JOSÉ MANUEL CÓNDOR CAPCHA

**Células-tronco mesenquimais derivados da geleia de Wharton
na injúria cardiopulmonar e neuroimunomodulação sistêmica
na sepse**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Dra. Samirah Abreu Gomes

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

Cóndor Capcha, José Manuel
Células-tronco mesenquimais derivados da geleia
de Wharton na injúria cardiopulmonar e
neuroimunomodulação sistêmica na sepse / José Manuel
Cóndor Capcha. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Samirah Abreu Gomes .

Descritores: 1.Sepse 2.Transplante de células-
tronco mesenquimais 3.Cordão umbilical 4.Geleia de
Wharton 5.Terapia celular 6.Neuroimunomodulação
7.Receptor nicotínico de acetilcolina alfa7

USP/FM/DBD-162/18

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

DEDICATÓRIA

À minha mãe Luisa, pelo amor e dedicação incondicional em todos os momentos da minha vida, pelo exemplo de vida e por me fazer, a cada dia, uma pessoa melhor.

À minha família, pelo carinho e apoio em distintas fases de minha vida.

Às minhas orientadoras Samirah e Lúcia, pela confiança, exemplo, apoio, força e pelos ânimos em cada momento.

Aos meus amigos e mestres, pelas lições de vida.

AGRADECIMENTOS

Essa tese de doutorado é o resultado da dedicação e da contribuição de muitos esforços pois nada seria possível sem a colaboração de grandes pessoas. Com recordação, entusiasmo e muitos sentimentos encontrados agradeço:

À minha orientadora, médica e pesquisadora exemplar, **Dra. Samirah Abreu Gomes**, pelas lições e direcionamentos sobre a pesquisa com ética e responsabilidade. Em uma visão integral interdisciplinar e de muitas colaborações. Claramente com diplomacia, empatia e quando não com uma gargalhada. Obrigado não só por ser a minha orientadora, mas também como uma amiga e irmã. Agradeço infinitamente de coração as sugestões e recomendações de vida e pelas oportunidades fora do Brasil.

À minha co-orientadora, médica e pesquisadora exemplar, **Profa. Dra. Lúcia da Conceição Andrade**, pela oportunidade desde quando comecei a pós-graduação, pela confiança, apoio e incentivo na execução desse trabalho. Agradeço de coração não somente por ser uma excelente co- e orientadora, mas também por ser como uma mãe nesta fase de minha vida, pelos conselhos, apoio, carinho e pelas oportunidades a frente. Minha grande admiração e eterna gratidão para sua pessoa.

À **Dra. Camila Eleuterio Rodrigues**, pela ajuda, sugestões e sempre com a disponibilidade para trabalhar nesse mundo experimental das células-tronco, seps e outras doenças. Você foi uma grande parceira para poder conseguir a obtenção e caracterização dessas células. Fico verdadeiramente grato, aprendi muitas coisas com você.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Seguro**, que me recebeu desde o primeiro dia que fui ao laboratório, muito obrigado pelos conselhos e pela calorosa acolhida no LIM 12.

Ao **Dr. Marcelo Augusto Silveira** e à **Ms. Daniela Ferreira**, pelo entusiasmo e momentos especiais que vivemos durante essa pós-graduação, além do apoio incondicional em diversas dificuldades, fico grato pelos conselhos e sua forma especial de enxergar a vida. Vocês são grandes amigos que levarei presente.

Ao **Prof. Dr. Roberto Moreira Souza**, pelas sugestões e ensinamentos não somente na parte acadêmica, mas também no acontecer da vida diária. Fico agradecido pela amizade, parceria na bancada e apoio incondicional, vou lembrar sempre desse grande parceiro corinthiano.

À **Ms. Nathalia Moreira Santos e família**, com menção especial, pelo apoio e carinho desde o início quando cheguei ao Brasil e durante minha estadia, minha irmãzinha e a família que me adotou, vou agradecer sempre esse gesto de amor. Estarei eternamente agradecido com vocês.

Aos colegas do LIM 12, **Dra. Talita Sanches, Leticia Urbano, Dra. Karin, Prof. Dr. Antonio José Barros Magaldi, Profa. Dra. Cláudia Helou Maria, Dra. Maria Heloisa Massola Shimizu, Dr. Emmanuel Burdman, Dr. Luis Yu, Dra. Daniele Canale, Dr. Rildo Aparecido Volpini, Dra. Carol Bragança, Dr. Pedro Gois, Adriana, Igor Oliveira**, pelas sugestões e boa convivência no laboratório.

Aos funcionários do LIM 12, **Nivaldo, Eloá, Mirela e Denisse**, pelo apoio administrativo e logístico, sugestões, dicas e muitas coisas mais. Sempre vou agradecer aqueles divertidos momentos compartilhados.

À **Profa. Dra. Irene de Lourdes Noronha**, pelo suporte na cultura celular, citometria de fluxo e imunofluorescência dentro do laboratório LIM 29.

À **Dra. Margoth Ramos Garnica**, pela amizade e apoio incondicional em diversas situações, especialmente na logística dos experimentos e na imunofluorescência. Fico muito grato pelo seu entusiasmo e no acontecer do dia a dia no laboratório.

Aos meus amigos do LIM 29, **Priscila, Cleonice, Talita, Rita Caligleri, Rafael Pepinelli, Mirtes, Andressa, Camila Faneli, Marcia, Marciana e Jessica** pelas sugestões e principalmente pelo carinho e atenção em cada momento. Graças a vocês o LIM 29 ficou um lugar tão agradável.

À **Ms. Fernanda Fregnan Zambom**, pela amizade, sugestões e sempre com a disponibilidade de me apoiar na escrita portuguesa. Fico verdadeiramente grato, vou ficar com saudade dessas conversas na hora do almoço.

Aos meus amigos do LIM 16, **Amanda, Neto, Rafael, Carol, Karen, Viviane, Flavia, Wagner, Ivone, Simone, Solange, Lucia, Prof, Roberto Zatz, Profa. Clarice entre outros**, pela amizade e receptividade no Laboratório, pelas sugestões e principalmente e atenção em cada momento.

À **Profa. Dra. Maria Irigoyen**, pelas sugestões na qualificação, pelo apoio e suporte nos experimentos hemodinâmicos e cardiovasculares. Fico muito agradecido por abrir as portas do seu laboratório.

Aos meus amigos do Laboratório de hipertensão, **Leandro, Fernando, Maikon e Paulo Dourado**, pela ajuda logística e sugestões na bancada.

À **Profa. Dra. Ângela do Valle**, pela amizade, apoio e suporte na cirurgia estereotáxica e registros de eletroencefalograma. Fico muito agradecido pelo entusiasmo e ajuda incondicional

Aos meus amigos da FMUSP, **Jânio, Tânia, Priscila, Cynthia, Juliana, Andrés, Alexandre, Adalberto, Sergio, Natalia Madureira e Larissa**, pela amizade e atenção em diversos momentos.

Aos meus amigos peruanos no Brasil, **Yohel Mendoza, Marcos Sulca, Francisco Miroslav, Hector Victorino, Alex, Juvissan Ariza, Edgar e William Roldan**, pela ajuda e companhia.

À **Dra. Jessica Contreras Guadalupe** e família, pelo apoio e companhia em diversos momentos do doutorado. Fico muito agradecido pela receptividade e a atenção.

À **Dra. Estheysi Elias Solis**, pela amizade, apoio e companhia nessa última fase do doutorado. Estou muito agradecido pelos conselhos e pela forma especial para enxergar a vida.

À minha querida **Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Escuela de Tecnologia Médica**, minha alma *mater*, com quem sempre estarei em dívida, aprendi muitas lições, moldei os meus pensamentos e minha forma de olhar o dia a dia. Nessa linha, fico eternamente agradecido com os mestres, colegas e amigos com quem

compartilhei a fase de graduação. UNMSM você é e será sempre um orgulho e um dos motivos para transcender e continuar lutando na vida. Assim como vários de seus ex-alunos ilustres.

À **Universidade São Paulo**, exemplo de excelência acadêmica no Brasil. Fico muito orgulhoso de me formar como doutor e pertencer a sua comunidade. Estou muito agradecido por tudo o suporte para tornar esse sonho em realidade.

Aos meus amigos brasileiros e estrangeiros de muitos e gratos momentos compartilhados, **Ana Paula, Alexandra Pava, Jessica Miranda, Wilfredo, Mara, Greice, Edna, Fabiana, Bruna Vaz, Mônica, Rosilene, Juliano, Ivani, Ítalo, Jhenyfer e Marcio**. Fico muito agradecido pela atenção e a amizade, sempre lembrarei de vocês.

À FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo), pelo suporte e financiamento do presente trabalho. Fico infinitamente agradecido pelas bolsas de Mestrado e Doutorado, assim como financiamento através do projeto temático.

E a todos aqueles que por ventura não foram mencionados aqui, mais que contribuíram para este sonho, muitíssimo obrigado.

EPIGRAFE

Science is not only a disciple of reason but, also, one of
romance and passion

(Tradução livre)

*“A ciência não é apenas um discípulo da razão, mas
também um romance e uma paixão”*

Stephen Hawking
(1942-2018)

Esta dissertação ou 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 e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Sepses	02
1.2. Fisiopatologia da sepsis	06
1.3. Reflexo Inflamatório e neuromodulação via colinérgica anti-inflamatória	14
1.4. Disfunção da atividade autonômica na sepsis	17
1.5. Modelos experimentais de sepsis	20
1.6. Terapias na sepsis	22
1.7. Células-tronco mesenquimais	23
1.8. Células-tronco mesenquimais derivadas da geleia de wharton	27
1.9. Células-tronco mesenquimais na sepsis e neuroimunomodulação	28
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. MÉTODOS	36
3.1. Considerações gerais	37
3.2. Desenho experimental	39
3.2.1. Grupos experimentais	39
3.2.1. Cálculo do número de animais	39
3.2.3. Avaliações	39
3.3. Indução de sepsis e tratamento	41
3.4. Obtenção, cultivo e expansão das CTM de cordão umbilical humano	43
3.4.1. Método de tripsinização celular	44
3.5. Caracterização das células-tronco mesenquimais	46
3.5.1. Imunofenotipagem	46
3.5.2. Imunofluorescência	47
3.5.3. Ensaios de diferenciações	48

3.6. Ecocardiograma.....	49
3.7. Canulação e medidas hemodinâmicas	56
3.8. Avaliação do reflexo pressorreceptor.....	58
3.9. Avaliação autonômica.....	60
3.9.1. Análise espectral e espectral cruzada.	60
3.9.2. Avaliação do controle autonômico.....	60
3.10. Análise de gases arteriais.....	61
3.11. Eutanásia dos animais.....	62
3.12. Análise da atividade da mieloperoxidase (MPO)	62
3.13. Medição hematológica.....	62
3.14. Coleta do baço e obtenção de esplenócitos.....	63
3.15. Subpopulações linfocitárias.....	63
3.16. Estudo da expressão de proteínas	64
3.16.1. Western blot	64
3.16.1. Medidas das citocinas.	65
3.17. Estudo histológico.....	66
3.17.1. Estudo de imuno-histoquímica.....	66
3.16.2. Estudo morte celular no pulmão, baço e intestino.....	67
3.18. Análise estatística.....	68
4. RESULTADOS.....	69
4.1. Obtenção e caracterização das células-tronco mesenquimais da geleia da Wharton (CTM-GW)	70
4.2. Avaliação cardíaca.....	75
4.2.1. Medições morfológicas.....	75
4.2.2. Função global e sistólica.....	76
4.2.3. Função diastólica.....	78
4.3. Avaliação hemodinâmica.....	81
4.4. Avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores.....	82
4.5. Avaliação Autonômica.....	84
4.5.1. Análise espectral.....	84
4.6. Avaliação pulmonar.....	89
4.6.1. Gasometria.....	89
4.6.2. Infiltração de Macrófagos no Pulmão.....	90
4.6.3. Medição da atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO)	92
4.7. Avaliação celular e imunológica	94

4.7.1. Medidas hematológicas.....	94
4.7.2. Perfil de citocinas em soro.....	96
4.7.3. Perfil de citocinas no baço.....	98
4.8. Expressão de marcadores proteicos.....	102
4.8.1. Expressão do TLR4 e o receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$	102
4.8.2. Expressão do p-STAT3 e STAT3 Total no baço.....	105
4.9. Apoptose – TUNEL.....	107
5. DISCUSSÃO.....	112
6. CONCLUSÕES.....	128
7. REFERÊNCIAS.....	130
8. ANEXOS.....	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
$\alpha 7$ nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$
ATB	Antibiótico
Bpm	Batimentos por minuto
C5a	Componente 5a complemento
CID	Coagulação intravascular disseminada
CLP	do inglês, <i>Cecal ligation puncture</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Células-tronco
CTH	Células-tronco hematopoiéticas
CTM	Células-tronco mesenquimais
CTM-GW	CTM derivadas da geleia de wharton
CTR	Células-tronco adultas residentes
dL	Decilitros
DMOS	Disfunção de múltiplos órgãos
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	do inglês, <i>US Food and Drug Administration</i>
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
FR	Frequência respiratória
FSC	Fator de células-tronco
FT	Fator tissular
G	Gravitacional
GW	Geleia de Wharton
H ₂ O	Água
HIF	Fator de indução de hipóxia
HLA-DR	do inglês, <i>Human leukocyte antigen - DR</i>
HMGB1	do inglês, <i>High Mobility Group Box Protein Type 1</i>
IC	Intervalo de confiança
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleucina

IL-10	Interleucina 10
INR	<i>International normalized ratio</i>
iPS	Células pluripotentes induzidas
IR	insuficiência respiratória aguda
IRA	Injúria renal aguda
K	Potássio
Kg	Quilogramas
LPC	Ligadura e punção do ceco
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Fenótipo do macrófago pro-inflamatório
M2	Fenótipo anti-inflamatório
mEq	Miliequivalentes
mg	Miligramas
MLA	Metillicaconitine
MHC	do inglês, <i>Major histocompatibility complex</i>
MIF	Fator inibidor de macrófagos
mm ²	Milímetros quadrados
mmHg	Milímetros de mercúrio
MSC	do inglês, <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
°C	Graus centígrados
P	Fósforo
P1	Passagem 1
PaCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono.
PAI- 1	do inglês, <i>Plasminogen-activator inhibitor type- 1</i>
PAM	Pressão arterial média
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PAS/D	Pressão arterial sistólica/diastólica
PBS	Solução buffer fosfato
PCO ₂	Pressão parcial de monóxido de carbono no sangue arterial
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão

SARA	Síndrome da angústia respiratória do adulto
SHAM	Animal ou grupo controle
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SNA	Sistema nervoso autônomo
SRAC	Síndrome de resposta anti-inflamatória compensatória
SVO2	Saturação venosa de oxigênio
TA	Tecido adiposo
TCD4+	Células T ou linfócitos T CD4+
TGF	Taxa de filtração glomerular
TGF- β 1	Fator de crescimento transformante β 1
Th1	Fenótipo pró-inflamatório das células T CD4+
Th2	Fenótipo anti-inflamatório das células T CD4+
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Tempo de atividade da protrombina
Tregs	Células T reguladoras
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
UI	Unidades internacionais
UTI	Unidade de Terapia Intensiva.
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
α 7nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina α 7

LISTA FIGURAS

Figura 1 - Ativação da via canônica do NF-KB.....	09
Figura 2 - Resposta imune do hospedeiro na sepse.....	12
Figura 3 - Resposta imune e morte na sepse.....	13
Figura 4 - Reflexo inflamatório e modulação via colinérgica anti-inflamatória.....	16
Figura 5 - Variabilidade da frequência cardíaca em um registro de eletrocardiograma de 24 horas.....	19
Figura 6 - Modelo ligadura e punção do ceco (LPC)	21
Figura 7 - Células-tronco Mesenquimais da geleia de wharton (CTM-GW) na sepse	32
Figura 8 - Plano de trabalho desde a submissão ao comitê de ética e coleta do material biológico até as avaliações funcionais	38
Figura 9 - Desenho do experimento.....	41
Figura 10 - Indução da sepse	42
Figura 11 - Processamento do cordão umbilical	45
Figura 12 - Avaliação no modo-M do Ventrículo Esquerdo.....	53
Figura 13 - Análise de pressorreceptores.....	59
Figura 14 - Células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton em cultura	71
Figura 15 - Imunofenotipagem das células-tronco da geleia de Wharton (Passagem 3, P3)	72

Figura 16 - Imunofluorescência das células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton.....	73
Figura 17 - Diferenciação das células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton.....	74
Figura 18 - Função geral e sistólica, avaliada 24 horas após a indução da sepse.....	77
Figura 19 - Função diastólica, avaliada 24 horas após a indução da sepse.....	79
Figura 20 - Função diastólica aferido pelo doppler, avaliada 24 horas após a indução da sepse.....	80
Figura 21 - Sensibilidade dos presorreceptores, avaliada 24 horas após a indução da sepse.....	83
Figura 22 - Análise espectral no domínio da frequência cardíaca de sepse.....	87
Figura 23 - Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica e índice alfa.....	88
Figura 24 - Número de células CD68 positivas (%) do parênquima pulmonar, avaliada 24 horas após a indução da sepse.....	90
Figura 25 - Imunolocalização de macrófagos (células CD68+) do parênquima pulmonar, avaliada 24 horas após a indução de sepse	91
Figura 26 - Medição da atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO), avaliada 24 horas após a indução da sepse	93
Figura 27 - Medição de parâmetros hematológicos, avaliada 24 horas após a indução da sepse.....	95

Figura 28 - Medida de citocinas pró-inflamatórias no baço, avaliada 24 horas após a indução de sepse.....	100
Figura 29 - Medida de citocinas anti-inflamatórias e VEGF no baço, avaliada 24 horas após a indução de sepse.....	101
Figura 30 - Expressão do TLR4 e o receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$)	104
Figura 31 - Expressão do p-STAT3 e STAT3 TOTAL no baço, análise da relação..	106
Figura 32 - Células TUNEL positivas (%) do parênquima pulmonar e esplênico.....	108
Figura 33 - Reação TUNEL por imunofluorescência no pulmão.....	109
Figura 34 - Reação TUNEL por imunofluorescência no baço.....	110
Figura 35 - Reação TUNEL por imunofluorescência no intestino.....	111
Figura 36 - Mecanismo proposto dos efeitos das CTM-GW na sepse.....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Novos termos e definições da sepse “2016”	04
Tabela 2 - Avaliação sequencial [relacionada à sepse] de disfunção orgânica (SOFA)	05
Tabela 3 - Estudos pré-clínicos sobre a terapia com células-tronco mesenquimais na sepse	30
Tabela 4 - Anticorpos usados na caracterização das CTM-GW por citometria de fluxo	46
Tabela 5 - Parâmetros morfológicos do ventrículo esquerdo.....	75
Tabela 6 - Função geral e sistólica.....	76
Tabela 7 - Função diastólica.....	78
Tabela 8 - Função hemodinâmica	81
Tabela 9 - Pressoreceptores.....	82
Tabela 10 - Análise espectral no domínio da frequência cardíaca	85
Tabela 11 - Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica e índice alfa.....	86
Tabela 12 - Gasometria arterial.....	89
Tabela 13 - Infiltração de macrófagos no pulmão	90
Tabela 14 - Medição da atividade da mieloperoxidase pulmonar.....	92
Tabela 15 - Dados hematológicos	94
Tabela 16 - Perfil de citocinas em soro.....	97
Tabela 17 - Perfil de citocinas no baço.....	99
Tabela 18 - Expressão do TLR4 e o receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ no baço.....	103
Tabela 19 - Expressão do TLR4 e o receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ no coração.....	103
Tabela 20 - Relação p-STAT3 e STAT3.....	105

RESUMO

Cóndor Capcha JM. *Células-tronco mesenquimais derivados da geleia de Wharton na injúria cardiopulmonar e neuroimunomodulação sistêmica na sepse* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A sepse causa uma alta taxa de mortalidade no mundo. A fisiopatologia da doença envolve uma rede complexa de mediadores inflamatórios que promovem a lesão de diversos tecidos, além de diversas alterações hemodinâmicas e disfunção do sistema nervoso autônomo (SNA). Assim sabe-se que o sistema nervoso cumpre um papel importante no controle da inflamação sistêmica mediante a via colinérgica anti-inflamatória (VCA) através do receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$). O uso das células-tronco mesenquimais (CTM) tem mostrado efeitos benéficos em diversos ensaios clínicos de doenças inflamatórias. Neste contexto, as células-tronco mesenquimais derivadas da geleia de Wharton do cordão umbilical (CTM-GW) tornam-se promissórias, uma vez que essas células são reconhecidas pela regulação da resposta imunológica, reparação neural, efeito anti-apoptose, assim como a melhora da sobrevida na sepse, em modelos experimentais. Nossa hipótese foi de que as CTM-GW poderiam cumprir um papel neuroimunomodulador através da VCA e atenuar a disfunção de múltiplos órgãos em um modelo animal de sepse de ligadura e punção do ceco (LPC). Inicialmente células da matriz do cordão umbilical foram isoladas e caracterizadas de acordo com o consenso internacional vigente. Ratos Wistar machos adultos foram subdivididos em grupos: 1) **sham** (operação simulada); 2) **LPC**; 3) **LPC+CTM-GW** (injetado 10^6 CTM-GW via intraperitoneal, i.p. 6 h após LPC) e 4) **LPC+MLA+CTM-GW** (MLA: Metillicaconitine, *antagonista do $\alpha 7nAChR$* , i.p., 5:30 h após LPC e 10^6 CTM-GW 6h após). Às 24 horas após LPC, foram avaliadas a função cardiovascular, hemodinâmica assim como os outros parâmetros. Interessantemente, o tratamento com CTM-GW na sepse atenuou a disfunção diastólica e protegeu a sensibilidade baroreflexa. Além disso, as CTM-GW estimularam a atividade autônoma, simpática e parassimpática no coração. Observamos que o tratamento celular induziu uma regulação da expressão do receptor $\alpha 7nAChR$ e TLR4 no baço e no coração, assim como a redução da relação p-STAT3^{TYR705} e STAT3 total no baço. Outros efeitos importantes e adicionais foram a diminuição da infiltração de leucócitos e a regulação das citocinas pró-inflamatórias pelas células. O bloqueio da VCA usando MLA confirmou que o receptor $\alpha 7nAChR$ pode ser um provável alvo, chave da ação das CTM entre vários outros mecanismos envolvidos na resposta imune. Finalmente, as CTM-GW conseguiram reduzir a

apoptose no pulmão e no baço independentemente da VAC reforçando o conceito de que as células-tronco tem efeitos diversos além da imuno-regulação. Em conclusão, as CTM-GW na sepse foram capazes de atenuar a lesão cardiopulmonar assim como modular a atividade autonômica, reduzindo a inflamação sistêmica, pelo menos em parte, através da via colinérgica anti-inflamatória. Indubitavelmente todos estes efeitos anteriormente descritos e em associação se demonstraram fundamentais no mecanismo de reparo e proteção tecidual em resposta a sepse. Mais estudos pré-clínicos e futuros testes clínicos precisam ser realizados para maior compreensão destes mecanismos bem como uma possível validação terapêutica.

Descritores: sepse; transplante de células-tronco mesenquimais; cordão umbilical; geleia de Wharton; terapia celular; neuroimunomodulação; receptor nicotínico de acetilcolina alfa7

ABSTRACT

Cóndor Capcha JM. *Wharton's Jelly derived mesenchymal stem cells in sepsis-induced cardiopulmonar injury and systemic neuroimmunomodulation* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Sepsis induces organ dysfunction due to overexpression of the inflammatory host response, involving cardiorespiratory and autonomic dysregulation, thus increasing the associated morbidity and mortality. The cholinergic anti-inflammatory pathway (CAP) is mediated by nervous system through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR). This receptor has an important role in systemic inflammation control. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) are known to express genes and secreted factors related to neurological and immunological protection, as well as to improve survival in experimental sepsis. We hypothesized that WJ-MSCs play a modulatory role through the CAP and attenuate sepsis-induced organ injury in a cecal ligation and puncture (CLP) model. Rats were randomly divided into 4 groups: 1) Control (sham-operated); 2) submitted to CLP without treatment; 3) submitted to CLP and treated with 10⁶ WJ-MSCs 6 h later and 4) CLP+MLA+WJ-MSC group (MLA: Methyllycaconitine, $\alpha 7$ nAChR antagonist). All experiments were performed 24 h post-surgery. Echocardiographic parameters and heart rate variability were assessed. Importantly, treatment with WJ-MSCs attenuated diastolic heart failure and recovered baroreflex sensitivity. Moreover, WJ-MSCs injection increased cardiac sympathetic and cardiovagal activity. In cardiac and splenic tissue, WJ-MSC treatment downregulated TLR4 and $\alpha 7$ nAChR expression, as well as it reduced p-STAT3/Total STAT3 ratio in the spleen. In addition, WJ-MSC reduced leukocyte infiltration and pro-inflammatory cytokines, which only were abolished by MLA treatment. Finally, WJ-MSC treatment diminished apoptosis in lung and spleen tissue. Together these findings suggest that treatment with WJ-MSCs appears to protect against sepsis-induced organ injury reducing systemic inflammation, at least in part, through cholinergic anti-inflammatory pathway.

Descriptors: sepsis; mesenchymal stem cells transplantation; umbilical cord; Wharton jelly; cell therapy; neuroimmunomodulation, alpha7 nicotinic acetylcholine receptor.

1. Introdução

1.1. Sepses: História, Definições e Epidemiologia

Na antiga Grécia as manifestações clínicas da sepse já eram conhecidas, a palavra sepse (do grego, σήψις) significa putrefação ou decomposição de material orgânico⁽¹⁾. O termo foi conhecido pela primeira vez nos poemas de Homero (928-898 a.C.) mas em um contexto clínico foi amplamente utilizado por Hipócrates (460-377 a.C.) em nas suas obras do *Corpus Hippocraticum*⁽²⁾. Logo no século XX, Hugo Schottmüller (1867-1936) publicou as bases para a definição moderna da sepse e foi o primeiro a descrever que a presença de uma infecção é um componente fundamental da doença. Em 1991, se estabeleceram as primeiras definições internacionais, indicando que a sepse resulta de uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que acontece durante uma infecção^(3,4). Anos depois, em 2001, se ampliaram os conceitos de sepse e foram introduzidos maiores critérios diagnósticos para a doença, que definiu a sepse como “a presença de infecção (provável ou documentada) junto a uma resposta inflamatória sistêmica”^(5,6).

Atualmente a sepse é definida como “disfunção orgânica de alta mortalidade causado por uma resposta desregulada do hospedeiro frente a uma infecção”. Em um contexto clínico a sepse é “uma infecção suspeita ou documentada, acompanhada de um incremento ≥ 2 no escore *Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment* (SOFA)”⁽⁷⁾. Essas definições e outros conceitos relacionadas à patologia foram elaborados no Terceiro consenso internacional para as definições de sepse e choque séptico⁽⁷⁾. (Ver tabelas 1 e 2)

A sepse é uma das principais causas de morte no Mundo. Sobre os dados epidemiológicos é difícil saber com precisão a taxa de incidência e mortalidade global. Em um estudo publicado em 2016, estimaram que anualmente há aproximadamente 31,5 milhões de casos de sepse, com potencial de 5,3 milhões de óbitos⁽⁸⁾. No Brasil, a sepse representa um grave problema de saúde pública e segundo um estudo nacional, foi identificado um incremento da taxa de mortalidade em um 40,7%; de 69,5 no ano 2002 a 97,8 óbitos por 100,000 pessoas no ano 2010⁽⁹⁾.

