NATHALIA LONGHINI DOS SANTOS

Terapia celular em modelo experimental do enfisema pulmonar induzido por meio de fumaça de cigarro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2014

NATHALIA LONGHINI DOS SANTOS

Terapia celular em modelo experimental do enfisema pulmonar induzido por meio de fumaça de cigarro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof. Dra. Elisabete José Vicente

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Santos, Nathalia Longhini dos.
Terapia celular em modelo experimental do enfisema pulmonar induzido por meio de fumaça de cigarro / Nathalia Longhini dos Santos. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Elisabete José Vicente.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Terapia celular.

Versão do título para o inglês: Cell therapy in a model of pulmonary emphysema induced by cigarrette smoke.

1. Enfisema pulmonar 2. Modelo animal 3. Fumaça de cigarro 4. Terapia Celular 5. Células tronco da medula óssea 6. Células mesenquimais I. Vicente, Profa. Dra. Elisabete José II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB011/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Nathalia Longhini dos Santos.

Título da Dissertação: Terapia celular em modelo experimental do enfisema pulmonar induzido por meio de fumaça de cigarro.

Orientador(a): Profa. Dra. Elisabete José Vicente.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Ciências e Letras de Assis
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Projeto "***Terapia celular em modelo experimental do enfisema pulmonar induzido por meio de fumaça de cigarro***", Registro n° 021/2011, sob responsabilidade do(a) Pesquisador **João Tadeu Ribeiro Paes**, conforme registrado, atende à legislação vigente no que tange o respeito aos princípios éticos na experimentação animal.

CERTIFICAMOS, ainda, que o referido projeto será desenvolvido no período de Julho/2012 a Dezembro/2012, sendo que o Relatório Final deverá ser entregue em Dezembro/2012.

Assis, 11 de Julho de 2012.

Marcelo Fábio Gouveia Nogueira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Av. Dom Antônio, 2100 - ASSIS/SP - CEP. 19806-900 - Fone: (18) 3302-5740 – 3302-5811
http//www.assis.unesp.br – e-mail: ceua@assis.unesp.br

À minha família e amigos,

que acreditaram no meu trabalho e sempre me incentivaram,

meu amor e minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo apoio, amor e dedicação. Obrigada por acreditarem e confiarem em meu trabalho.

Ao Dr. João Tadeu Ribeiro Paes, meu orientador, pelo apoio e conhecimento transmitido.

À Dra. Elisabete José Vicente, minha orientadora, pela compreensão, paciência e apoio.

Aos meus amigos, que mesmo não entendendo meu trabalho, sempre me apoiaram e se orgulham de mim!

À equipe do Laboratório de Genética e Terapia Celular - GenTe Cel, por toda ajuda durante a execução do projeto e por fazerem dos meus dias mais felizes dentro do laboratório!

Aos funcionários da Secretaria de Biotecnologia pelo apoio, paciência e atenção.

Ao Laboratório de Terapêutica Experimental, LIM 20, em especial ao Dr. Milton. Arruda Martins e a Dra. Fernanda Lopes por todo o suporte e experiência passados.

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

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Longhini-dos-Santos N. Terapia celular em modelo experimental do enfisema pulmonar induzido por meio de fumaça de cigarro. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) representa um importante problema de saúde pública mundial e é caracterizada por uma limitação às trocas gasosas, associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas e gases nocivos. O enfisema, dentro do espectro da DPOC, apresenta como principal característica, o aumento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, resultantes da destruição das paredes alveolares, sem fibrose pulmonar significativa. A fumaça de cigarro representa o principal agente etiológico relacionado à DPOC, sendo que cerca de 85% dos casos da doença obstrutiva pulmonar estão associados ao hábito tabágico. Apesar da incorporação de novas estratégias terapêuticas e de reabilitação, não se obteve até o presente uma forma de tratamento clínico eficaz. Neste contexto, as células tronco representam uma nova alternativa terapêutica potencialmente interessante e promissora. Este estudo propôs comparar os efeitos terapêuticos do transplante de células mononucleares da medula óssea (BMMC) e células tronco mesenquimais (CTM) em animais com enfisema induzido por exposição à fumaça de cigarro. Camundongos fêmeas da linhagem C57Bl6/J com idade de 8 semanas foram expostos à fumaça de cigarro em um aparato desenvolvido no Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel – UNESP – Campus de Assis. Os animais foram expostos à fumaça de cigarro durante 90 dias e, 21 dias após o término do período de exposição, receberam “pool” de BMMC ou CTM derivadas da medula óssea de camundongos machos da linhagem C57Bl6/J, expressando a proteína GFP. Os grupos foram comparados em relação ao diâmetro alveolar, obtido pela medida do intercepto alveolar médio (Lm). Diferenças estatísticamente significativas ($p<0,05$) foram observadas entre os animais expostos e não expostos à fumaça de cigarro, confirmando o desenvolvimento de enfisema. As análises morfométricas do pulmão mostraram que os tratamentos com BMMC e CTM foram eficientes na recuperação do parênquima pulmonar dos animais expostos à fumaça de cigarro, uma vez que estes grupos não mostraram diferença estatística em relação aos animais não expostos à fumaça de cigarro. Testes de fluorescência direta e PCR mostraram a migração de BMMC e CTM para o pulmão. Dessa forma, é lícito concluir que a terapia celular com BMMC ou CTM é, morfologicamente, eficaz no tratamento de enfisema pulmonar induzido experimentalmente por exposição à fumaça de cigarro em camundongos.

Palavras-chave: Enfisema pulmonar. Modelo animal. Fumaça de cigarro. Terapia Celular. Células tronco da Medula Óssea. Células Mesenquimais.

ABSTRACT

Longhini-dos-Santos N. Cell therapy in an experimental model of pulmonary emphysema induced by cigarette smoke. [Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is an important public health problem worldwide, with high prevalence and elevated socioeconomic impact. The disease is characterized by the limitation of gas exchange and associated with an abnormal inflammatory response of the lungs to harmful gases and particles. Emphysema, within the COPD spectrum, presents as main feature the airspace enlargement distal to the terminal bronchioles, associated to the destruction of the alveolar walls, without significant fibrosis. The main etiologic agent related to COPD is cigarette smoke and 85% of cases of pulmonary obstructive disease are associated with smoking. Despite new therapeutic strategies and techniques of rehabilitation, it was not achieved until the present an effective clinical treatment. In this context, stem cells represent a new therapeutic alternative potentially interesting and promising. This study aimed to compare the effects of transplantation of bone marrow mononuclear cells (BMMC) and mesenchymal stem cells (MSC) in animals with emphysema experimentally induced by exposure to cigarette smoke. Female mice of the strain C57Bl6/J with 8 weeks old were exposed to cigarette smoke in an apparatus developed by the "Laboratory of Genetics and Cell Therapy"- GenTe Cel – UNESP - Campus Assis. The animals were exposed to cigarette smoke for 90 days and 21 days after the end of the exposure period, the animals received a pool of BMMC or MSC derived from bone marrow of male mice C57Bl6/J, expressing GFP protein (transgenic). Both groups were compared regarding the alveolar diameter, obtained by measuring the mean linear intercept (Lm). Statistically significant differences ($p < 0.05$) were observed between the animals exposed) and not exposed to cigarette smoke, confirming the development of pulmonary emphysema in the exposed animals. The analysis of the alveolar diameter showed that both treatments with BMMC and with MSC were efficient in recovering the lung parenchyma of mice exposed to cigarette smoke, since these groups showed no statistically significant difference with the animals not exposed to cigarette smoke. The analysis of direct fluorescence and PCR showed migration of BMMC and MSC to the lung. Thus, it can be concluded that cell therapy with BMMC or MSC is, morphologically, effective in the treatment of the pulmonary emphysema experimentally induced by exposure to cigarette smoke in mice.

Keywords: Pulmonary Emphysema. COPD. Stem Cells. BMMC. MSC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema do aparato para exposição à fumaça de cigarro.....30
Figura 2- Aparato para exposição à fumaça de cigarro.....31
Figura 3- Separação das células mononucleares da medula óssea (BMMC).....32
Figura 4- Retículo (A) empregado para determinação do Lm do parênquima pulmonar (B), conforme proposto por Weibel (1963).....36
Figura 5- Colônia celular observada no 2º dia de cultura.....39
Figura 6- Cultura celular no (A) 4º dia; (B) 8º dia e (C) 12º dia.....40
Figura 7- Curva de crescimento das células mesenquimais da medula óssea de camundongos EGFP com background C57Bl/6J.....41
Figura 8- Porcentagem das células presentes na fração mononuclear da medula óssea de camundongos EGFP com background C57Bl6/J.....42
Figura 9- Porcentagem das células mesenquimais após cultura celular.....43
Figura 10- Valores da resistência das vias aéreas (Raw) obtidos nos diferentes grupos experimentais.....44
Figura 11- Valores da resistência do tecido pulmonar (Gtis) obtidos nos diferentes grupos experimentais.....45
Figura 12- Valores da elastância do tecido pulmonar (Htis) obtidos nos diferentes grupos experimentais.....45
Figura 13- Contagem do número total de células presentes no lavado bronco alveolar dos animais (LBA).....46
Figura 14- Intercepto Linear Médio (LM).....47
Figura 15- Tecido pulmonar de camundongos fêmeas C57Bl6/J após respectivo tratamento.....48
Figura 16- Análise do tecido pulmonar com micrsoscopia de fluorescência e coloração com DAPI (azul). Grupo N.....51
Figura 17- Análise do tecido pulmonar com micrsoscopia de fluorescência e coloração com DAPI (azul). Presença de células GFP (verde). Grupo BMMC.....51
Figura 18- Análise do tecido pulmonar com micrsoscopia de fluorescência e coloração com DAPI (azul). Presença de células GFP (verde). Grupo CTM.....52
Figura 19- PCR. Análise do cromossomo Y no tecido pulmonar.....54
Figura 20- Imunohistoquímica para metaloproteinase de matriz 09 – MMP9. Presença de marcação de mmp9 (em marrom). Grupo N.....55

Figura 21- Imunohistoquímica para metaloproteinase de matriz 09 – MMP9. Presença de marcação de mmp9 (em marrom). Grupo F.....55
Figura 22- Imunohistoquímica para metaloproteinase de matriz 09 – MMP9. Presença de marcação de mmp9 (em marrom). Grupo PL.....56
Figura 23- Imunohistoquímica para metaloproteinase de matriz 09 – MMP9. Presença de marcação de mmp9 (em marrom). Grupo BMMC.....56
Figura 24- Imunohistoquímica para metaloproteinase de matriz 09 – MMP9. Presença de marcação de mmp9 (em marrom). Grupo CTM.....57

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Principais modelos animais de exposição à fumaça de cigarro.....22
Tabela 1 - Grupos experimentais.....29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ºC - Graus Celsius

α-MEM – Meio de cultura α-MEM

AAT- α1-antitripsina

BMMC – células mononucleares da medula óssea / grupo de animais expostos à fumaça de cigarro que receberam tratamento com células tronco mononucleares da medula óssea

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

cm – Centímetro

cm^2 – Centímetro quadrado

CO2- Gás Carbônico

CT – Célula Tronco

CTA – Célula Tronco Adulta

CTE – Célula Tronco Embrionária

CTH – Célula Tronco Hematopoética

CTM – Célula Tronco Mesenquimal / Grupo em que os animais foram expostos à fumaça de cigarro e, posteriormente, receberam infusão de meio de cultura contendo células mesenquimais

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM – Meio de cultura Dulbecco, do inglês Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EGFP - Proteína verde fluorescente (melhorada), do inglês Enhanced Green Fluorescent Protein

F - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro e que não receberam nenhum outro tratamento

***g* –** força gravitacional

GOLD - Iniciativa Global para Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, do inglês Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

Gtis - Resistência tecidual

HE – corante hematoxilina-eosina

Htis - Elastância do tecido pulmonar

IL - Interleucina

iPS- célula tronco de pluripotência induzida

kg - Quilogramas

LBA - Lavado Bronco-Alveolar

Li - Número de interceptos de estruturas alveolares com as retas do retículo de Weibel

Lm - Intercepto linear médio

Ltot - comprimento total das retas do retículo de Weibel

mg - miligramas

mL - mililitros

MMP - Metaloproteinase de matriz

MSC – Células tronco mesenquimais, do inglês Mesenchymal Stem Cells

N- Grupo em que os animais não receberam tratamento

NIH - Instituto Nacional de Saúde, do inglês National Institute of Health

N - grupo de animais que não foi exposto à fumaça e não recebeu nenhum tratamento

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Solução salina tamponada com fosfato, do inglês Phosphate Buffered Saline

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDT – Tempo de dupicação cellular, do inglês Population Doubling Time

PL - grupo em que os animais foram expostos à fumaça de cigarro e, posteriormente, receberam infusão de meio de cultura (placebo)

