of trophic factors by, or induced by, MSC(Gupta, *et al.*, 2007). In this context, MSC had the ability to do the following: 1) decrease proinflammatory cytokines such as NOS-2 and Fibrinogen; 2) increase growth factors (Endothelin), contributing to endothelial repair; and 3) reduce TGF- β , PDGF, and VEGF and Von Willebrand, which are involved in the fibroproliferative process contributing to epithelial repair.

VEGF protein was higher in BLM-induced fibrosis, which may contribute to increased vascular permeability and pulmonary edema in early BLM-induced fibrosis model(Thickett, *et al.*, 2001). MSC and CM therapy led to a further decrease in VEGF with possible protective and regenerative effects on pulmonary vascular endothelial cells, reducing the number of capillaries and reducing vascular permeability(Zhao, *et al.*, 2005). During recovery, VEGF may take part in angiogenesis, an important component of lung repair(Mura, *et al.*, 2004).

Von-Willebrand Factor and endothelin are important markers of endothelial activation and injury. Ware *et al.*(Ware, *et al.*, 2004) suggested hypothesis that plasma levels of von Willebrand factor (VWF), a marker of endothelial activation and injury, would be associated with clinical outcomes in acute lung injury. They found that baseline VWF levels were similar in patients with and without sepsis, and were significantly higher in non survivors versus survivors even when controlling for severity of illness, sepsis, and ventilator strategy. Higher VWF levels were also significantly associated with fewer organ failure-free days. They concluded that the degree of endothelial activation and injury is strongly associated with outcomes in ALI/ARDS, regardless of the presence or absence of sepsis, and is not modulated by a protective ventilatory strategy. To improve outcomes further, new treatment strategies targeted at the endothelium should be investigated.

Collagen fiber content was higher in BLM-induced fibrosis, which may be attributed to the higher degree of epithelial lesion and increased expression of

1
2
3
4 TGF- β , PDGF, and Von Willebrand(Pelosi and Rocco, 2008, Ware, *et al.*,
5 2004). MSC-treated rats had a marked reduction in the amount of collagen
6 fibers, probably related to the resulting decrease in inflammatory process and
7 growth factors (TGF- β , PDGF, and VEGF). Furthermore, efficient alveolar
8 epithelial repair may reduce the development of fibrosis due to the presence of
9 an intact alveolar epithelial layer suppresses fibroblast proliferation and matrix
10 deposition(Adamson, *et al.*, 1988). Along this line, in BLM groups treated with
11 MSC and CM, electron microscopic analysis demonstrated an increase in type
12 II epithelial cells and cells with no definitive phenotype repairing alveolar
13 epithelium.

14
15 In the current study, collagen V expression was progressively increased
16 among CTR, BLM, MSC and CM groups, respectively. Collagen V expression
17 was abnormal and disrupted assuming the shape of bundle, consequently
18 promoting the recognize of the immunogenic epitope of collagen V, similarly to
19 other interstitial lung diseases(Parra, *et al.*, 2009, Parra, *et al.*, 2006, Souza, *et al.*,
20 2010, Tiriveedhi, *et al.*, 2012). Recently, many of these diseases have been
21 related to Th17 response(Burlingham, *et al.*, 2007, Khoury, 2011). Interestingly,
22 we demonstrated that the IL-17 expression was equally higher in MSC and CM
23 compared to BLM group. Together, these findings suggest a positive feedback
24 triggered by treatment among collagen V, Th17 response and non-
25 myofibroblastic activation, in which misbalance between collagen I and V favors
26 collagen V-mediated Th17 response, blockade the myofibroblastic activation
27 and thereafter recovery of lung lesion. The exact mechanism of modulation of
28 myofibroblast by mesenchymal stem cell or their paracrine effect are not yet
29 known in pulmonary fibrosis. However, the regulation of IL-17 receptor may
30 intimately be involved in this process. The absence of IL-17 A receptor is
31 associated with the maintenance of peripheral pulmonary fibrosis in a collagen
32 V-induced Th17 response manner(Fabro, *et al.*, 2015). Here, the IL-17
33 receptors may differentially contribute to modulate the collagen I and V
34 production, however, the aim of study is not including this initial approach to
35 investigate it.