Outros estudos como COSTS I e Sepse Brasil encontraram uma taxa aproximada de incidência de sepse e choque séptico de 49,2% e 50,8%, respectivamente; e uma taxa de mortalidade global de 46,6%^(10,11). Nesse último estudo foi observado que a taxa de mortalidade no choque séptico é uma das mais elevadas no mundo⁽¹¹⁾. Também se identificou que as principais fontes de infecção nas UTIs do Brasil, foram o trato respiratório (69%) e o abdômen (23,1%), sendo os bacilos gram-negativos os mais prevalentes (40,1%), seguido de cocos gram-positivos (32,8%) e as infecções fúngicas (5%). O estudo COSTS I demonstrou também que a sepse gera um custo médio de 9 632.00 dólares americanos por paciente (95% IC 8657 – 10672)^(10,11).

Tabela 1 - Novos termos e definições da sepse “2016”

Termo	Definição conceitual
Sepse	Disfunção orgânica com risco de vida causado por uma resposta desregulada do hospedeiro frente a uma infecção.
Sepse: Critério clínico	Infeção suspeita ou documentada, acompanhada de um incremento ≥ 2 no escore SOFA (próximo a uma disfunção orgânica, ver tabela 2)
Choque séptico	Subconjunto da sepse em que a relação das anormalidades circulatórias e celulares/metabólicas são profundamente suficientes para incrementar a mortalidade substancialmente.
Choque séptico: critério clínico	Sepse com necessidade de terapia vasopressora para aumentar o PAM ≥ 65 mmHg e a presença de lactato sérico >2 mmol/L (18 mg/dL) a pesar de uma adequada ressuscitação com fluidos.
A disfunção orgânica pode ser identificada como uma alteração aguda ≥ 2 no escore SOFA total, consequentemente frente a uma infecção.	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Os delineamentos do escore SOFA podem ser assumidos como “0” nos pacientes com desconhecimento para ter disfunção orgânica. ➤ O escore SOFA ≥ 2 reflete um amplo risco de mortalidade, aproximadamente 10% em uma população geral do hospital com suspeita de infecção. Incluso pacientes que apresentam disfunção modesta que se pode deteriorar ainda mais, enfatizando a gravidade desta condição e a necessidade de rápido e adequada intervenção, se não estiver já sendo instituído. 	
Pacientes com suspeita de infecção que são susceptíveis de ter um tempo prolongado na UTI ou morrer no hospital podem se rapidamente identificados ao lado do leito com o qSOFA:	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Frequência respiratória ≥ 22/min ➤ Alteração do estado mental ➤ Pressão sistólica ≤ 100 mmHg 	

Fonte: Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). 2016;315(8):801–10⁽⁷⁾. **PAM:** pressão arterial média, **qSOFA:** *quick* SOFA e **SOFA:** *Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment*

Tabela 2 - Avaliação sequencial [relacionada à sepse] de disfunção orgânica (SOFA)

Sistema	Escore				
	0	1	2	3	4
Respiratório					
PaO ₂ /FIO ₂ , mmHg (kPa)	≥400 (53,3)	<400 (53,3)	<300 (40)	<200 (26,7) com suporte respiratório	<100 (13,3) com suporte respiratório
Coagulação					
Plaquetas, x10 ³ /uL	≥150	<150	<100	<50	<20
Fígado					
Bilirrubina, mg/dL (umol/L)	<1,2 (20)	1,2-1,9 (20-32)	2,0-5,9 (33-101)	6,0-11,9 (102-204)	>12,0 (204)
Cardiovascular	PAM ≥70 mm Hg	PAM <70 mm Hg	Dopamina <5 ou dobutamina (qualquer dose)	Dopamina 5,1-15 ou epinefrina ≤0,1 ou norepinefrina ≤0,1	Dopamina >15 ou epinefrina >0,1 ou norepinefrina >0,1
Sistema nervoso central					
Escore da escala de glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinina, mg/dL (umol/L)	<1,2 (110)	1,2-1,9 (110-170)	2,0-3,4 (171-299)	3,5-4,9 (300-440)	>5,0 (440)
Débito urinário, mL/d				<500	<200

Fonte: Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). 2016;315(8):801–10⁽⁷⁾. **PaCO₂**: Pressão parcial de dióxido de carbono **PAM**: pressão arterial média, e **SOFA**: Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment

1.2. Fisiopatologia da sepse

O sistema imune age normalmente contra patógenos, no qual classicamente se insere a sepse. A fisiopatologia da sepse esta compreendido dentro de uma inadequada regulação dessa resposta imunológica, envolvendo tanto o sistema imunológico inato quanto o adaptativo⁽¹²⁾. Entretanto, este processo também produz coletivamente, hipotensão arterial sistêmica, distúrbios da coagulação, alterações hormonais e metabólicos, disfunção mitocondrial, disfunção intravascular e hemodinâmica, alterações neurais, isquemia de órgãos-alvo e a disfunção de múltiplos órgãos (DMO)^(13,14,15).

Nesta disfunção, o pulmão é provavelmente um dos órgãos mais afetados o que leva a uma insuficiência respiratória aguda (IR)⁽⁹⁾, configurando um quadro clínico exuberante traduzido por proliferação de neutrófilos, edema intersticial, perda de surfactante, e exudatos alveolares, promovendo desenvolvendo posteriormente infiltração de células mononucleares, proliferação de pneumócitos tipo II, e fibrose intersticial^(9,13). Adicionalmente, outro órgão muito afetado na sepse é o coração, com presença comum de disfunção miocárdica. A cardiomiopatia pode-se apresentar como uma disfunção global, tanto sistólica quanto diastólica, de ambos lados (esquerdo e direito) do coração⁽¹⁶⁾. Esta disfunção cardíaca se caracteriza por uma dilatação do ventrículo esquerdo com normal ou baixa pressão de enchimento, uma diminuição da fração de ejeção e uma normalização da função dentro de 7 a 10 dias⁽¹⁷⁾. A função sistólica na sepse é avaliada em relação às porcentagens da fração de ejeção, e a diastólica avaliada em função da relação da onda E (enchimento rápido do ventrículo esquerdo) sobre a onda A (contração atrial), e o tempo de desaceleração da onda E (ms)^(18,19). Por outro lado, em caso de

sepsse grave há aparecimento de outros comprometimentos clínicos como a encefalopatia, incluindo agitação, confusão mental além de coma, demonstrando assim o comprometimento do sistema nervoso central⁽²⁰⁾. Em estudos de autópsia de pacientes com choque séptico, várias das lesões cerebrais foram descritas: múltiplas lesões isquêmicas pequenas, hemorragias, microtrombos, micro-abscessos disseminados, leucoencefalopatia necrosante multifocal e mudanças metabólicas não específicas (associações em forma decrescente por incidência). Esses estudos sugerem que a queda da função hemodinâmica em pacientes com choque séptico pode ser devido à apoptose neuronal no núcleo cardiovascular autonômico⁽²¹⁾.

Sendo assim, na compreensão molecular dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na sepsse; são as células do sistema imunológico as primeiras a agirem sendo que estas apresentam os PRRs (receptores de reconhecimento padrão), que permitem iniciar uma resposta de defesa após uma infecção microbiana mediante o reconhecimento dos PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) que geralmente estão expressos por agentes microbianos⁽²²⁾. Após a exposição desses antígenos, a família de receptores TLR (do inglês, *Toll-like receptor*), que são uma subfamília de PRRs, induzem uma cascata de ativação celular; sendo o TLR4 e TLR2 uns dos receptores comumente envolvidos na reação séptica frente a exposição de lipopolissacarídeos (LPS) de microrganismos Gram negativos, e peptidoglicanos (PGS) dos Gram positivos, respetivamente⁽²³⁾. Após a ligação entre PAMPs e TLRs diversos mecanismos são acionados, sendo um deles a ativação das quinases I κ B α e I κ B β , as quais formam o dímero I κ B, que por sua

vez fosforila o I κ B, causando a degradação dele e liberando o NF- κ B (Fator nuclear kappa B); principal responsável pela ativação de genes que sintetizam mediadores pró-inflamatórios⁽²⁴⁾. Desta maneira, na fase aguda da sepse há uma ampla ativação da resposta imune devido aos altos níveis de PAMPs, o que leva a estimulação das células imunológicas. Como resultado, a liberação de citocinas se eleva, que em excessivas quantidades são prejudiciais para o hospedeiro⁽¹⁴⁾. **(Figura 1)**

Figura 1 – Ativação da via canônica do NF-κB. Os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que se ligam a TLRs ativam a via canônica do NF-κB, (1). IKK ativado fosforila as proteínas IκB em 2 resíduos de serina e induz a poliubiquitinação do IκB (2), que por sua vez induz o reconhecimento dele pelo proteossoma e provoca uma degradação proteolítica sucessiva (3). Após a degradação do IκB, os dímeros citoplasmáticos do NF-κB são liberados e translocados para o núcleo, onde a transcrição do gene é ativada (4). Adaptado de: Jost. P, 2017⁽²⁵⁾.

No início da resposta imune, estão envolvidos tanto o TLR4 quanto o sistema do complemento, além de estar estreitamente relacionados, já que a ativação do TLR4 incrementa a expressão dos receptores anafiláticos do complemento (C5aR e C3aR)⁽²⁶⁾. Durante a sepse a anafilatoxina C5a é produzida pelo sistema do complemento, a interação com a alta expressão de seus receptores contribui sinergicamente com os efeitos deletérios da sepse. A C5a desencadeia a liberação de mediadores pro-inflamatórios como o MIF (Fator inibidor de macrófagos) e o HMGB1 (do inglês, *High Mobility Group Box Protein Type 1*), ativa o Fator Tissular (FT) provocando assim a coagulação intravascular disseminada (CID), induz apoptose dos timócitos e das células da medula adrenal, além disso causa disfunção de neutrófilos, cardiomiopatia e DMOS⁽²⁷⁾. O MIF é induzido fortemente por TNF- α , INF- γ (Interferon gamma) e C5a, para promover a resposta imune inata e adaptativa mediante ativação dos macrófagos e células T; e o HMGB1, que apresenta um efeito pleiotrópico sobre as células do sistema imune, promove inflamação e rompimento das barreiras epiteliais; sua ativação está mediada pela ativação do NF-kB, e interage com vários receptores, incluindo TLR2 e TLR4^(28,29).

As células do sistema imune respondem frente a liberação dessas moléculas. Na sepse coexistem tanto o processo pró-inflamatório quanto o processo anti-inflamatório, na tentativa de eliminar o patógeno. Esta competição entre esses 2 processos determinam o comprometimento clínico do indivíduo. Se o paciente sobrevive à fase aguda da sepse (fase inicial), o ambiente pró-inflamatório alterará o estado funcional das células do sistema imune, causando assim a disfunção de neutrófilos e uma imunossupressão⁽³⁰⁾.

A magnitude e duração do estado inicial de hiperinflamação está determinado por vários fatores, entre eles a quantidade e a virulência do patógeno; a idade, predisposição genética e co-morbilidades do hospedeiro^(31,32). Na compreensão desta imunossupressão, dados recentes demonstram que um subconjunto de linfócitos liberam grandes quantidades de citocinas imunossupressoras, como a interleucina-10 (IL-10), reduzindo a expressão de HLA-DR em células apresentadoras de antígenos, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas e isto prejudica a apresentação ideal dos antígenos microbianos para as células T⁽³⁰⁾. Não obstante, a sepse provoca uma perda acentuada depleção de células TCD4+ e TCD8+, células B, assim como células dendríticas, por causa da apoptose⁽³³⁾. Por outro lado, células T reguladoras (Tregs) são as mais resistentes à apoptose induzida pela sepse; portanto, há um aumento da porcentagem de células Tregs na circulação contribuindo para a formação de um fenótipo mais imunossupressor⁽³⁴⁾. Células TCD4+ sobreviventes mudam o fenótipo pró-inflamatório de Th1 para um fenótipo anti-inflamatório Th2 possibilitando a regulação da resposta imune, causando assim um estado de imunossupressão conhecido também como Síndrome de resposta anti-inflamatória compensatória (SRAC). Os níveis aumentados de apoptose em linfócitos e células dendríticas, contribuem também para a supressão da resposta imune durante a sepse, colocando o paciente em riscos para adquirir infecções intra-hospitalares⁽³⁵⁾. **(Figuras 2-3)**

Figura 2 – Resposta imune do hospedeiro na sepse. Ocorre ativação de ambas respostas imunes pró e anti-inflamatórias logo após o início da sepse. Células do sistema imune inato, incluindo monócitos e neutrófilos, liberam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias que provocam inflamação (linha azul, dias 1-3). A intensidade da resposta inflamatória inicial varia em pacientes individuais, dependendo de múltiplos fatores, incluindo o patógeno carga e virulência, co-morbidades do paciente e fatores genéticos do hospedeiro. Mortes prematuras em sepsis (linha vermelha superior, dia 3) são geralmente devidas a uma resposta hiperinflamatória (tempestade de citocinas) com febre, choque refratário, acidose e hipercatabolismo. Um exemplo desse cenário seria um paciente jovem morrendo de síndrome de choque tóxico ou meningococcemia. A maioria dos pacientes têm uma restauração da imunidade inata e adaptativa e sobrevivem à infecção (recuperação, linhas azul e verde, dia 6). Se a sepse persistir, a falha de elementos cruciais dos sistemas imune inato e adaptativo ocorre de forma que os pacientes entram em um estado imunossupressor marcado (linhas azul e vermelha, após o dia 6). Adaptado de: Hotchkiss. R, 2013⁽³⁰⁾.

Figura 3 – Resposta imune e morte na sepse. A morte em sepse pode ocorrer devido a uma resposta hiperinflamatória, mediada por uma "tempestade de citocinas" (hipercitocinemia), que induz lesão celular e orgânica. As mortes que são devidas a esta resposta hiperinflamatória geralmente ocorrem cedo durante a sepse e terapia direcionada para diminuir ou modular a resposta imune pode melhorar a sobrevivência. Alternativamente, à medida que a condição continua, os pacientes desenvolvem uma resposta hipoinflamatória na qual são incapazes de erradicar a infecção primária ou desenvolvem infecções secundárias adquiridas no hospital por imunossupressão. A apoptose é um importante mecanismo de imunossupressão causando a depleção de células imunes e induzindo uma resposta anti-inflamatória de citocinas. Terapia que bloqueia a apoptose ou ativa a resposta imune poderia melhorar a sobrevivência. Adaptado de: Hotchkiss. R, 2006⁽³⁶⁾.

1.3. Reflexo Inflamatório e neuromodulação pela via colinérgica anti-inflamatória

Para regular a resposta imune e manter a homeostase frente a uma injúria ou infecção precisa-se de vários fatores que atuem conjuntamente. Na atualidade sabe-se que o sistema nervoso (SN) interage com o sistema imune na regulação da inflamação mediante vias neurais e humorais, cujo efeito foi evidenciado em diversos lugares de nosso organismo e com distintas vias neuronais⁽³⁷⁾. Como parte do sistema nervoso periférico (SNP), temos ao sistema nervoso autônomo (SNA) que possui 2 importantes divisões: sistema simpático e parassimpático, que juntos agem opostamente ou sinergicamente no controle de várias de nossas funções vitais, como a frequência cardíaca e respiratória, pressão sanguínea dentre outros. A relação da resposta imune e o SN é mediada por diversos processos, por exemplo frente a uma inflamação as células neuronais sintetizam citocinas pró-inflamatórias que podem ativar o Hipotálamo-Hipófise para logo liberar glicocorticóides, neurotransmissores e outras moléculas que controlam a inflamação; no entanto, esse processo também envolve a participação das células do sistema imune, que possuem diversos receptores para cada neurotransmissor⁽³⁸⁾. Durante uma inflamação aguda é importante ressaltar a resposta reflexa por parte do sistema autonômico, executada principalmente pelo nervo vago e sua ação colinérgica anti-inflamatória. Borovikova e cols⁽³⁹⁾ demonstraram que estimulação elétrica do vago diminui os níveis de TNF- α durante uma endotoxemia e a vagotomia incrementa exageradamente esses níveis, causando um alto risco de morte. Outro estudo demonstrou que frente a uma lesão ou infecção a estimulação do vago estaria dado por pelo receptor da IL-1 (IL-1R) das vias aferentes nervosas

locais e pelas células do glomus⁽⁴⁰⁾. Após esse processamento o vago iniciaria a resposta colinérgica anti-inflamatória através das vias eferentes nervosas que finalmente agem nos macrófagos⁽⁴¹⁾. Vale mencionar que durante uma inflamação tanto os macrófagos quanto os linfócitos podem secretar catecolaminas (neurotransmissores) para incrementar a resposta inflamatória e provavelmente estimular as vias aferentes do vago. Um estudo demonstrou que na estimulação do nervo Vago, o receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$) é o principal receptor pelas quais são modulados os macrófagos do baço e que o efeito anti-inflamatório é perdido quando for bloqueado esse receptor (*Knock-out* em camundongos)^(42,43,44).

O baço regula a maior parte da resposta inflamatória sistêmica (aferido pelos níveis de $TNF-\alpha$) porém também suprime essa resposta mediante a estimulação do vago, no entanto o efeito anti-inflamatório da estimulação vagal depende da presença da noradrenalina contida nas terminações nervosas no baço. Vale considerar que não há nenhuma conexão sináptica do vago até o baço via nervos esplênicos simpáticos, por tanto a estimulação do vago não conduz potenciais de ação no nervo esplênico; uma conexão não neural poderia ser explicada através dos linfócitos T, os quais podem liberar acetilcolina, e assim mediar o efeito anti-inflamatório do vago até o baço^(45,46,47). Desta forma, a neuroimunomodulação sobre o baço dependeria da intensidade da resposta imune (por lesão tecidual ou infecção), um excesso nos sinais dos nervos periféricos poderiam ser inadequados para o sistema imune, pois no baço também confluem as vias adrenérgicas pró-inflamatórias⁽⁴⁸⁾. **(Figura 4)**

Figura 4 – Reflexo Inflamatório e modulação via colinérgica anti-inflamatória. O reflexo inflamatório controla a resposta imune inata via regulação do NF- κ B. Os produtos moleculares exógenos e endógenos de infecção e/ou lesão geralmente interagem com receptores tipo Toll (TLRs) e tipo Nod (NLRs). A ativação desses receptores induz a resposta imune inata e conduzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Essas moléculas também ativam neurônios sensoriais aferentes, que constituem o arco sensorial do reflexo inflamatório. Os axões que viajam no nervo vago transmitem essa informação como potenciais de ação para o tronco cerebral. Isso, por sua vez, ativa o arco eferente, que é conhecido como a via colinérgica anti-inflamatória. Isso inibe a resposta imune inata no baço por meio do nervo vago e através do receptor de acetilcolina nicotínica $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR), que é expressa por células imunes produtoras de citocinas. Isso leva à supressão da ativação NF- κ B. Note-se que a estimulação elétrica do vago ou a administração de agonistas do $\alpha 7$ nAChR induzem também a regulação do NF- κ B. Adaptado de: Tracey. K, 2009⁽⁴⁸⁾.

1.4. Disfunção da atividade autonômica na sepse

O Sistema nervoso autônomo (SNA) é composto pelo sistema nervoso simpático, sistema nervoso parassimpático e sistema nervoso entérico. O SNA tem a principal responsabilidade de garantir a integridade fisiológica das células, tecidos e órgãos em todo o corpo (homeostase) frente a perturbações exercidas pelo ambiente externo e interno⁽⁴⁹⁾. O SNA exerce um papel importante na interação cardiorrespiratória, essa função vem dada por um equilíbrio entre os sistemas simpático e parassimpático, o qual é mantido por diversos arcos reflexos: baroreflexo arterial, quimioreflexo arterial periférico, quimioreflexo arterial central e reflexo de estiramento pulmonar. Esses reflexos representam os maiores componentes do controle da pressão arterial (especialmente os pressorreceptores) e da respiração (quimiorreceptores)⁽⁵⁰⁾.

Durante a sepse existe uma alteração na atividade do SNA, o que se traduz em uma inadequada função cardiovascular e respiratória, representada por um desequilíbrio baroreflexo que a sua vez pode contribuir na redução da produção da vasopressina em uma fase tardia da sepse, que em um caso grave pode levar a um choque refratário⁽⁵¹⁾. As alterações autonômicas podem ocorrer devido a excessivas concentrações de catecolaminas circulantes⁽⁵²⁾. Além de lesões cerebrais causados por isquemia, hemorragia, inflamação e apoptose de centros neuronais autonômicos contribuindo assim a falência circulatória^(21,53). Esse desequilíbrio entre o SNA e o sistema cardiovascular pode ser evidenciado por uma diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e nas oscilações da pressão sanguínea, os quais são avaliados por análise espectral da frequência cardíaca e pressão arterial sistólica, respectivamente⁽⁵⁴⁾. Esta análise espectral é comumente utilizada para estudar

os estados de atividade do sistema simpático e parassimpático, principalmente os ramos que convergem e agem no nó sinusal (SA) para acelerar ou desacelerar o ritmo cardíaco⁽⁵⁵⁾. Em um modelo experimental de sepse Mazzlom e cols⁽⁵⁶⁾ demonstraram que uma administração de uma baixa dose de LPS é suficiente para reduzir os índices da VFC. Outro estudo demonstrou que pacientes sépticos com risco de DMO demonstraram índices reduzidos da VFC antes de evidenciar algum sinal clínico relacionado⁽⁵⁵⁾. **(Figura 5)**

Figura 5 – Variabilidade da frequência cardíaca em um registro de eletrocardiograma de 24 horas. A. Registro de um paciente com sepse e disfunção de múltiplos órgãos. Os registros evidenciam a baixa variabilidade da frequência cardíaca. Esse efeito está muito relacionado com a disfunção autonômica causado pela doença. B. Registro de uma pessoa voluntária saudável. Adaptado de: Schmidt. H, 2001⁽⁵⁰⁾.

1.5. Modelos experimentais de sepse

Nos modelos experimentais de sepse em animais se consegue observar o curso da doença em pacientes. No momento são conhecidos três modelos, o modelo da endotoxemia (com administração intravenosa de LPS), o modelo de ligadura e punção do ceco (LPC), considerado o modelo padrão; e finalmente, a peritonite com stent no cólon ascendente. Esses dois últimos têm em comum a exposição do abdômen aos fatores polimicrobianos (comumente fezes)⁽⁵⁷⁾. Os três modelos podem ter taxas de mortalidade semelhantes, entretanto, os picos de citocinas e o curso fisiopatológico podem variar em cada modelo. O presente estudo utilizou o modelo LPC o modelo mais relevante clinicamente⁽⁵⁸⁾. Um fato importante a considerar no modelo LPC é que a severidade da doença pode variar dependendo de vários fatores como o comprimento do ceco ligado, o diâmetro e o número de punções do ceco^(58,59).

(Figura 6)

Figura 6 – Modelo ligadura e punção do ceco (LPC). A. Ilustração do modelo LPC. Depois da laparotomia abdominal, o ceco é exposto para logo ser feito a ligadura e punção, com extravasamento de fezes na cavidade abdominal B. Relação local de ligadura do ceco e sobrevivência na sepse. A ligadura próxima à válvula ileocecal do ceco está relacionada com alto grau de mortalidade (Linha vermelha) e a ligadura na metade do ceco com grau meio de mortalidade (Linha verde). Adaptado de: Buras. J, 2005(60) e Rittirsch. D, 2009⁽⁵⁹⁾.

1.6. Terapias na sepse

Atualmente existem diversas orientações para tratar a sepse. Segundo os *guidelines* internacionais, a ressuscitação volêmica e a terapia antimicrobiana precoce são os mais estabelecidos⁽⁶¹⁾, entretanto, até o momento não há um agente terapêutico eficaz e eficiente para diminuir os efeitos deletérios e melhorar a condição clínica do paciente. A utilização dos imunoterápicos é uma estratégia muito considerada e geralmente são direcionados para regular ou estimular alvos terapêuticos tais como:

1. Bloqueio de mediadores pró-inflamatórios (MIF, HMGB1 e IL-17A)^(62,63,64);
2. Bloqueio das vias de apoptose⁽⁶³⁾;
3. Neutralização das vias do sistema do complemento (bloqueio dual de C5aR e C5L2, e neutralização de C5a)^(27,26);
4. Modulação do sistema nervoso autônomo (ramo parassimpático: estímulo do receptor $\alpha 7$ -nicotina acetilcolina em células do sistema imunológico e estimulação do vago; ramo simpático: modulação farmacológica dos receptores α - e β -adrenérgicos nos leucócitos)^(37,39,43,44,45,65,66,67);

Outra estratégia inovadora a ser considerada é a terapia com células-tronco mesenquimais (CTM). Atualmente as CTM estão sendo muito utilizadas em vários estudos experimentais, pré-clínicos e já existem ensaios clínicos destinados a uma grande variedade de doenças tais como as inflamatórias, autoimunes, cardíacas e neurodegenerativas⁽⁶⁸⁾. Recentemente, no ano 2015 foi aprovado pelo governo japonês, o uso de CTM para o tratamento da doença do enxerto versus hospedeiro pós transplante de células-tronco Hematopoiéticas, e em 2016 o uso dessas células foi lançado como produto

comercial (TEMCELL® HS Injection)⁽⁶⁹⁾. Por outro lado, apesar do maior número de pesquisas serem executadas nos Estados Unidos, esta terapia ainda aguarda aprovação pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) como tratamento regular para as mais diversas patologias. Não obstante, continuam os estudos para avaliar a eficácia e/ou segurança das CTM em outras doenças específicas, como por exemplo a sepse. Um dos primeiros estudos que utilizaram as CTM em um modelo de endotoxemia em ratos foi realizada por Xu e cols⁽⁷⁰⁾ em 2007. Estes autores demonstraram que as CTM reduziram significativamente o perfil de citocinas pró-inflamatórias no início e durante a sepse, além de levar também a uma diminuição na lesão pulmonar. Outros estudos mais recentes também demonstram que a terapia com CTM pode ser benéfica durante a fase inicial da sepse⁽⁷¹⁾. Recentemente, o nosso grupo demonstrou que o uso de CTM derivadas da geleia de Wharton (CTM-GW), 6 horas após indução da sepse, diminuiu a mortalidade, protegeu a função renal e hepática mediante mecanismos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos⁽⁷²⁾. Sugerindo que o uso dessas células pode trazer uma nova perspectiva terapêutica da sepse. Entretanto, ainda é necessário compreender e esclarecer melhor outros mecanismos envolvidos.

1.7. Células-tronco mesenquimais

As CTM são consideradas células multipotentes não hematopoiéticas ou células-tronco adultas com propriedade de auto-renovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e não mesenquimais⁽⁷¹⁾. O primeiro relato das CTM foi realizado na década de 70, pelo pesquisador russo Friedenstein e seus colaboradores, que as descreveu como células aderentes,

morfologicamente semelhantes a fibroblastos e com alta capacidade de adesão à superfície plástica⁽⁷³⁾. Foram mudando muitos nomes e descrições, até que no ano 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) sugeriu três critérios para defini-las: primeiro, estas células devem ser aderentes em cultura; segundo, devem expressar os antígenos CD73, CD90, CD105, CD44 e CD29 em ausência de antígenos hematopoiéticos tais como CD34, CD45, marcadores de monócitos, macrófagos e linfócitos B; e terceiro, as CTM devem ser capazes de diferenciarem-se *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condrócitos sob condições padronizadas de cultivo *in vitro*⁽⁷⁴⁾.