PPE – elastase pancreática de porco

ppm - Partes por milhão

R_{aw} - Resistência das vias aéreas

SFB – Soro Fetal Bovino

µL – microlitros

µm – micrômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....17
1.1 Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e enfisema pulmonar.....17
1.2 Modelos experimentais de DPOC.....20
1.3 Células tronco.....24
1.3.1 Fração mononuclear da medula óssea.....24
1.4 Terapia celular.....25
1.4.1 Terapia celular em pulmão.....26
2 OBJETIVOS.....28
2.1 Objetivo geral.....28
2.2 Objetivos específicos.....28
3 METODOLOGIA.....29
3.1 Animais.....29
3.2 Grupos experimentais.....29
3.3 Aparato para exposição à fumaça de cigarro.....30
3.4 Modelo experimental de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro.....31
3.5 Obtenção de células mononucleares.....31
3.6 Obtenção das células mesenquimais.....33
3.6.1 Curva de crescimento das células mesenquimais.....34
3.7 Transplante celular.....34
3.8 Citometria de fluxo.....34
3.9 Mecânica ventilatória.....35
3.10 Coleta e análise do lavado bronco alveolar (LBA).....35
3.11 Análise histológica.....35
3.12 Morfometria - medida do intercepto linear médio (Lm).....36
3.13 Fluorescência direta.....36
3.14 Análise estatística.....37
3.15 PCR.....37
3.16 Imunohistoquímica.....37
3.17 Aspectos éticos do projeto.....38
4 RESULTADOS.....39
4.1 Cultura celular.....39
4.2 Caracterização das células tronco......42

4.2.1 Caracterização das células mononucleares da medula óssea (BMMC).....42
4.2.2 Caracterização das células tronco mesenquimais (CTM).....43
4.3 Análise funcional.....44
4.4 Lavado bronco alveolar.....46
4.5 Análise morfométrica.....47
4.6 Migração das células para o pulmão.....50
4.7 Detecção do cromossomo Y no pulmão das fêmeas receptoras.....53
4.8 A análise imunohistoquímica evidencia positividade do tratamento.....54
5 DISCUSSÃO.....58
6 CONCLUSÃO.....62
REFERÊNCIAS.....63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e enfisema pulmonar

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é considerada um grave problema de saúde pública, apresentando alta prevalência e considerável impacto econômico e social (Campos, 2003; Global Initiative for Chronic Lung Disease, 2011; Lopez et al., 2006; Murray, Lopez, 1997). Atualmente, a DPOC é considerada a quinta causa de morte e, segundo estimativas recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS), 210 milhões de indivíduos sofrem da doença, sendo 80 milhões de grau moderado e severo. Estima-se que em 2020 a DPOC atingirá a terceira posição em causa de morte, devido à exposição contínua aos fatores de risco, em especial à fumaça de cigarro (World Health Organization, 2008).

Realizado em 2003, o Projeto Platino (Projeto Latino-Americano de Investigação de Enfermidade Obstrutiva) mostrou, segundo exame de espirometria, que 15,8% da população acima de 40 anos apresentava DPOC. Esses dados representam cerca de 5 a 6,9 milhões de indivíduos acometidos pela DPOC no Brasil (Jardim, Nascimento, 2007) e, devido a alta mortalidade causada pela doença e o impacto social e familiar gerados, novas alternativas de tratamento estão sendo buscadas em estudos recentes (Ribeiro-Paes et al., 2011).

A DPOC pode ser entendida como um estado patológico caracterizado concomitantemente pela limitação de troca gasosa, não reversível, de caráter crônico e obstrutivo. Esta limitação de troca gasosa é usualmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas e gases nocivos (GOLD, 2009; Mattos et al., 2009). Caracteriza-se, essa condição obstrutiva pulmonar, por uma aceleração da perda da função pulmonar natural, com limitação lenta e progressiva de troca gasosa, que culmina em incapacitação e, consequentemente, morte prematura (Barnes, 2003; GOLD, 2009, 2011; Jardim et al., 2007; Saetta et al., 2001).

Dentro do espectro da DPOC, definem-se, atualmente, duas entidades nosológicas: a bronquite crônica e o enfisema pulmonar. (Cosio, Agustí, 2011; GOLD, 2009; Manino, 2011; Sangani, Ghio, 2011). Segundo o I Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, a bronquite crônica é caracterizada pelo aumento recorrente das secreções brônquicas, suficientes para causar expectoração, devendo estar presente pelo menos três vezes por ano, em dois anos sucessivos. O enfisema, por sua vez, caracteriza-se pela destruição das paredes alveolares e aumento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo

terminal, com a presença inicial de um infiltrado inflamatório, sem fibrose aparente (GOLD, 2009; Jardim et al., 2007).

O principal fator de risco para o enfisema pulmonar é a prática do tabagismo (GOLD, 2009, 2011; Mattos et al., 2009; WHO, 2008). Outros fatores causais incluem a poluição atmosférica e exposição ocupacional a poluentes, que contribuem para a aceleração da perda funcional e morfológica pulmonar, limitando gradualmente as trocas gasosas (Lee et al., 2011). Como consequência, há evolução para o quadro de dispneia progressiva, que pode dificultar a realização de tarefas simples do cotidiano dos pacientes, como subir escadas, tomar banho e barbear-se (Anciães et al., 2011; Barnes et al., 2003; GOLD, 2009, 2011; Kozma, 2012; Oliveira et al., 2000).

O desequilíbrio entre proteases, responsáveis pela destruição do parênquima pulmonar, e antiproteases, que inibem a ação das enzimas proteolíticas, representa a teoria mais aceita quando se refere à patogênese do enfisema pulmonar (Kozma, 2012; Rufino et al., 2006). Em condições normais, as antiproteases, como a α1-antitripsina (AAT), inibem o efeito destrutivo causado pelas proteases. Porém, em indivíduos acometidos pelo enfisema, há um aumento da produção de proteases, como a elastase neutrofílica, gerando o desequilíbrio entre proteases, evoluindo assim para a destruição do parênquima pulmonar (Kozma, 2012).

Além dos macrófagos, linfócitos T CD8+ e neutrófilos, intimamente relacionados à fisiopatologia da DPOC, células epiteliais presentes no próprio tecido pulmonar liberam mediadores inflamatórios quando ativadas por fatores irritantes exógenos, contribuindo assim para a progressão do processo inflamatório característico da DPOC (Kozma, 2012; Rufino et al., 2006; Takizawa et al., 2001).

A infiltração celular da parede e luz brônquicas é a primeira característica encontrada em pacientes com DPOC, resultando em um processo inflamatório, mediado pela proliferação de neutrófilos nas vias aéreas, promovido geralmente pela exposição à fumaça de cigarro (Cosio et al., 2002). Responsáveis pela liberação de enzimas elastolíticas, como a elastase neutrofílica, catepsina G e proteinase-3, os neutrófilos são relacionados ao desencadeamento do processo inflamatório e à destruição do parênquima pulmonar por também secretarem interleucina-8 (IL-8), promovendo o recrutamento de outros neutrófilos, amplificando o processo inflamatório (Do, Chin, 2012; Rufino et al., 2006).

Com o desencadeamento do processo inflamatório, o número de macrófagos encontrados no lavado bronco-alveolar (LBA) de pacientes com DPOC é 5 a 10 vezes maior do que em indivíduos não tabagistas (Barnes, 2008). Acredita-se que a relação entre macrófagos e DPOC seja pela produção de enzimas metaloproteases (MMP), como as MMP-

1, MMP-9 e MMP12, que semelhantemente às enzimas neutrofílicas, têm capacidade de degradação da matriz extracelular e recrutam células inflamatórias da circulação (Chung, Adcock, 2008; Sampsonas et al., 2007; Selman et al., 2003).

Semelhante aos macrófagos, os linfócitos T CD4 e T CD8 apresentam-se em maior quantidade nos pacientes acometidos pela DPOC (Saetta et al., 2001) e uma correlação direta entre esse aumento e a gravidade da doença foi observada em modelo animal de enfisema pulmonar induzido por fumaça de cigarro (Takubo et al., 2002). Da mesma forma, alterações patológicas pulmonares destrutivas foram relacionadas à ativação excessiva ou anormal de linfócitos T CD8 (Barnes, 2004; Rufino et al., 2006).

Influenciando o desequilíbrio entre proteases, a liberação de oxidantes pela fumaça de cigarro nas vias aéreas leva ao estresse oxidativo, mecanismo envolvido na patogênese da DPOC por causar danos à matriz extracelular, bem como disfunção ou morte celular (Demets et al., 1994). Nas fases particulada e gasosa da fumaça de cigarro são estimadas 1.017 partículas e oxidantes, que são capazes de reduzir a eficiência do sistema de antiproteases pela oxidação do sítio ativo destas enzimas e promover uma agressão direta à matriz extracelular (Barnes, 2003; Kozma, 2012; Rufino, Silva, 2006).

Os principais fatores de risco do enfisema pulmonar são: tabagismo, vapores e resíduos ocupacionais, poluição atmosférica, infecções, idade, asma e fatores socioeconômicos (Gold, 2010, 2011). O tabagismo aparece como a principal causa relacionada à DPOC, e corresponde a 15-20% dos casos clínicos de enfisema pulmonar. A interação entre fatores genéticos e agentes agressores é relacionada à causa de 90% dos casos de DPOC e, uma minoria, representada por 1 a 3% dos casos, apresenta um distúrbio genético, diagnosticado pela deficiência de α1-antitripsina, uma antiprotease produzida no fígado (Ribeiro-Paes et al., 2009).

A DPOC representa, como já referido, um elevado custo econômico e social. Na União Européia, 56% dos gastos relacionados a doenças respiratórias são direcionados à DPOC, compreendendo 38,6 bilhões de euros (GOLD, 2009). Em 2002, os custos diretos e indiretos nos Estados Unidos foram da ordem de 32 bilhões de dólares (GOLD, 2009), e de acordo com dados da American Thoracic Society International Conference, de 2006, estima-se que nos próximos 20 anos, serão gastos 833 bilhões de dólares somente nos Estados Unidos.

Em associação a novas técnicas de reabilitação pulmonar, as terapias utilizadas para o tratamento do enfisema têm contribuído para a melhora da qualidade de vida do paciente. Entretanto, ainda não se obteve um tratamento clínico eficaz (Ribeiro-Paes et al., 2011).

Desta forma, muitos modelos animais de DPOC têm sido propostos por diferentes grupos de pesquisadores que buscam uma maior compreensão da fisiopatologia, bem como alternativas que sejam eficazes no tratamento do enfisema (Cazzola et al., 2007; Faria et al., 2012; Fusco et al., 2002; GOLD, 2009; Gross et al., 1965; Hele, 2002; Hyatt et al., 2000; Longhini-dos-Santos et al., 2013; Mahadeva, Shapiro, 2002; Martorana et al., 1989; Nikula et al , 2000; Ribeiro-Paes et al., 2009, 2011, 2012).

1.2 Modelos experimentais de DPOC

Utilizando a instilação intratraqueal de papaína, os trabalhos de Gross, iniciados na década de 60, proporcionaram uma grande contribuição ao estudo dos processos fisiopatológicos do enfisema (Gross et al., 1965). Nestes trabalhos pioneiros, foi verificada a destruição significativa do tecido alveolar, causada pela administração de papaína, representando um forte argumento em favor da hipótese do desequilíbrio protease-antiprotease (Dawkins, Stockley, 2001; Mahadeva, Shapiro, 2002; Shapiro, 2000).

Embora os métodos de indução de enfisema pulmonar não reproduzam perfeitamente a patologia humana, novas metodologias de indução foram propostas, como instilação por via intratraqueal e intranasal de proteases (papaína e elastase), exposição à fumaça de cigarro e modelos genéticos, visando contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatologia da DPOC (Brusselle et al., 2006; Faria et al., 2012; Fox, Fitzgerald, 2004; Fusco et al., 2005; Hele, 2001; Longhini-dos-Santos et al., 2013; Mahadeva, Shapiro, 2002; Nikula et al. 2000; Ribeiro-Paes et al., 2012; Rubio et al., 2004; Zhang et al., 2009).

Apresentando-se como uma técnica simples e de fácil reprodução, a utilização de proteases ganhou espaço nos estudos relacionados à DPOC por representarem, em um curto espaço de tempo, características da doença humana relacionadas principalmente à morfologia (Fujita, Nakanishi, 2007; Longhini-dos-Santos et al., 2013; March et al., 2000; Shapiro, 2000). Desta forma, o aumento dos espaços aéreos, resultante da perda do poder de retração elástica do tecido pulmonar devido à degradação de elastina, pode ser observado em 21 dias após a instilação intranasal de elastase pancreática de porco (PPE) em camundongos (Longhini-dos-Santos et al., 2013).

Alguns estudos demonstram que o grau do enfisema está relacionado à dosagem administrada ao animal (Antunes, Rocco, 2011; Faria, 2012; Kawakami et al., 2008; Lüthje et al., 2009). Ministrando doses repetidas de elastase em tempos pré determinados, Lüthje et al.

observaram maior severidade no grau de enfisema quando comparado à única dose administrada. Em consequência, os animais apresentaram perda de peso, hipertensão pulmonar e diminuição da capacidade de exercício (Lüthje et al., 2009).

A deficiência da α_1-antitripsina, principal causa do enfisema pulmonar relacionado a fatores genéticos, pode ser observada em modelos que apresentam mutações naturais ou induzidas ("gene targeting"), responsáveis pelo surgimento de anormalidades no desenvolvimento animal, podendo evoluir para o quadro de DPOC (Shapiro, 2000; Wright et al., 2008). Desta forma, a utilização de modelos genéticos representa uma peça fundamental para o estudo da DPOC, uma vez que proporciona características fisiopatológicas ligadas à doença humana (Kozma, 2012).