In summary, we showed that adipose-derived mesenchymal stem cell and their conditioned media therapy were effective at modulating the inflammatory and fibrogenic processes in BLM model. They act to modulate the myofibroblastic activation, especially in the collagen V-induced Th17 response manner. In addition, CM was more efficient to recovery lung remodeling due to strongly paracrine effects. Our study provides new insights about cellular therapy to regulate collagen V expression and the Th17 response that could serve as potential therapeutic targets in PF. Future studies should focus on elucidating the basic mechanisms responsible for the beneficial effects of MSC and MC, as well as resolving the practical issues involved in developing a cell-based therapy for patients, such as optimal dose and route of cell delivery.

Disclosure Statement

The author declares that he had no conflicts of interest with respect to his authorship or the publication of this article.

Funding sources

This study was supported by the following brazilian agencies: the National Council for Scientific and Technological Development [CNPq-471939/2010-2 and 483005/2012-6]; Foundation for the Support of Research of the State of São Paulo [FAPESP 12/03543-2, FAPESP11/09181-2, FAPESP 2012/07040-5, FAPESP 2013/05886-7]; and the Laboratories for Medical Research [LIMs], Hospital das Clinicas, University of São Paulo Medical School.

Author contributions statement

Study conception or design: RGF, ATF, ED, WT and VLC; Data acquisition: RGF, ALCB, OSC, PSL and SSB; Data analysis: RGF, ATF, ED, MAG and APV; Manuscript drafting: RGF, ALCB, OSC, PSL, SSB and MAG; Critical manuscript revision: WT, ED, ATF and VLC. All author approval the final manuscript.

Acknowledgments

The authors would like to thank the technician Paulo Cesar Georgete and Luiz Carlos Edevalter Bardella for excellent technical support in UNIPEX/UNESP. In addition, the authors thank Sandra de Moraes Fernezlian and Esmeralda Miristene Eher for their help with immunohistochemistry in FMUSP.

References

- Adamson IY, Young L, Bowden DH. 1988, Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis, *The American journal of pathology*, **130** (2): 377-383.
- Aguilar S, Scotton CJ, McNulty K, *et al.* 2009, Bone marrow stem cells expressing keratinocyte growth factor via an inducible lentivirus protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *PloS one*, **4** (11): e8013.
- Araujo IM, Abreu SC, Maron-Gutierrez T, *et al.* 2010, Bone marrow-derived mononuclear cell therapy in experimental pulmonary and extrapulmonary acute lung injury, *Critical care medicine*, **38** (8): 1733-1741.
- Bertanha M, Moroz A, Almeida R, *et al.* 2013, Tissue-engineered blood vessel substitute by reconstruction of endothelium using mesenchymal stem cells induced by platelet growth factors, *J Vasc Surg.*
- Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, *et al.* 1990, Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter, *Journal of cell science*, **95** (Pt 4): 649-657.
- Bruscia EM, Price JE, Cheng EC, *et al.* 2006, Assessment of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity in CFTR-null mice

- after bone marrow transplantation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103** (8): 2965-2970.
- Burlingham WJ, Love RB, Jankowska-Gan E, *et al.* 2007, IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants, *The Journal of clinical investigation*, **117** (11): 3498-3506.
- Eyden B. 2008, The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine, *Journal of cellular and molecular medicine*, **12** (1): 22-37.
- Fabro AT, da Silva PH, Zocolaro WS, *et al.* 2015, The Th17 pathway in the peripheral lung microenvironment interacts with expression of collagen V in the late state of experimental pulmonary fibrosis, *Immunobiology*, **220** (1): 124-135.
- Garippo AL, Parra ER, Teodoro WR, *et al.* 2006, Immune cell infiltration and broncovascular remodeling after nitric acid nasal instillation in a mouse bronchiolitis obliterans model, *Lung*, **184** (4): 229-238.
- Gelse K, Poschl E, Aigner T. 2003, Collagens--structure, function, and biosynthesis, *Advanced drug delivery reviews*, **55** (12): 1531-1546.
- Grove JE, Lutzko C, Priller J, *et al.* 2002, Marrow-derived cells as vehicles for delivery of gene therapy to pulmonary epithelium, *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **27** (6): 645-651.
- Gupta N, Su X, Popov B, *et al.* 2007, Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates

- endotoxin-induced acute lung injury in mice, *Journal of immunology*, **179** (3): 1855-1863.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, *et al.* 2007, The myofibroblast: one function, multiple origins, *The American journal of pathology*, **170** (6): 1807-1816.
- Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, *et al.* 2010, An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure, *American journal of respiratory and critical care medicine*, **181** (4): 394-418.
- Khoury SJ. 2011, Th17 and Treg balance in systemic sclerosis, *Clin Immunol*, **139** (3): 231-232.
- Konomi H, Hayashi T, Nakayasu K, *et al.* 1984, Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung, and skin. Immunohistochemical evidence by anti-collagen antibodies characterized by immunoelectroblotting, *The American journal of pathology*, **116** (3): 417-426.
- Laurent GJ, McAnulty RJ, Hill M, *et al.* 2008, Escape from the matrix: multiple mechanisms for fibroblast activation in pulmonary fibrosis, *Proceedings of the American Thoracic Society*, **5** (3): 311-315.
- Li X, Zhao H, Qi C, *et al.* 2015, Direct intercellular communications dominate the interaction between adipose-derived MSCs and myofibroblasts against cardiac fibrosis, *Protein & cell*, **6** (10): 735-745.
- Linero I, Chaparro O. 2014, Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration, *PloS one*, **9** (9): e107001.

- Moore BB, Hogaboam CM. 2008, Murine models of pulmonary fibrosis, *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, **294** (2): L152-160.
- Mura M, dos Santos CC, Stewart D, *et al.* 2004, Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury, *Journal of applied physiology*, **97** (5): 1605-1617.
- Noth I, Martinez FJ. 2007, Recent advances in idiopathic pulmonary fibrosis, *Chest*, **132** (2): 637-650.
- Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, *et al.* 2007, Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells, *Stem cells*, **25** (5): 1166-1177.
- Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, *et al.* 2003, Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (14): 8407-8411.
- Parra ER, Aguiar AC, Jr., Teodoro WR, *et al.* 2009, Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis, *Clin Respir J*, **3** (3): 135-142.
- Parra ER, Teodoro WR, de Moraes J, *et al.* 2010, Increased mRNA expression of collagen V gene in pulmonary fibrosis of systemic sclerosis, *Eur J Clin Invest*, **40** (2): 110-120.
- Parra ER, Teodoro WR, Velosa AP, *et al.* 2006, Interstitial and vascular type V collagen morphologic disorganization in usual interstitial pneumonia, *The*

journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society, **54** (12): 1315-1325.

Pelosi P, Rocco PR. 2008, Effects of mechanical ventilation on the extracellular matrix, *Intensive care medicine*, **34** (4): 631-639.

Prota LF, Lassance RM, Maron-Gutierrez T, *et al.* 2010, Bone marrow mononuclear cell therapy led to alveolar-capillary membrane repair, improving lung mechanics in endotoxin-induced acute lung injury, *Cell Transplant*, **19** (8): 965-971.

Reddy M, Fonseca L, Gowda S, *et al.* 2016, Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate Early Stage of Bleomycin Induced Pulmonary Fibrosis: Comparison with Pirfenidone, *International journal of stem cells*, **9** (2): 192-206.

Roulet M, Ruggiero F, Karsenty G, *et al.* 2007, A comprehensive study of the spatial and temporal expression of the col5a1 gene in mouse embryos: a clue for understanding collagen V function in developing connective tissues, *Cell and tissue research*, **327** (2): 323-332.

Sandrim VC, Dias MC, Bovolato AL, *et al.* 2016, Plasma from pre-eclamptic patients induces the expression of the anti-angiogenic miR-195-5p in endothelial cells, *Journal of cellular and molecular medicine*, **20** (6): 1198-1200.

Sausville EA, Stein RW, Peisach J, *et al.* 1978, Properties and products of the degradation of DNA by bleomycin and iron(II), *Biochemistry*, **17** (14): 2746-2754.