As CTM possuem diversas propriedades, como por exemplo o *homing* (migração para a área de lesão). Em muitos experimentos demonstrou-se que a administração intravenosa e intraperitoneal das CTM foi eficaz pois estas conseguiram migrar para os tecidos lesados, como coração, pulmão, cérebro, fígado e rim^(75,76,77). Foi demonstrado que após sepse polimicrobiana, as CTM se dirigem em maior concentração até o pulmão, rim, e o baço⁽⁷⁸⁾. O *homing* das CTM compartilha muitas semelhanças com a migração dos leucócitos, como a expressão específica de selectinas e integrinas⁽⁷⁹⁾. Por outro lado, também existem fatores estimulantes que propiciam a migração como o G-CSF (fator de estimulação de granulócitos), a hipóxia⁽⁸⁰⁾, o MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos), MCP-3, fator de células-tronco (FSC), IL-6, e IL-8. Sendo o SDF-1 (fator de células do estroma derivada), CXCL12, CXCR-4, HIF (fator de indução de hipóxia), CCR1, CCR2, CCR4, CXCR5, CCR7, CCR9, CCR10 CCR8, CXCR1, CXCR2 e CXCR3, os principais receptores envolvidos nesse processo^(81,82,83).

As CTM desempenham também um papel na sinalização parácrina. Estudos demonstraram que essas células promovem a regeneração de tecidos lesados, além de melhorar a função geral de tecidos após insultos, tais como isquemia ou infecção bacteriana⁽⁸⁴⁾. No entanto, em doenças que evoluem rapidamente como a sepse, a interação das CTM com células e tecidos adjacentes podem assumir maior importância na imunomodulação da doença e na sobrevivência do hospedeiro; sendo que elas poderão melhorar esse potencial através de uma redução da inflamação local e sistêmica, além da redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias⁽⁸⁵⁾. Segundo os estudos de modulação, os principais fatores de ação são: o TGF- β 1 (fator de crescimento transformante), IL-10, IL-13, e proteína 6 (TSG-6), que formam parte do perfil de citocinas anti-inflamatórias das CTM⁽⁸⁶⁾.

Efeitos anti-apoptóticos também são envolvidos como uma das propriedades. Vários estudos em isquemia/reperfusão miocárdica demonstraram que as CTM são capazes de promover a sobrevivência das células da margem de área de infarto do miocárdio⁽⁸⁷⁾. Se evidenciaram também que as células possuem mecanismos anti-apoptóticos mediante a regulação e reparo do DNA, regulação das vias de morte mitocondrial, aumento da atividade antioxidante e alteração da expressão de proteínas pró-apoptóticas⁽⁸⁸⁾.

As CTM ainda apresentam efeitos imunomoduladores capazes de suprimir a resposta imune regulando a proliferação das células T, B e NK, e inibindo a diferenciação, maturação e ativação de células dendríticas^(89,90). Por outro lado, como essas células praticamente não expressam moléculas de

classe II do MHC (Complexo principal de histocompatibilidade) não iniciam uma resposta imune no transplante alogênico e até xenogênico^(91,92). Fatores secretados como TGF- β 1, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), prostanglandina E2 (PGE2), IL-10, indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), fator inibidor de leucemia (LIF), entre outros, são atribuídos como responsáveis pela ação imunomoduladora das CTM; e moléculas como ICAM-1 e VCAM-1 são importantes para a interação das CTM com os linfócitos, mediando assim a capacidade imunomoduladora. Dessa forma, as CTM são capazes de induzir a proliferação das células T reguladoras (Tregs), o que também contribui para a imunomodulação dos fenótipos T_H1 e T_H17 , para T_H2 dos linfócitos^(93,94,95). Além disso, essas células cumprem um papel importante na modulação dos macrófagos, elas induzem a polarização dos macrófagos tipo M1 (fenótipo pró-inflamatório) para os macrófagos tipo M2 (fenótipo anti-inflamatório e reparador). A sua vez, esses macrófagos polarizados exercem efeitos inibitórios sobre as células NK e linfócitos T. Por enquanto as células NK são afetadas principalmente na ativação delas e a produção do INF- γ , os linfócitos T são induzidos a células Tregs^(96,97).

Diversos estudos demonstraram que as CTM têm capacidade de se diferenciar em células de linhagem neuronal, além de possuir efeitos de neurogênese e neuroproteção, como na restauração da liberação de neurotransmissores, mediante a integração de redes neurais e sinápticas existentes e o restabelecimento funcional de conexões aferente e eferentes^(98,99,100). Devido a essas propriedades, estão sendo elaborados diversos ensaios clínicos em fase I/II para doenças como esclerose múltipla e lesão de medula espinal⁽¹⁰¹⁾. Estudos mostram que os efeitos neurológicos

poderiam estar relacionados pela expressão de genes neurais (BDNF, CNTF, S100, Neu, NeuroD1) os quais foram identificados em uma CTM diferenciada⁽⁹⁸⁾; além de diferentes fatores tróficos como o fator de crescimento nervoso (NGF), VEGF, fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2), repressor transcricional da família polycomb (BMI-1) e Wnt3a que podem estar agindo tanto nas células precursoras como nos astrócitos^(102,103).

1.8. Células-tronco mesenquimais derivadas da geleia de wharton (CTM-GW)

As CTM são isoladas de tecido de origem mesodérmica e não mesodérmica. Inicialmente, elas foram isoladas da medula óssea (MO), especificamente do estroma, onde cumprem funções de suporte e reparo das células estromais, entretanto o seu uso foi se tornando menos frequente na prática porque o acesso à MO é muito invasivo e sua proliferação *ex-vivo* é lenta em comparação com CTM de outros tecidos. O tecido adiposo (TA) também é outra fonte, sua obtenção é principalmente por lipoaspirado, é uma ótima fonte porém um pouco invasivo⁽¹⁰⁴⁾. Outra fonte de obtenção das CTM é do cordão umbilical; podendo ser retirado do sangue, veia artérias ou do estroma (geleia de Wharton) do cordão⁽¹⁰⁵⁾. Uma importante diferença entre as CTM derivadas do TA ou do cordão umbilical é que estas últimas são mais jovens, apresentando um maior comprimento de telômeros, o que lhe permite proliferar por mais tempo sem ter danos citogenéticos^(106,107).

As CTM derivadas da geleia de Wharton do Cordão Umbilical (CTM-GW) podem ser encontradas, além do estroma, em torno dos vasos

umbilicais. Pesquisas demonstraram que essas células possuem características similares às CTM derivadas de outros tecidos, quanto a morfologia, a plasticidade, o fenótipo e a produção de citocinas, porém elas podem ter maior número de passagens *in vitro* até alcançar a senescência⁽¹⁰⁸⁾. Sendo assim, as CTM-GW parecem representar uma boa alternativa para o tratamento e terapia de diversas doenças, além de algumas vantagens importantes em relação as CTM de outras fontes bem como de outras regiões do cordão umbilical⁽¹⁰⁹⁾. Estas células apresentam maiores efeitos de imunomodulação e angiogênese, baixa imunogenicidade e além de expressar fatores transcricionais de pluripotência, Oct-4, Nanog e Sox2 indicando assim algumas características embrionárias^(110,111,112).

Curiosamente as CTM-GW apresentam maiores propriedades neurológicas em relação as CTM-MO, além de se diferenciar com maior facilidade em células neuronais; dentre as suas características fundamentais elas possuem alta plasticidade⁽¹¹³⁾, secretam vários fatores imunomoduladores e fatores neurotróficos *in vitro*, incluindo TGF- β 1, fator neurotrófico ciliar (CNTF), nuerotrofina-3 (NT-3) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que poderiam desempenhar um papel importante na neuroproteção^(110,114).

1.9. Células-tronco Mesenquimais na sepse e neuroimunomodulação

As CTM apresentam muitas propriedades que podem bloquear o efeito sistêmico e delétero da sepse. Nos diversos estudos, já foi demonstrado que as células permitem melhora da sobrevida e diminuição de citocinas pró-inflamatórias, induzem produção de citocinas anti-inflamatorias, reduzem

migração dos neutrófilos, reduzem apoptose, melhoram o clearance bacteriano, aumentam a atividade fagocítica dos macrófagos e atenuam a disfunção orgânica. **(Tabela 3)** Nosso grupo também demonstrou que o tratamento com CTM-GW na sepse, apresentam aqueles mesmos efeitos relacionados, além de diminuir a insuficiência renal, hepática e endotelial mediante efeitos de imunomodulação e antiapoptose. **(Figura 7)** Atualmente, até o 2018 há 4 ensaios clínicos em fase I, investigando os efeitos das CTM derivados do TA e MO na sepse⁽¹¹⁵⁾.

Tabela 3 - Estudos pré-clínicos sobre a terapia com células-tronco mesenquimais na sepse

Autor, Ano (Referencia)	Modelo	Tratamento	Dose	Resultado do tratamento
Gonzalez-Rey e cols. 2009 ⁽¹¹⁶⁾	Camundongo, LPC	CTM-TA de Humanos CTM-TA de Camundongos	1 X 10 ⁶ IP 4h pós LPC	↑ Sobrevida, IL-10, clearance bacteriano ↓ TNF-α, IL-6, IL-1β, MIP-2, RANTES, IL-12, INF-γ
Gonzalez-Rey e cols. 2009 ⁽¹¹⁶⁾	Camundongo, LPS	CTM-TA de Humanos	3 X 10 ⁵ ou 1 X 10 ⁶ IP 0,5h pós LPS	↑ Sobrevida, IL-10, clearance bacteriano ↓ TNF-α, IL-6, IL-1β, MIP-2, RANTES, IL-12, INF-γ
Nemeth e cols. 2009 ⁽⁷⁸⁾	Camundongo, LPC	CTM-MO de Camundongos (auto/alo)	1 X 10 ⁶ IV 24h antes ou 1h pós LPC	↑ Sobrevida, Função renal, IL-10 ↓ TNF-α, IL-6. Não muda = INF-γ
Bi e cols. 2010 ⁽¹¹⁷⁾	Camundongo, LPC	CTM-MO de Camundongos (auto/alo) ± IL-10	1 X 10 ⁶ IV 1h pós LPC	↑ Sobrevida ↓ TNF-α, IL-6, IL-1α, IL-1β
Mei e cols. 2010 ⁽¹¹⁸⁾	Camundongo, LPC	CTM-MO de Camundongos (auto/alo) ± ATB	1 X 10 ⁶ IV 6h pós LPC	↑ Sobrevida, clearance bacteriano, função orgânica ↓ IL-6, IL-1β, IL-10, KC, JE, CCL5
Liang e cols. 2011 ⁽¹¹⁹⁾	Rato, LPS	CTM- MO de Ratos	1 X 10 ⁶ IV 2h pós LPS	↑ Sobrevida (Não significativa), IL-10 ↓ TNF-α, IL-1β, MPO
Sun e cols. 2011 ⁽¹²⁰⁾	Camundongo, LPS	CTM-C de Humanos	1 X 10 ⁶ IV 4h pós LPS	↑ Sobrevida, IL-10, Tregs ↓ TNF-α, MIP-2, INF-γ
Chang e cols. 2012 ⁽¹²¹⁾	Rato, LPC	CTM-TA de rato (auto) CTM-TA apoptóticas de rato (auto)	1,2 X 10 ⁶ IV 0,5; 6 e 18h pós LPC	↑ Sobrevida, Tregs (CTM normais) ↓ TNF-α, Tregs (CTM apoptóticas)
Krasnodembskaya e cols. 2012 ⁽¹²²⁾	Camundongo, Administração de <i>P. aeruginosa</i>	CTM- MO de Humanos	1 X 10 ⁶ IV 1h pós infecção	↑ Sobrevida, clearance bacteriano ↓ PAI-1. Não muda = TNF-α, MIP-2, IL-10, PGE ₂

Tabela 3 - Continuação

Autor, Ano (Referencia)	Modelo	Tratamento	Dose	Resultado do tratamento
Sepúlveda e cols. 2014 ⁽¹²³⁾	Camundongo, LPS	CTM-TA normais ou senescentes de Humanos	1 X 10 ⁶ IV 0,5h pós LPS	↑ Sobrevida ↓ TNF-α, IL-6, IL-10. CTM senescentes = sem efeito
Chao e cols. 2014 ⁽¹²⁴⁾	Rato, LPC	CTM- MO de Humanos CTM- C de Humanos	1 X 10 ⁶ IV 4h pós LPC	↑ Sobrevida, Tregs ↓ TNF-α, IL-6
Pedrazza e cols. 2014 ⁽¹²⁵⁾	Camundongo, Administração de <i>E. coli</i>	CTM-TA de Camundongo (auto)	1 X 10 ⁶ retro orbital no momento da infecção	↑ Sobrevida, IL-10 ↓ TNF-α IL-6, MPC-1
Alcayage-Miranda e cols. 2015 ⁽¹²⁶⁾	Camundongo, LPC	CTM-Mens de Humanos ± ATB	7,5 X 10 ⁵ IP 3h pós LPC	↑ Sobrevida, clearance bacteriano, função hepática ↓ TNF-α, IL-6, IL-10, MPC-1
Guldner e cols. 2015 ⁽¹²⁷⁾	Camundongo, LPC	CTM- MO de Humanos CTM-MO de Camundongos	1 X 10 ⁵ IV 24h pós LPC	↑ Recuperação pulmonar, IL-10 (CTM humano) ↓ TNF-α, IL-6, IL-10 (CTM Camundongo) Não há diferença = sobrevida
Cóndor e cols. 2016 ⁽⁷²⁾	Rato, LPC	CTM-GW de Humanos + ATB	1 X 10 ⁶ IP 6h pós LPC	↑ Sobrevida, função hepática e renal, IL-4, IL-10 ↓ NF-Kb, IL-6, IL-1α, INF-γ
Sung e cols. 2016 ⁽¹²⁸⁾	Rato, LPC	CTM-TA de rato (auto) ± ATB	5 X 10 ⁵ IV 0,5: 6 e 18h pós LPC	↑ Sobrevida, função renal, IL-4, IL-10 ↓ TNF-α, NF-Kb, IL-1β, INF-γ, MMP-9, RANTES, EROs

Alo: Transplante alogênico, Auto: transplante autólogo, ATB: antibióticos, CTM-C: Células-tronco mesenquimais derivados do cordão umbilical, CTM-GW: Células-tronco mesenquimais derivados da geleia de Wharton, CTM-MO: Células-tronco mesenquimais derivados da medula óssea, CTM-MO: Células-tronco derivados mesenquimais da menstruação CTM-TA: Células-tronco derivados do tecido adiposo. EROs: Espécies reativas do oxigênio, IP: Administração intraperitoneal, IV: Administração intravenosa. LPC: Modelo ligadura e punção do ceco, LPS: Modelo da administração de Lipopolisacárido. Adaptado de Johnson. C.L. e cols, 2017⁽¹²⁹⁾.

Figura 7 – Células-tronco Mesenquimais da geleia de wharton (CTM-GW) na sepse. CTM-GW administradas 6 horas após indução da sepse e resultados avaliados 24 horas após da indução. A. CTM-GW apresentam maior expressão de Klotho (proteína de proteção renal) do que as CTM derivadas de tecido adiposo (CTM-TA). B. Curva de sobrevivência. C. Clearance de Inulina (Indicador de função renal) D. Aspartato aminotransferase (Indicador de função hepática) E. Expressão proteica no rim. CTM-GW na sepse, induzem expressão de VEGF, atenuam a lesão renal (Klotho), regulam a inflamação (NF- κ B), atenuam a lesão endotelial (eNOS) e reduzem a apoptose (Bax / Bcl-X) F. Imuno-histoquímica e gráfico da avaliação da apoptose (TUNEL) no tecido renal. *: $p < 0,05$ vs SHAM; **: $p < 0,001$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC; ##: $p < 0,001$ vs LPC. Adaptado de: Condor. J.M. e cols, 2016⁽⁷²⁾.

Sobre a neuroimunomodulação, como já foi descrito o SNA cumpre um rol importante na regulação da inflamação e que de acordo a diversos estudos o nervo vago estaria envolvido como um dos agentes principais dessa regulação^(39,40,65). Cabe mencionar que esse processo é conhecido também como a via colinérgica anti-inflamatória e sua ação é realizada através dos receptores nicotínicos de acetilcolina alfa 7 ($\alpha 7$ -nAChR)⁽⁴⁴⁾. Consideramos que segundo a revisão sobre as CTM-GW e suas diversas propriedades e efeitos (principalmente neuronais, imunológicos e antiapoptóticos), elas poderiam estar agindo sistemicamente no controle da sepse, provavelmente modulando a via colinérgica anti-inflamatória em concomitância das propriedades benéficas já mencionados.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo principal é avaliar o efeito das células tronco mesenquimais derivadas da geleia de Wharton como tratamento da injúria cardiopulmonar e ainda observar possíveis efeitos na neuroimunomodulação sistêmica, em um modelo experimental de sepse (modelo de ligadura e punção do ceco em ratos).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a função cardiovascular (Ecocardiograma), hemodinâmica (Pressão arterial, frequência cardíaca e resposta baroreflexa) e a lesão pulmonar (Infiltração de macrófagos e neutrófilos) nos grupos experimentais;
- Avaliar a atividade autonômica (Variabilidade da frequência cardíaca) assim como o sistema imunológico (Hematologia além de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro e no baço) nos grupos experimentais;
- Avaliar o processo de morte celular por apoptose (Detecção TUNEL no pulmão, baço e intestino);
- Avaliar o papel da expressão do TLR4, o receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 ($\alpha 7nAChR$) e proteínas envolvidas na via colinérgica anti-inflamatória (p-STAT3^{TYR705} e STAT3 total);
- Avaliar a administração do Metillicaconitine (antagonista do $\alpha 7nAChR$) na terapia das CTM-GW na sepse como contraprova do efeito, sobre a via colinérgica anti-inflamatória

3. Métodos

3.1. Considerações gerais

Para realização deste estudo foram usadas Células-tronco mesenquimais (CTM) de cordão umbilical humano obtido de 3 puérperas voluntárias após orientação quanto aos propósitos do protocolo e assinatura de consentimento informado. O procedimento de coleta de amostras foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP (**Registro CEP-HU/USP: 1278/13**) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (**Nº de parecer: 378.603 e 934/2017 – PLATBR CAAE: 18323513.2.0000.0065**). Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), conforme normas estabelecidas pelos referidos comitês e pela resolução 196/96 do Conselho nacional de Saúde (CNS 196/96).

Para a realização experimental de indução da sepse, foram usados Ratos Wistar machos com pesos entre 200 – 280 gramas, próximo de 8 semanas de vida; foram obtidos do Biotério Central da FMUSP e tiveram livre acesso à água e a dieta padrão para ratos. Nós utilizamos o modelo de LPC (Ligadura e Punção do Ceco) descrito por Holly MK et. al⁽¹³⁰⁾. O estudo foi aprovado paralelamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O plano de trabalho foi desenhado em função dos aspectos éticos para obtenção do cordão umbilical e o uso dos animais de experimentação. (**Figura 8**)

Figura 8 – Plano de trabalho desde a submissão ao comitê de ética e coleta do material biológico até as avaliações funcionais.

3.2. Desenho experimental

3.2.1. Grupos experimentais:

Grupo 1 = SHAM:	grupo controle;
Grupo 2 = LPC:	grupo induzido à sepse;
Grupo 3 = LPC + CTM-GW:	grupo induzido à sepse com tratamento de 10^6 CTM, intraperitoneal, após 6h da indução da sepse;
Grupo 4 = LPC+MLA+CTM-GW:	grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10^6 CTM, intraperitoneal, 6h após indução.

3.2.2. Cálculo do número de animais:

O tamanho da amostra ou o cálculo do número de animais foi baseado nos seguintes dados: tamanho do efeito (1,69); erro α (0,05); confiança (95%); número de grupos (3 e 4) e correção pela perda de animais (taxa de mortalidade igual a 30%)⁽⁷²⁾. O resultado foi um $n = 7$ por grupo experimental.

3.2.3. Avaliações:

Avaliação cardiológica:

- Primeiro conjunto de experimentos:

Os três grupos (SHAM, LPC e LPC+CTM-GW) foram submetidos a medidas de ecocardiograma 24 horas após da indução da sepse. Para essas medidas os animais foram anestesiados. **(Figura 9)**

Avaliação hemodinâmica:

- Segundo conjunto de experimentos:

Os três grupos (SHAM, LPC, LPC+CTM-GW e LPC+MLA+CTM-GW) foram submetidos a medidas de Pressão Arterial, Frequência Cardíaca e sensibilidade aos barorreflexos; estudo da resposta vasomotora 24 horas após da indução da sepse. Nestas medidas os animais estavam acordados. As medidas de foram realizadas após o término das medidas de ecocardiograma.

(Figura 9)

Avaliação pulmonar, imunológica e sistêmica:

- Terceiro conjunto de experimentos:

Outro conjunto de animais de 4 grupos foram submetidos a sepse/sham e tratamento. Após 24 horas da indução, os animais foram sedados e foi feita a cirurgia para a coleta das amostras. Foram colhidos sangue e tecidos (processados e guardados no -70C para posterior análise); os órgãos foram perfundidos com PBS e retirados (para realização de imunohistoquímica e Western blotting). **(Figura 9)**

Figura 9 - Desenho do experimento. SHAM: grupo controle, LPC: grupo induzido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 10^6 CTM após 6h da indução da sepse e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10^6 CTM 6h após cirurgia.

3.3. Indução de sepse e tratamento

No grupo controle, sob anestesia com tribromoetanol 2,5% (2,2,2 tribromoetanol, 99%), dose 250mg/Kg, os animais foram submetidos a laparotomia abdominal com incisão longitudinal mediana de cerca de 3,5 cm e o ceco foi localizado e exposto. No grupo LPC (Ligadura e punção do ceco), após localização, foi realizada a perfuração e ligadura do ceco com fio nylon 3.0 cerca de 1,5 cm abaixo da válvula íleo-cecal (local meio entre a válvula ileocecal e o final do ceco). O ceco então foi puncionado duas vezes com jelo 14 e pressionado levemente para vazamento de pequena quantidade de fezes para dentro da cavidade abdominal. Nos grupos LPC, LPC+CTM-GW e LPC+MLA+CTM-GW os animais foram submetidos ao mesmo procedimento para indução da sepse, porém receberam soro fisiológico, CTM-GW e MLA mais CTM-GW via intraperitoneal, respectivamente; a dose de MLA foi 5 mg/kg do animal, 5:30 horas após LPC e a dose de CTM foi $1,0 \times 10^6$ cel/ml, 6 horas após a indução da sepse (Células descongeladas com viabilidade de 80-90%).

A parede abdominal foi suturada em duas camadas (músculo e pele) com pontos simples utilizando-se fio nylon 4.0 Imediatamente após o procedimento cirúrgico os animais receberam solução salina 0,9% pré-aquecido, via intraperitoneal, na dose de 25 ml/Kg de peso corpóreo.

Seis horas após a cirurgia todos os animais passaram a receber antibiótico (ATB) de largo espectro, imipenem-cilastatina sódica (Tienam – Merck Sharp & Dohme) na dose de 14mg/Kg de peso corpóreo e ressuscitação volêmica com solução salina 0,9% (25ml/Kg de peso corpóreo), via subcutânea. **(Figura 10)**

Figura 10 – Indução da sepse. **A.** Início da laparotomia abdominal. **B.** Exposição e ligadura do ceco, local m local médio entre a válvula ileocecal e o final do ceco. **C.** Punção do ceco. **D.** Vazamento de fezes. **E.** Administração de ATB após 6 horas da indução da sepse.

3.4. Obtenção, cultivo e expansão das células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano

As células-tronco mesenquimais (CTM) do estroma do cordão umbilical humano ou geleia de wharton foram isoladas e processadas no Laboratório de genética e hematologia molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de acordo com protocolo estabelecido⁽⁷²⁾.

Para isolar as CTM-GW, o material foi obtido nos procedimentos pós-parto. O cordão foi transportado em um frasco refrigerado a 4°C, contendo PBS estéril (do inglês, *Phosphate Buffer Solution*, NaCl 0,14M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 7,1mM e KH₂PO₄ 1,5mM) e antibiótico.

Após a coleta e o transporte, o processamento foi realizado de forma estéril dentro de uma cabina de biossegurança tipo II. O cordão foi lavado com PBS e cortado em pequenos pedaços de aproximadamente 0,5 cm², para logo aderi-los em placas de 6 poços (Corning, Estados Unidos), logo foi adicionado meio de cultura α -MEM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) suplementado com 20% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), penicilina 100U/ml, estreptomicina 100ug/ml (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e foram acondicionadas em incubadora a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5% (ThermoForma, Estados Unidos).

Os *explants* foram mantidos por 15 a 25 dias, o meio de cultura foi trocado 2 a 3 vezes por semana, quando as células atingirem 80% de confluência os *explants* foram retirados (encaminhados para estudo histológico mediante a técnica hematoxilina-eosina) e as placas foram tripsinizadas (Gibco, Estados Unidos), finalmente a cultura foi expandida para garrafas de 25 cm² na

primeira passagem e em 75 cm² (Corning, Estados Unidos) para as outras passagens.

As células foram mantidas com meio de cultura α -MEM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF), penicilina 100UI/ml, estreptomicina 100ug/ml (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e acondicionadas em incubadora a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5% (ThermoForma, Estados Unidos). O meio de cultura foi trocado cada 3 dias e as garrafas foram tripsinizadas quando as células atingirem o 80 a 90% de confluência. As células foram expandidas em cultura até a passagem 4 (P4) e congeladas em nitrogênio líquido. Método Explant⁽¹³¹⁾. **(Figura 11)**

3.4.1. Método de tripsinização celular

Após as células atingirem 80% de confluência, o meio de cultura foi desprezado e logo as células foram lavadas 3 vezes com PBS, com a intenção de retirar o SBF por completo. Depois, foram adicionados 1 ou 3 ml de Tripsina-EDTA 0,25% (Gibco-Invitrogen, Estados Unidos) por garrafas de 25 cm² ou 75 cm², respectivamente; em seguida as células foram incubadas a 37° C por 3 minutos. As garrafas foram agitadas moderadamente para o desprendimento das células e logo foi adicionado meio de cultura suplementado com SBF para inibir a ação da tripsina. As células foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL (Corning, Estados Unidos) e centrifugados a 1600 rpm por 5 minutos a 4° C. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura completo. O número e a viabilidade celular foram determinados com o uso da coloração de azul de tripan 0,4% (Sigma aldrich, Estados Unidos), depois as células foram

replaqueadas. Entenda-se que o processo de tripsinização e replaqueamento está referido com a passagem das células.