A fumaça de cigarro, principal causa relacionada ao desenvolvimento do enfisema pulmonar em humanos, atualmente se apresenta como uma alternativa capaz de mimetizar significativamente as características fisiopatológicas do enfisema pulmonar humano em animais que sofrem exposição (Kozma, 2012; Wright, Churg, 2010).

Em 1981, o primeiro trabalho a utilizar exposição de fumaça de cigarro para a indução do enfisema pulmonar em modelo animal, mostrou aspectos morfométricos e fisiológicos da doença, que serviram de base para estudos posteriores (Huber et al., 1981).

Com a consolidação do método, novas variáveis surgiram, dentre elas o tipo de animal a ser utilizado, a quantidade de cigarros e o tempo de exposição. O quadro a seguir faz um resumo dos principais trabalhos que utilizaram modelos animais de exposição à fumaça de cigarro.

Quadro 1. Principais modelos animais de exposição à fumaça de cigarro

Animal	Tempo de exposição	Metodologia	Resultados Observados	Estudo
Ratos Wistar	45 a 90 dias	30 cigarros por dia	Destruição do espaço aéreo distal, diminuição da elastância e elevados graus de inflamação.	Cendon et al., 1997
Ratos Wistar	80 dias	6hs de exposição	Aumento da resistência pulmonar e diminuição da complacência pulmonar	Xu et al., 2004
Ratos Wistar	Entre 2 e 36 semanas	2hs de exposição	Animais expostos a períodos mais longos (24 e 36 semanas) apresentaram maiores valores de resistência das vias aéreas e elastância, além de maiores valores de intercepto médio (Lm) e maior resposta inflamatória	Zheng et al., 2009
Ratos Lewis	6 meses	20 cigarros diários, 5 vezes por semana	Destruição alveolar severa, representada por aumento no valor do intercepto linear médio (Lm), mesmo após a cessação da exposição	Huh et al., 2011
Camundongo C57Bl/6	6 meses	30 minutos por dia, 5 dias na semana	Desenvolvimento do enfisema pulmonar e presença de infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar dos animais expostos à fumaça de cigarro	Toledo et al., 2012

Outra questão a ser abordada é a forma de exposição utilizada, podendo ser por via nasal, na qual a fumaça é direcionada às narinas do animal (Jardim et al., 2010; Rinaldi et al., 2012; Xu et al., 2004) ou no animal como um todo, com o animal tendo espaço suficiente para circulação (Cendon et al., 1997; Huh et al., 2011; Zheng et al., 2009).

Com a exposição do animal como um todo, há a possibilidade de ingestão de nicotina e alcatrão durante o comportamento de auto limpeza do animal, podendo gerar interferência nos resultados. Da mesma forma, a via nasal de exposição pode gerar alterações no padrão "stress" do animal, em função do confinamento necessário para a exposição. (Wrigth et al., 2008).

Outro fator relevante é o tipo de fumaça utilizada na exposição dos animais. A fumaça da queima do cigarro compreende uma metodologia capaz de simular as condições fisiopatológicas de um fumante passivo. Já a fumaça resultante da sucção do cigarro ("tragada"), simula as condições de um fumante ativo e, geralmente, é fornecida ao compartimento de alocação dos animais por meio de uma bomba (Huh et al., 2011; Jardim et al., 2010; Kozma, 2012; Toledo et al., 2012; Zhang et al., 2011; Zheng et al., 2009). Não existem estudos que abordem a comparação das duas metodologias, no entanto, ambas são capazes de gerar o enfisema pulmonar nos animais, sendo o grau da doença relacionado ao tempo de exposição (Wrigth et al., 2008).

Um dos principais fatores para a criação de um modelo experimental é a escolha da espécie animal a ser utilizada. Os roedores (ratos, camundongos e guinea pig - *Cavia porcellu*) são os animais mais citados na literatura (Wrigth et al., 2008).

O tamanho reduzido dos camundongos, quando comparado a outros roedores, pode dificultar as análises funcionais mais sensíveis (Wrigth et al., 2008). Entretanto, existem linhagens naturais que apresentam reações distintas à fumaça, podendo desenvolver o enfisema pulmonar em diferentes graus de severidade (Bracke et al., 2006; Guerassimov et al., 2004; Kozma, 2012; Wrigth et al., 2008).

Embora haja questionamentos que envolvam parâmetros relacionados à fumaça de cigarro, o modelo de exposição em animais representa uma técnica promissora, devido à semelhança nos padrões morfológicos da DPOC apresentado em humanos (Kozma, 2012; March et al., 2000; Wright, Churg, 2010).

1.3 Células tronco

As células tronco (CT) compreendem as células em estado indiferenciado que apresentam, concomitantemente, capacidade de gerar células diferenciadas e autorrenovação, por longos períodos (NHI, 2001).

As CT podem ser classificadas em grupos, de acordo com seu nível de diferenciação. As células totipotentes, obtidas até a fase de 16 células da mórula, possuem capacidade de gerar todos os tipos celulares e tecidos do corpo, incluindo tecidos embrionários e extra embrionários, como a placenta. As células pluripotentes, obtidas da massa celular interna do blastocisto, possuem capacidade de gerar células dos três folhetos embrionários, mas não dão origem a tecidos extra embrionários. Atualmente, células adultas podem ser reprogramadas geneticamente, dando origem às células tronco de pluripotência induzida (iPS). As células multipotentes, obtidas em nichos específicos do corpo como a medula óssea, possuem capacidade de gerar células dos tecidos que são provenientes, sendo responsáveis pela constante renovação celular (Chandar, Viselli, 2011; Wagers, Weissman, 2004).

De acordo com o tecido de origem, as células tronco também podem ser classificadas como embrionárias (CTE), oriundas da massa interna do blastocisto, e células tronco adultas (CTA), oriundas dos tecidos pós-natais, feto, cordão umbilical entre outros nichos, incluindo as células tronco hematopoéticas (CTH) e células tronco (estromais) mesenquimais (CTM) (Lakshmipathy, Verfaillie, 2005; NIH, 2001; Roobrouck et al., 2008).

A capacidade de autorrenovação das CTA proporciona o cultivo celular, método muito utilizado para aumentar o rendimento e quantidade de células (Leeb et al., 2011; Watt, Driskell, 2010). Desta forma, culturas de CTA multipotentes representam uma alternativa amplamente estudada, voltada principalmente ao tratamento de patologias, por meio da terapia celular.

1.3.1 Fração mononuclear da medula óssea

A fração mononuclear da medula óssea (“Bone marrow mononuclear cells- BMMC”), composta por células indiferenciadas (células tronco hematopoéticas e mesenquimais) e células diferenciadas (linfócitos, neutrófilos entre outras), possui papel importante na homeostase tecidual em condições normais, bem como no reparo de lesões ou comprometimentos de ordem patológica (Giangreco et al., 2009).

As células tronco hematopoéticas (CTH), são células adultas multipotentes responsáveis pela produção de células dos tecidos mieloide e linfoide. Em condições padrões de cultura, correspondem à porção não aderente e representam cerca de 1% das células totais da medula óssea. As CTH expressam o imunofenótipo $CD34^{+}$, $CD38^{-}$, $CD133^{+}$, $CD90^{+}$, Rho^{low}, c-kit^{+} , Sca-1^{+} e lin^{-} (Wognum et al., 2003).

As células (tronco) estromais mesenquimais (CTM) apresentam formato fibroblastóide, capacidade de aderência ao plástico, formação de colônias e podem dar origem, em determinadas condições de cultivo "in vitro", aos tecidos ósseo, cartilaginoso, adiposo, alguns tecidos musculares, tendões e neurônio. Embora expressem pelo menos 95% dos marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, as CTM não expressam os marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79α ou CD19 e HLA-DR (Bydlowsky et al., 2009; Dominici et al., 2006).

Com fácil obtenção e provenientes de múltiplos locais, tais como medula óssea, tecido adiposo, polpa dentária, cordão umbilical, músculo esquelético, tecido sinovial, cartilagem, líquido aminiótico, tendão e pele, as CTM se tornaram alvo dos estudos clínicos, sendo amplamente utilizadas no tratamento de diversas patologias (Bajada et al., 2008; Bianco et al., 2013; Bydlowsk, 2009; Tigges et al., 2013; Xiao, 2012; Zhu et al., 2012).

1.4 Terapia celular

A terapia celular compreende uma prática amplamente estudada, que visa restabelecer a função normal de órgãos e tecidos por meio da aplicação de células, tornando-se uma alternativa promissora no tratamento de inúmeras doenças (Ribeiro-Paes et al., 2009).

Visando avaliar o efeito protetor promovido pela medula óssea, em 1951, Lorenz deu início aos estudos relacionados à terapia celular, e observou que a medula óssea de ratos saudáveis, transplantada em ratos tratados com uma dose letal de radiação, impedia a morte do animal receptor (Lorenz, 1951).

Em 1961, Till e McCulloch também observaram a resposta de ratos com a medula óssea transplantada após lesão provocada por irradiação ionizante. Esses trabalhos iniciais deram abertura para a consolidação da terapia celular e, atualmente, o transplante de medula óssea representa a única forma de terapia celular incorporada na terapêutica humana.

Por sua potencialidade terapêutica, as CTA estão sendo cada vez mais utilizadas no tratamento de doenças degenerativas e regeneração de tecidos lesados (Ribeiro-Paes et al., 2009). Em especial, as CTM despertam o interesse dos pesquisadores devido a sua

diferenciação em diversas linhagens, a produção de citocinas e fatores de crescimento evolvidos no reparo e regeneração de tecidos danificados, bem como a mediação de efeitos imunossupressivos e antiinflamatórios (Aggarwal, Pittenger, 2005; Carrion et al., 2010). Desta forma, a terapia celular representa um conjunto de práticas inovadoras, designando a medicina regenerativa.

1.4.1 Terapia celular em pulmão

O uso da terapia celular vem sendo abordado por muitos pesquisadores que buscam novos tratamentos para diferentes patologias, sendo considerada uma prática promissora especialmente quando aplicada a doenças de ordem pulmonar. A migração das células tronco para o pulmão tem sido alvo de estudos em humanos e modelos animais, em diferentes situações experimentais. Tal fato fornece o embasamento teórico e fundamenta a aplicação da terapia celular em doenças pulmonares (Ribeiro-Paes et al., 2012).

O processo de migração celular é relatado como resultado de uma injúria ou lesão tecidual, que provoca o recrutamento das células por meio da liberação de quimiocinas e ativação de mediadores celulares ainda pouco conhecidos, que estão associados ao mecanismo de reparo tecidual (Giangreco et al., 2009; Rojas et al., 2005; Sueblivong et al., 2009).

Em 1995, Pereira e colaboradores demonstraram que as células da medula óssea podem migrar para o pulmão e atuar como precursores de células locais, e puderam observar, por meio de PCR, a permanência destas células incorporadas no parênquima pulmonar por um período de até cinco meses. Posteriormente, outros autores mostraram, por diferentes metodologias, em modelos experimentais e pacientes humanos, que as CTA podem migrar para o parênquima pulmonar e desencadear respostas biológicas que auxiliam na recuperação fisiológica do pulmão (Krause et al., 2001; Ishizawa et al., 2004; Longhini-dos-Santos et al., 2013; MacPherson et al., 2005, 2006; Ortiz et al., 2003; Ribeiro-Paes, et al., 2009, 2012; Rojas et al. 2005; Suratt et al., 2003, Yamada et al., 2004).

Nos estudos realizados por Lama em 2007, as técnicas de RT-PCR e imunohistoquímica mostraram a permanência de células infundidas (masculinas) no pulmão de mulheres submetidas ao transplante de medula óssea, por um período de até onze anos (Lama et al., 2007).

O primeiro estudo brasileiro a utilizar células tronco hematopoiéticas no tratamento humano do enfisema pulmonar foi publicado em 2011 por Ribeiro-Paes e colaboradores.

Neste procedimento autólogo, as células mononucleares da medula óssea foram infundidas por via periférica em pacientes com estágio avançado de enfisema pulmonar. Os resultados demonstraram a segurança do procedimento, bem como melhora nos padrões de gasometria e qualidade de vida dos pacientes (Ribeiro-Paes et al., 2011).

Em 2013, Longhini-dos-Santos e colaboradores mostraram a recuperação morfológica do parênquima pulmonar de camundongos tratados com células mononucleares da medula óssea após sofrerem lesão por instilação intranasal de elastase. Este trabalho mostrou a migração celular e permanência das células no pulmão por até 21 dias (Longhini-dos-Santos et al, 2013).

Estudos em modelos animais (ratos e camundongos) e em humanos têm demonstrado que a administração das células mesenquimais é um processo eficaz e seguro (Hu et al., 2010; Le Blanc et al., 2008; Reinders et al., 2010; Rojas et al., 2005), apresentando resultados satisfatórios em modelos animais de DPOC, uma vez que desaceleram as alterações degenerativas características do enfisema (Zheng, 2009).

Em doenças pulmonares, quando administradas em camundongos que sofreram instilação de bleomicina, as células mesenquimais migraram para o pulmão e apresentaram características de pneumócitos tipo I (Kotton et al., 2001) bem como efeito protetor, reduzindo a fibrose e o quadro inflamatório (Ortiz et al., 2003; Rojas et al., 2005).