- Seiler A, Klaghofer R, Ture M, *et al.* 2016, A systematic review of health-related quality of life and psychological outcomes after lung transplantation, *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, **35** (2): 195-202.
- Silva PH, Parra ER, Zocolaro WS, *et al.* 2012, Immunophenotyping and extracellular matrix remodeling in pulmonary and extrapulmonary sarcoidosis, *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*, **38** (3): 321-330.
- Souza P, Rizzardi F, Noleto G, *et al.* 2010, Refractory remodeling of the microenvironment by abnormal type V collagen, apoptosis, and immune response in non-small cell lung cancer, *Human pathology*, **41** (2): 239-248.
- Spees JL, Pociask DA, Sullivan DE, *et al.* 2007, Engraftment of bone marrow progenitor cells in a rat model of asbestos-induced pulmonary fibrosis, *American journal of respiratory and critical care medicine*, **176** (4): 385-394.
- Srour N, Thebaud B. 2015, Mesenchymal Stromal Cells in Animal Bleomycin Pulmonary Fibrosis Models: A Systematic Review, *Stem cells translational medicine*, **4** (12): 1500-1510.
- Tashiro J, Elliot SJ, Gerth DJ, *et al.* 2015, Therapeutic benefits of young, but not old, adipose-derived mesenchymal stem cells in a chronic mouse model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, **166** (6): 554-567.

- Thannickal VJ, Lee DY, White ES, *et al.* 2003, Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase, *The Journal of biological chemistry*, **278** (14): 12384-12389.
- Theise ND, Henegariu O, Grove J, *et al.* 2002, Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow, *Experimental hematology*, **30** (11): 1333-1338.
- Thickett DR, Armstrong L, Christie SJ, *et al.* 2001, Vascular endothelial growth factor may contribute to increased vascular permeability in acute respiratory distress syndrome, *American journal of respiratory and critical care medicine*, **164** (9): 1601-1605.
- Tiriveedhi V, Angaswamy N, Brand D, *et al.* 2012, A shift in the collagen V antigenic epitope leads to T helper phenotype switch and immune response to self-antigen leading to chronic lung allograft rejection, *Clin Exp Immunol*, **167** (1): 158-168.
- Ware LB, Eisner MD, Thompson BT, *et al.* 2004, Significance of von Willebrand factor in septic and nonseptic patients with acute lung injury, *American journal of respiratory and critical care medicine*, **170** (7): 766-772.
- Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, *et al.* 2005, Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis, *The American journal of pathology*, **166** (5): 1321-1332.

- Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, *et al.* 2010, Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent, *The Journal of experimental medicine*, **207** (3): 535-552.
- Xu J, Woods CR, Mora AL, *et al.* 2007, Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice, *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, **293** (1): L131-141.
- Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, *et al.* 2004, Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury, *Journal of immunology*, **172** (2): 1266-1272.
- Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, *et al.* 2005, Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease, *Circulation research*, **96** (4): 442-450.

Figures Legend

Figure 1 – Experimental Design and Weight difference. A – Note that the BLM instillation (I) is D0 and MSC/CM instillation is D10. Saline is used as control. B – The weight loss is heightened in BLM group, however cell therapy changes the inflammatory condition. * $p < 0.05$ vs BLM; ** $p < 0.01$ vs BLM.

Figure 2 – Plasmatic inflammatory and fibrotic mediator levels. A – Fibrinogen is related to acute injury. Note the decrease levels in MSC/CM groups. B – Von Willebrand Factor is attenuated after cellular therapy

compared to BLM group. C- PDGF is a very important fibrogenic factor and shows the same pattern of von Willebrand Factor. γ $p < 0.05$ vs BLM; δ $p < 0.01$ vs CTR.

Figure 3 – Panel of extracellular matrix profile. The expression of collagen I is strong and diffuse in the pulmonary parenchyma in the BLM group (A) compared to MSC (B) and CM (C). In contrast, MSC (E) and CM (F) groups collagen v is strongly expressed in disrupt and bundle manner compared to BLM group (D). Ultrastruturally, large deposits of colagenic fibrils is frequently seen aroud myofibroplastic in BLM (G) group compared to MSC (H) and CM (I) group. Note the “silent” fibroblast in both last groups. The deposition of extracellular matrix extends into adventitia of small vessels ($< 50\mu\text{m}$ of diameter) in BLM group (J) compared to MSC (K) and CM (L). Collagen I (J), Collagen V (K) and Adventitia of small vessels were quantified by morphometric analysis as described by ATS/ERS standand protocol. Note the upexpression of collagen I and deposition of extracellular matrix in adventitia in BLM group. On other hand, Collagen V shows a progressive increase among BLM, MSC and MC in the late stage.