Figura 11 - Processamento do cordão umbilical. A. O cordão foi cortado em pequenos pedaços para facilitar a extração das artérias e veias. **B, C, E e F.** Método Explant para cultura de CTM.(131)

3.5. Caracterização das células-tronco mesenquimais

3.5.1. Imunofenotipagem

A imunofenotipagem foi determinada pela técnica de citometria de fluxo. As células foram lavadas com tampão PBS e dissociadas da superfície de cultivo mediante tripsinização. As células viáveis foram contadas e processadas em aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/100 uL, para adicionar os anticorpos monoclonais conjugados a um fluorocromo. Os anticorpos foram adquiridos da BD (BD Biosciences, Estados Unidos) e da Thermo Fisher Scientific (eBioscience, Estados Unidos). **(Tabela 4)**

Tabela 4 - Anticorpos usados na caracterização das CTM-GW por citometria de fluxo

Anticorpos	Especificidade	Fluorocromo Conjugado	Isotipo	Diluição
Anti-CD73	CTM	PE	Camundongo IgG1	1:100
Anti-CD105	CTM	PE-Cy7	Camundongo IgG1	1:100
Anti-CD90	CTM	PE	Camundongo IgG1	1:100
Anti-CD44	CTM	APC	Camundongo IgG1	1:100
Anti-CD29	CTM	PE	Camundongo IgG1	1:100
Anti-CD34	CTH	APC	Camundongo IgG1	1:100
Anti-CD45	Pan-leucocitário	FITC	Camundongo IgG1	1:100
Anti-HLA-DR	Antígeno D leucocitário	PE-Cy7	Camundongo IgG1	1:100

APC: Alofococianina (do Inglês, *allophycocyanin*) FITC: Isotiocianato de fluoresceína (do Inglês, *fluorescein isothiocyanate*), PE: Ficoeritrina (do Inglês, *phycoeritin*), PE-Cy7: Ficoeritrina-Cy 7 (do Inglês, *phycoeritin-Cy 7*). CTH: Células-tronco hematopoiéticas.

Controles de marcações inespecíficas foram usadas para a calibração do Citometro e análise de resultados. Para a compensação dos registros foram usados beads marcadas com anticorpos conjugados com cada fluorocromo. Evitando falsos positivos a causa de sobreposições dos espectros de emissão dos fluorocromos.

As amostras previamente ajustadas foram incubadas com os anticorpos mencionados por 30 minutos, em campo escuro a 4° C. Logo foi adicionado 1 mL de PBS a cada tubo e eles foram centrifugados a 2000 rpm por 6 minutos a 4° C. O sobrenadante foi desprezado por inversão e as células foram ressuspensas em 500 mL de solução de 1% de formaldeído em PBS. Logo as células foram mantidas sob-refrigeração ao abrigo da luz até o momento da aquisição, dentro de no máximo 24 horas.

Foi realizada uma aquisição de 20,000 eventos em cada amostra. Para aquisição dos dados utilizou-se o programa BD CellQuest Pro® (BD, Estados Unidos) em um citômetro FACSCanto (BD, Estados Unidos). Os resultados foram fornecidos em forma de histograma e foram classificadas de forma qualitativa de acordo com a porcentagem de positividade da população selecionada, sendo populações com positividade até 5% considerado como “negativo”, de 5 a 50% considerado como “positivo débil” e maior a 50% considerado como “positivo”.

3.5.2. Imunofluorescência

Foi usado o kit para caracterização de células-tronco mesenquimais humanas (Millipore, Estados Unidos). Segundo o protocolo, em uma placa de 6 poços foram fixadas as CTM-GW desde que elas atingiram 80- 90% de

confluência (de P3 para P4). Logo as células foram submetidas a um ensaio de imunocitoquímica com aplicação de um painel de anticorpos primários: anti-CD90, anti-CD14, anti-CD146, anti-CD19, anti-CD44 e anti-STRO-1 (1:500). E o anticorpo secundário: anti-Mouse IgG-FITC. Finalmente a detecção foi com a aplicação de imunofluorescência e o contraste com o uso do DAPI (do Inglês, *4',6-diamidino-2-phenylindole*).

3.5.3. Ensaios de Diferenciações

Cerca de 5×10^3 células foram semeadas em placas de 6 poços para realização de cada ensaio de diferenciação celular. O protocolo teve início no momento em que as culturas atingiam aproximadamente 70-80% de confluência (de P0 para P1). Neste momento, todo o meio de cultura foi substituído por um meio de indução próprio para cada diferenciação ou somente pelo meio de cultura (α -MEM suplementado com 20% de SFB) para o controle indiferenciado. Os respectivos meios foram trocados duas a três vezes por semana durante aproximadamente 14 - 21 dias. As células foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂. Após a indução completa, a diferenciação foi confirmada por meio de colorações.

3.5.3.1. Diferenciação Adipogênica

Foi utilizado *STEMPRO® Adipocyte Differentiation Basal Medium*, *STEMPRO® Adipogenesis Supplement* (Gibco, Estados Unidos) e Gentamicina (10mg/mL), as células foram mantidas aproximadamente 14 dias. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela visualização do acúmulo de

vacúolos lipídicos citoplasmáticos através da coloração Oil Red (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

3.5.3.2. Diferenciação Condrogênica

Foi utilizado *STEMPRO® Condrocyte Differentiation Basal Medium*, *STEMPRO® Chondrogenesis Supplement* (Gibco, Estados unidos) e Gentamicina (10mg/mL), as células foram mantidas aproximadamente 14 dias. A diferenciação condrogênica foi confirmada pela visualização de polissacáridos sulfatados através da coloração de Alcian Blue (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

3.5.3.3. Diferenciação Osteogênica

Foi utilizado *STEMPRO® Osteocyte Differentiation Basal Medium*, *STEMPRO® Osteogenesis Supplement* (Gibco, Estados unidos) e Gentamicina (10mg/mL), as células foram mantidas aproximadamente 21 dias. Para visualizar diferenciação óssea foram realizadas as colorações com Vermelho de Alizarina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

3.6. Ecocardiograma

Em colaboração com a Profa. Dr. Maria Maria Irigoyen do Instituto do Coração foram realizadas as medições de ecocardiograma nos animais 24 horas após a indução da sepse nos grupos Sham, LPC e LPC +CTM. Os seguintes parâmetros abaixo foram analisados:

Morfologia:

- Cavidade diastólica do Ventrículo Esquerdo (VEDIA/do inglês, **LVDD**);
- Cavidade sistólica do Ventrículo Esquerdo (VESIS/ do inglês, **LVSD**);
- Espessura do septo interventricular na diástole (SIVDIA/ do inglês,

IVS);

- Espessura da parede do VE na diástole (PPVEDIA/ do inglês, **LVPWD**);
- Massa ventricular esquerda corrigida pelo peso corporal (MVE);

Função cardíaca global e sistólica:

- Índice de desempenho miocárdico (IDM).
- Débito cardíaco (CO);
- Fração de ejeção do VE (FEVE%);
- Fração de encurtamento do VE ($\Delta D\%$)

Função Diastólica:

- Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV);
- Tempo de desaceleração do pico E (TDE);
- Relação dos picos E e A do fluxo transmitral (E/A);
- Relação dos picos E'/A' do doppler tecidual obtido no nível do anel mitral da parede septal do VE (E'/A');
- Relação dos picos E e do pico E' (E/E')

Após anestesia com uma solução intra-peritoneal de ketamina (50 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) os animais tiveram a região torácica devidamente tricotomizada e foram mantidos em decúbito lateral para a realização do exame

no aparelho SEQUOIA 512 (ACUSON, Corporation, Mountain View, Estados Unidos), com transdutor linear multifrequencial (10-14mHz), que permite imagens bidimensional e monodimensional simultâneas, além da análise de fluxo por efeito Doppler espectral e registro eletrocardiográfico, pela colocação de três eletrodos para a derivação DII. Para registro das imagens foi utilizado gel de transmissão para ultra-som de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL, Estados Unidos). O estudo do Doppler tecidual para análise da velocidade diastólica das paredes do VE também foi realizado, pela colocação do volume-amostra no nível do anel mitral das paredes septal do VE. A profundidade de imagem trabalhada foi de 2 cm.

Foram utilizadas as janelas longitudinal paraesternal direita para a obtenção dos cortes longitudinal e transversal e a longitudinal paraesternal esquerda para a obtenção dos cortes apical (quatro e cinco câmaras). As medidas lineares foram realizadas nas imagens obtidas pelo modo-M, conforme Schiller et al, com as seguintes medidas: Espessura do septo interventricular na diástole (SIVDIA), diâmetro do VE ao final da diástole (VEDIA) e ao final da sístole (VESIS), Espessura da parede do VE na diástole (PPVEDIA)⁽¹³²⁾. **(Figura 12)**

A massa ventricular esquerda foi então, obtida a partir da fórmula:

$$1,047 \times [(SIVDIA+VEDIA+PPVEDIA)3-VEDIA3] \times 0,8 + 0,6$$

Onde: 1,047 representa a densidade do miocárdio, validada em ratos por Fard et al, e os índices 0,8 e 0,6; fatores de correção. Após a obtenção destas medidas, obtivemos os valores corrigidos pelo peso corporal (valor absoluto/peso corporal do animal)⁽¹³³⁾.

Outro importante índice de morfometria avaliado, fornecido pelo ecocardiograma, para caracterização da hipertrofia cardíaca (excêntrica/concêntrica) foi a espessura relativa da parede (ERP), que leva em conta as medidas diastólicas da parede do ventrículo esquerdo e da cavidade do ventrículo esquerdo, cuja fórmula é: $2 \times \text{PPVEDIA} / \text{VEDIA}$ (PPVEDIA: parede posterior do VE em diástole; VEDIA: cavidade diastólica do VE). Este índice é mais sensível em relatar alterações do VE na hipertensão do que outros, incluindo a massa ventricular esquerda. Tais medidas morfométricas, foram fornecidas pelo Modo-M, sempre guiado pelo modo bidimensional.

Figura 12 – Avaliação no modo-M do Ventrículo Esquerdo. Análise guiado pelo modo bidimensional, com o cursor posicionado entre a válvula mitral e o músculo papilar. Indicando a cavidade diastólica do ventrículo esquerdo (VEDIA/ LVDD), cavidade sistólica do ventrículo esquerdo (VESIS/LVSD), espessura do septo interventricular na diástole (SIVDIA/IVS) e a espessura da parede do VE na diástole (PPVEDIA/ LVPWT).

A função sistólica foi avaliada pelas frações de ejeção (FE%), e de encurtamento ($\Delta D\%$) e velocidade de encurtamento circunferencial (VEC-circ/seg), cujas fórmulas estão a seguir:

$$FE = (VDF)-(VSF)/(VDF) \times 100\%$$

Onde: VDF= Volume Diastólico Final; VSF= Volume Sistólico Final, sendo que o volume foi obtido a partir da seguinte fórmula: $V = [7 / (2.4 + D)] \times D^3$

$$\Delta D\% = (VEDIA-VESIS/VEDIA) \times 100 \%$$

A função diastólica foi analisada utilizando-se os índices derivados da curva de velocidade de fluxo diastólico mitral e do fluxo sistólico da via de saída do ventrículo esquerdo obtidos pela técnica de Doppler pulsátil. A curva de velocidade do fluxo diastólico foi obtida a partir da imagem apical quatro câmaras, posicionando-se o volume-amostra próximo à face ventricular da valva mitral. Foram determinadas: a) onda E – maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular (enchimento rápido do ventrículo); b) onda A – maior valor da velocidade de fluxo telediastólico mitral (correspondente à contração atrial); c) relação E/A - razão entre a velocidade máxima da onda E e a velocidade máxima da onda A; d) tempo de desaceleração da onda E (TDE) –tempo, em milissegundos (ms) entre o pico da onda (E) e o ponto em que a rampa de desaceleração intercepta a linha de base da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral. A curva de velocidade dos fluxos para análise do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foi obtida posicionando-se o volume amostra numa posição intermediária entra a valva mitral e a via de saída do ventrículo esquerdo. Foi determinado o TRIV em ms, entre o final do fluxo sistólico na via de saída do ventrículo esquerdo e o início do fluxo diastólico mitral. O TDE e o TRIV, posteriormente, foram

corrigidos pela frequência cardíaca, dividindo-se seus valores pela raiz quadrada dos respectivos intervalos R-R.

A avaliação do Doppler tecidual foi realizada com o posicionamento do volume-amostra no nível do anel mitral no corte apical quatro câmaras, para a obtenção dos picos de velocidade diastólica máxima rápida (E') e lenta (A') da parede septal do VE. Em seguida, obtivemos as razões dos picos E' e A' para a parede septal (E'/A's). Após a aquisição destas medidas, também obtivemos a razão do pico E do fluxo transmitral pelo pico E' a partir do doppler tecidual no nível do anel mitral da parede septal do VE. Segundo Nagueh e cols⁽¹⁸⁾, este índice guarda importante correlação com o nível da pressão capilar pulmonar em cunha (pressão de oclusão da artéria pulmonar) em seres humanos.

Entretanto, além das avaliações das funções sistólica e diastólica em separado, foi utilizado outro método de avaliação funcional combinado, o índice de desempenho miocárdico (IDM), derivado de intervalos obtidos pelo Doppler pulsátil. Conceitualmente simples, é descrito como sendo mais preciso para análise da função cardíaca global do que os parâmetros de avaliação isolada e representa a razão do tempo total gasto na atividade isovolumétrica (contração isovolumétrica e relaxamento isovolumétrico) pelo tempo de ejeção.

Para tanto, mede-se o tempo de fechamento da valva mitral (a), que corresponde à soma do tempo de contração isovolumétrica, tempo de ejeção e tempo de relaxamento isovolumétrico. O tempo de ejeção é obtido pela medida da duração do fluxo de via de saída do ventrículo esquerdo (b). Então podemos obter o IDM pela fórmula:

$$(a - b) / b$$

Para a obtenção do débito cardíaco, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$3.14 \times (D/2)^2 \times VTI \times FC$$

Onde D = diâmetro aórtico, obtido no modo bidimensional, VTI = integral da velocidade do fluxo aórtico, obtido no estudo doppler pulsátil da via de saída do VE e FC = frequência cardíaca, por intermédio dos intervalos R-R. Slama e cols(134), demonstraram uma correlação positiva com $r = 0,93$ entre esta metodologia e medidas invasivas de termodiluição para obtenção do débito cardíaco em ratos. Todas as medidas seguiram as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia⁽¹³⁵⁾.

3.7. Canulação e Medidas hemodinâmicas

Para a avaliação hemodinâmica os animais foram previamente submetidos a canulação da veia e artéria femoral. Para isso os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) para colocação de cânulas de polietileno (PE-10, com diâmetro interno de 0,01 mm conectadas a uma peça de PE-50, com diâmetro interno de 0,05 mm). As cânulas foram preenchidas com soro fisiológico, e acondicionadas no interior da artéria e veia femorais esquerdas para registro da pressão arterial (PA), frequência cardíaca e administração de drogas, respectivamente. A extremidade a ser conectada ao transdutor de pressão foi fechada com pinos de aço inoxidável. As cânulas foram introduzidas a partir de uma pequena incisão inguinal esquerda em direção ao feixe vaso-nervoso, as extremidades das cânulas de menor calibre (PE-10) foram introduzidas na luz da artéria e veia femorais. As cânulas foram fixadas com fio de algodão, na artéria e na veia e suas extremidades

mais calibrosas foram passadas subcutaneamente, exteriorizadas no dorso da região cervical, fixadas com fio de algodão na pele.

A cânula arterial foi conectada a um tubo de polietileno (PE 50), este último a um transdutor eletromagnético (P23 Db; Gould-Statham) que, por sua vez, foi conectado a um amplificador (General Purpose Amplifier-Stemtech, Estados Unidos). O sinal analógico da PA foi transformado para digital através de uma placa de conversão de 10 bits (CODAS, DataQ Instruments, Estados Unidos), com frequência de amostragem de 2000Hz por canal.

A análise dos sinais de pressão foi realizada utilizando-se um programa comercial associado ao sistema de aquisição: Windaq® (DataQ Instruments, Estados Unidos). Este programa permitiu a detecção de máximos e mínimos da curva de pressão batimento a batimento, fornecendo os valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) pela integral da área sob a curva no tempo. A frequência cardíaca (FC) foi determinada a partir do intervalo entre dois picos sistólicos. Os resultados foram apresentados em valores médios e desvios padrões dos períodos em que os dados foram analisados para PA e FC. As planilhas de dados obtidas foram analisadas em programa comercial para análise (Excel 5.0, Microsoft, Estados Unidos), onde se calcularam a média e desvio padrão da PAM, PAS, PAD e FC para cada animal. A variabilidade da PAM foi calculada, utilizando-se a média dos desvios padrões de cada animal estudado. O coeficiente da variabilidade da pressão arterial média foi conseguido por meio da razão da variabilidade da PAM pelo valor da pressão arterial média de cada animal em estudo.

3.8. Avaliação do reflexo pressorreceptor

Após o registro de PA e os animais terem permanecido em condições de repouso por 15 minutos, a sensibilidade dos pressorreceptores foi testada através da infusão de fenilefrina e logo após, nitroprussiato de sódio. A fenilefrina (Sigma Chemical Company, Estados Unidos), um potente estimulador α_1 , cuja ação predominante se dá nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição foi injetada em doses crescentes na cânula da veia femoral. Tal fármaco foi utilizado, portanto, para causar aumento da pressão arterial, efeito que provoca bradicardia reflexa subsequente, comandada pelos pressorreceptores.

Efeito contrário, qual seja, redução da pressão arterial com resposta taquicardia, também comandada pelos pressorreceptores, foi provocado pela injeção doses crescente de nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, MO, Estados Unidos), um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias, cuja ação se dá por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de guanosína monofosfato 3', 5'-cíclico (GMPc) na musculatura lisa dos vasos e outros tecidos.

Para avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores, o pico máximo ou mínimo da PAM foi reduzido dos valores de PAM do período controle. Da mesma forma, a variação máxima da frequência cardíaca foi reduzida dos valores de frequência cardíaca do período controle, imediatamente antes da infusão das drogas, para posterior quantificação das respostas. A sensibilidade barorreflexa foi avaliada pelo índice calculado através divisão da variação da FC pela variação da PAM(136). **(Figura 13)**

Figura 13 – Análise de pressorreceptores. Registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). A. Taquicardia Reflexa. B. Bradicardia Reflexa. Observe-se as alterações hemodinâmicas após administração de droga vasoativas e os cálculos respectivos.

3.9. Avaliação da modulação autonômica

3.9.1. Análise espectral e espectral cruzada

Algoritmo Paramétrico Autorregressivo

A decomposição de séries temporais de vários sinais como: intervalo de pulso (tacograma), pressão arterial sistólica (sistograma), pressão arterial diastólica (diastograma), atividade nervosa (neurograma), etc, são obtidas através da análise espectral. Com essa análise podemos obter os espectros com suas respectivas potências a partir de bandas de frequência pré-determinadas. As análises espectrais e espectral cruzada foram realizadas pelo Algoritmo paramétrico Autorregressivo. Esse algoritmo nos permite através de remodelamento matemático a obtenção dos componentes espectrais a partir de frequências centrais, presente no sinal desejado (p. ex. Intervalo de pulso, pressão arterial, atividade nervosa, etc). O modelo da ordem utilizado será o de Akaike e às potências espectrais foram apresentados em valores absolutos e normalizados. Estas foram integradas em duas faixas de frequência de interesse: frequências altas (HF) entre 0,75 e 3,0 Hz e frequências baixas (LF) entre 0,20 e 0,75 Hz.

3.9.2 Avaliação do controle autonômico

A modulação autonômica (simpática e parassimpática) foi avaliada, a partir do registro basal dos animais acordados, através de ferramenta de análise tempo-frequência da variabilidade do intervalo de pulso (VAR-IP) e da pressão arterial sistólica (VAR-PAS). A variabilidade do IP e da PAS foi avaliada no domínio do tempo através da variância e no domínio da frequência usando o método de análise autoregressiva^(137,138,139).

Resumidamente, as séries temporais de VAR-IP e VAR-PAS foram divididas em segmentos de 200 batimentos com sobreposição de 50%; um espectro foi calculado para cada segmento de acordo com o critério de Levinson-Durbin, com o modelo de ordem escolhido de acordo com o critério de Akaike, na faixa entre 10-14.

Os componentes oscilatórios foram quantificados em duas faixas de frequência de interesse: frequências altas (HF) entre 0,8 e 4 Hz e frequências baixas (LF) entre 0,06 e 0,15 Hz. Os dados foram expressos em unidades absolutas e percentuais. O componente LF foi usado como índice da modulação simpática e o componente HF foi usado como um índice da modulação parassimpática. A relação entre LF/HF foi utilizada como indicador do balanço simpato-vagal(140). Segmentos que apresentem oscilações em muito baixa frequência (< 0.1 Hz) que contribuíam para mais de 70% de toda a variabilidade foram considerados segmentos não estacionários e foram descartados do estudo.

Em relação a VAR-PAS, a análise no domínio da frequência ocorreu pela decomposição do sistograma pela Transformada Rápida de Fourier e após esse ajuste matemático foi obtida a potência absoluta da banda de baixa frequência (LF).

3.10. Análise de gases arteriais

Após 24 horas da indução de sepse, foi obtida 0.2 ml de sangue arterial da aorta abdominal. A amostra foi obtida com heparina sódica e logo foi analisada no equipamento ABL800 FLEX (Radiometer, Dinamarca)

3.11. Eutanásia dos animais

Ao término dos experimentos, os ratos receberam uma sobrecarga de tiopental sódico via endovenosa.

3.12. Análise da Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

O recrutamento ou transmigração de neutrófilos para o pulmão foi quantificado indiretamente, através da medida da atividade enzimática da MPO. Os tecidos foram homogeneizados em solução de tampão fosfato de sódio (50 mM; pH 6,0) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; 0,5 %, p/v). O homogenato resultante foi centrifugado (20 min, 10.000 g, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio de determinação da atividade da enzima MPO. Para o ensaio enzimático foi utilizada uma alíquota de 25 µL do sobrenadante. A reação enzimática foi desenvolvida na presença de ortodianisina (1,6 mM) e H₂O₂ 0,1% (em solução tampão fosfato 80 mM; pH 5,4), por 5 minutos e leitura a 450 nm. Os valores foram apresentados na forma de unidades de densidade óptica (D.O.) / peso do tecido em g.

3.13. Medição Hematológica

Para as medições hematológicas as amostras de sangue foram obtidas em tubos de K2 EDTA e processadas dentro das 24 horas. Para a contagem absoluta de células foi usado o aparelho Hemacounter 60 (Rayto life and analytical sciences, China). Para a medição diferencial de leucócitos foi usado a técnica de tinção Wright, a partir do esfregaço sanguíneo

3.14. Coleta do baço e obtenção de esplenócitos

Após a eutanásia dos animais os baços dos mesmos foram removidos cirurgicamente e mantidos em placas de Petri estéreis contendo 2-3 mL de PBS (Solução buffer fosfato) a 4°C. Um pequeno fragmento foi separado e pesado para ser submetido à análise das subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo, outro fragmento foi fixado em formaldeído 10% e o restante do órgão foi imediatamente congelado à -80°C para outras análises.

O fragmento extraído do baço total foi divulsionado com a ajuda de um filtro de 0.70 μm , até a obtenção de uma suspensão celular turva. Essa suspensão foi centrifugada a 500g durante 10 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 4 ml de tampão de lise de hemácias (Tris 0,17M e NH_4Cl 0,16M) por 4 minutos. Para inativação do tampão de lise foram acrescentados 5 mL de PBS. As células foram centrifugadas a 400g durante 10 min a 4 °C e posteriormente a concentração celular foi ajustada para o experimento de imunofenotipagem das células por citometria de fluxo.

3.15. Medidas das subpopulações linfocitárias

A medição de subpopulações linfocitárias, foi feita a partir de alíquotas de 100 μL de células mononucleares de sangue periférica e células do baço, contendo $2,5 \times 10^5$ células/100 μL , foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente escuro, com 2 μL de anticorpos monoclonais diretamente conjugados aos fluorocromos. Foram feitas marcações duplas para a análise das subpopulações linfocitárias. As seguintes subpopulações linfocitárias foram analisadas de acordo ao protocolo do fabricante: CD3+

(linfócitos T totais), CD3+CD4+ (linfócitos T *helper* ou auxiliares), CD8+ (linfócitos T citotóxicos e NK) e CD4+CD25+Foxp3+ (linfócitos T reguladores)

3.16. Estudo da expressão de proteínas (western blotting e Milliplex)

Os tecidos congelados dos animais foram homogeneizados em uma solução de K-Hepes (200mM Mannitol, 80mM Hepes, 41mM KOH; pH 7.5) contendo inibidores de proteases (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, Estados Unidos) usando um pistilo de teflon (Schmidt and Co, Frankfurt/M, Alemanha). Todo o procedimento foi feito no gelo, com uso de nitrogênio líquido quando necessário. O homogenato foi então centrifugado (20000 G) por 15 min a 4°C para remoção das células e resíduos celulares. A medida da concentração da proteína foi feita pelo método de Bradford (Bioagency, Brasil).

3.16.1. Western blot

As amostras de proteína foram submetidas à eletroforese em minigel de poliacrilamida. Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, os blots foram tratados com leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-T (24,2 g de TRIS base, 29,2g de NaCl, 3,36 g de EDTA, Tween20, pH 7.5) por 1 hora e incubados com anticorpos específicos diluídos em TBS-T. A marcação foi feita através da peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (anti-rabbit, anti-goat, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) usando sistema de quimiluminescência (ECL, Amersham, Reino Unido).

Semi-quantificação das proteínas - As bandas obtidas foram obtidas no aparelho Alliance 4.2 (UVITEC, Reino Unido) e realizada a densitometria pelo

software Image J (NIH, Bethesda, Estados Unidos). As bandas foram normalizadas pela densitometria das bandas originadas pela hibridização do GAPDH (Millipore, Estados Unidos).

Foram estudadas as respectivas proteínas: TLR4 e $\alpha 7$ -nAChR (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos) no baço e no coração. STAT3 e pSTAT3 (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos) no baço.

3.16.2 Medidas das citocinas

As medidas de citocinas foram feitas utilizando o sistema multiplex / luminex de detecção (MILLIPLEX® MAP Kit - Multiplex Assays Using Luminex®, Alemanha) assim como o painel (Rat Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel) para analisar as seguintes citocinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, INF- γ , VEGF e TNF- α no baço e no sangue periférico.

Para a dosagem da citocinas, as placas contendo 96 poços tiveram seus filtros lavados com *Bioplex Wash Buffer*, e logo, foram adicionadas *beads* conjugadas com os anticorpos anti-citocinas e lavados com *Bioplex Wash Buffer*.

As amostras foram adicionadas segundo as diretrizes do fabricante, e se mantiveram incubadas por 2 horas. As placas foram lavadas novamente com o buffer e depois foi adicionado o anticorpo biotinilado em cada poço. A detecção das citocinas foram reconhecidos por epítomos diferentes daqueles anticorpos conjugados com as beads. Após 1 hora as placas foram lavadas com buffer e analisadas pelo *Bioplex Suspension Array System/Luminex* (Bio-rad, Estados

Unidos) utilizando o software Bio-Plex Manager, versão 4.0 (Bio-rad, Estados Unidos).