Recentemente, o emprego das células mesenquimais em camundongos com enfisema pulmonar induzido por elastase promoveu a regeneração pulmonar (Katsha et al., 2011). Já em camundongos com enfisema pulmonar induzido por exposição à fumaça de cigarro, o tratamento com as células mesenquimais promoveu a recuperação do parênquima pulmonar e melhora aparente em outros aspectos da DPOC (Schweitzer et al., 2011).

Há, portanto, em modelos animais e pacientes humanos um conjunto de resultados consistentes que mostram a migração de CT para o pulmão, sobretudo, no órgão submetido a algum tipo de trauma ou injúria. Desta forma, este conjunto de evidências experimentais sustentam a possibilidade do emprego de CTM ou células mononucleares da medula óssea (BMMC) na terapia celular em doenças pulmonares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a análise comparativa da resposta pulmonar (morfológica e funcional) ao tratamento com “pool” de células mononucleares da medula óssea (BMMC) ou células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea em camundongos com enfisema pulmonar induzido experimentalmente por fumaça de cigarro.

2.2 Objetivos específicos

Adequar, nas condições experimentais do laboratório, um modelo animal (camundongo) de indução de enfisema pulmonar por meio de exposição à fumaça de cigarro.

Realizar análises morfométricas com determinação do intercepto alveolar médio nos animais controles e tratados.

Avaliar a migração e efeito terapêutico das células infundidas nos animais.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados 75 camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6J com aproximadamente 8 semanas de idade. Para a extração das células tronco foram utilizados 15 camundongos machos EGFP ("Enhanced Green Fluorescent Protein") com background C57Bl/6J com aproximadamente 8 semanas de idade, gentilmente cedidos pelo Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita, Japan. Todos os animais foram mantidos em caixas de polipropileno forradas com serragem, em sala com temperatura e luminosidade controladas (22 °C e 12 h – luz e 12 h – escuro), receberam dieta sólida e água *ad libitum*.

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos nos seguintes grupos compostos por 15 animais cada:

- Grupo N: animais foram mantidos no biotério, sem tratamento de exposição à fumaça e/ou células (controle);
- Grupo F: animais expostos à fumaça de cigarro (controle);
- Grupo PL: animais expostos à fumaça de cigarro que receberam infusão de meio de cultura (controle);
- Grupo BMMC: animais expostos à fumaça de cigarro que receberam infusão de BMMC em meio de cultura;
- Grupo CTM: animais expostos à fumaça de cigarro que receberam infusão de CTM em meio de cultura.

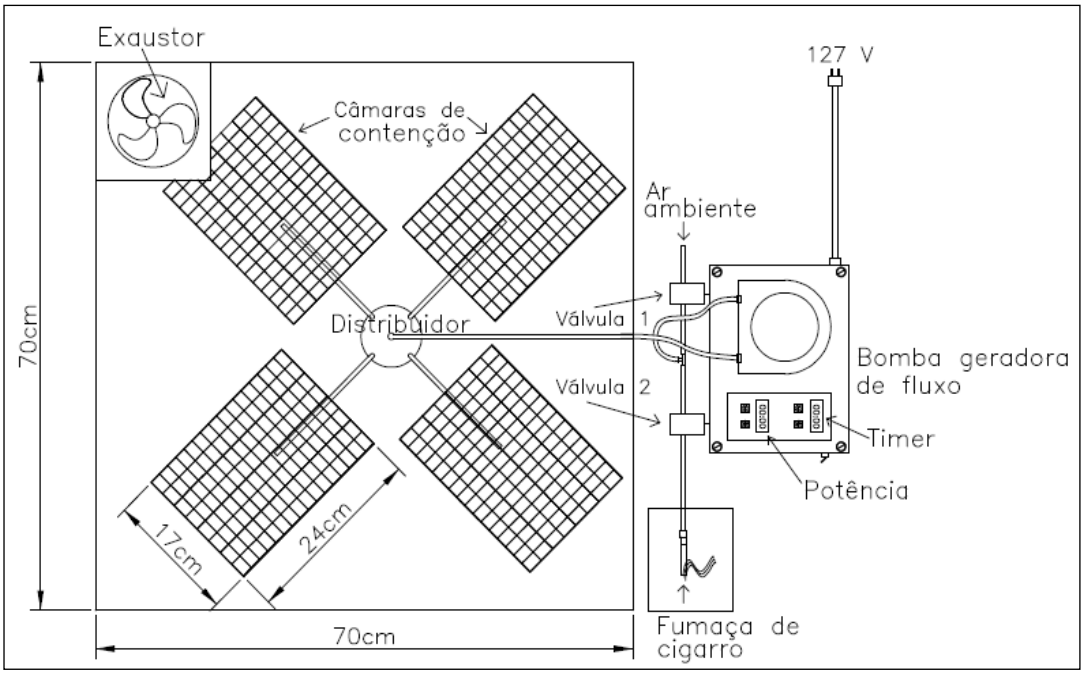
Tabela 1: Grupos experimentais.

Grupo	Exposição à fumaça de cigarro	Tratamento
N	Não	Não
F	Sim	Não
PL	Sim	Sim (Veículo)
BMMC	Sim	Sim (Veículo + *Pool* de BMMC)
CTM	Sim	Sim (Veículo + CTM)

3.3 Aparato para exposição à fumaça de cigarro

O aparelho consiste na união de dois sistemas: sistema de captação e distribuição da fumaça de cigarro e um sistema de contenção dos animais (Figura 1).

Figura 1- Esquema do aparato para exposição à fumaça de cigarro.



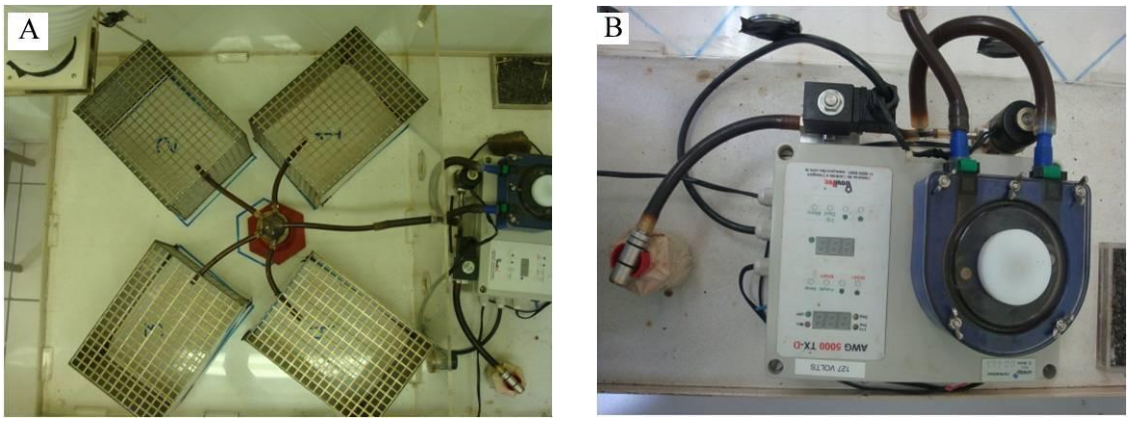
Vista superior do aparato. Ao lado direito pode ser observado o módulo de combustão e tragada do cigarro. À esquerda estão situadas as gaiolas para contenção dos animais, que permanecem dentro da caixa de acrílico.
Fonte: Kozma (2012).

O sistema de contenção de animais compreende quatro gaiolas de metal, com dimensões de 24 cm x 17 cm x 15 cm, com capacidade para até quinze camundongos cada. Desta forma, o aparelho permite aplicar a metodologia em um total de sessenta animais simultaneamente. As quatro gaiolas encontram-se equidistantes no interior de uma caixa de acrílico com dimensões de 70 cm x 70 cm x 20 cm, com tampa hermeticamente fechada, acoplada a um exaustor (Figura 2A).

O sistema de captação e distribuição da fumaça compreende um suporte externo para cigarro, conectado por mangueira a uma bomba elétrica de sucção com temporizador automático (Figura 2B). A bomba possui programação que permite definir períodos de sucção de fumaça intercalados com períodos de sucção de ar ambiente para evitar asfixia dos animais. Desta forma, a bomba gera uma pressão negativa que obriga a fumaça da combustão a passar pelo interior do cigarro, percorrendo a mangueira em direção ao interior da caixa de acrílico, onde ramifica-se, com o auxílio de um distribuidor de vidro, em quatro direções

perpendiculares coplanares de modo que cada uma das direções alimente uma gaiola. A fumaça é lançada verticalmente no sentido súpero-inferior a partir da parte superior da gaiola, alcançando os animais e difundindo-se por toda a caixa (Figura 2A).

Figura 2. Aparato para exposição à fumaça de cigarro.



Sistema de contenção dos animais (A) e Sistema de captação e distribuição de fumaça (B).

Fonte: Kozma (2012).

3.4 Modelo experimental de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro

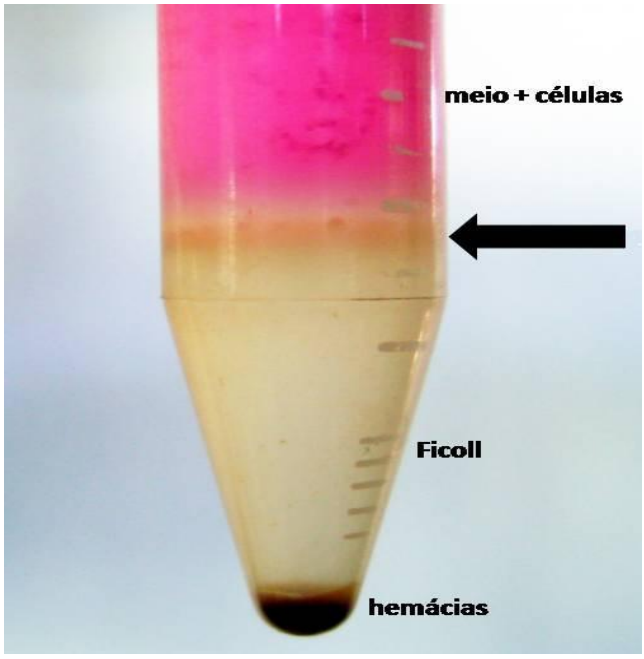
Para o desenvolvimento do modelo animal, foram utilizados 60 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J com aproximadamente 8 semanas de idade. Os animais foram expostos diariamente à fumaça de cigarro, durante 90 dias. A exposição foi realizada três vezes ao dia, às 8, 12 e 16 horas, totalizando assim, três horas de exposição diária. Durante cada hora de exposição, foram feitos três ciclos de 20 minutos, divididos em 15 minutos de exposição à fumaça de 4 cigarros comerciais e 5 minutos de ar ambiente. A concentração média de monóxido de carbono no interior da caixa variou entre 350 – 400 ppm durante os períodos de exposição. Foram utilizados cigarros comerciais da marca Derby® (Souza Cruz, Rio de Janeiro, Brasil), embalagem vermelha com 20 unidades, cada cigarro contendo filtro, 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono, totalizando 3240 cigarros.

3.5 Obtenção de células mononucleares

Para a obtenção e isolamento das células mononucleares da medula óssea, foram utilizados 5 camundongos machos EGFP com background C57Bl/6J, com aproximadamente 8 semanas de idade. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram o

fêmur e a tíbia extraídos e colocados em solução salina PBS 1X (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) com 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco®, New York, USA). Após a limpeza dos ossos, as epífises foram seccionadas e, com o auxílio de uma seringa contendo meio de cultura "Dulbecco's Modified Eagle's Médium" – DMEM (Gibco®, New York, USA) a medula óssea foi removida ("flushing"). A suspensão celular foi homogeneizada em meio de cultura (DMEM) e seguiu para centrifugação a 377 g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em uma solução contendo 1,5 mL de meio DMEM e 1,5 mL de soro fisiológico a 0,9%. Em seguida, a solução celular foi colocada cuidadosamente sobre 2 mL de Ficoll a 50% (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil) para separação por gradiente de densidade, mediante centrifugação por 26 minutos a 377 g. O concentrado contendo o "pool" de células mononucleares da medula ósssea, presente na interface entre o meio de cultura e o Ficoll (Figura 3), foi recolhido e lavado em 10 mL de meio DMEM (centrifugação por 10 minutos a 377 g). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 2 mL de meio α-MEM. Uma alíquota de 10 µL foi retirada para contagem em câmara hematimétrica de Neubauer. A viabilidade das células foi verificada por Azul de Trypan. Em seguida foi feita a diluição, em meio α-MEM, das células para uma concentração final de 7 x 10^6 células/mL.

Figura 3. Separação das células mononucleares da medula óssea (BMMC).



Separação por gradiente de densidade (Ficoll). A seta indica o anel contendo o "pool" de BMMC.