Figure 4 – Panel of inflammatory and fibrotic mediator in situ by IHC. Fibrotic areas show a interstitial overexpressed TGF- β in BLM group (A) compared to MSC (B) and CM (C). IL-17 shows interstitial expression stronger in MSC (E) and CM (F) group than in BLM group (D). By morphomentric analysis, as described by ATS/ERS standand protocol, TGF- β (G), IL-17 (H), Endothelin-1 (I), NOS-2 (J) and VEGF (K) are seen. All fibrotic mediator, as TGF- β , Endothelin-1 and VEGF show decreased expression in the treated groups (MSC and CM) compared to BLM group, except IL-17 (H). NOS-2 is also reduced because it is a inflammatory marker (J).

Figure 5 - Pathophysiological scheme of the crosstalking between collagen V and IL-17 after MSC and CM treatment. Collagen V is highly immunogenicity, especially in bundle and disrupt as here, inducing and faciliating a Th17 response. However, the mesenchymal stem cells or their conditioned medium infusion alter the physiologic pathways of miofibroblasts to produce

extracellular matrix as collagen I. Their conditioned medium treatment seems to show a lower Th17 response compared to MSC group, because there is more Collagen V expression, but the same levels of IL-17. Taken together, our results suggesting a critical modulation of myofibroblastic activation and Th17 maturation in the late stage of bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

For Peer Review

Figure 1 – Experimental Design and Weight difference. A – Note that the BLM instillation (I) is D0 and MSC/CM instillation is D10. Saline is used as control. B – The weight loss is heightened in BLM group, however cell therapy changes the inflammatory condition. * $p < 0.05$ vs BLM; ** $p < 0.01$ vs BLM.

116x141mm (150 x 150 DPI)

Figure 2 – Plasmatic inflammatory and fibrotic mediator levels. A – Fibrinogen is related to acute injury. Note the decrease levels in MSC/CM groups. B – Von Willebrand Factor is attenuated after cellular therapy compared to BLM group. C- PDGF is a very important fibrogenic factor and shows the same pattern of von Willebrand Factor. γ p<0.05 vs BLM; δ p<0.01 vs CTR.

212x72mm (150 x 150 DPI)

Figure 3 – Panel of extracellular matrix profile. The expression of collagen I is strong and diffuse in the pulmonary parenchyma in the BLM group (A) compared to MSC (B) and CM (C). In contrast, MSC (E) and CM (F) groups collagen v is strongly expressed in disrupt and bundle manner compared to BLM group (D). Ultrastructurally, large deposits of collagenic fibrils are frequently seen around myofibroblastic in BLM (G) group compared to MSC (H) and CM (I) group. Note the "silent" fibroblast in both last groups. The deposition of extracellular matrix extends into adventitia of small vessels (<50µm of diameter) in BLM group (J) compared to MSC (K) and CM (L). Collagen I (J), Collagen V (K) and Adventitia of small vessels were quantified by morphometric analysis as described by ATS/ERS standard protocol. Note the upexpression of collagen I and deposition of extracellular matrix in adventitia in BLM group. On other hand, Collagen V shows a progressive increase among BLM, MSC and MC in the late stage.

179x258mm (150 x 150 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Figure 4 – Panel of inflammatory and fibrotic mediator in situ by IHC. Fibrotic areas show a interstitial overexpressed TGF- β in BLM group (A) compared to MSC (B) and CM (C). IL-17 shows interstitial expression stronger in MSC (E) and CM (F) group than in BLM group (D). By morphometric analysis, as described by ATS/ERS standard protocol, TGF- β (G), IL-17 (H), Endothelin-1 (I), NOS-2 (J) and VEGF (K) are seen. All fibrotic mediator, as TGF- β , Endothelin-1 and VEGF show decreased expression in the treated groups (MSC and CM) compared to BLM group, except IL-17 (H). NOS-2 is also reduced because it is a inflammatory marker (J).

179x218mm (150 x 150 DPI)

Figure 5 - Pathophysiological scheme of the crosstalk between collagen V and IL-17 after MSC and CM treatment. Collagen V is highly immunogenicity, especially in bundle and disrupt as here, inducing and facilitating a Th17 response. However, the mesenchymal stem cells or their conditioned medium infusion alter the physiologic pathways of miofibroblasts to produce extracellular matrix as collagen I. Their conditioned medium treatment seems to show a lower Th17 response compared to MSC group, because there is more Collagen V expression, but the same levels of IL-17. Taken together, our results suggesting a critical modulation of myofibroblastic activation and Th17 maturation in the late stage of bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

249x170mm (150 x 150 DPI)