3.17. Estudo Histológico

Os tecidos dos animais foram perfundidos com solução de PBS (pH 7,4). Em seguida o baço, o pulmão, o coração, uma parte do intestino e um caso especial os explantes do cordão umbilical foram retirados e seccionados transversalmente em um fragmento de aproximadamente 0,5cm² para logo ser fixado em solução de 10% de formalina tamponada. Após fixação os tecidos parafinizados automaticamente, a partir da desidratação em banhos sucessivos de álcoois com aumento progressivo de concentração, seguido de diafanização (banho de álcool absoluto e xilol) e finalmente foram incluídos em parafina fundida a 60° C e cortadas em seções de 4 µm de espessura. Para a realização dos estudos histológicos, a parafina foi removida dos fragmentos de tecido após as laminas serem aquecidas a 60° C por 30 minutos e incubadas em xilol. Logo as lâminas passaram por banhos de álcool absoluto para remoção dos restos do xilol e reidratados em banhos sucessivos de álcool 96%, álcool 70% e água destilada. Ao final de cada estudo histológico as laminas foram secadas ou embebidas em gradientes maiores de álcool até chegar ao xilol, logo as lâminas foram cobertas com lamínula de vidro, utilizando meio de montagem permount.

3.17.1. Estudo de Imuno-histoquímica

As lâminas de tecido pulmonar foram submetidas à reação de imuno-histoquímica para identificação de macrófagos, de acordo com o seguinte

protocolo: os cortes foram incubados overnight à temperatura de 4° C com anticorpo anti-CD68 (CD62P, Abbiotec, Estados Unidos) na diluição 1/100. O produto dessa reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase e a cor desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), na presença de água oxigenada. A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris. Foi expresso o número de células CD68+ sobre o número total de células do parênquima pulmonar, foram avaliados de 25 a 30 campos (0.087 mm²/campo), determinado uma média para cada animal.

3.17.2. Estudo de morte celular no pulmão, baço e intestino

A indução de apoptose por causa da sepse foi avaliada utilizando o método TUNEL (TdT mediated dUTP nick endlabelling). As lâminas foram desparafinadas e processadas segundo o protocolo sugerido pelo fabricante (In Situ Cell Death Detection Kit, POD®, Roche Applied Science, Alemanha), seguindo as etapas: (1) permeabilização da amostra com Proteinase K (20ug/mL) à temperatura ambiente por 30 minutos; (2) reação para equilíbrio e inserção de nucleotídeos com a enzima TdT (terminal deoxinucleotidil transferase), reação em câmara úmida a 37°C por 60 minutos; (4) finalização da reação com tampão de parada; (5) detecção com aplicação de imunofluorescência e contraste com DAPI. Foi expresso o número de células TUNEL positivas, sobre o número total de células do parênquima pulmonar. Foram avaliados de 25 a 30 campos (0.087 mm²/campo) determinado uma média para cada animal.

3.18. Análise estatística

Os dados estão expressos em média $\pm$ erro padrão ou média $\pm$ desvio padrão. Diferenças entre as médias dos múltiplos parâmetros foram analisadas pelo método One-Way ANOVA, seguido pelo análise *post-hoc* de Newman-Keuls ou pelo método Kruskal-Wallis seguido pelo análise *post-hoc* de Dunn. O programa estatístico utilizado foi o GraphPrism 5.0. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. Resultados

4.1. Obtenção e caracterização das células-tronco mesenquimais da geleia da Wharton (CTM-GW)

Após coleta e transporte, as amostras de cordão umbilical foram processadas para a obtenção da geleia de wharton. De acordo o protocolo do método explant, a partir das duas semanas de cultura, foram observadas células aderidas à superfície das placas de cultura com características fibroblastóide ao redor dos pedaços de GW (*explants*). Com passar dos dias, essas células foram migrando e formando colônias até sua tripsinização.

Diferentemente do isolamento e expansão das CTM derivadas do tecido adiposo, as CTM derivadas da GW ou do estroma do cordão umbilical precisam de maior tempo para sua adesão, migração e proliferação, sendo de 18 a 30 dias o intervalo de tempo em média para nosso procedimento de cultura primaria, e de 35 a 45 dias, para chegar até a passagem 4 e a criopreservação das respectivas células. **(Figura 14)**

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), definição de CTM, se baseia em três critérios mínimos: as CTM precisam apresentar uma morfologia fibroblastóide, **(Figura 14)** imunofenótipo negativo para células de linhagem hematopoiética e positivo para linhagem mesenquimal, **(Figura 15 e 16)** além da capacidade de diferenciação *in vitro* em três linhagens (adipogênica, osteogênica e condrogênica). **(Figuras 17)**

Figura 14 - Células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton em cultura. A. *Explant* da geleia de Wharton (GW) do Cordão Umbilical; coloração HE, linha azul: 1 mm (2.5X). **B.** *Explant* da GW do cordão umbilical; coloração HE, linha azul: 100 μ m (20X). **C.** Células em migração saindo do explant (4X), após 18 – 20 dias de cultura primária. **D.** Avaliação morfológica (10x), as CTM apresentam uma morfologia fibroblastóide. P1: Passagem 1.

Figura 15 – Imunofenotipagem das Células-tronco da geleia de Wharton (Passagem 3, P3). A imunofenotipagem de moléculas de superfície das células retiradas demonstrou que a população celular total tinha 99,6% de CD73+; 97,7% de células CD90+; 99% de células CD105+; 99% de células CD44+; 99% de células CD29+; 0,175% de CD45+; 0,314% de CD34+ e 4% de HLA-DR+.

Figura 16 – Imunofluorescência das Células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton (Passagem 3, P3). Marcação positiva para CD90, CD146 e CD44; e marcação negativa para CD14, CD19 e STRO-1. Linha cinza: 50 um (40x).

Figura 17 - Diferenciação das Células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton. A. Diferenciação adipogênica, lipídios corados em vermelho (40X) **B.** Diferenciação condrogênica, glucopeptidos sulfatados são evidenciados de cor turquesa, característica dos condrócitos (40X) **C.** Diferenciação Osteogênica, cristais de cálcio são evidenciados de cor vermelho refringente, característica dos osteócitos (10X). Linha azul: 50 μ m.

4.2. Avaliação cardíaca

4.2.1. Medições morfológicas

Em relação aos parâmetros morfológicos do coração, não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. **(Tabela 5)**

Tabela 5 – Parâmetros morfológicos do ventrículo esquerdo

	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW
VEDIA (cm)	0,66±0,02	0,61±0,02	0,64±0,02
PPVEDIA (cm)	0,12±0,01	0,13±0,004	0,13±0,01
SIVDIA (cm)	0,12±0,004	0,12±0,01	0,11±0,003
VESIS (cm)	0,40± 0,01	0,38± 0,02	0,39± 0,02
MVE (g)	0,42± 0,04	0,41± 0,03	0,42± 0,04

VEDIA: Cavidade diastólica do Ventrículo Esquerdo. PPVEDIA: Espessura da parede do VE na diástole. SIVDIA: Espessura do septo interventricular na diástole. VESIS: Cavidade sistólica do Ventrículo Esquerdo. MVE: Massa ventricular esquerda. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10⁶ CTM-GW após 6h da cirurgia. Valores expressos em média ± erro padrão. *n* = 7 animais/grupo.

4.2.2. Função global e sistólica: As CTM-GW mantiveram estável a função miocárdica na sepse

A função global é determinada pelo índice de desempenho miocárdico (IDM). O grupo LPC apresentou uma diminuição nesse parâmetro em relação ao grupo SHAM, no entanto o tratamento com CTM-GW restabeleceu esse valor, indicando uma melhora na função global, enquanto a função sistólica não encontramos alterações significativas entre os parâmetros. **(Tabela 6 e Figura 18)**

Tabela 6 – Função geral e sistólica

	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW
IDM	0,46± 0,03	0,59± 0,03*	0,45± 0,05#
Débito cardíaco (mL/min)	72,1±2,1	61,5±3,3	70,3±5,04
Fração de ejeção (%)	74,7±1,80	71,4±2,88	74,9±2,97
Fração de encurtamento (%)	39,2±1,69	38,1±2,21	39,4±2,58

IDM: Índice de desempenho miocárdico. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10⁶ CTM-GW após 6h da cirurgia. Valores expressos em média ± erro padrão. *n* = 7 animais/grupo. *: *p*<0,05 vs SHAM; #: *p*<0,05 vs LPC

Figura 18 - Função geral e sistólica, avaliada 24 horas após a indução da sepse.

IDM: Índice de desempenho miocárdico. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 106 CTM-GW após 6h da cirurgia. *: $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC.

4.2.3. Função diastólica: As CTM-GW conseguiram atenuar a disfunção diastólica na sepse

Nosso modelo de sepse desenvolveu aumento significativo na Onda E, na relação onda E/ onda A (E/A) e no indicador E/E', por outro lado a doença diminuiu a relação E'/A', sendo essas alterações contrastadas com grupo SHAM. O tratamento com CTM-GW não conseguiu regular o pico da onda E, o que está relacionada com o enchimento rápido, mas na avaliação da relação E/A e E/E' o tratamento conseguiu normalizar esses indicadores, em relação ao grupo SHAM. (Tabela 7 e figura 19 - 20)

Tabela 7 – Função diastólica

	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW
TRIV (ms)	24,5±1,81	22,2±1,75	23,0±0,98
TDE (ms)	29,6±3,77	29,8±3,11	32,7±2,96
Onda E (m/s)	0,59±0,04	0,82±0,07*	0,83±0,03*
Onda A (m/s)	0,41± 0,04	0,35± 0,04	0,46± 0,03
E/A	1,54± 0,13	2,83± 0,53*	1,74± 0,12 [#]
E'(m/s)	0,04±0,005	0,04±0,004	0,05±0,01
A'(m/s)	0,04 ±0,002	0,05±0,01	0,05±0,01
E'/A'	1,15±0,13	0,8±0,06*	1,08±0,17
E/E'	15,9±1,02	23,5±1,78*	12,7±1,40 [#]

TRIV: Tempo de relaxamento isovolumétrico. TDE: Tempo de desaceleração do pico E. E/A: Relação onda E / onda A. E'/A': Relação dos picos E'/A' do doppler tecidual obtido no nível do anel mitral da parede septal do VE. E/E': Relação do pico E e pico E'. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10⁶ CTM-GW após 6h da cirurgia. Valores expressos em média ± erro padrão. n = 7 animais/grupo. *: p<0,05 vs SHAM; #: p<0,05 vs LPC

Figura 19 - Função diastólica, avaliada 24 horas após a indução da sepse. TRIV: Tempo de relaxamento isovolumétrico. TDE: Tempo de desaceleração do pico E. E/A: Relação onda E / onda A. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia. *: $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC.

Figura 20 - Função diastólica aferido pelo doppler, avaliada 24 horas após a indução da sepse. E'/A': Relação dos picos E'/A' do doppler tecidual obtido no nível do anel mitral da parede septal do VE. E/E': Relação do pico E e pico E'. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia. *: $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC.

4.3. Avaliação Hemodinâmica

Apesar de alguns trabalhos descreverem alterações hemodinâmicas na sepse como hipotensão, no nosso estudo, não encontramos alterações significativas no grupo com sepse em relação ao grupo SHAM. Os tratamentos com CTM-GW e MLA mais CTM-GW, não alteraram os parâmetros hemodinâmicos, os grupos mostraram semelhança com o SHAM. **(Tabela 8)**

Tabela 8 - Função Hemodinâmica

	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW	LPC + MLA + CTM-GW
PAS (mmHg)	133,3 ± 3,70	128,2 ± 2,92	134,6 ± 2,70	137,9 ± 3,8
PAD (mmHg)	98,5 ± 3,71	92,8 ± 2,66	92,8 ± 1,37	91,8 ± 2,7
PAM (mmHg)	115,1 ± 3,62	107,1 ± 2,60	110,8 ± 2,22	113,3 ± 3,1
FC (bpm)	389,0 ± 7,96	421,3 ± 18,5	387,2 ± 3,71	353,7 ± 9,3

PAS: Pressão arterial sistólica. PAD. Pressão arterial diastólica. Pressão arterial média. FC: Frequência cardíaca. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10^6 CTM 6h após cirurgia. Valores expressos em média ± erro padrão. $n = 7$ animais/grupo.

4.4. Avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores: As CTM-GW protegeram a resposta baroreflexa na sepse.

Na sepse, como já é descrito, se evidenciam alterações na sensibilidade dos pressorreceptores. Nos animais com sepse tanto a taquicardia reflexa, induzida pelo nitroprussiato de sódio (0,5 µ/Kg / 1 µ/Kg), quanto a bradicardia reflexa, induzida pela fenilefrina (0,25 µ/Kg / 0,5 µ/Kg), apresentaram alterações na resposta. Podemos concluir com estes achados que frente a uma alteração da PAM (geralmente queda), não se consegue estabelecer uma resposta adequada da FC (que seria uma resposta de aumento da FC). O tratamento com CTM-GW protegeu a sensibilidade da resposta da taquicardia reflexa e bradicardia reflexa em alta e baixa dose dos compostos vasoativos. O grupo com adicional administração de MLA, mostrou que os efeitos das CTM-GW na sepse, foram mantidas em grande parte a pesar de ter a via colinérgica anti-inflamatória (VCA) bloqueada. **(Tabela 9 e Figura 21)**

Tabela 9 - Pressorreceptores.

(bpm/mmHg)	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW	LPC + MLA + CTM-GW
TR (0,5 ug)	4,03 ± 0,60	2,31 ± 0,18*	4,07 ± 0,62 [#]	3,92 ± 0,82 [#]
BR (0,25 ug)	-3,41 ± 0,34	-1,47 ± 0,16*	-2,61 ± 0,51 [#]	-1,84 ± 0,21*
TR (1 ug)	4,56 ± 0,74	2,61 ± 0,25*	4,02 ± 0,30 [#]	4,66 ± 0,59 [#]
BR (0,5 ug)	-3,51 ± 0,28	-1,24 ± 0,16*	-2,10 ± 0,11* [#]	-2,35 ± 0,25* [#]

TR: Taquicardia reflexa, após injeção endovenosa de 0.5 µg ou 1 µg de nitroprussiato de sódio, **BR:** Bradicardia reflexa após injeção endovenosa de 0.25 µg ou 0,5 µg de fenilefrina. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10⁶ CTM-GW após 6h da cirurgia e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10⁶ CTM 6h após cirurgia. Valores expressos em média ± erro padrão. *n* = 7. *: *p*<0,05 vs SHAM; #: *p*<0,05 vs LPC.

Figura 21 - Sensibilidade dos presorreceptores, avaliada 24 horas após a indução da sepse. A. TR: Taquicardia reflexa, após injeção endovenosa de 0.5 µg de nitroprussiato de sódio, BR: Bradicardia reflexa, após injeção endovenosa de 0.25 µg de fenilefrina. **B.** TR após injeção endovenosa de 1 µg de nitroprussiato de sódio, BR após injeção endovenosa de 0.5 µg de fenilefrina. **bpm:** batimentos por minuto. Os dados são expressos como média ± erro padrão. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10^6 CTM 6h após cirurgia. *: $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC.

4.5. Avaliação Autonômica

4.5.1. Análise espectral: As CTM-GW atenuaram a disfunção autonômica na sepse e estimularam a atividade simpática e parassimpática no coração

Na análise espectral no domínio da frequência cardíaca foi observado um quadro de disfunção autonômica no grupo LPC. Em relação ao grupo SHAM os animais sépticos apresentaram uma queda na variância do intervalo do pulso (variabilidade da frequência cardíaca) e no valor absoluto da alta frequência HF (ms^2) que representa à atividade vagal – parassimpática sobre o coração. O tratamento com CTM-GW restabeleceu a queda do HF (ms^2), no entanto, induziu um incremento no valor absoluto da baixa frequência LF (ms^2) que representa à atividade simpática e além um aumento no índice RMSSD (atividade parassimpática). O grupo com MLA, mostrou que o bloqueio da via colinérgica anti-inflamatória (VCA) não interfere na indução ou estimulação dos valores absolutos de LF e HF, por parte das CTM-GW na sepse. Esse resultado junto ao observado em análises prévias evidenciam que composto MLA, não foi prejudicial para as CTM-GW em termos de citotoxicidade.

Enquanto na análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica, encontramos que o grupo LPC apresentou uma diminuição significativa no valor absoluto da baixa frequência LF (mmHg) e uma tendência negativa na variância do PAS em relação ao grupo SHAM. O tratamento com CTM-GW restabeleceu essas alterações, sendo comparáveis com o grupo SHAM. O grupo com MLA evidenciou que é necessário a VCA para que as CTM-GW consigam manter a variabilidade da pressão arterial na sepse.

(Tabela 10 – 11 e figura 22 - 23)

Tabela 10 - Análise espectral no domínio da frequência cardíaca

	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW	LPC + MLA + CTM-GW
Variância do IP (ms²)	172,5 ± 39,5	47,3 ± 5,76*	131,7 ± 41,3	76,91 ± 15,93
RMSSD (ms)	4,65 ± 0,47	3,85 ± 0,41	6,10 ± 0,80 [#]	5,29 ± 0,4
LF (ms²)	1,64 ± 0,20	1,2 ± 0,30	2,93 ± 0,79 [#]	3,18 ± 0,82 [#]
HF (ms²)	5,76±1,02	3,43±0,35*	7,72±0,85 [#]	6,57 ± 0,92 [#]
LF (%)	10,1±1,57	7,71±0,94	9,6±1,47	13,8±2,13
HF (%)	33,2±3,3	26,9±3,3	34,8±4,89	34,6±4,48
LF/HF	0,34 ± 0,07	0,31 ± 0,03	0,34 ± 0,06	0,34 ± 0,06

IP: Intervalo do pulso. RMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, em um intervalo de tempo (Medida de atividade parassimpática). LF (ms²): Valor absoluto da baixa frequência (Medida de atividade simpática). HF (ms²): Valor absoluto da alta frequência (Medida de atividade parassimpática). LF (%): Valor relativo da baixa frequência. HF (%): Valor relativo da alta frequência. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10⁶ CTM-GW após 6h da cirurgia e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10⁶ CTM 6h após cirurgia. Valores expressos em média ± erro padrão. *n* = 7 animais/grupo. *: *p*<0,05 vs SHAM; #: *p*<0,05 vs LPC.

Tabela 11 - Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica e índice alfa

	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW	LPC + MLA + CTM-GW
Variância do PAS (mmHg²)	42,7 ± 7,22	28,6 ± 3,62	49,1 ± 8,07 [#]	25,07 ± 3,07 ^{&}
LF (mmHg²)	8,78 ± 2,03	3,07 ± 0,21 [*]	6,52 ± 0,82	5,64 ± 0,73
Índice alfa (ms/mmHg)	0,49 ± 0,04	0,71 ± 0,09	0,61 ± 0,05	0,76 ± 0,12

PAS: Pressão arterial sistólica. LF (mmHg): Valor absoluto da baixa frequência. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10⁶ CTM-GW após 6h da cirurgia e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10⁶ CTM 6h após cirurgia. Valores expressos em média ± erro padrão. *n* = 7 animais/grupo. *: *p*<0,05 vs SHAM; #: *p*<0,05 vs LPC; &: *p*<0,05 vs LPC + CTM-GW

Figura 22 - Análise espectral no domínio da frequência cardíaca. IP: Intervalo do pulso. RMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, em um intervalo de tempo (Medida de atividade parassimpática). LF (ms²): Valor absoluto da baixa frequência (Medida de atividade simpática). HF (ms²): Valor absoluto da alta frequência (Medida de atividade parassimpática). LF (%): Valor relativo da baixa frequência. HF (%): Valor relativo da alta frequência. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia. *: $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC.

Figura 23 - Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica e índice alfa. PAS: Pressão arterial sistólica. LF (mmHg): Valor absoluto da baixa frequência. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia. *: $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC. &: $p < 0,05$ vs LPC + CTM-GW

4.6. Avaliação Pulmonar

4.6.1. Gasometria

A sepse não alterou significativamente os parâmetros gasométricos, a exceção da pressão parcial de CO₂ (PCO₂) que apresentou uma diminuição significativa em relação ao grupo SHAM (grupo controle). O grupo dos animais com sepse tratados com CTM-GW (LPC + CTM-GW) não apresentaram alterações significativas. **(Tabela 12).**

Tabela 12 – Gasometria arterial

	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW
pH	7,44± 0,01	7,51± 0,03	7,46±0,03
PCO ₂ (mmHg)	32,2±2,38	26,2±1,09*	30,33±1,88
SO ₂ (mmHg)	95,4± 0,47	94,8±1,98	95,4±0,90
HCO ₃ (mEq/L)	22,8±1,28	22,3± 0,81	22,0±1,1
Lactato (mmol/L)	1,58± 0,11	2,08± 0,32	1,58±0,13

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10⁶ CTM-GW após 6h da cirurgia. Valores expressos em média±erro padrão. *n* = 7 animais/grupo. *: *p*<0,05 vs SHAM; #: *p*<0,05 vs LPC.

4.6.2. Infiltração de Macrófagos no Pulmão

A sepse é um processo hiper-inflamatório caracterizado pela mobilização e infiltração de leucócitos. No nosso modelo avaliamos esse processo mediante a infiltração de macrófagos, pela imunolocalização de células CD68 positivas no parênquima pulmonar. Os grupos LPC e LPC + CTM-GW apresentaram um aumento significativo no número de macrófagos, quando comparado ao grupo SHAM. No entanto não foram estatisticamente diferentes entre eles. (Tabela 13 e Figuras 24 e 25)

Tabela 13 - Infiltração de Macrófagos no Pulmão.

	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW
Células CD68 + (%)	2,21± 0,37	8,15±1,55*	5,42± 0,72*

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia. Valores expressos em média±erro padrão. $n = 7$ animais/grupo. *: $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC.

Figura 24 - Número de células CD68 positivas (%) do parênquima pulmonar, avaliada 24 horas após a indução da sepse. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia. Os dados são expressos como média ± erro padrão. $n = 7$ animais/grupo. *: $p < 0,05$ vs SHAM.

Figura 25 - Imunolocalização de macrófagos (células CD68+) do parênquima pulmonar, avaliada 24 horas após a indução de sepse. A, B. SHAM. Marcação de macrófagos residentes do pulmão. C, D. LPC. E, F. LPC + CTM-GW. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia. $n = 7$ animais/grupo. Linha azul: 50 μ m. **Seta azul: células CD68+.**

4.6.3. Medida da atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO): As CTM-GW diminuíram a infiltração de neutrófilos no pulmão através da via colinérgica anti-inflamatória na sepse

A medição da atividade MPO está relacionada com a presença ou infiltração proporcional de neutrófilos nos tecidos. O grupo LPC apresentou um aumento significativo da MPO pulmonar em relação ao grupo SHAM, no entanto o tratamento com CTM-GW reduziu os níveis desse marcador de inflamação. A administração de MLA, evidenciou a importância da VAC para que as CTM-GW consigam reduzir a infiltração de neutrófilos e, por conseguinte a inflamação. (Tabela 14 e Figura 26).

Tabela 14 - Medição da atividade da mieloperoxidase pulmonar

	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW	LPC + MLA + CTM-GW
MPO pulmonar (Abs/g peso)	1,27 ± 0,23	5,02 ± 0,83*	2,09 ± 0,63#	4,23 ± 0,35*&

MPO: mieloperoxidase, SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10⁶ CTM-GW após 6h da cirurgia. Valores expressos em média±erro padrão. n = 7 animais/grupo.. Valores expressos em média ± erro padrão. n = 7 animais/grupo. *: p<0,05 vs SHAM; #: p<0,05 vs LPC

Figura 26 - Medição da atividade da mieloperoxidase pulmonar (MPO), avaliada 24 horas após a indução da sepse. MPO: mieloperoxidase, SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM: grupo submetido LPC mais tratamento de 10^6 CTM após 6h da cirurgia e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10^6 CTM 6h após cirurgia. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. $n = 7$ animais/grupo. *: $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC; &: $p < 0,05$ vs LPC + CTM-GW

4.7. Avaliação celular e imunológica

4.7.1. Medidas hematológicas

A sepse pode levar a diversas alterações no número dos componentes leucocitários. É assim que os animais do grupo LPC apresentaram uma alteração significativa na contagem relativa dos linfócitos, neutrófilos e na concentração de plaquetas, alterações em relação ao grupo SHAM. No entanto o grupo tratado apresentou um perfil comparável com o grupo controle. (**Tabela 15 e Figura 27**)

Tabela 15 - Dados hematológicos

	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW
Leucócitos (10^3 células/mm³)	6,8±0,58	5,64±0,49	5,92±0,60
Linfócitos (%)	73,5 ±1,19	58,3±5,12*	74,8 ±3,77 [#]
Neutrófilos (%)	20,0±0,58	33,8±4,25*	20,0±3,49 [#]
Monócitos (%)	5,75±1,03	8,60±0,93	5,25±1,03
Hemácias (10^6 células/mm³)	5,50±0,15	7,42±1,08	6,07±0,36
Hemoglobina (mg/dL)	12,4±0,27	13,6±0,51	13,4±0,52
Hematócrito (%)	29,1±1,07	34,1±2,0	33,1±1,91
Plaquetas (10^3/mm³)	850,8±41,8	705,2±38,04*	768,5±7,3

HTO: Hematócrito. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaonitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10^6 CTM 6h após cirurgia. Valores expressos em média ± erro padrão. $n = 7$ animais/grupo. *: $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC; &: $p < 0,05$ vs LPC + CTM-GW

Figura 27 - Medição de parâmetros hematológicos, avaliada 24 horas após a indução da sepse. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM: grupo submetido LPC mais tratamento de 10^6 CTM após 6h da cirurgia e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10^6 CTM 6h após cirurgia. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. n = 7 animais/grupo. *: p<0,05 vs SHAM; #: p<0,05 vs LPC; &: p<0,05 vs LPC + CTM-GW.

4.7.2. Perfil de citocinas em soro: As CTM-GW reduzem o ambiente pró-inflamatório na sepse, assim a concentração do TNF- α sérico é regulado através da via colinérgica anti-inflamatória.