3.6 Obtenção das células mesenquimais

Para a obtenção e isolamento das células mesenquimais da medula óssea, foram utilizados 10 camundongos machos EGFP com background C57Bl/6J, com aproximadamente 5 semanas de idade. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram o fêmur e a tíbia extraídos e colocados em solução salina PBS 1X (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) com 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco®, New York, USA). Após a limpeza dos ossos, as epífises foram seccionadas e, com o auxílio de uma seringa contendo meio de cultura α-MEM (Gibco®, New York, USA) a medula óssea foi removida ("flushing"). A suspensão celular foi homogeneizada em meio de cultura (α-MEM) e seguiu para centrifugação a 377 g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 2 mL de uma solução de meio α-MEM (Gibco®, New York, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (HyClone, Utah, USA) e 2% de antibiótico-antimicótico (Gibco®, New York, USA). Uma alíquota de 10 µL foi retirada para contagem em câmara hematimétrica de Neubauer. A viabilidade das células foi verificada por Azul de Trypan. Em seguida foi feita a diluição das células em meio α-MEM suplementado, para a concentração final de semeadura de $1x10^5$ células/cm^2. As células foram primeiramente semeadas em meio de cultura α-MEM contido em placas de cultura de 6 poços (BD Falcon™, New Jersey, USA), com 9 cm^2 cada poço, e incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2.

As células foram observadas e fotografadas todos os dias da cultura. A primeira troca do meio de cultura foi realizada 48 horas após a semeadura e as trocas seguintes a cada 72 horas.

No 5° dia de cultura, as células atingiram confluência de 70-80% e foi realizada a 1ª passagem. Os poços foram lavados três vezes com solução salina PBS 1x (0,1 mL/cm^2) e as células foram dissociadas com a utilização de Tryple™ (Gibco®, New York, USA), segundo protocolo do fabricante. Após a 1ª passagem, as células foram semeadas em meio de cultura suplementado e contido em garrafas de cultura (BD Falcon™, New Jersey, USA) de 25 e 75 cm^2 na concentração de 2×10^4 células/cm^2 e foram mantidas até a quarta passagem.

O transplante celular ocorreu no 15º dia de cultura. As células foram dissociadas e uma alíquota de 10 µL foi retirada para contagem em câmara hematimétrica de Neubauer. A viabilidade das células foi verificada por Azul de Trypan. Em seguida foi feita a diluição, em meio α-MEM, das células para a concentração final de 5×10^5 células/mL.

3.6.1 Curva de crescimento das células mesenquimais

Para avaliar a capacidade de adesão, proliferação e tempo de dobramento celular, após a primeira passagem, as células mesenquimais da medula óssea foram semeadas em meio de cultura suplementado contido em placas de cultura de 24 poços com 1 cm^2 cada (BD Falcon™, New Jersey, USA) para realização da curva de crescimento.

Cada poço de 1 cm^2 continha aproximadamente 4,5 x 10^4 células inicialmente, que foram mantidas em meio α-MEM suplementado com 20% de SBF e 2% de antibiótico – antimicótico (Gibco®, New York, USA) em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 durante 10 dias. A dissociação celular foi realizada diariamente e a concentração celular determinada em câmara hematimétrica de Neubauer, em triplicata. Após esse período, o número de células foi plotado em um gráfico linear (dias x número de células).

Para determinação do tempo de duplicação da população (*population doubling time* – PDT) foi empregada a seguinte fórmula: CT/ (log (N/N_0) x 3,31), onde CT: tempo (horas), N: número de células final e N_0: número de células inicial (Eslaminejad et al., 2010).

3.7 Transplante celular

O transplante celular foi realizado 16 dias após o fim da exposição à fumaça de cigarro. A infusão das células foi feita por via intravenosa (veia caudal). O grupo tratado com "pool" de células mononucleares (BMMC) foi infundido com 0,4 mL de solução celular, na concentração de 7 x 10^6 células/mL. O grupo tratado com as células mesenquimais (CTM) foi infundido com 0,4 mL de solução celular, na concentração de 5 x 10^5 células/mL. O grupo placebo (PL) recebeu tratamento similar, porém, infundido apenas com 0,4 mL do veículo (α-MEM). A realização dos testes ocorreu 21 dias após o transplante.

3.8 Citometria de fluxo

Após a obtenção das células, cada amostra retirada foi fixada em solução de paraformaldeído 2%. As células hematopoéticas (BMMC) foram reconhecidas utilizando os anticorpos anti-Flk2 (conjugado a PE- ficoeritrina), anti-Sca-1(conjugado a Cy7/PE – ficoeritrina ligada a cianina 7) e anti-c-Kit (conjugado a APC- aloficocianina). As células mesenquimais (CTM) foram reconhecidas utilizando-se marcadores para seleção negativa (anti-CD45, anti-Ter-119, anti-CD11b, anti-cKit -todos conjugados a APC- aloficocianina) e

os anticorpos anti-CD90, anti-CD73 (conjugados a PE-ficoeritrina) e anti-Sca-1 (conjugado a Cy7/PE - ficoeritrina ligada a cianina 7). As leituras foram realizadas no citômetro de fluxo FACsCalibur (Becton Dickinson, USA) do Laboratório de Biofísica Experimental da Escola Paulista de Medicina (Unifesp) e as análises realizadas no programa WinMDi 2.8.

3.9 Mecânica ventilatória

No 21º dia após a infusão, os animais foram submetidos a testes funcionais no Laboratório de Terapêutica Experimental I – Lim 20 (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP). Os animais foram anestesiados com tiopental (Thiopentax Cristália-Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.; São Paulo, Brasil) (250 mg/kg), traqueotomizados e conectados a um ventilador para animais pequenos (FlexiVent, Scireq, Canadá) para coleta dos dados referentes a parâmetros respiratórios: resistência das vias aéreas (Raw), amortecimento/resistência do tecido pulmonar (Gtis), e elastância do tecido pulmonar (Htis).

3.10 Coleta e análise do lavado bronco alveolar (LBA)

Após o teste de fisiologia respiratória, os animais foram exsanguinados. Com o auxílio de um cateter intravenoso Angiocath 20G x 1.16" 1,1 x 30 mm BD (Becton Dickinson Ind. Cir. LTDA – Juiz de Fora – MG – Brasil) inserido na traqueia, o pulmão do animal foi lavado por duas vezes, com 0,5 mL de soro fisiológico 0,9% cada vez. O material coletado foi centrifugado a 800 *g*, durante 10 minutos a 5 °C. O sobrenadante foi aspirado e armazenado a -70 °C para análises posteriores. O pellet foi ressuspenso em 0.3 mL de PBS 1x para a contagem do número total e absoluto de células/mL de lavado, em câmara hematimétrica de Neubauer.

3.11 Análise histológica

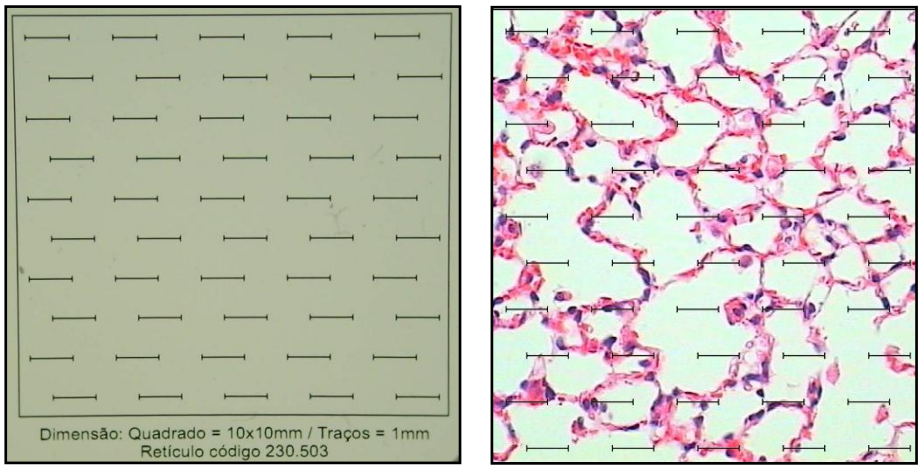
Após a coleta do LBA, os pulmões foram retirados e insuflados com pressão positiva constante de 20 cm de uma solução tamponada de paraformaldeído a 4%, por um período de 24 horas, utilizando-se um aparato para perfusão pulmonar adaptado e modificado pelo grupo do Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel (UNESP – Campus de Assis), conforme proposto por Barbosa-de-Oliveira et al., 2011. Os pulmões seguiram rotina histológica e foram incluídos em parafina. As lâminas foram confeccionadas com cortes de

5µm de espessura e coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e seguiram para análise do Intercepto Linear Médio (“Mean Linear Intercept” - Lm).

3.12 Morfometria - medida do intercepto linear médio (Lm)

Foram analisados vinte campos aleatórios não coincidentes das lâminas do tecido pulmonar em aumento de 400 vezes. A avaliação histológica do enfisema pulmonar foi realizada mediante cálculo do Lm, indicador do Intercepto linear médio, em micrômetros, segundo metodologia proposta por Weibel em 1963. O Intercepto linear médio - Lm é obtido pela equação: Lm = Ltot / Li , onde: Ltot - comprimento total das retas do retículo e Li - o número de interceptos de estruturas alveolares com as retas do retículo.

Figura 4 – Retículo (A) empregado para determinação do Lm do parênquima pulmonar (B), conforme proposto por Weibel (1963).



(A) (B)

Fonte: Barbosa-de-Oliveira et. al, 2010

3.13 Fluorescência direta

A fim de verificar se houve migração das células infundidas para o pulmão, no 30° dia após a infusão celular, dois animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical, para extração dos pulmões que foram analisados por meio de fluorescência direta.

Em ambiente com pouca luminosidade, os órgãos foram fixados com Tissue Tek, OCT® - Optimal Critical Temperature Compound (Sakura Finetek, Torrance, USA) e cortados a 3 µm de espessura, em criostato Leica CM3050 S (Leica Biosystems Nussloch

GmbH, Heidelberger, Germany). O bloqueio da peroxidase endógena dos cortes foi realizado por água oxigenada 30 volumes, em 4 vezes de 5 minutos cada. Após o bloqueio, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS 1x durante 3 minutos cada e foram corados com DAPI (1:300) durante 30 minutos em temperatura ambiente. Após a coloração, os cortes foram lavados 3 vezes em PBS 1x e as lâminas foram montadas e armazenadas em recipiente protegido da luz, a -20 °C. As análises foram realizadas em microscópio confocal Zeiss LSM 780 - Observer Z1/ZEN (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany).

3.14 Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes de mecânica respiratória e Lm foram analisados por meio do teste de ANOVA Kruskal-Wallis, teste post-hoc de Dunn.

3.15 PCR

Para a técnica de PCR, os pulmões removidos foram congelados e posteriormente seguiram para a extração do DNA, conforme protocolo sugerido pelo fornecedor do kit de extração NucleoSpin Tissue XS (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren · Germany). Adotou-se, em linhas gerais, o protocolo descrito por Longhini-dos-Santos et al. (2013). Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados foram Mouse Sry locus, 8276–8295 5´- TGGGACTGGTGACAATTGTC-3´ e 8677–8658 5´-GAGTACAGGTGTGCAGCTCT-3´, (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA). As condições da amplificação, padronizadas previamente, são: 95 °C por 4.5 minutos, seguido por 33 ciclos de 35 segundos a 95 °C, 1 minuto a 50 °C e 1 minuto a 72 °C cada. A extensão final foi de 5 minutos a 72 °C.

3.16 Imunohistoquímica

Neste estudo foi empregada anti-metaloproteinase 9 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) para detecção das metaloproteinases características do estado patológico na matriz extracelular do tecido pulmonar. Foi empregado como anticorpo secundário Anti-Goat biotinilado IgG B7014 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina. Adotou-se, em linhas gerais, o protocolo descrito por Suratt et al (2003).

3.17 Aspectos éticos do projeto

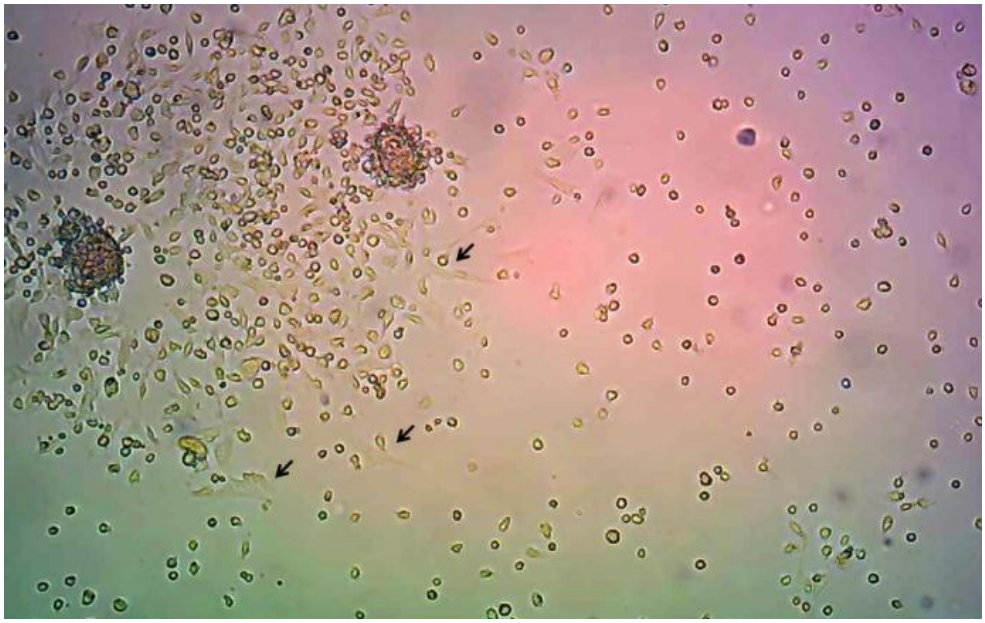
Foram rigorosamente seguidas neste projeto as normas estabelecidas nas portarias 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde. Deve-se salientar que o projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências e Letras da Unesp Campus de Assis. O projeto foi aprovado e possui número de registro: 021/2011.