A sepse em uma fase aguda é caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios e em menor medida mediadores anti-inflamatórios. Todos esses mediadores com diferente cinética de liberação no soro. No nosso estudo conseguimos observar diversas respostas imunológicas tanto no grupo com sepse, o grupo tratado, quanto no grupo com bloqueio da VAC. O grupo séptico mostrou aumento significativo das citocinas: IL-6, IL-12p70, IL-17, IL-18, TNF- α e VEGF no soro, em relação ao SHAM. O tratamento com CTM-GW diminuiu as concentrações séricas dessas citocinas pró-inflamatórias, no entanto aumentou significativamente a concentração de VEGF. O grupo com MLA evidenciou que as CTM-GW conseguem diminuir as concentrações séricas de TNF- α na sepse através de via colinérgica anti-inflamatória. **(Tabela 16).**

Tabela 16 - Perfil de citocinas em soro

(pg/mL)	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW	LPC + MLA + CTM-GW
IL-6	22,1 ± 2,53	75,3 ± 17,3*	32,7 ± 4,40 [#]	36,5 ± 6,61 [#]
IL-12p70	9,29 ± 0,92	23,8 ± 5,05*	10,1 ± 1,60 [#]	12,7 ± 2,31 [#]
IL-13	0,36 ± 0,03	0,70 ± 0,12	0,83 ± 0,14	0,83 ± 0,11
IL-17A	5,12 ± 0,68	10,4 ± 0,88*	6,41 ± 0,60 [#]	6,15 ± 0,36 [#]
IL-18	12,1 ± 2,01	49,2 ± 9,43*	17,9 ± 5,37 [#]	27,5 ± 5,73
TNF-α	1,37 ± 0,04	2,50 ± 0,28*	1,61 ± 0,08	3,21 ± 0,88* ^{&}
VEGF	25,4 ± 2,34	31,0 ± 3,02*	46,4 ± 5,29* [#]	27,0 ± 2,21 ^{&}

IL: Interleucina, INF-γ: Interferon gamma, TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa, VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10⁶ CTM-GW após 6h da cirurgia e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10⁶ CTM 6h após cirurgia. Valores expressos em média ± erro padrão. *n* = 7 animais/grupo. *: p<0,05 vs SHAM; #: p<0,05 vs LPC; &: p<0,05 vs LPC + CTM-GW

4.7.3. Perfil de citocinas no baço: As CTM-GW controlam o ambiente pró-inflamatório na sepse, assim as concentrações de IL-6, IL-17A, INF- γ e TNF- α esplênicos são regulados através da via colinérgica anti-inflamatória

O baço cumpre um papel importante na regulação imunológica. Assim, a via colinérgica anti-inflamatória tem ao baço como um dos componentes principais para agir frente à inflamação. No caso da sepse se apresentam diversas cinéticas em relação os mediadores inflamatórios. O grupo LPC apresentou um aumento significativo das citocinas pró-inflamatórias: IL-6, IL-12p70, IL-17A, IL-18, INF- γ e TNF- α , assim como um aumento da IL-4 e a relação de INF- γ / IL-10. O tratamento com CTM-GW reduziu em grande parte esses mediadores, induziu o aumento significativo do VEGF. O tratamento com CTM-GW reduziu a relação INF- γ / IL-10, o que indica que as células conseguiram mudar o perfil pró-inflamatório embora as citocinas anti-inflamatórias não tenham dado diferença. O grupo com administração de MLA evidenciou que as CTM-GW conseguem reduzir as citocinas: IL-6, IL-17A, INF- γ , TNF- α e a relação INF- γ / IL-10 através da VAC. **(Tabela 17 e Figura 28 e 29)**

Tabela 17 - Perfil de citocinas no baço

(pg/mg)	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW	LPC + MLA + CTM-GW
IL-1β	1,64 $\pm$ 0,68	33,1 $\pm$ 12,3	18,4 $\pm$ 11,8	55,9 $\pm$ 22,3*
IL-4	0,91 $\pm$ 0,29	4,64 $\pm$ 0,87*	2,31 $\pm$ 0,44	4,04 $\pm$ 1,31*
IL-6	9,66 $\pm$ 2,70	23,7 $\pm$ 2,82*	13,8 $\pm$ 2,29 [#]	25,7 $\pm$ 4,04* ^{&}
IL-10	1,61 $\pm$ 0,44	4,30 $\pm$ 0,80	4,23 $\pm$ 1,15	5,34 $\pm$ 0,75*
IL-12p70	0,98 $\pm$ 0,28	2,44 $\pm$ 0,40*	1,22 $\pm$ 0,19 [#]	1,81 $\pm$ 0,30
IL-13	0,33 $\pm$ 0,13	0,59 $\pm$ 0,08	0,38 $\pm$ 0,05	0,74 $\pm$ 0,09* ^{&}
IL-17A	0,38 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,14*	0,63 $\pm$ 0,09 [#]	1,13 $\pm$ 0,17* ^{&}
IL-18	342,3 $\pm$ 18,1	726,4 $\pm$ 102,7*	514,6 $\pm$ 95,6	524,3 $\pm$ 72,3
INF-γ	4,10 $\pm$ 1,12	29,0 $\pm$ 8,24*	15,6 $\pm$ 4,28	41,6 $\pm$ 10,0*
TNF-α	0,28 $\pm$ 0,04	1,10 $\pm$ 0,37*	0,59 $\pm$ 0,10	2,03 $\pm$ 0,90*
VEGF	2,56 $\pm$ 0,45	4,46 $\pm$ 0,57	4,95 $\pm$ 0,72*	3,09 $\pm$ 0,52
INF- γ / IL-10	1,83 $\pm$ 0,61	6,75 $\pm$ 1,64*	3,13 $\pm$ 0,44 [#]	7,97 $\pm$ 1,78* ^{&}

IL: Interleucina, INF- γ : Interferon gamma, TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa, VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10⁶ CTM-GW após 6h da cirurgia e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10⁶ CTM 6h após cirurgia. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. *n* = 7 animais/grupo. *: *p*<0,05 vs SHAM; #: *p*<0,05 vs LPC; &: *p*<0,05 vs LPC + CTM-GW

Citocinas pró-inflamatórias

Figura 28 – Medida de citocinas pró-inflamatórias no baço, avaliada 24 horas após a indução de sepse. IL: Interleucina, INF- γ : Interferon gamma, TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa. SHAM: grupo controle, LCP: grupo submetido a CLP, LCP + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10^6 CTM após 6h da cirurgia e LCP + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10^6 CTM 6h após cirurgia. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. n = 7 animais/grupo. *: p<0,05 vs SHAM; #: p<0,05 vs LCP; &: p<0,05 vs LCP + CTM-GW

Citocinas anti-inflamatórias e VEGF

Figura 29 – Medida de citocinas anti-inflamatórias e VEGF no baço, avaliada 24 horas após a indução de sepse. IL: Interleucina, VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10^6 CTM após 6h da cirurgia e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10^6 CTM 6h após cirurgia. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. n = 7 animais/grupo. *: p<0,05 vs SHAM; #: p<0,05 vs LPC; &: p<0,05 vs LPC + CTM-GW

4.8. Expressão de marcadores proteicos

4.8.1. Expressão do TLR4 e o receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$: As CTM-GW regulam os sinais da inflamação na sepse e estimulam os $\alpha 7$ nAChR no baço e no coração

O baço é órgão responsável da regulação da resposta inflamatória sistêmica. O TLR4 e o receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) são uns dos principais receptores pelas quais são modulados os macrófagos do baço e do coração. Demonstramos que na sepse houve um aumento na expressão do TLR4 e $\alpha 7$ nAChR em relação aos animais controle. No entanto, o tratamento com CTM-GW induz uma baixa expressão desses receptores em relação ao grupo séptico, tanto no baço quanto no coração. Em relação ao TLR4 observamos coerência com o que já demonstramos que as CTM-GW reduzem a expressão de NF- κ B na sepse. **(Tabela 18,19 e Figura 30).**

Tabela 18 - Expressão do TLR4 e o receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ no baço

	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW
TLR4 (%)	97,3 $\pm$ 4,28	118,2 $\pm$ 4,03*	106,9 $\pm$ 3,10 [#]
$\alpha 7$nAChR (%)	98,1 $\pm$ 1,95	115,1 $\pm$ 5,33*	92,0 $\pm$ 3,14 [#]

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse e LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 7$ animais/grupo. *: $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC

Tabela 19 - Expressão do TLR4 e o receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ no coração

	SHAM	LPC	LPC + CTM-GW
TLR4 (%)	100,0 $\pm$ 2,44	126,2 $\pm$ 11,1*	96,61 $\pm$ 5,40 [#]
$\alpha 7$nAChR (%)	100,0 $\pm$ 3,86	130,9 $\pm$ 6,69*	114,9 $\pm$ 3,51 [#]

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse e LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. $n = 7$ animais/grupo. *: $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC

Figura 30 - Expressão do TLR4 e o receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR). Baço (A) e Coração (B). Os grupos LPC e LPC + CTM-GW foram quantificados em relação ao controle. SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a sepse; LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão. $n = 7$ animais/grupo. #: $p < 0,05$ vs LPC.

4.8.2. Expressão do p-STAT3 e STAT3 Total no baço: As CTM-GW reduzem a relação p-STAT3/STAT3 total indicando assim a estimulação da via colinérgica anti-inflamatória na sepse

O p-STAT3 e o STAT3 total conformam parte da sinalização da via colinérgica anti-inflamatória depois da ativação do $\alpha 7$ nAChR (internalização citoplasmática). Assim a estimulação do $\alpha 7$ nAChR ativa e inibe indiretamente a ativação do STAT3 (fosforilação). Observamos que o tratamento com CTM-GW diminuiu relação p-STAT3 / STAT3 comparados com o grupo séptico sem tratamento e com o grupo com bloqueio da VAC. **(Tabela 20 e Figura 16).**

Tabela 20 – Relação p-STAT3 e STAT3

	SHAM	SHAM + CTM-GW	LPC	LPC + CTM-GW	LPC + MLA + CTM-GW
p-STAT3 / STAT3	1,37 $\pm$ 0,25	1,28 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,24 Φ	1,05 $\pm$ 0,04	1,63 $\pm$ 0,22 Φ

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10^6 CTM 6h após cirurgia. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão. Φ : $p < 0,05$ vs LPC+CTM-GW.

Figura 31 - Expressão do p-STAT3 e STAT3 TOTAL no baço, análise da relação.

SHAM: grupo controle, SHAM+CTM-GW: grupo controle mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10^6 CTM 6h após cirurgia. Φ : $p < 0,05$ vs LPC+CTM-GW.

4.9. Apoptose – TUNEL: As CTM-GW diminuem a apoptose na sepse independentemente da via colinérgica anti-inflamatória

A sepse causa uma lesão sistêmica e como consequência do dano, existe um aumento de apoptose na maioria das células do organismo. O efeito apoptose, pode ser evidenciado pela histologia mediante a reação TUNEL, o que indica a presença de células apoptóticas. O grupo LPC apresentou um aumento significativo no número de células TUNEL positivas quando comparado ao grupo SHAM (No pulmão: LPC $4,14 \pm 0,91$ vs SHAM $0,7 \pm 0,01$; $p < 0,05$) e (No Baço: LPC $1,98 \pm 0,36$ vs SHAM $0,67 \pm 0,14$; $p < 0,05$). No entanto o tratamento com CTM reduziu significativamente o número de células TUNEL positivas em relação ao grupo séptico (No pulmão: LPC $4,14 \pm 0,91$ vs LPC+CTM-GW $1,31 \pm 0,39$; $p < 0,05$) e (No baço: LPC $1,98 \pm 0,36$ vs LPC+CTM-GW $0,52 \pm 0,14$; $p < 0,05$). A administração de MLA não interferiu no efeito das CTM-GW (No pulmão: LPC $4,14 \pm 0,91$ vs LPC+MLA+CTM-GW $1,76 \pm 0,49$; $p < 0,05$) e (No baço: LPC $1,98 \pm 0,36$ vs LPC+MLA+CTM-GW $0,81 \pm 0,27$; $p < 0,05$). Na análise do intestino (íleo), observamos os mesmos padrões em relação ao tratamento com as CTM-GW, sob a inferência do efeito mostrado no pulmão e baço somente mostraremos os gráficos (**Figura 32, 33, 34 e 35**).

Figura 32 - Células TUNEL positivas (%) do parênquima pulmonar e esplênico.

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido à sepse, LPC + CTM-GW: grupo submetido a LPC mais tratamento de 10^6 CTM-GW após 6h da cirurgia e LPC + MLA + CTM-GW: grupo induzido à sepse com tratamento de 5mg/Kg Metillicaconitine (MLA) após 5:30h da indução da sepse e 10^6 CTM 6h após cirurgia. $n = 7$ animais/grupo. * $p < 0,05$ vs SHAM; #: $p < 0,05$ vs LPC.

Figura 33 – Reação TUNEL por imunofluorescência no pulmão. A: SHAM. B: LPC. C: LPC+CTM-GW. e D: LPC+MLA+CTM-GW. SHAM, o grupo apresenta poucas quantidades de células em apoptose. LPC, o grupo apresentou um aumento significativo. LPC+CTM-GW, o tratamento com CTM conseguiu reduzir a apoptose. LPC+MLA+CTM-GW, o bloqueio da via colinérgica anti-inflamatória não interferiu no efeito das CTM-GW. **A-D** (40x); **Seta amarela:** Células em apoptose “merge” (DAPI + Reação TUNEL). Linha cinza: 50 μ m.

Figura 34 – Reação TUNEL por imunofluorescência no baço. A: SHAM. B: LPC. C: LPC+CTM-GW. e D: LPC+MLA+CTM-GW. SHAM, o grupo apresenta poucas quantidades de células em apoptose. LPC, o grupo apresentou um aumento significativo. LPC+CTM-GW, o tratamento com CTM conseguiu reduzir a apoptose. LPC+MLA+CTM-GW, o bloqueio da via colinérgica anti-inflamatória não interferiu no efeito das CTM-GW. **A-D** (40x); **Seta amarela:** Células em apoptose “merge” (DAPI + Reação TUNEL). Linha cinza: 50 um

Figura 35 – Reação TUNEL por imunofluorescência no intestino (íleo). A,E: SHAM. B,F. LPC. C,G. LPC+CTM-GW. e D,H. LPC+MLA+CTM-GW. E,F,G,H: Placas de peyer. SHAM, o grupo apresenta poucas quantidades de células em apoptose. LPC, o grupo apresentou um aumento significativo. LPC+CTM-GW, o tratamento com CTM conseguiu reduzir a apoptose. LPC+MLA+CTM-GW, o bloqueio da via colinérgica anti-inflamatória não interferiu no efeito das CTM-GW. A-D (40x), E-F (20x); **Seta amarela:** Células em apoptose “merge” (DAPI + Reação TUNEL). Linha cinza: 50 um

5. Discussão

A presente investigação demonstrou que a administração de células-tronco mesenquimais derivadas da geleia de wharton (CTM-GW), em um modelo experimental de sepse, atenuou a lesão pulmonar e cardíaca, restabeleceu a sensibilidade dos pressorreceptores, reduziu a apoptose e modulou a atividade autonômica e inflamatória. Além disso, as CTM-GW demonstraram regular a resposta inflamatória sistêmica através da via colinérgica anti-inflamatória (VAC).

Este estudo tem um desenho de tradução clínica, na primeira etapa, tentamos mimetizar a ocorrência da sepse como acontece na prática clínica. Sendo assim, os animais com sepse induzida (LPC) receberam antibioticoterapia de amplo espectro e expansão volêmica com soro fisiológico. O tempo de início da terapia foi inferido de forma semelhante ao que acontece nas unidades de terapia intensiva (UTI): em geral, 6 horas como tempo médio desde o início da sepse até seu diagnóstico e tratamento. Na segunda etapa, utilizamos as CTM-GW como tratamento integral para os diferentes alvos da sepse. De acordo com estudos prévios, essas células representam uma alternativa bastante atrativa de fonte celular pois a obtenção do cordão umbilical, é um material relativamente acessível e de fácil obtenção além de ser uma boa fonte de células jovens^(109,141).

As CTM-GW, isoladas do cordão umbilical humano, tem uma característica marcante de proliferação pois necessitam de maior tempo para duplicarem no início da expansão celular. No presente estudo, as células começaram a proliferar após 15 dias do início do cultivo, aspecto que é comparável com outros estudos, que sugerem também que as CTM do cordão

umbilical não entram facilmente no ciclo de divisão celular, além que elas possuem baixa atividade da telomerase, o que significa que são células mais precoces ou mais jovens em relação às CTM do tecido adulto o que confere um vantagem adicional para sua expansão e manutenção das suas propriedades celulares^(131,142,143).

As CTM-GW foram caracterizadas de acordo a sua imunofenotipagem e plasticidade. As células apresentaram, enquanto à citometria e a imunofluorescência, marcação positiva para CD73, CD90, CD105, CD29, CD146, e CD44, e negativa para CD34, CD45, HLA-DR CD14, CD19 e STRO-1. Além disto apresentaram morfologia fibroblastóide e capacidade de diferenciação *in vitro* nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica, o que está em acordo com a literatura^(74,144). **(Figuras 14 – 17)**

Em relação a modelo experimental de sepse em ratos, o LPC é descrito na literatura como o modelo que mais mimetiza a doença em humanos. Porém ainda há muitas divergências e discussões com respeito ao protocolo e variáveis que são pontos críticos⁽¹⁴⁵⁾. Vale considerar que neste modelo, existem diversos outros fatores que podem influenciar os resultados, como a idade, sexo, linhagem genética do animal, intervenções terapêuticas, entre outros fatores que em parte refletem a heterogeneidade da resposta inflamatória da sepse nos humanos^(57,146). Por exemplo, segundo os estudos, os animais recém-nascidos e idosos não conseguem se adaptar à resposta inflamatória da sepse, como consequência apresentam menos probabilidades de sobrevida; a explicação decorre à falta de maturação do sistema imunológico nos recém-nascidos e à falta de controle ou regulação nos animais

idosos⁽³²⁾. No nosso estudo anterior⁽⁷²⁾, observamos que o modelo de sepse induzida causou disfunção de múltiplos órgãos e que a mortalidade nos animais sépticos foi maior que 30%, panorama semelhante ao que é encontrado nas unidades de terapia intensiva⁽⁹⁾. **(Figura 7)**

Nesse estudo⁽⁷²⁾ foi demonstrado que o modelo de sepse (sob antibioticoterapia e reposição volêmica) provocou lesão endotelial, hepática e disfunção renal. Já no presente estudo, usando este mesmo modelo animal, observamos adicionalmente diversas outras alterações orgânicas, tais como: lesão cardíaca, pulmonar e disfunção autonômica. Estas últimas alterações foram o nosso foco atual de estudo além dos mecanismos envolvidos.

Para discriminar os efeitos do tratamento e ser comparados com outros estudos, a avaliação funcional e coleta das amostras foram determinadas às 24 horas após indução da sepse^(59,71,78,147,116,148). De acordo aos critérios para a definição da sepse, estabelecidos no 2016, fizemos uma conotação em relação a nosso modelo experimental. O modelo apresentou características de sepse e não de choque séptico, embora os animais tenham recebido antibióticos e expansão volêmica e às 24 horas após indução já manifestaram diversas processos inflamatórios e disfunções orgânicas^(7,72,149,150). **(Figura 7)**

No presente estudo foram usadas células humanas de cordão umbilical como tratamento da sepse em ratos, portanto fizemos um xenotransplante. Há evidências de que as CTM são bem toleradas pois não possuem expressão de MHC-II o que inibe a apresentação de antígenos bloqueando assim a resposta antígeno-anticorpo. Estas células também são bem toleradas em transplantes alogênicos humanos. Por outro lado, existem outros estudos mostrando que o

uso dessas células na terapia interespecie também têm resultados benéficos^(151,152,153). Nesta direção, Gonzales-Rey e cols⁽¹¹⁶⁾ avaliaram os efeitos das CTM na sepse, em transplantes alogênicos e xenogênicos (humano - camundongo), usando a via intraperitoneal e demonstraram que ambos tratamentos melhoraram de forma semelhante a sobrevivência dos animais sépticos⁽¹⁵⁴⁾ mas entre eles não se encontrou alguma diferença significativa, mostrando assim, como outros estudos, que as CTM humanas podem agir tanto quanto as células alogênicas⁽¹⁵⁴⁾. Entretanto, eles também demonstraram que o efeito benéfico das CTM foi melhor observado com uma dose maior ou igual a um milhão de células por tratamento, razão pela qual nós utilizamos esta mesma dose no presente estudo, assim como vários outros estudos na literatura^(116,155,118). **(Tabela 3)**

As alterações cardíacas representam outras complicações importantes da sepse. O nosso modelo de sepse comprometeu o índice de desempenho miocárdico (IDM) e a função diastólica. Este último foi aferido pela onda E e a relação E/A, pois os animais do grupo LPC revelaram uma alteração do tipo padrão restritivo reversível ($E/A > 2$), indicando uma disfunção severa (grau III), apresentando uma reduzida distensibilidade do ventrículo esquerdo (VE)⁽¹⁵⁶⁾. Além disso, os animais LPC mostraram transtornos no relaxamento do VE ($E'/A' < 1$) e uma elevação acentuada da pressão capilar pulmonar ($E/E' > 15$) o que prediz uma pressão capilar pulmonar (PCP) > 15 mmHg, indicando provavelmente um aumento da pressão diastólica final do VE^(157,158). No entanto, o nosso grupo SHAM apresentou valores um pouco acima do valor limite da E/E' , portanto não encontrando esses índices padronizados para ratos; consideramos que o aumento significativo desse parâmetro no grupo

LPC foi o resultado mais relevante. Todos esses últimos parâmetros foram obtidos pelo *doppler* tecidual no nível do anel mitral da parede septal do VE^(157,158). Na avaliação com o ecocardiograma, não encontramos alterações morfológicas nos grupos experimentais, sendo um resultado coerente por ser uma doença aguda e com análise após 24 horas. O tratamento com CTM-GW demonstrou uma melhora no IDM (função global), além da manutenção do débito cardíaco, o qual é um parâmetro relacionado com a função sistólica. Em relação à função diastólica as CTM-GW normalizaram a relação E/A (<2) e diminuíram o E/E', indicando uma regulação no período de relaxamento ventricular. Diversos estudos também demonstraram que a aplicação de CTM na sepse reduz a inflamação do miocárdio e atenua a disfunção cardíaca^(155,159). Rocheteau e cols⁽¹⁶⁰⁾ Observaram que as CTM restauram a função metabólica e mitocondrial em células satélites além disso melhoram a força muscular na miopatia causado por sepse. Interessantemente, Manukyan e cols⁽¹⁶¹⁾ demonstraram que as CTM de origem feminina são superiores às masculinas, em relação a proteção cardíaca contra uma lesão aguda causada por endotoxemia. Nossos resultados vão de encontro com este estudo uma vez que utilizamos células originadas de fetos femininos. **(Tabela 6 - 7)**

No que se refere as medidas de pressão arterial sistêmica, não encontramos diferenças significativas nos quatro grupos; entretanto, encontramos uma tendência na diminuição da PAM e no aumento da FC nos animais com sepse sem tratamento, provavelmente como uma resposta compensatória. Esses achados também são evidenciados em um estudo no qual avaliaram as fases dinâmicas da sepse no modelo LPC, no qual não encontraram nenhuma alteração na PAM e FC⁽¹⁶²⁾. No entanto esses

parâmetros não foram afetados pelo tratamento, possivelmente como um efeito regulador hemodinâmico. **(Tabela 8)**

Em adição a estes dados hemodinâmicos, observamos que os barorreceptores se mostraram alterados na sepse; isto é, frente a um estímulo de elevação da PAM (fenilefrina) ou de redução (nitroprussiato) a resposta bradicárdica e taquicárdica estavam com a sensibilidade alterada respectivamente. Sabidamente esta resposta é dependente dos barorreceptores⁽¹⁶³⁾. Esses componentes arteriais são um dos principais sistemas para corrigir os desvios da PAM, agem tanto no ramo simpático (diminuindo sua atividade), quanto no ramo parassimpático (aumentando sua atividade) do sistema nervoso autônomo. Vários estudos demonstraram que a sepse afeta negativamente a sensibilidade desses receptores; e a perda da resposta destes reguladores é um dos principais determinantes de hipóxia e disfunção orgânica^(50,164). Segundo Godin e cols⁽¹⁶⁵⁾ consideram que na sepse com DMO, é o resultado da diminuição da sensibilidade dos baro e quimiorreflexos, que são indicadores de disfunção do SNA, no entanto, esses achados são mantidos com a hipótese de que há um desacoplamento de sinais biológicas na sepse. Nosso experimento demonstrou que os barorreceptores se mostraram alterados nos animais com sepse, e em contrapartida, o tratamento com CTM-GW levou a um efeito benéfico em relação a melhora da sensibilidade desses receptores quando foi avaliado em relação a dose-efeito do receptor independentemente da VCA. Johansson e cols⁽¹⁶⁴⁾ demonstraram uma melhora da sensibilidade dos barorreceptores após transtorno depressivo maior, isto poderia diminuir o risco de parada cardíaca e favorecer a sobrevivência dos pacientes. Em nossos resultados, o efeito observado estaria sendo

mediado provavelmente pela atenuação da disfunção do SNA, mediante liberação dos diversos fatores neurotróficos secretados pelas CTM-GW, o que estão envolvidos na proteção e reparação do tecido nervoso. O bloqueio da VAC não interferiu no efeito das CTM-GWs, demonstrando que mecanismo de proteção da sensibilidade dos baroreflexos é independente da via colinérgica, a pesar da lesão causada pela sepse. **(Tabela 9)**

De acordo com a literatura a sepse causa diversas alterações neurológicas, como por exemplo, o comprometimento do sistema nervoso autônomo (SNA)⁽⁵⁰⁾. Conhecidamente, uma disfunção do SNA pode desencadear um infarto do miocárdio, um estudo mostra que a análise dos componentes do SNA podem ser fatores prognósticos de uma parada cardíaca, independentemente da arritmia o FEVE⁽¹⁶⁶⁾. A avaliação desses componentes pode derivar da análise espectral dos tempos R-R do sinal da frequência cardíaca. No nosso modelo de sepse encontramos uma diminuição na variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e uma alteração na variabilidade da pressão arterial sistólica (VPAS). Na análise da VFC, o qual também reflete o reflexo cardiorrespiratório, encontramos que os animais apresentaram uma diminuição na variância do intervalo (VAR-IP) de pulso e uma diminuição na atividade do sistema nervoso parassimpático (HF) que age no coração; indicando assim um alto risco de mortalidade. Estes dados estão correlacionados com o estudo de Pontet e cols⁽¹⁶⁷⁾ que compararam pacientes com e sem DMO, e encontraram que pacientes que desenvolviam DMO apresentavam diminuição nos parâmetros: RMSSD (obtido na função do tempo), LF e HF absolutos (obtido na função da frequência). Em contrapartida, a análise de VPAS demonstrou uma queda na atividade simpática (que age nos

vasos arteriais) e uma tendência no aumento no índice alfa (que mede o trabalho exercido pelos vasos). Estes dados estão em concordância com o estudo de Paconto e cols⁽⁵¹⁾ que também encontraram uma diminuição dos parâmetros da VFC e redução da atividade do sistema nervoso simpático (LF) em um modelo experimental de LPC em ratos. Inesperadamente, evidenciamos que o tratamento com CTM-GW, além de normalizar alterações prévias, induziu um aumento na variabilidade da FC na atividade dos sistemas simpático e parassimpático (no domínio do tempo e frequência). Esses resultados são inéditos e animadores, pois uma melhoria na atividade do SNA pode diminuir o risco de mortalidade, como se evidencia nos estudos de Schmidt e cols; Johansson e cols e Rucatti e cols^(50,164,168) O tratamento com CTM-GW, poderia estar agindo no cérebro ou no sistema nervoso do animal séptico, quem por sua vez estaria atuando na regulação dos impulsos nervosos para manter a homeostase hemodinâmica. Entretanto, também poderia estar agindo na proteção ou suporte do SNA e na modulação dos astrócitos, sendo essas propriedades já descritas⁽¹⁶⁹⁾. Por outro lado, podemos mencionar que as CTM-GW agem no SNA independentemente da via colinérgica (grupo: LPC+MLA+CTM-GW), o qual foi um resultado inesperado. Na compreensão desse efeito podemos sustentar que as CTM-GW são capazes de liberar fatores neurotróficos (relacionados com diversas vias) e antiapoptóticos que em parte também estariam atenuando a disfunção dos sinais autonômicos e estimulando outros mecanismos. **(Tabela 10 - 11)**

Em relação as alterações funcionais, a Insuficiência respiratória aguda (IRsA) é uma das principais complicações orgânicas na sepse⁽⁹⁾. Essa disfunção conduz a uma alta mortalidade na fase aguda da doença a razão de

alterações no endotélio pulmonar e elevada infiltração leucocitária nos alvéolos. No presente estudo, demonstramos que o tratamento com CTM-GW atenuou a lesão pulmonar apresentados nos animais com sepse. Na gasometria encontramos apenas alterações da PCO₂ no qual se apresentava diminuída no grupo LPC, provavelmente porque os animais desse grupo estavam hiperventilando, como um efeito de compensação. **(Tabela 12)** Não encontramos diferença significativa na infiltração de macrófagos no parênquima pulmonar, o qual foi elevado nos grupos “LPC” e “LPC + CTM-GW”. Esse achado não necessariamente representam uma desvantagem do tratamento, pois estudos demonstram que as CTM precisam da interação com os macrófagos para poder reparar ou modular o ambiente inflamatório^(78,118). Estudos com CTM na lesão pulmonar aguda demonstraram que as células liberam prostanglandinas E2 (PGE2) e provavelmente mudariam o perfil dos macrófagos no tecido pulmonar^(122,170,171,172). **(Tabela 13)** Além disto, está claro na literatura que a falência da função pulmonar na sepse é devido à morte por apoptose das células pulmonares⁽¹⁷³⁾. No presente estudo, nos evidenciamos que o tratamento com as células tronco foi capaz de diminuir significativamente o índice de morte celular. Este nosso dado está de acordo com outros^(87,88,118). No entanto, observamos que o tratamento com CTM-GW reduziu a infiltração de leucócitos na sepse, o que foi aferido pela análise da atividade da MPO. De acordo com a administração do antagonista do $\alpha 7$ nAChR, podemos indicar que a via colinérgica é importante para que as CTM-GW possuam o efeito anti-inflamatório e/ou atenuar a transmigração de leucócitos *in vivo*. **(Tabela 14)**

Além das alterações orgânicas e hemodinâmicas, em uma visão mais específica, a sepse conduz a diversas alterações celulares. No nosso modelo

não encontramos alterações no número de leucócitos, mas houve uma diminuição na porcentagem dos linfócitos, no número de plaquetas e um aumento na porcentagem no número de neutrófilos, resultado que contrasta com a literatura^(174,175). A explicação poderia derivar pela disfunção celular causada pela sepse, o que conduz a um aumento da apoptose e posterior depleção das células susceptíveis como os linfócitos, entretanto se mantém uma proliferação e infiltração dos neutrófilos provenientes da medula óssea⁽³⁰⁾.

(Tabela 15)

Durante a sepse são liberados tanto citocinas pró-inflamatórias como citocinas anti-inflamatórias, mas em um período inicial ou agudo existe uma predominância do fenótipo pró-inflamatório, caracterizado pelo aumento de diversas citocinas, além da resposta dos linfócitos TCD4+ no fenótipo T_H1. Não obstante, em uma fase tardia, é sabido que os pacientes desenvolvem a síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (SRAC) tentando neutralizar o estado pró-inflamatório. Consequentemente, progredem para uma imunossupressão sistêmica. Essa síndrome é caracterizada por induzir o fenótipo T_H2⁽³⁵⁾. O nosso estudo avaliou parâmetros 24 horas após a indução da sepse, portanto avaliamos a fase aguda da doença; sob essas premissas, nossos animais com sepse desenvolveram um perfil pró-inflamatório, caracterizado pelo incremento das citocinas IL-6, IL-12p70, IL-17, IL-18, TNF- α no soro e IL-6, IL-12p70, IL-17A, IL-18, INF-Y e TNF- α no baço, além disso, um aumento da relação de INF-Y/ IL-10, indicando assim, um forte estado inflamatório com presença indireta dos fenótipos T_H1 e T_H17 das células TCD4+. O tratamento com CTM-GW foi capaz de reverter esse estado, diminuindo a expressão dessas citocinas, além de reduzir a relação INF-Y/IL-

10, o que indica a relação pró- e anti-inflamatório no ambiente da doença⁽¹⁷⁶⁾. Todos esses achados demonstram a regulação imunológica causada pelas CTM-GW. Esses resultados são semelhantes a outros estudos tal qual o de Aggarwal e cols⁽⁹³⁾ que também encontraram a redução de citocinas T_H1. Por outro lado, alguns estudos sugerem que essa regulação pode ser pela ação das CTM e a consequente estimulação das células T reguladoras^(78,94,124,172,177); além da diminuição da proliferação das células T citotóxicas⁽¹⁷⁸⁾. Outros estudos relatam a importância da interação das CTM com os macrófagos circulantes e/ou residentes para o controle do ambiente inflamatório e posterior reparação dos tecidos danificados, provavelmente como resultado dessa interação os macrófagos estariam mudando do fenótipo M1 ao M2, sendo este último justamente envolvido na imunoregulação e reparo tecidual^(179,180,181). Outra propriedade evidenciada pelas CTM-GW é o incremento do VEGF, componente que está relacionado com a angiogênese, possivelmente esse incremento esteja relacionado com os mecanismos de sobrevivência e antiapoptose através da via PI3K/Akt, promovendo assim a sobrevivência do endotélio, embora a presença do VEGF na sepse seja discutível^(72,93). **(Tabela 16 e 17, Anexo 3)**

A administração do antagonista do $\alpha 7$ nAChR confirmou e deu suporte o nosso resultado de infiltração leucocitária. A via colinérgica anti-inflamatória é de grande importância para os efeitos anti-inflamatórios ou imunoreguladores das CTM-GW na sepse. O baço que está intimamente relacionado com essa via, então nos proporcionou resultados robustos em relação ao perfil imunológico, do qual podemos indicar que as CTM-GW regulam o estado inflamatório através da via colinérgica. **(Tabela 16 e 17)** Por outro lado,

conseguimos observar o efeito anti-apoptótico das CTM-GW no pulmão, baço e intestino na sepse. Entretanto, o bloqueio da via colinérgica não interferiu nessa propriedade, demonstrando que as CTM-GW agem também de forma independente dessa via. **(Figura 32 - 35)**

Conforme os nossos achados, ficou evidente que o tratamento com CTM-GW, exerce um efeito anti-inflamatório, imunoregulador, antiapoptótico e ainda age no sistema nervoso autonômico. Com a finalidade de observar a regulação neuroimunoreguladora estudamos o receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$) no baço e no coração, já que diversos estudos mostraram que uma ativação desse receptor pode diminuir a inflamação sistêmica além de melhorar a sobrevida dos animais com sepse^(43,56,182). No presente estudo, observamos que o tratamento com CTM-GW induziu *downregulation do receptor $\alpha 7nAChR$* , que provavelmente estaria relacionado com a ativação do receptor nicotínico (internalização citoplasmática e degradação)^(183,184). Nesse contexto, analisamos outras moléculas vinculadas com esse receptor. O tratamento com CTM-GW na sepse demonstrou reduzir a relação $p\text{-STAT3}^{\text{TYR705}}$ e STAT3 total. Este efeito estaria relacionado com a ativação da via colinérgica anti-inflamatória e a ação estaria sendo mediada pela inibição de fatores de transcrição de proteínas inflamatórias, tais como a inibição do NF- κ B por ação do $p\text{-STAT3}$ induzido pelo JAK2, além da posterior inibição da ativação do STAT3 (fosforilação) assim como diminuição da expressão do TLR4 via sinalização $\alpha 7nAChR/PI3K$ ^(43,44,185,186). Estudos também demonstram que ativação do $\alpha 7nAChR$ cumpre um papel protetor no dano por isquemia e reperfusão renal; se as CTM-GW estariam agindo através desse receptor provavelmente estaria relacionado com a atenuação da disfunção

renal na sepse, o que já foi observado no nosso estudo anterior^(72,183,187,188). Sabemos que em uma resposta inflamatória sistêmica o sistema nervoso tem um papel importante na regulação desse efeito. O SN controla diversos mecanismos tais como; (a) a via humoral através da ativação das fibras aferentes do nervo vago e posterior estimulação da resposta anti-inflamatória do eixo hipotálamo hipófise adrenal; (b) pela ação da via anti-inflamatória das fibras eferentes do nervo vago, onde o $\alpha 7nAChR$ é essencial para este efeito⁽⁴⁷⁾. Nossa hipótese é que as CTM-GW como tratamento na sepse, estariam modulando a resposta do sistema nervoso, o qual foi evidenciado pelo aumento da atividade do SNA e ativação da via colinérgica anti-inflamatória. Esta ação das CTM-GW de forma sistêmica seria através da via parácrina, mediante a liberação de diversos fatores tróficos. No tratamento experimental e clínico de doenças neurológicas é sabido que as CTM cumprem um papel importante na reparação das células neurais, essa ação está mediada pela liberação de uma série de fatores neurotróficos. No caso das CTM-GW, um estudo demonstrou que elas secretam esses fatores em maior proporção que as CTM de fonte adulta, sendo principalmente bFGF, fator de crescimento nervoso (NGF), neurotrofina 3 (NT3), neurotrofina 4 (NT4) e fator neurotrófico derivado da glía (GDNF)^(189,190). Como esses fatores estão envolvidos na sobrevivência, manutenção e reparação dos neurônios, é muito provável que no tratamento da sepse com CTM-GW, eles estariam protegendo e reforçando o SN na neuroimunomodulação da resposta inflamatória sistêmica. Outro possível mecanismo estaria dado pela influência das CTM nas células T, os diversos fatores secretados pelas CTM-GW poderiam estar estimulando a liberação de acetilcolina por parte dos linfócitos T colina acetiltransferase + (ChAT+) e por

consequente estar estimulando os $\alpha 7$ nAChR nos macrófagos^(46,47). **(Tabela 18–20 e Figura 36)**

Com esses resultados reforçamos a ideia de que a terapia com CTM-GW na sepse, consiste em um tratamento de amplo espectro contra os diferentes alvos terapêuticos da sepse. No entanto, novos estudos experimentais e pré-clínicos são necessários e fundamentais para esclarecer e confirmar os mecanismos pelos quais estas células agem na via colinérgica anti-inflamatória.

Figura 36 – Mecanismos propostos dos efeitos das CTM-GW na sepse. A sepse induz liberação de mediadores inflamatórios através do NF- κB . A administração de CTM-GW na sepse atenua a disfunção orgânica e regula a inflamação através da via colinérgica anti-inflamatória (VCA): **1.** As células estimulam o sistema nervoso, por conseguinte causam uma interação com o baço, mediante liberação de noradrenalina. Logo, os linfócitos ChAT+ são ativados liberando acetilcolina. Assim, os $\alpha 7nAChR$ presente nos macrófagos serão estimulados, desencadeando sinais como fosforilação do STAT3 (p-STAT3) via JAK2, que posteriormente entrará no núcleo. Bloqueando a atividade no NF- κB e como regulação negativa inibira a ativação do STAT3. Esse último, também inibe a translocação do NF- κB – I κB . **2.** As células poderiam também agir com os linfócitos ChAT+ induzindo a liberação da acetilcolina e posterior ativação da VAC. As CTM-GW inibem a apoptose independentemente da VAC. CTM-GW: Células tronco mesenquimais da geleia de Wharton; $\alpha 7nAChR$: receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$. $\beta 2AR$: receptor $\beta 2$ adrenérgico. ChAT+: linfócitos T colina acetiltransferase +.

6. Conclusões

As células-tronco mesenquimais derivadas da geleia de Wharton foram capazes de atenuar a lesão pulmonar, cardíaca, hemodinâmica e autonômica, durante a sepse em modelo animal.

As CTM-GW regulam a resposta inflamatória sistêmica através da via colinérgica anti-inflamatória na sepse.

As CTM-GW diminuem a apoptose na sepse como um mecanismo independentemente da via colinérgica anti-inflamatória.

7. Referencias

1. Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word “sepsis” [1]. *Intensive Care Med.* 2006;32(12):2077.
2. Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and Septic Shock: A History. *Crit Care Clin* [Internet]. 2009;25(1):83–101. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2008.12.003>
3. Bone RC. Sepsis , The Septic Syndrome and Multi- Organ Failure : Early Diagnosis. 1990;6(1):9–12.
4. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* [Internet]. 1992 Jun [cited 2015 Feb 17];101(6):1644–55. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1303622>
5. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Opal SM, Sevransky JE, et al. Surviving Sepsis Campaign. *Int Guidel Manag Sev Sepsis Septic Shock* [Internet]. 2013;41(2):580–637. Disponível em: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003246-201302000-00024%5Cnpapers3://publication/doi/10.1097/CCM.0b013e31827e83af>
6. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* [Internet]. 2003;31(0090–3493 (Print)):1250–6. Disponível em: <c:%5CKarsten%5CPDFs%5CInfektiologie-PDFs%5CInfekt-2003%5CLEvy et al.-2001 SCCM ESICM ACCP ATS SIS International Sepsis Definitions Conference.pdf>
7. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). 2016;315(8):801–10.
8. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis – Current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;193:1–61.
9. Taniguchi LU, Bierrenbach AL, Toscano CM, Schettino GPP, Azevedo LCP. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. *Crit Care* [Internet]. 2014;18(6):608. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4240892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Sogayar A, Machado F, Rea-Neto a. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *Pharmacoeconomics* [Internet]. 2008;26(5):425–34. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.2165/00019053-200826050-00006>

11. Sales Júnior JAL, David CM, Hatum R, César P, Souza SP, Japiassú A, et al. Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de terapia intensiva Brasileiras* An Epidemiological Study of Sepsis in Intensive Care Units. Sepsis Brazil Study. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2006;18(1):9–17.
12. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski M, Valentine C, Kurosawa S, D.E. R. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011;6(1):19–48.
13. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med* [Internet]. 2007;35(10):2408–16. Disponível em: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003246-200710000-00026%5Cnpapers3://publication/doi/10.1097/01.CCM.0000282072.56245.91>
14. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2008;8(10):776–87. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2786961&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
15. Landry D, Oliver J. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*. 2001;345(8):588–95.
16. Antonucci E, Fiaccadori E, Donadello K, Taccone FS, Franchi F, Scolletta S. Myocardial depression in sepsis: From pathogenesis to clinical manifestations and treatment. *J Crit Care* [Internet]. 2014;29(4):500–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2014.03.028>
17. Sato R, Nasu M. A review of sepsis-induced cardiomyopathy. *J Intensive Care* [Internet]. 2015;3(1):48. Disponível em: <http://www.jintensivecare.com/content/3/1/48>
18. Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, Marino PN, Oh JK, Smiseth OA, et al. Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2009;22(2):107–33.
19. Rolando G, Espinoza E, Avid E, Welsh S, Pozo J, Vazquez A, et al. Prognostic value of ventricular diastolic dysfunction in patients with severe sepsis and septic shock. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2015;27(4):333–9.
20. Akroun N, Sharshar T, Annane D. Mechanisms of brain signaling during sepsis. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 2009;7(4):296–301. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2811863&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
21. Sharshar T, Annane D, de la Grandmaison GL, Brouland JP, Hopkinson NS, Françoise G. The neuropathology of septic shock. *Brain Pathol* [Internet]. 2004;14(1):21–33. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14997934>

22. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):1–5.
23. Mifsud EJ, Tan ACL, Jackson DC. TLR agonists as modulators of the innate immune response and their potential as agents against infectious disease. *Front Immunol.* 2014;5(MAR).
24. Arcaroli J, Silva E, Maloney JP, He Q, Svetkauskaite D, Murphy JR, et al. Variant IRAK-1 haplotype is associated with increased nuclear factor- κ B activation and worse outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(12):1335–41.
25. Jost PJ, Ruland J. Review in translational hematology Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. 2017;109(7):2700–8.
26. Koleva M, Schlaf G, Landmann R, Gtze O, Jungermann K, Schieferdecker HL. Induction of Anaphylatoxin C5a Receptors in Rat Hepatocytes by Lipopolysaccharide In Vivo: Mediation by Interleukin-6. *Gastroenterology* [Internet]. 2002;122(3):697–708. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11875003>
27. Ward P a, Oeser A, Gebretsadik T, Shintani A. Role of C5 activation products in sepsis. *ScientificWorldJournal.* 2010;10(1):2395–402.
28. Sauler M, Bucala R, Lee PJ. Role of macrophage migration inhibitory factor in age-related lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2015;309(1):L1--L10. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25957294>
29. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2005;5(4):331–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri1594>
30. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013;13(12):862–74. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24232462>
31. Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *N Engl J Med* [Internet]. 2003;348(2):138–50. Disponível em: [papers2://publication/uuid/7CE1127E-1F5D-449F-A4C6-F3C7A086AC24](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/publication/uuid/7CE1127E-1F5D-449F-A4C6-F3C7A086AC24)
32. Gentile LF, Nacionales DC, Lopez MC, Vanzant E, Cuenca A, Cuenca AG, et al. Protective immunity and defects in the neonatal and elderly immune response to sepsis. *J Immunol* [Internet]. 2014;192(7):3156–65. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24591376>
33. Chang KC, Unsinger J, Davis CG, Schwulst SJ, Muenzer JT, Strasser A, et al. Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrial-mediated apoptosis. *FASEB J.* 2007;21(3):708–19.
34. Venet F, Pachot A, Debard A-L, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, et al. Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol.* 2006;177:6540–7.

35. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: A novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2013;13(3):260–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70001-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70001-X)
36. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2006;6(11):813–22. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri1943>
37. Fernandez R, Nardocci G, Navarro C, Reyes EP, Acuña-Castillo C, Cortes PP. Neural reflex regulation of systemic inflammation: Potential new targets for sepsis therapy. *Front Physiol*. 2014;5(DEC):1–9.
38. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* [Internet]. 2002;420(6917):853–9. Disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v420/n6917/pdf/nature01321.pdf>
39. Borovikova L V, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000;405(6785):458–62.
40. Hansen MK, O'Connor K a, Goehler LE, Watkins LR, Maier SF. The contribution of the vagus nerve in interleukin-1 β -induced fever is dependent on dose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2001;280(4):R929-34. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11247812>
41. Flierl M a, Rittirsch D, Nadeau B a, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, et al. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature*. 2007;449(7163):721–5.
42. Pohanka M. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *Int J Mol Sci*. 2012;13(2):2219–38.
43. Kim TH, Kim SJ, Lee SM. Stimulation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor protects against sepsis by inhibiting toll-like receptor via phosphoinositide 3-kinase activation. *J Infect Dis*. 2014;209(10):1668–77.
44. Su X, Matthay MA, Malik AB. Requisite Role of the Cholinergic $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Pathway in Suppressing Gram-Negative Sepsis-Induced Acute Lung Inflammatory Injury. *J Immunol* [Internet]. 2010;184(1):401–10. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0901808>
45. Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM, et al. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008;105(31):11008–13. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2504833&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

46. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* [Internet]. 2011;334(6052):98–101. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4548937&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
47. Martelli D, McKinley MJ, McAllen RM. The cholinergic anti-inflammatory pathway: A critical review. *Auton Neurosci Basic Clin* [Internet]. 2014;182:65–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2013.12.007>
48. Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009;9(6):418–28. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2566>
49. Wehrwein EA, Oler HS, Barman SM. Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Compr Physiol*. 2016;6(3):1239–78.
50. Schmidt HB, Werdan K, Müller-Werdan U. Autonomic dysfunction in the ICU patient. *Curr Opin Crit Care*. 2001;7:314–22.
51. Pancoto JAT, Corrêa PBF, Oliveira-Pelegrin GR, Rocha MJA. Autonomic dysfunction in experimental sepsis induced by cecal ligation and puncture. *Auton Neurosci Basic Clin*. 2008;138(1–2):57–63.
52. Annane D, Trabold F, Sharshar T, Jarrin I, Blanc AS, Raphael JC, et al. Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: A spectral analysis approach. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(2):458–65.
53. Sharshar T, Gray F, De La Grandmaison GL, Hopkinson NS, Ross E, Dorandeu A, et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet*. 2003;362(9398):1799–805.
54. Alamili M, Rosenberg J, Gögenur I. Day-night variation in heart rate variability changes induced by endotoxaemia in healthy volunteers. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2015;59(4):457–64.
55. Malliani A. Editorial Power spectrum analysis of heart rate variability: a tool to explore neural regulatory mechanisms. *Br Heart J*. 1994;71:1–2.
56. Mazloom R, Eftekhari G, Rahimi M, Khorram V, Hajizadeh S, Dehpour AR, et al. The role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in modulation of heart rate dynamics in endotoxemic rats. *PLoS One*. 2013;8(12):1–14.
57. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol*. 2007;81(January):137–43.
58. Singleton KD, Wischmeyer PE. Distance of Cecum Ligated Influences Mortality, Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-6 Expression following Cecal Ligation and Puncture in the Rat. *Eur Surg Res*. 2003;35(6):486–491.

59. Rittirsch D, Huber-lang MS, Flierl M a, Ward P a. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc.* 2009;4(1):31–6.
60. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Model organisms: Animal models of sepsis: Setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(10):854–65.
61. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Vol. 36, *Critical care medicine.* 2008. 296-327 p.
62. Al-Abed Y, Dabideen D, Aljabari B, Valster A, Messmer D, Ochani M, et al. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis. *J Biol Chem.* 2005;280(44):36541–4.
63. Qin S, Wang H, Yuan R, Li H, Ochani M, Ochani K, et al. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med* [Internet]. 2006;203(7):1637–42. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16818669>
64. Li J, Zhang Y, Lou J, Zhu J, He M, Deng X, et al. Neutralisation of Peritoneal IL-17A Markedly Improves the Prognosis of Severe Septic Mice by Decreasing Neutrophil Infiltration and Proinflammatory Cytokines. *PLoS One.* 2012;7(10).
65. Huston JM. The Vagus Nerve and the Inflammatory Reflex: Wandering on a New Treatment Paradigm for Systemic Inflammation and Sepsis. *Surg Infect (Larchmt).* 2012;13(4):187–93.
66. Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med* [Internet]. 2004;10(11):1216–21. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15502843>
67. Schmitz D, Wilsenack K, Lendemanns S, Schedlowski M, Oberbeck R. B-Adrenergic blockade during systemic inflammation: Impact on cellular immune functions and survival in a murine model of sepsis. *Resuscitation.* 2007;72(2):286–94.
68. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: A review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion.* 2014;54(5):1418–37.
69. Miyamura K. Insurance approval of mesenchymal stem cell for acute GVHD in Japan: need of follow up for some remaining concerns. *Int J Hematol* [Internet]. 2016;103(2):155–64. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26759322>
70. 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. 2007;30322:131–41.

71. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Kitagawa Y. Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Attenuate Organ Injury Induced by LPS and Burn. *Cell Transplant*. 2010;19(6):823–30.
72. Córdor JM, Rodrigues CE, Sousa Moreira R, Canale D, Volpini RA, Shimizu MHM, et al. Treatment With Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuates Sepsis-Induced Kidney Injury, Liver Injury, and Endothelial Dysfunction. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5:1048–57.
73. Friedenstein A, Chailakhjan R, Lalykina K. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393–403.
74. 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(4):315–7.
75. Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2007;104(26):11002–7. Disponível em: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=17569781&retmode=ref&cmd=prlinks>
76. Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M, Amar AP, Brawanski A, et al. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*. 2003;53(3):697–703.
77. Hauger O, Frost EE, Deminie C, Grenier N. MR Evaluation of the Glomerular Homing of Magnetically Labeled Mesenchymal Stem Cells in a rat. *Radiology*. 2006;238(1):200-10
78. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* [Internet]. 2009;15(1):42–9. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2706487&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
79. Tondreau T, Meuleman N, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Delforge A, Dejeneffe M, et al. In vitro study of matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase production by mesenchymal stromal cells in response to inflammatory cytokines: the role of their migration in injured tissues. *Cytotherapy*. 2009;11(5):559–69.
80. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, Hérault O, Bonnet P, Charbord P, et al. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells*. 2006;24(10):2202–8.

81. Chavakis E, Urbich C, Dimmeler S. Homing and engraftment of progenitor cells: A prerequisite for cell therapy. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2008;45(4):514–22. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.01.004>
82. Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, et al. Towards in situ tissue repair: Human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem*. 2007;101(1):135–46.
83. Von Lüttichau I, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, Peters C, Henger A, Seliger C, et al. Human Adult CD34– Progenitor Cells Functionally Express the Chemokine Receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but Not CXCR4. *Stem Cells Dev*. 2005;14(3):329–36.
84. García-Gómez I, Elvira G, Zapata A, Lamana M, Ramírez M, Castro J, et al. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(10):1453–68.
85. Mazhari R, Hare JM. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4 Suppl 1(February):S21–6.
86. Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages. *Blood*. 2011;118(2):330–8.
87. Hu X, Yu SP, Fraser JL, Lu Z, Ogle ME, Wang JA, et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;135(4):799–808.
88. Li W, Ma N, Ong L-L, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, et al. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells* [Internet]. 2007;25(8):2118–27. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17478584>
89. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* [Internet]. 2002;30(1):42–8. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11823036
90. Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, Velada I, Leite C, Andrade P, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2013;4(5):125. Disponível em: <http://stemcellres.com/content/4/5/125>

91. Le Blanc K, Tammki L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic response independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*. 2003;57:11–20.
92. Matysiak M, Orlowski W, Fortak-Michalska M, Jurewicz A, Selmaj K. Immunoregulatory function of bone marrow mesenchymal stem cells in EAE depends on their differentiation state and secretion of PGE2. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2011;233(1–2):106–11. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.12.004>
93. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Transplantation* [Internet]. 2009;105(4):1815–22. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/105/4/1815.abstract>
94. Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol*. 2008;36(3):309–18.
95. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010;5(4).
96. Chiossone L, Conte R, Spaggiari GM, Serra M, Romei C, Bellora F, et al. Mesenchymal Stromal Cells Induce Peculiar Alternatively Activated Macrophages Capable of Dampening Both Innate and Adaptive Immune Responses. *Stem Cells*. 2016;34:1909–21.
97. Cho DI, Kim MR, Jeong HY, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med* [Internet]. 2014;46(1):e70-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2013.135>
98. Kassis I, Vaknin-Dembinsky A, Karussis D. Bone marrow mesenchymal stem cells: agents of immunomodulation and neuroprotection. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2011;6(1):63–8.
99. Kassis I, Grigoriadis N, Gowda-Kurkalli B, Mizrachi-Kol R, Ben-Hur T, Slavin S, et al. Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Neurol* [Internet]. 2008;65(6):753–61. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18541795>
100. Siniscalco D, Giordano C, Galderisi U, Luongo L, Alessio N, Di Bernardo G, et al. Intra-brain microinjection of human mesenchymal stem cells decreases allodynia in neuropathic mice. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(4):655–69.