4 RESULTADOS

4.1 Cultura celular

Com o propósito de avaliar as características de isolamento, proliferação e expansão das células tronco mesenquimais (CTM), as células isoladas da medula óssea foram inicialmente semeadas em meio de cultura suplementado e contido em placas de cultura de 9 cm^2 , na densidade de 1 x 10^5 células/cm^2. No 2º dia de cultura, foi verificada a aderência celular, formação de colônias e alongamento inicial de células esparsas (Figura 5). No 3º dia, foi realizada a primeira troca de meio de cultura, sendo possível notar a presença de colônias com células já em formato fibroblastóide.

Figura 5 – Colônia celular observada no 2º dia de cultura.

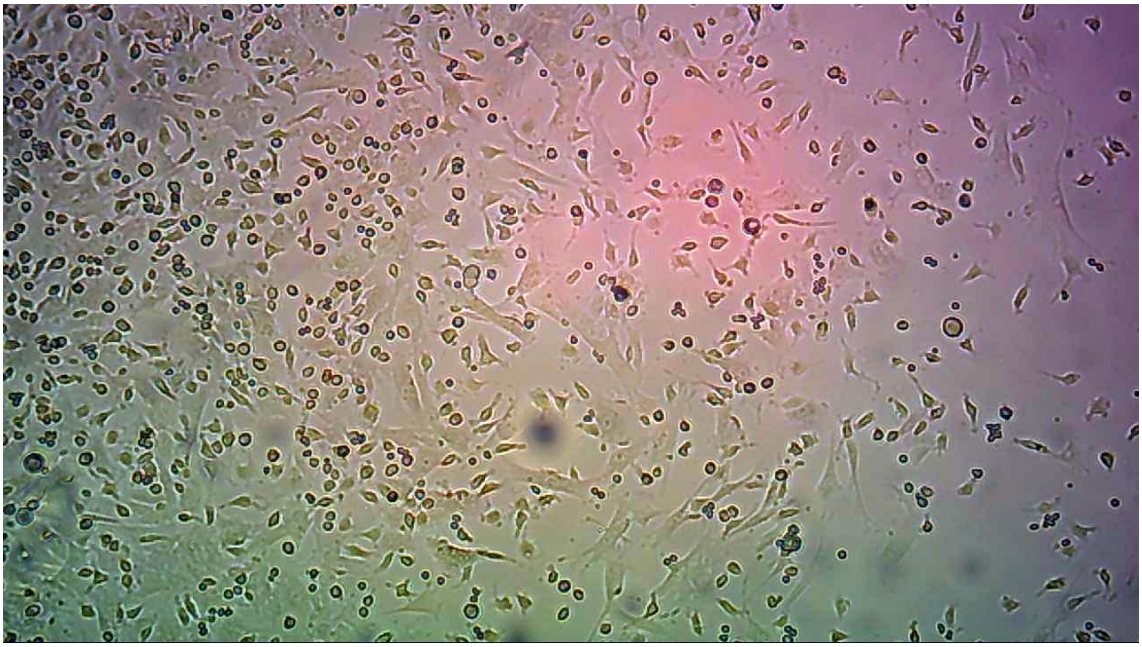


Células mesenquimais aderidas à placa de cultura após 2 dias de semeadura. As setas indicam células em formato fibroblastóide. Aumento 200x.

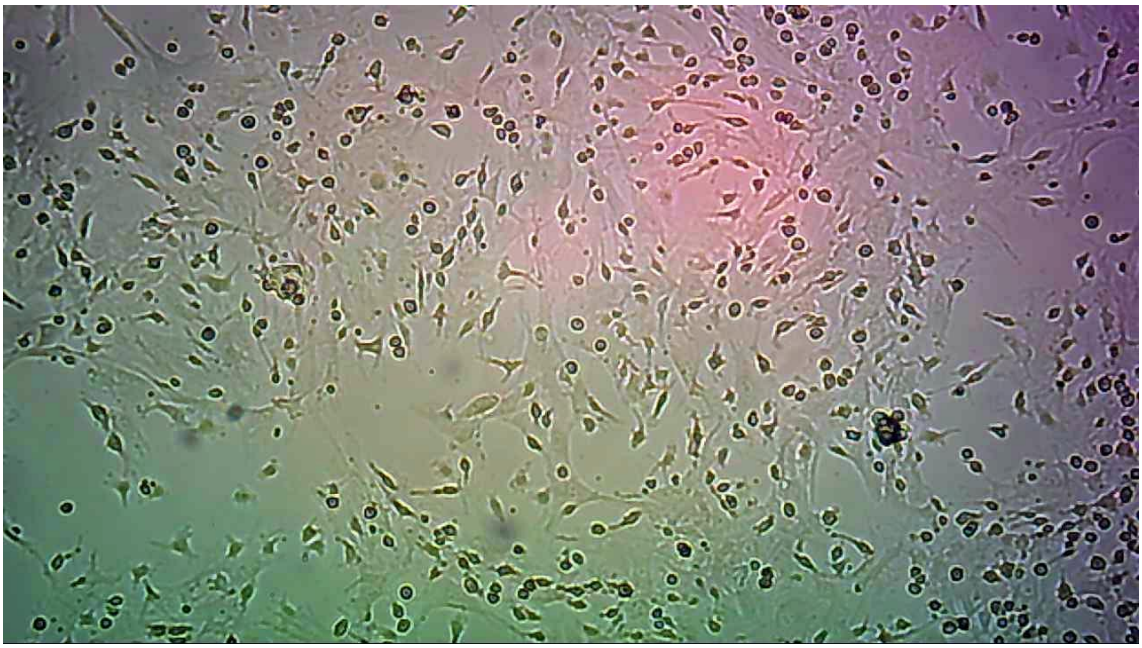
A cultura primária atingiu confluência de 70 – 80% após 5 dias do início da cultura e assim foi realizada a primeira passagem.

As células foram cultivadas até a 4ª passagem, totalizando 15 dias (Figura 6). A viabilidade foi mensurada em cada uma das passagens, obtendo-se uma média de aproximadamente 99%.

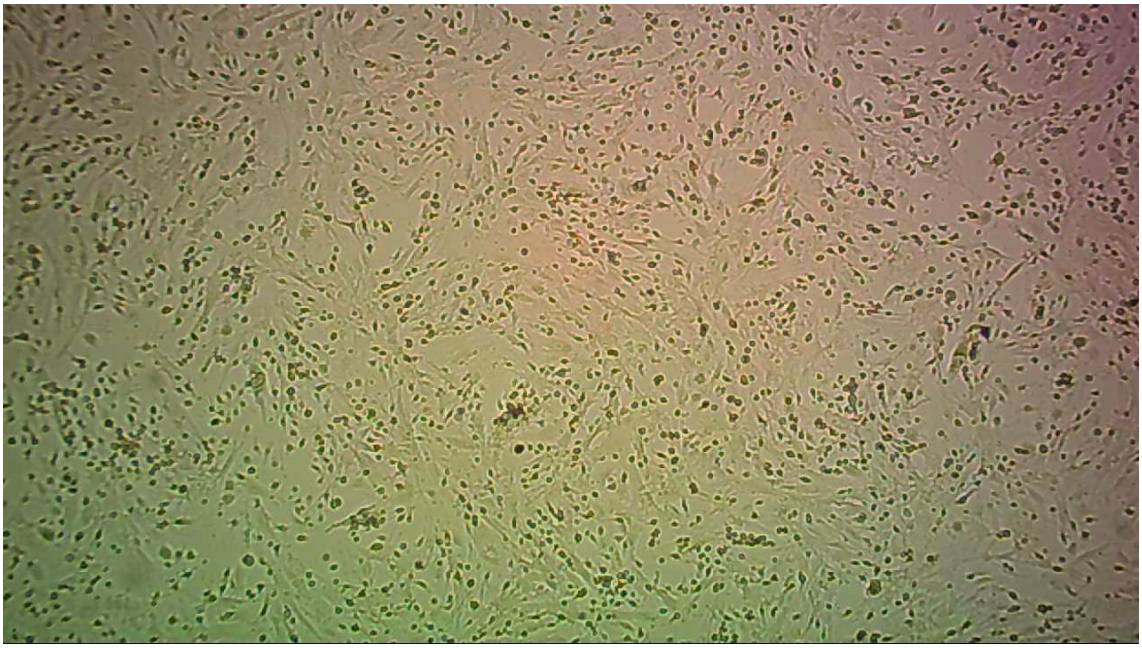
Figura 6 – Cultura celular no (A) 4º dia; (B) 8º dia e (C) 12º dia.



A. Colônia celular no 4º dia de cultura. Células bastante alongadas e em formato fibroblastóide observadas no fundo da placa. Aumento 400x.



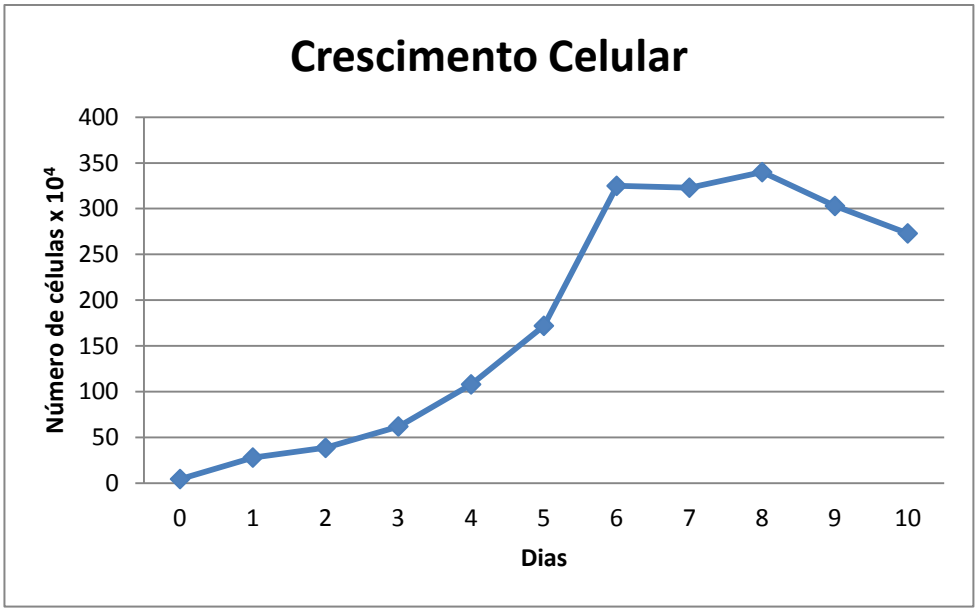
B. Colônia celular no 8º dia de cultura. 2ª passagem. Células bastante aderidas e alongadas, com formato fibroblastóide. Aumento 400x.



C. Colônia celular no 12º dia de cultura. Células bastante aderidas e alongadas, com formato fibroblastóide. Aumento 200x.

Para investigar o potencial de adesão, proliferação e o tempo de duplicação da população das CTM foi realizada uma curva de crescimento celular durante 10 dias. Os dados foram plotados conforme apresentado na Figura 7 a seguir.

Figura 7 – Curva de crescimento das células mesenquimais da medula óssea de camundongos EGFP com background C57Bl/6J.



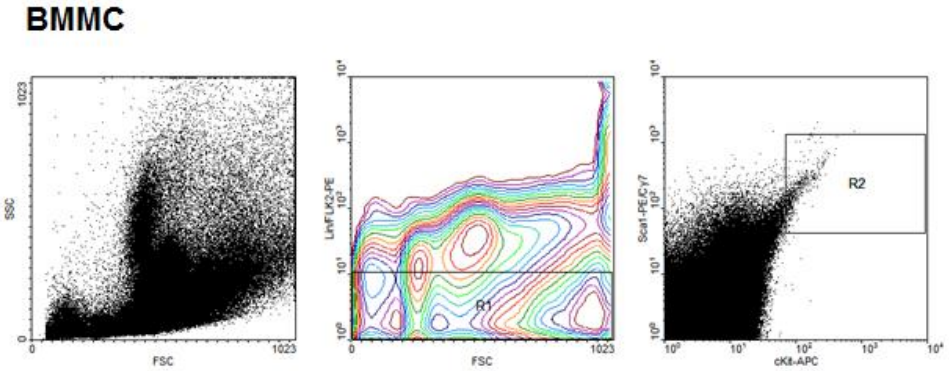
A curva de crescimento mostra que as células iniciam o processo de proliferação logo após a semeadura. A fase exponencial de crescimento foi mantida até o 6º dia, quando se deu inicio à fase de "plateau", mantida por 2 dias. O cálculo do tempo de duplicação celular (PDT), um importante indicador da capacidade de proliferação, mostrou que a população celular duplica a cada 26,05 horas.

4.2 Caracterização das células tronco

4.2.1 Caracterização das células mononucleares da medula óssea (BMMC)

As células mononucleares da medula óssea (BMMC) inicialmente obtidas a partir de camundongos machos da linhagem EGFP com background C57Bl6/J foram separadas empregando-se gradiente de Ficoll (Metodologia, item 3.5). Para avaliar a eficiência da separação destas células por esta metodologia, procedeu-se à análise das células e de seus marcadores de superfície por citometria de fluxo. As células hematopoéticas (BMMC) foram reconhecidas utilizando os anticorpos anti-Flk2 (conjugado a PE- ficoeritrina), anti-Sca-1(conjugado a Cy7/PE – ficoeritrina ligada a cianina 7) e anti-c-Kit (conjugado a APC-aloficocianina). Os resultados são apresentados na Figura 8.

Figura 8 – Porcentagem das células presentes na fração mononuclear da medula óssea de camundongos EGFP com background C57Bl6/J.



Gates: R1
Project: Experiment:
File: CTH.006 Sample:
Date: 29-May-12 Parameters: 7
Total Events 300000 Gated Events 95956 31.99%
System: Log Parameter Means: Geometric
cKit-APC (7) vs Sca1-PE/Cy7 (5)

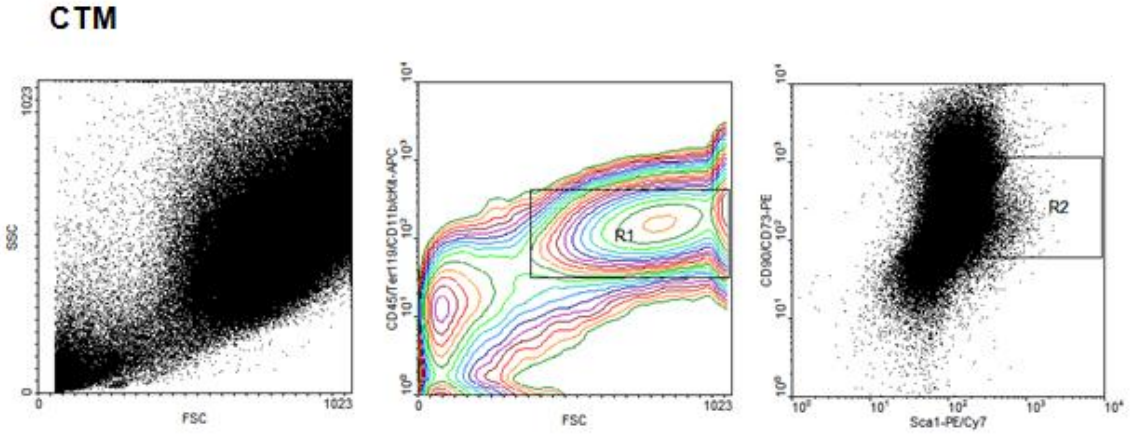
Region	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated	Params	X Range	Y Range
R0	6.1	3.7	95956	31.99	100.00	7,5	10000	10000
R1	342.1	3.8	95956	31.99	100.00	1,4	1024	10000
R2	92.9	198.1	5	0.08	0.01	7,5	10000	10000

4.2.2 Caracterização das células tronco mesenquimais (CTM)

A eficiência de obtenção de células tronco mesenquimais (CTM) por cultivo (Item 4.1) foi avaliada empregando-se análise das células e seus marcadores de superfície por citometria de fluxo. As células mesenquimais (CTM) foram reconhecidas utilizando-se marcadores para seleção negativa (anti-CD45, anti-Ter-119, anti-CD11b, anti-cKit -todos conjugados a APC- aloficocianina) e os anticorpos anti-CD90, anti-CD73 (conjugados a PE-ficoeritrina) e anti-Sca-1 (conjugado a Cy7/PE - ficoeritrina ligada a cianina 7).

Os resultados são apresentados na Figura 9.

Figura 9 – Porcentagem das células mesenquimais após cultura celular.



Gates: R1
Project: Experiment:
File: CTM.007 Sample:
Date: 29-May-12 Parameters: 7
Total Events 300000 Gated Events 217254 72.42%
System: Log Parameter Means: Geometric
Sca1-PE/Cy7 (5) vs CD90/CD73-PE (4)

Region	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated	Params	X Range	Y Range
R0	112.7	190.4	217254	72.42	100.00	5,4	10000	10000
R1	775.8	156.9	217254	72.42	100.00	1,7	1024	10000
R2	159.9	241.4	110722	33.91	50.96	5,4	10000	10000

É possível observar que as duas amostras diferem tanto pelo volume celular quanto pelo padrão de expressão dos marcadores avaliados.

A análise dos marcadores de superfície da amostra contendo o “pool” de células mononucleares da medula óssea (BMMC) mostrou que 0.08% das células eram positivas para Sca-1 e c-kit e negativas para Lin- e FLK-2.

A análise dos marcadores de superfície da amostra contendo as células mesenquimais (CTM) mostrou que 33. 91% das células eram positivas para Sca-1, CD90 e CD73 e negativas para CD45, Ter119, CD11b e c-kit .

Os resultados indicam que o processo de obtenção das células foi adequado.

4.3 Análise funcional

Para verificar a alteração causada pela fumaça de cigarro nos aspectos funcionais dos animais expostos à fumaça de cigarro, a resistência das vias aéreas (Raw), o amortecimento/resistência do tecido pulmonar (Gtis), e a elastância do tecido pulmonar (Htis) de todos os grupos foram avaliados por um ventilador para pequenos animais (FlexiVent, Scireq, Canadá).

As medianas e desvios interquartílicos são mostrados nas figuras a seguir.

Figura 10 – Valores da resistência das vias aéreas (Raw) obtidos nos diferentes grupos experimentais. H= 11.1069; p= 0.254.

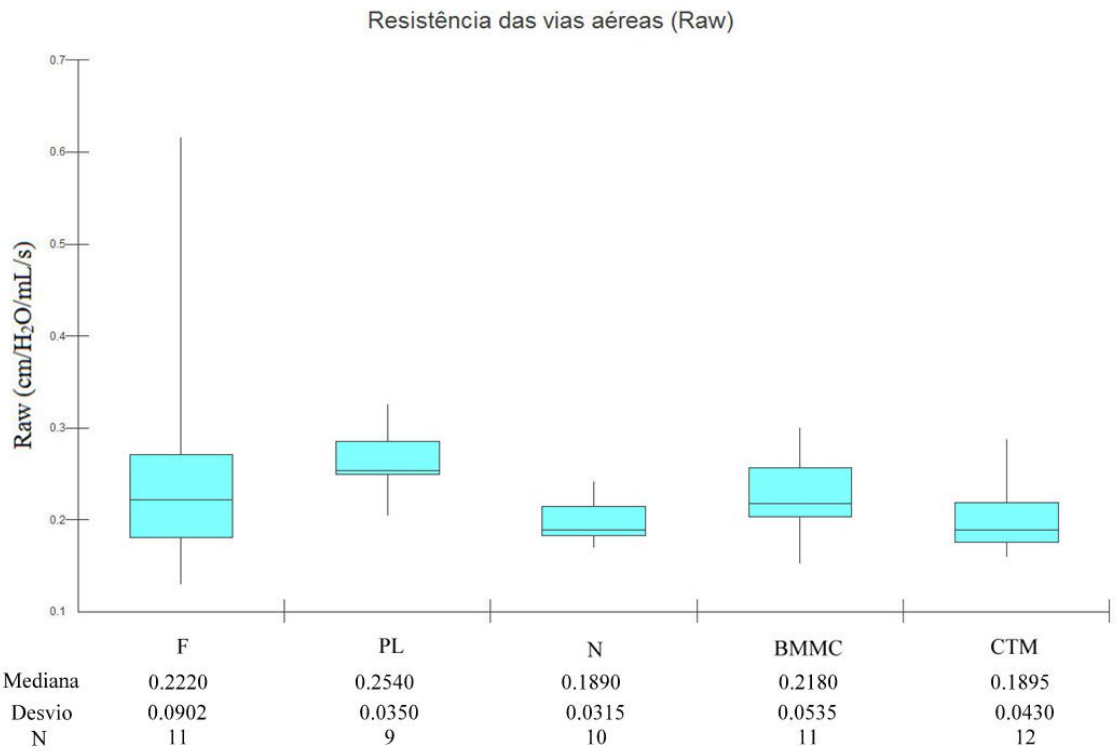
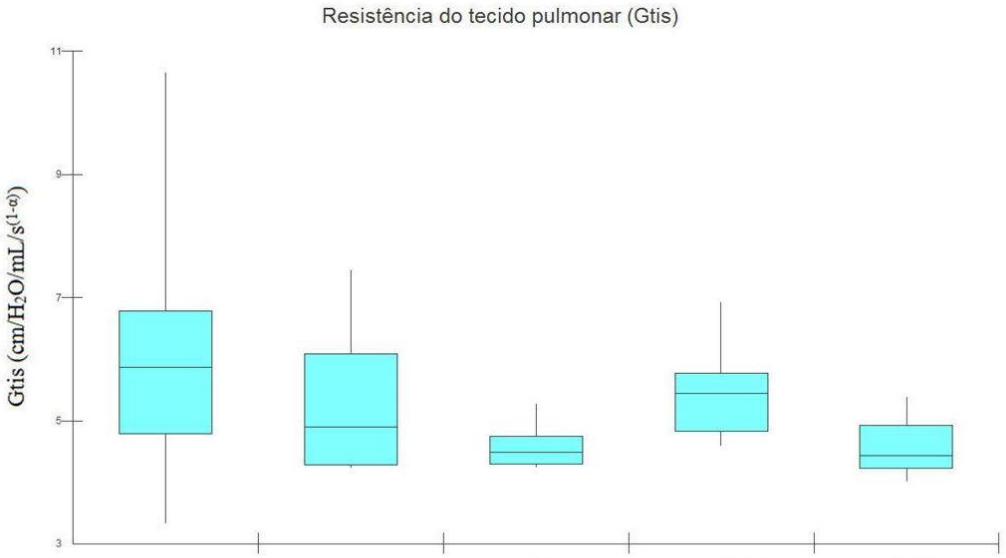
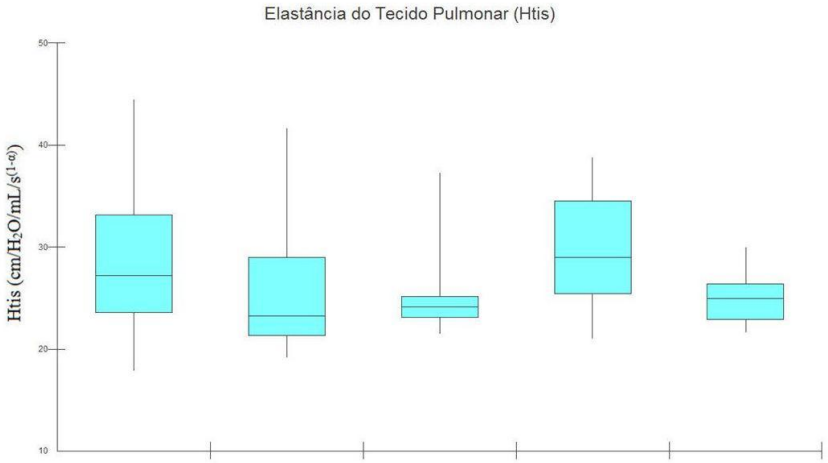


Figura 11 – Valores da resistência do tecido pulmonar (Gtis) obtidos nos diferentes grupos experimentais. H= 12.0409 p= 0.170.



	F	PL	N	BMMC	CTM
Mediana	5.8650	4.8990	4.4860	5.4480	4.4340
Desvio	1.9935	1.8023	0.4580	0.9440	0.6978
N	11	10	9	9	12

Figura 12 – Valores da elastância do tecido pulmonar (Htis) obtidos nos diferentes grupos experimentais. H= 5.5258 p= 0.2375.



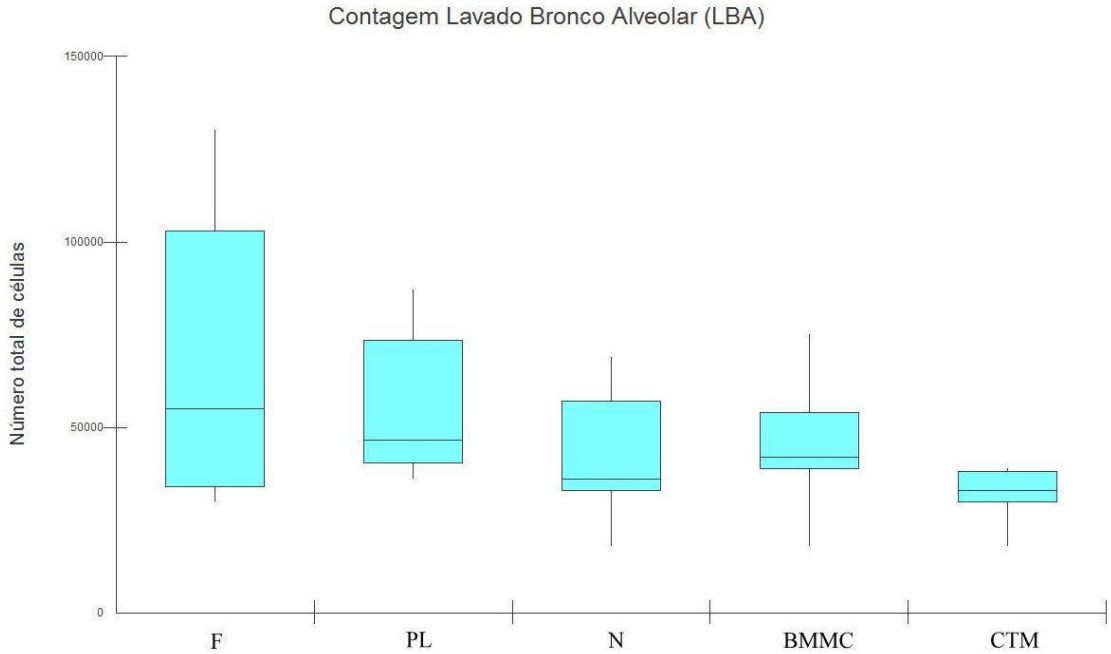
	F	PL	N	BMMC	CTM
Mediana	27.1985	23.2400	24.1485	28.9920	24.9515
Desvio	9.5965	7.6408	2.0010	9.0925	3.5135
N	10	12	10	10	12

A análise dos gráficos mostra uma tendência de aumento nos valores dos parâmetros avaliados nos animais que somente sofreram exposição à fumaça de cigarro (F) em comparação aos demais grupos. Apesar disso não houve diferença significativa entre os parâmetros respiratórios analisados.