101. Ng TK, Fortino VR, Pelaez D, Cheung HS. Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases. *World J Stem Cells* [Internet]. 2014;6(2):111–9. Disponible em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3999769&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
102. Munoz J, Stoutenger B, Robinson A, Spees J, Prockop D. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):18171–6.
103. Zhao Y, Gibb SL, Zhao J, Moore AN, Hylin MJ, Menge T, et al. Wnt3a, a protein secreted by Mesenchymal Stem Cells is neuroprotective and promotes neurocognitive recovery following Traumatic Brain Injury. *Stem Cells* [Internet]. 2016;n/a-n/a. Disponible em: <http://doi.wiley.com/10.1002/stem.2310>
104. Tsuji W. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World J Stem Cells* [Internet]. 2014;6(3):312. Disponible em: <http://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v6/i3/312.htm>
105. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2004;8(3):301–16. Disponible em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15491506>
106. Azandeh S. Mixed enzymatic-explant protocol for isolation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly and encapsulation in 3D culture system. *J Biomed Sci Eng*. 2012;5(10):580–6.
107. Gadalla SM, Savage SA. Telomere biology in hematopoiesis and stem cell transplantation. *Blood Rev* [Internet]. 2011;25(6):261–9. Disponible em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2011.06.004>
108. Romanov Y, Svintsitskaya V, Smirnov V. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* [Internet]. 2003;21(1):105–10. Disponible em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1634/stemcells.22-3-275/full>
109. Subramanian A, Fong C-Y, Biswas A, Bongso A. Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(6):e0127992. Disponible em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0127992>
110. Savilova AM, Zakharov A V., Metlyuk EA, Serdyuk Y V., Veryasov VN, Krasnyi AM, et al. Comparison of the Expression of Immunomodulatory Factors in Cultures of Mesenchymal Stromal Cells from Human Extraembryonic Tissues. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2015;158(4):555–60. Disponible em: <http://link.springer.com/10.1007/s10517-015-2806-z>

111. Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4:8.
112. Jomura S, Uy M, Mitchell K, Dallasen R, Bode CJ, Xu Y. Potential treatment of cerebral global ischemia with Oct-4+ umbilical cord matrix cells. *Stem Cells* [Internet]. 2007;25(1):98–106. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16960128>
113. Drela K, Lech W, Figiel-Dabrowska A, Zychowicz M, Mikula M, Sarnowska A, et al. Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. *Cytotherapy* [Internet]. 2016;18(4):497–509. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324916000177>
114. Zwart I, Hill A, Al-Allaf F, Shah M, Girdlestone J, Sanusi A, et al. Umbilical cord blood mesenchymal stromal cells are neuroprotective and promote regeneration in a rat optic tract model. *Exp Neurol*. 2009;216(2):439–48.
115. U.S. National Institutes of Health. ClinicalTrials.gov. Mesenchymal stem cells AND sepsis. 2018.
116. Gonzalez-Rey E, Anderson P, González M a, Rico L, Büscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*. 2009;58(7):929–39.
117. BI L-K, TANG B, ZHU B, XIE C-L, LI S, LIN T-X, et al. Systemic Delivery of IL-10 by Bone Marrow Derived Stromal Cells Has Therapeutic Benefits in Sepsis Therapy*. *Prog Biochem Biophys* [Internet]. 2010;37(6):678–85. Disponível em: <http://pub.chinasciencejournal.com/article/getArticleRedirect.action?doiCode=10.3724/SP.J.1206.2010.00107>
118. Mei SHJ, Haitsma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PFH, Slutsky AS, et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(8):1047–57.
119. Liang Z, Sun J, Wang P, Tian Q, Yang Z, Chen L. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect rats from endotoxin-induced acute lung injury. *Chin Med J (Engl)* [Internet]. 2011 Sep [cited 2018 Feb 28];124(17):2715–22. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22040430>
120. Sun J, Han Z, Liao W, Yang S. of human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuates acute lung injury by expanding CD4+ CD25+ Forkhead Boxp3 (FOXP3)+ regulatory T cells and balancing. *Cell Physiol ...* [Internet]. 2011;300020(27):587–96. Disponível em: <http://www.karger.com/Article/Abstract/329980>

121. Chang C-L, Leu S, Sung H-C, Zhen Y-Y, Cho C-L, Chen A, et al. Impact of apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cells on attenuating organ damage and reducing mortality in Rat sepsis syndrome induced by cecal puncture and ligation. *J Transl Med* [Internet]. 2012;10(1):244. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23217183>
122. Krasnodembskaya A, Samarani G, Song Y, Zhuo H, Su X, Lee J-W, et al. Human mesenchymal stem cells reduce mortality and bacteremia in gram-negative sepsis in mice in part by enhancing the phagocytic activity of blood monocytes. *AJP Lung Cell Mol Physiol*. 2012;302(March):L1003–13.
123. Sepúlveda JC, Tomé M, Fernández ME, Delgado M, Campisi J, Bernad A, et al. Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model. *Stem Cells* [Internet]. 2014;32(7):1865–77. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4209016&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
124. Chao YH, Wu HP, Wu KH, Tsai YG, Peng CT, Lin KC, et al. An increase in CD3+CD4+CD25 + regulatory T cells after administration of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells during sepsis e110338. *PLoS One*. 2014;9(10):1–8.
125. Pedrazza L, Lunardelli A, Luft C, Cruz CU, De Mesquita FC, Bitencourt S, et al. Mesenchymal stem cells decrease splenocytes apoptosis in a sepsis experimental model. *Inflamm Res*. 2014;63(9):719–28.
126. Alcayaga-Miranda F, Cuenca J, Martin A, Contreras L, Figueroa FE, Khoury M. Combination therapy of menstrual derived mesenchymal stem cells and antibiotics ameliorates survival in sepsis. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2015;6(1):1–13. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-015-0192-0>
127. Güldner A, Maron-Gutierrez T, Abreu SC, Xisto DG, Senegaglia AC, Barcelos PRDS, et al. Expanded endothelial progenitor cells mitigate lung injury in septic mice. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2015;6(1):4–11. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-015-0226-7>
128. Sung P, Chiang H, Chen C, Chen Y, Huang T, Zhen Y, et al. Combined Therapy With Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Ciprofloxacin Against Acute Urogenital Organ Damage in Rat Sepsis Syndrome Induced by Intrapelvic Injection Cecal Bacteria. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2016;5(6):782–92. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27075767>
129. Johnson CL, Soeder Y, Dahlke MH. Concise review: Mesenchymal stromal cell-based approaches for the treatment of acute respiratory distress and sepsis syndromes. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(4):1141–51.

130. Holly MK, Dear JW, Hu X, Schechter a N, Gladwin MT, Hewitt SM, et al. Biomarker and drug-target discovery using proteomics in a new rat model of sepsis-induced acute renal failure. *Kidney Int.* 2006;70(3):496–506.
131. Otte A, Bucan V, Reimers K, Hass R. Mesenchymal stem cells maintain long-term in vitro stemness during explant culture. *Tissue Eng Part C Methods* [Internet]. 2013;19(12):1–42. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23560527>
132. Schiller NB, Acquatella H, Ports T a., Drew D, Goerke J, Ringertz H, et al. Left ventricular volume from paired biplane two-dimensional echocardiography. *Circulation* [Internet]. 1979;60(3):547–55. Disponível em: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.60.3.547>
133. Fard A, Wang CY, Takuma S, Skopicki H a., Pinsky DJ, Di Tullio MR, et al. Noninvasive Assessment and Necropsy Validation of Changes in Left Ventricular Mass in Ascending Aortic Banded Mice. *J Am Soc Echocardiogr* [Internet]. 2000;13(6):582–7. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0894731700537031>
134. Slama M, Ahn J, Peltier M, Maizel J, Chemla D, Varagic J, et al. Validation of echocardiographic and Doppler indexes of left ventricular relaxation in adult hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2005;289(3):H1131-6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863455>
135. Sahn DJ, DeMaria a, Kisslo J, Weyman a. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978;58(6):1072–83.
136. Mostarda C, Moraes-Silva IC, Moreira ED, Medeiros A, Piratello AC, Consolim-Colombo FM, et al. Baroreflex sensitivity impairment is associated with cardiac diastolic dysfunction in rats. *J Card Fail* [Internet]. 2011;17(6):519–25. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2011.02.007>
137. Chen Y, Joaquim LF, Farah VM, Wichi RB, Fazan Jr. R, Salgado HC, et al. Cardiovascular autonomic control in mice lacking angiotensin AT1a receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2005;288(4):R1071-1077. Disponível em: <http://ajpregu.physiology.org/cgi/content/abstract/288/4/R1071%5Cnhttp://ajpregu.physiology.org/content/288/4/R1071.full.pdf>
138. Dias Da Silva VJ, Gneccchi-Ruscione T, Lavelli B, Bellina V, Manzella D, Porta A, et al. Opposite effects of iv amiodarone on cardiovascular vagal and sympathetic efferent activities in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;283(2):R543–8.
139. Joaquim LF, Farah VM, Bernatova I, Fazan R, Grubbs R, Morris M. Enhanced heart rate variability and baroreflex index after stress and cholinesterase inhibition in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2004;287(1):H251-7. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14988080>

140. Task-Force. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* [Internet]. 1996 Mar 1 [cited 2018 Mar 3];93(5):1043–65. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598068>
141. Joerger-Messerli MS, Marx C, Oppliger B, Mueller M, Surbek D V., Schoeberlein A. Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly and Amniotic Fluid. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2015;31:30–44. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.07.006>
142. Secunda R, Vennila R, Mohanashankar AM, Rajasundari M, Jeswanth S, Surendran R. Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. *Cytotechnology* [Internet]. 2015;67(5):793–807. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10616-014-9718-z>
143. Jin H, Bae Y, Kim M, Kwon S-J, Jeon H, Choi S, et al. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013;14(9):17986–8001. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/9/17986/>
144. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* [Internet]. 2006;24(5):1294–301. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410387>
145. Singleton KD, Wischmeyer PE. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res.* 2003;35(6):486–91.
146. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* [Internet]. 2011;19(4):198–208. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.01.001>
147. Sun C-K, Yen C-H, Lin Y-C, Tsai T-H, Chang L-T, Kao Y-H, et al. Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells markedly reduced acute ischemia-reperfusion lung injury in a rodent model. *J Transl Med* [Internet]. 2011;9(1):118. Disponível em: <http://www.translational-medicine.com/content/9/1/118>
148. Luo C, Zhang F, Zhang L, Geng Y, Li Q, Hong Q, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate sepsis-associated acute kidney injury in mice. *Shock* [Internet]. 2014;41(2):123–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24169208>

149. Buras J a, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(10):854–65.
150. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, Bland KI, et al. Cecal Ligation and Puncture. *Shock* [Internet]. 2005;24(Supplement 1):52–7. Disponible em: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00024382-200512001-00009>
151. Shin S, Kim Y, Jeong S, Hong S, Kim I, Lee W, et al. The therapeutic effect of human adult stem cells derived from adipose tissue in endotoxemic rat model. *Int J Med Sci* [Internet]. 2013;10(1):8–18. Disponible em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3534872&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
152. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75(3):389–97.
153. Lin C-S, Lin G, Lue TF. Allogeneic and Xenogeneic Transplantation of Adipose-Derived Stem Cells in Immunocompetent Recipients Without Immunosuppressants. *Stem Cells Dev*. 2012;21(15):2770–8.
154. Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, Otero-Ortega L, Fuentes B, Vallejo-Cremades MT, et al. Comparison between xenogeneic and allogeneic adipose mesenchymal stem cells in the treatment of acute cerebral infarct: proof of concept in rats. *J Transl Med* [Internet]. 2015;13:4–13. Disponible em: <http://www.translational-medicine.com/content/13/1/46>
155. Weil BR, Herrmann JL, Abarbanell AM, Manukyan MC, Poynter J a, Meldrum DR. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells is associated with improved myocardial function during endotoxemia. *Shock* [Internet]. 2011;36(3):235–41. Disponible em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21654558>
156. Nishimura RA, Tajik AJ. Evaluation of diastolic filling of left ventricle in health and disease: Doppler echocardiography is the clinician's Rosetta Stone. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30(1):8–18.
157. Quiñones MA, Otto CM, Stoddard M, Waggoner A, Zoghbi WA. Recommendations for quantification of Doppler echocardiography: a report from the Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2002;15(2):167–84.
158. Moller JE, Pellikka PA, Hillis GS, Oh JK. Prognostic importance of diastolic function and filling pressure in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2006;114(5):438–44.

159. Weil BR, Manukyan MC, Herrmann JL, Wang Y, Abarbanell AM, Poynter JA, et al. Mesenchymal stem cells attenuate myocardial functional depression and reduce systemic and myocardial inflammation during endotoxemia. *Surgery* [Internet]. 2010;148(2):444–52. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2010.03.010>
160. Rocheteau P, Chatre L, Briand D, Mebarki M, Jouvion G, Bardon J, et al. Sepsis induces long-term metabolic and mitochondrial muscle stem cell dysfunction amenable by mesenchymal stem cell therapy. *Nat Commun*. 2015;6(May):1–12.
161. Manukyan MC, Weil BR, Wang Y, Abarbanell AM, Herrmann JL, Poynter J a, et al. Female stem cells are superior to males in preserving myocardial function following endotoxemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(6):R1506–14.
162. Yang S, Zhou M, Chaudry IH, Wang P. Novel approach to prevent the transition from the hyperdynamic phase to the hypodynamic phase of sepsis: role of adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1. *Ann Surg*. 2002;236(5):625–33.
163. Moreira RS, Irigoyen M, Sanches TR, Volpini RA, Camara NOS, Malheiros DM, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F attenuates kidney injury, heart injury, and endothelial dysfunction in sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2014;307(5):R514-24. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24920733>
164. Johansson M, Ehnvall A, Friberg P, Myredal A. Arterial baroreflex dysfunction in major depressive disorder. *Clin Auton Res* [Internet]. 2010;20(4):235–40. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20127136>
165. Godin P, Buchman T. Uncoupling of biological oscillators: a complementary hypothesis concerning the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*. 1996;24(7):1107–16.
166. La Rovere MT, Bigger JT, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet*. 1998;351(9101):478–84.
167. Pontet J, Contreras P, Curbelo A, Medina J, Noveri S, Bentancourt S, et al. Heart Rate Variability as Early Marker of Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Septic Patients. *J Crit Care*. 2003;18(3):156–63.
168. Lazzarotto Rucatti A, Boemo Jaenisch R, Dalcin Rossato D, Poletto Bonetto JH, Ferreira J, Xavier LL, et al. Skeletal muscle electrical stimulation improves baroreflex sensitivity and heart rate variability in heart failure rats. *Auton Neurosci* [Internet]. 2015;193:92–6. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1566070215300229>
169. Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol* [Internet]. 2011;24(1):59–64. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beha.2011.01.004>

170. Li Z hua, Liao W, Cui X long, Zhao Q, Liu M, Chen Y hao, et al. Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head. *Int J Med Sci*. 2011;8(1):74–83.
171. Chen K, Wang D, Du WT, Han ZB, Ren H, Chi Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin Immunol* [Internet]. 2010;135(3):448–58. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2010.01.015>
172. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25Highforkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(1):149–60.
173. Gill SE, Rohan M, Mehta S. Role of pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis in murine sepsis-induced lung injury in vivo. *Respir Res* [Internet]. 2015;16(1):109. Available from: <http://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-015-0266-7>
174. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmieg RE, Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* [Internet]. 2001;166(11):6952–63. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359857>
175. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissières P, Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* [Internet]. 2013;41(3):820–32. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348516>
176. Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, Ali MM, Mcguire F, Nagarkatti PS, et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In Vivo (Brooklyn)*. 2013;27(6):669–84.
177. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(34):1–9.
178. Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4 + T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005;90(4):516–25.
179. Anderson P, Souza-Moreira L, Morell M, Caro M, O'Valle F, Gonzalez-Rey E, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut* [Internet]. 2013;62(8):1131–41. Disponível em: <http://gut.bmj.com/content/62/8/1131.long>

180. Anders H-J. Immune system modulation of kidney regeneration—mechanisms and implications. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2014;10(6):347–58. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrneph.2014.68>
181. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2013;13(4):392–402. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>
182. Jeremias IC, Victorino VJ, Barbeiro H V., Kubo SA, Prado CM, Lima TM, et al. The Role of Acetylcholine in the Inflammatory Response in Animals Surviving Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2015;1–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-015-9538-y>
183. Yeboah MM, Xue X, Javdan M, Susin M, Metz CN. Nicotinic acetylcholine receptor expression and regulation in the rat kidney after ischemia-reperfusion injury. 2008;11030:654–61.
184. Corradi J, Bouzat C. Understanding the Bases of Function and Modulation of 7 Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2016;90(3):288–99. Disponível em: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.116.104240>
185. de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* [Internet]. 2005;6(8):844–51. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16025117>
186. Peña G, Cai B, Liu J, Van Der Zanden EP, Deitch EA, De Jonge WJ, et al. Unphosphorylated STAT3 modulates alpha7 nicotinic receptor signaling and cytokine production in sepsis. *Eur J Immunol*. 2010;40(9):2580–9.
187. Yeboah MM, Xue X, Duan B, Ochani M, Tracey KJ, Susin M, et al. Cholinergic agonists attenuate renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Kidney Int*. 2008;74(1):62–9.
188. Inoue T, Abe C, Sung SJ, Moscalu S, Jankowski J, Huang L, et al. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through $\alpha 7$ nAChR+ splenocytes. *J Clin Invest* [Internet]. 2016 Apr 18;126(5):1939–52. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/86826>
189. Balasubramanian S, Thej C, Venugopal P, Priya N, Zakaria Z, SundarRaj S, et al. Higher propensity of Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells towards neuronal lineage in comparison to those derived from adipose and bone marrow. *Cell Biol Int*. 2013;37(5):507–15.
190. Yoon JH, Roh EY, Shin S, Jung NH, Song EY, Chang JY, et al. Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's jelly. *Biomed Res Int*. 2013;2013:428726.

8. Anexos

ANEXO 1: APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA DA FMUSP **APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **14/08/2013**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **286/13** intitulado: **“AVALIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO EM LESÃO DE ÓRGÃOS E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA SEPSE”** apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Lúcia da Conceição Andrade

Pesquisador (a) Executante: José Manuel Córdor Capcha

CEP-FMUSP, 14 de Agosto de 2013.

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

ANEXO 2: APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “Células-tronco mesenquimais derivados da geleia de Wharton na injúria cardiopulmonar e neuroimunomodulação sistêmica na sepse”, registrada com o nº 934/2017, sob a responsabilidade de Samirah Abreu Gomes e José Manuel Córdor Capcha, apresentado pelo Departamento de Patologia- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada “Ad Referendum” pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 09.10.2017

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 27-09-2017 Término: 28-09-2018
Espécie/linhagem/raça	Rato wistar
Nº de animais	70
Peso/Idade	6 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério do ICB

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 09 de Outubro de 2017

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

ANEXO 3: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

“Avaliação de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano em lesão de órgãos e a
disfunção endotelial na sepse”

2. PESQUISADOR: JOSÉ MANUEL CÓNDOR CAPCHA

CARGO/FUNÇÃO: Biomédico - Pós-graduando em Nefrologia

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de investigação médica em doenças renais - LIM12

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐	RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do Sujeito de Pesquisa

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1. Apresentação

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar de um projeto de pesquisa científica que envolve o tratamento de ratos com sepse da Faculdade de Medicina da USP. O tratamento em pesquisa é a aplicação de células-tronco provenientes de cordão umbilical humano, e a perspectiva é de que haja melhora na condição clínica desses animais.

Sua participação será a doação de um fragmento do cordão umbilical de sua placenta, após o parto, quando isto não for mais útil para seu bebê. Este fragmento será utilizado para o isolamento das células-tronco.

Sua participação será muito importante para o avanço da pesquisa científica brasileira. Abaixo, há algumas informações técnicas referentes ao protocolo. Sinta-se à vontade para ler o projeto em sua íntegra, e consentir na participação apenas se concordar com os propósitos do projeto e se sentir confortável em colaborar.

2. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

Até o momento, poucas são as terapias disponíveis para evitar os danos secundários feitos pela sepse, tanto em humanos quanto em animais. São muitos os casos de sepse que se apresentam nas salas de operações sendo um grave problema de saúde pública no Brasil. A proposta do presente estudo é verificar se a administração de células-tronco, retiradas de cordão umbilical humano, em ratos com sepse, pode trazer benefícios no sentido de minimizar os danos secundários.

3. Procedimentos que serão utilizados e propósitos:

O procedimento realizado será a retirada de parte do cordão umbilical proveniente de bebês e mães saudáveis, após o parto e a inutilização da placenta e do cordão umbilical.

A placenta e o cordão umbilical não são mais necessários para o bebê após o seu nascimento. Caso a placenta precise ir para análise após o parto, a coleta de amostra do cordão umbilical não atrapalha essa análise. Os exames do bebê que precisam ser coletados do cordão umbilical também não serão prejudicados, sendo coletados antes da coleta para o experimento.

Após a coleta do cordão, as células-tronco serão isoladas e injetadas em ratos com sepse induzida, como tratamento. Não haverá manipulação de seres humanos, apenas do sangue que seria desprezado. Não haverá nenhum procedimento experimental no bebê ou na mãe.

4. Desconfortos e riscos esperados:

Nenhum

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do Sujeito de Pesquisa

5. Benefícios que poderão ser obtidos:

A mãe ou o bebê não terão benefícios diretos por colaborarem com o estudo.

O possível benefício encontrado poderá acontecer aos ratos com sepse da Faculdade de Medicina da USP, pois caso o tratamento seja efetivo, se apresentarão dados importantes para poder transferir o tratamento para o campo clínico.

As células retiradas não serão utilizadas nos bebês doadores, pois as células-tronco ainda são um tratamento em pesquisa, sem riscos e benefícios totalmente definidos. Também não serão usadas no futuro por esses doadores, pois até que as células- tronco se tornem um tratamento seguro e efetivo, essas células já estarão velhas e trazendo riscos a quem venha a utilizá-las.

As células serão isoladas para serem utilizadas em sua totalidade de forma experimental em animais, sendo que eventuais sobras de células serão desprezadas ao final do estudo.

6. Procedimentos alternativos existentes:

Os únicos tratamentos disponíveis para a sepse são algumas medicações que ajudam pouco na redução do efeito inflamatório e a proteção de órgãos-alvo. Estes estudos podem contribuir para o aumento da expectativa de vida dos pacientes com sepse. Mesmo assim, o tratamento não é ainda o ideal, e faz-se necessário o estudo de outras terapias que possam contribuir para a melhora desta doença.

Assim, o estudo da utilização de células-tronco como terapia na sepse poderá contribuir com os avanços da terapia celular.

7. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecimento de eventuais dúvidas:

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Prof. Dra Lúcia da Conceição Andrade, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César - CEP: 01246903 - São Paulo - SP - Brasil Telefone(s) +55 11 3061-7281 e-mail: luciacan@usp.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 2º andar– tel: 3061-8004, FAX: 3061-8004– E-mail: cep.fm@usp.br

8. Liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e, portanto, deixar de participar do estudo:

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade:

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do Sujeito de Pesquisa

10. Formas de ressarcimento, ao sujeito de pesquisa, decorrentes da participação na pesquisa (gastos com transporte, etc.):

Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, por isso não haverá compensação financeira relacionada à sua participação.

Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

11. Disponibilidade de assistência, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa:

Como não haverá nenhum procedimento experimental no bebê ou na mãe, provavelmente não haverá danos à saúde decorrentes da pesquisa. Entretanto, caso haja alguma situação em que isto aconteça, a assistência será disponibilizada prontamente, financiada pelo orçamento da pesquisa. Da mesma forma que na situação acima, caso haja algum dano à saúde dos participantes, estes serão indenizados com verba do orçamento da pesquisa (agência financiadora: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP)

12. Se for detectado no sujeito que está sendo selecionado, algum problema de saúde previamente ao início da pesquisa:

Ele será encaminhado ao Sistema Único de Saúde (SUS) para tratamento. Da mesma forma, se houver intercorrência de saúde, com o sujeito participante, decorrente da pesquisa, este será atendido no HU/USP segundo o critério de assistência do mesmo (hospital de atendimento secundário). Se houver necessidade de atendimento de maior complexidade, o sujeito será encaminhado ao SUS pela equipe de pesquisa.

13. Compromisso do Pesquisador:

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo *“Avaliação de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano em lesão de órgãos e a disfunção endotelial na sepse”*

Eu discuti com o Dra. Lúcia da Conceição Andrade, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

São Paulo, ____ / ____ / ____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

São Paulo, ____ / ____ / ____

Lúcia da Conceição Andrade

Médica e pesquisadora do laboratório de
Investigação Médica em Doenças Renais (LIM 12
– Faculdade de Medicina da USP)

ANEXO 4: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de células-tronco mesenquimais em lesão de órgãos e disfunção endotelial na sepse

Pesquisador: Lúcia da Conceição Andrade

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2

CAAE: 18323513.2.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 378.603

Data da Relatoria: 30/08/2013

Apresentação do Projeto:

A sepse é uma doença sistêmica se demonstra que o país possui uma alta incidência e que está projetada a seguir crescendo à medida que a população envelhece. Em pesquisas realizadas com ratos no modelo de sepse, a administração de células tronco-mesenquimais (CTM) promoveu a diminuição do efeito sistêmico da doença, protegendo alguns órgãos-alvo

Objetivo da Pesquisa:

O projeto trata de utilização de células tronco mesenquimais (CTM) de cordão umbilical de humano em lesão de órgãos e a disfunção endotelial induzida na sepse sendo neste projeto será estudado com enfoque em três objetivos específicos: Avaliar se a terapia inter-espécies com células tronco é capaz de proteger os

Endereço: DOUTOR ARNALDO 455

Bairro: PACAEMBU

UF: SP

Município: SÃO PAULO

CEP: 01.248-903

Telefone: (11)3061-8004

E-mail: cep.fm@usp.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

Continuação do Parecer: 378.603

rins e os órgãos à distância (principalmente pulmões, coração e microcirculação) contra a agressão sistêmica gerada pela sepse. Avaliar se há diferença de mortalidade entre os animais. Avaliar o efeito imunológico entre a infusão de CTM de cordão umbilical humano, após a agressão na sepse

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos serão mínimos pois o cordão será coletado depois do nascimento. Como benefícios será a aplicação terapêutica clínica de células-tronco mesenquimais na sepse, como possível minimizador da alta mortalidade desta doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é bastante importante e representa um grande avanço na obtenção de suporte para pacientes que apresentam sepsis.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Não há recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

Endereço: DOUTOR ARNALDO 455

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3061-8004

E-mail: cep.fm@usp.br

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa: Avaliação de células-tronco mesenquimais em lesão de órgãos e disfunção endotelial na sepse

Informações Preliminares

Responsável Principal

CPF: 11137982896	Nome: Lúcia da Conceição Andrade
Telefone: (11) 3061-7281	E-mail: luciaca@usp.br

Instituição Proponente

CNPJ: 63.025.530/0018-52	Nome da Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
--------------------------	---

É um estudo internacional? Não

Equipe de Pesquisa

CPF	Nome
29804529807	Camila Eleuterio Rodrigues
	José Manuel Córdor Capcha

Área de Estudo

Área Temática Especial

Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 2. Ciências Biológicas
- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Ciências Básicas

Título Público da Pesquisa: Avaliação de células-tronco mesenquimais em lesão de órgãos e disfunção endotelial na sepse

Contato Público

CPF	Nome	Telefone	E-mail
11137982896	Lúcia da Conceição Andrade	(11) 3061-7281	luciaca@usp.br

Contato Lúcia da Conceição Andrade

ANEXO 5: ESTUDOS PILOTO

Medição de células T reguladoras no sangue periférico e no baço “em células congeladas”

Tabela 21. Medição de células T reguladoras no sangue periférico

	SHAM	LPC	LPC + CTM
CD4+CD25^{High}FOXP3+ (%)	0,64± 0,03	0,56±0,06	1,07±0,19*#

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10⁶ CTM após 6h da injúria. Valores expressos em média±erro padrão. n = 5 animais/grupo. *: p<0,05 vs SHAM; #: p<0,05 vs LPC.

Tabela 21. Medição de células T reguladoras no sangue baço

	SHAM	LPC	LPC + CTM
CD4+CD25^{High}FOXP3+ (%)	0,37± 0,03	0,47±0,02	0,51±0,04*

SHAM: grupo controle, LPC: grupo submetido a CLP, LPC + CTM: grupo submetido a CLP mais tratamento de 10⁶ CTM após 6h da injúria. Valores expressos em média±erro padrão. n = 5 animais/grupo. *: p<0,05 vs SHAM