4.4 Lavado bronco alveolar

Para verificar a quantidade de células inflamatórias presentes no tecido pulmonar dos animais, uma amostra de lavado bronco alveolar foi recolhida. O número total de células é mostrado na Figura 13 a seguir.

Figura 13 – Contagem do número total de células presentes no lavado bronco alveolar dos animais (LBA). H= 5.5788; p= 0.2329.



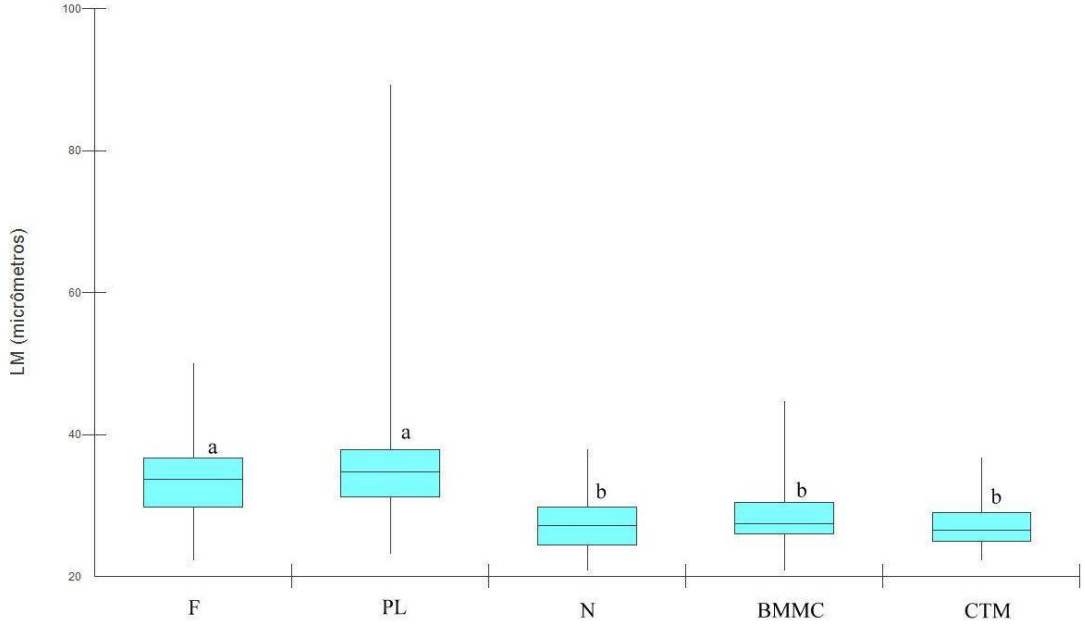
	F	PL	N	BMMC	CTM
Mediana	55000	46500	36000	42000	330000
Desvio	69000	33000	24000	15000	8250
N	6	6	5	5	6

Embora haja uma tendência maior no número de células dos animais expostos à fumaça de cigarro, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, em relação ao número de células presentes no lavado bronco alveolar (LBA).

4.5 Análise morfométrica

Para verificar a influência dos diferentes tratamentos aplicados nos grupos (indução e/ou tratamento do enfisema pulmonar) foi empregada a análise do intercepto linear médio (Lm) conforme proposto por Weibel em 1963. O valor de Lm reflete o diâmetro dos espaços aéreos pulmonares, portanto, valores maiores de Lm indicam o alargamento alveolar, caracterizando morfometricamente o quadro enfisematoso.

Figura 14 - Intercepto Linear Médio (LM). ANOVA Kruskal-Wallis post-hoc Dunn. H= 184.8250 p<0.0001. *Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa.



	F	PL	N	BMMC	CTM
Mediana	33.7838	34.7222	27.1739	27.4758	26.5957
Desvio	7.0028	6.6288	5.2521	4.4461	4.0698
N	100	110	100	90	110

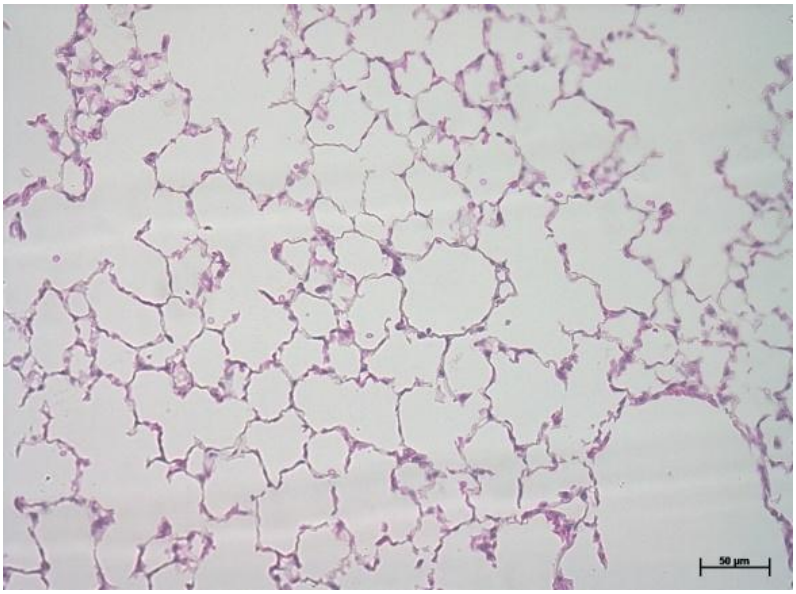
Como pode ser observado na Figura 14, o grupo dos animais expostos à fumaça de cigarro (F) apresentou aumento no valor de Lm (33.7838 ± 7.0028) em relação ao grupo dos animais que não sofreram a exposição (N) (27.1739 ± 4.4461). Desta forma, a indução do enfisema pulmonar foi confirmada morfometricamente pela diferença estatisticamente significativa encontrada entre os grupos N e F (p<0,05).

Os animais que sofreram exposição à fumaça de cigarro e não foram submetidos ao tratamento com células grupos F (33.7838 ± 7.0028) e PL (34.7222 ± 6.6288) não

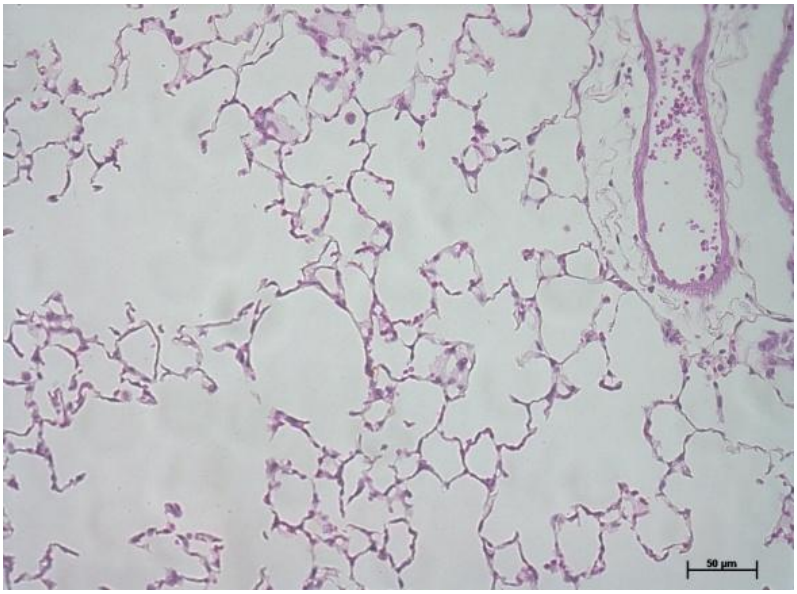
apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao diâmetro alveolar. Esse dado indica que o meio de cultura, administrado como placebo no grupo PL, não exerce influência no tratamento do enfisema pulmonar.

Os animais tratados com células, BMMC (27.4758 ± 4.4461) ou CTM (26.5957 ± 4.0698), apresentaram uma redução significativa no valor de Lm em relação aos animais dos grupos F (33.7838 ± 7.0028) e PL (34.7222 ± 6.6288). Em concordância a estes resultados, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de Lm obtidos dos grupos tratados com células, BMMC (27.4758 ± 4.4461) ou CTM (26.5957 ± 4.0698) em relação ao grupo controle N (27.1739 ± 5.2521), que não sofreu exposição à fumaça de cigarro. Desta forma, é possível inferir que o tratamento com as células, BMMC ou CTM, foi eficaz e promoveu a reestruturação do parênquima pulmonar, como pode ser observado nas figuras a seguir.

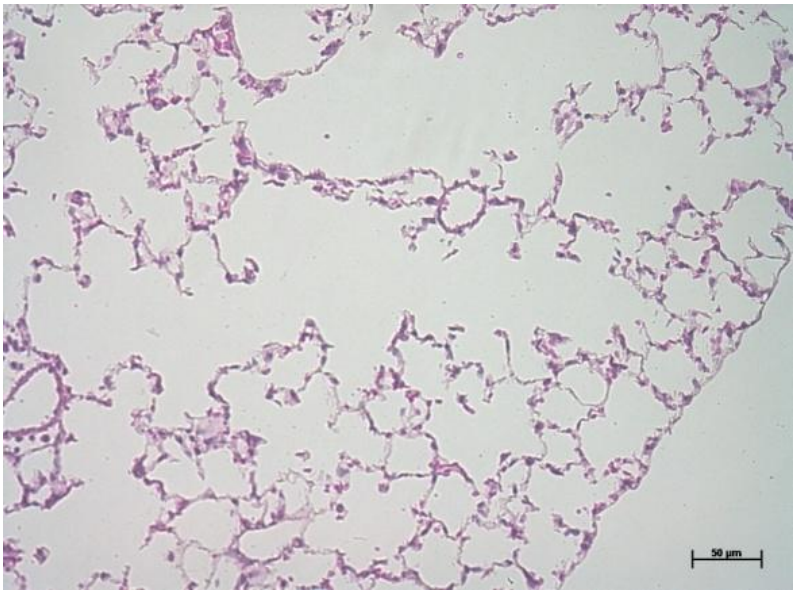
Figura 15 - Tecido pulmonar de camundongos fêmeas C57Bl6/J após respectivo tratamento. (F) Animais que sofreram exposição à fumaça de cigarro. (PL) Animais que sofreram exposição à fumaça de cigarro e tratamento com meio de cultura. (BMMC) Animais que sofreram exposição à fumaça de cigarro e tratamento com células mononucleares da medula óssea. (CTM) Animais que sofreram exposição à fumaça de cigarro e tratamento com células mesenquimais. (N) Animais que não sofreram nenhum tipo de tratamento. Coloração HE. Aumento 200x.



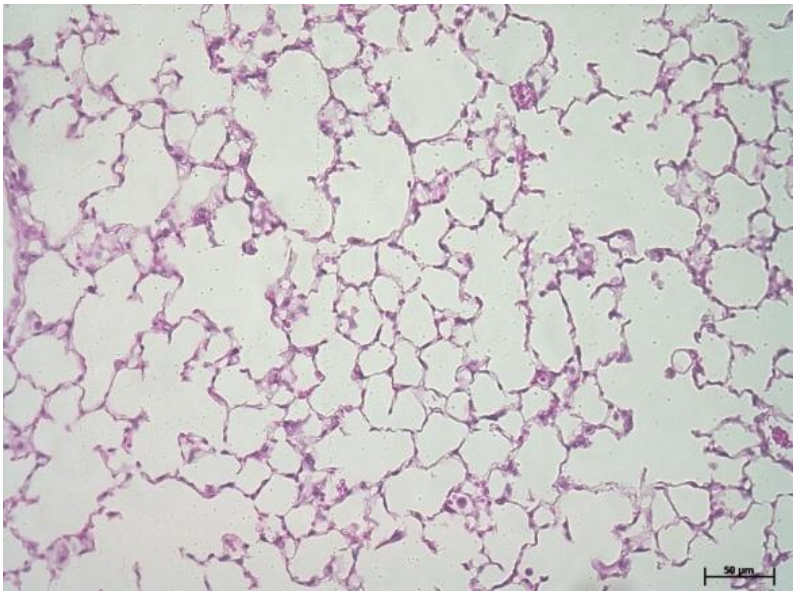
N



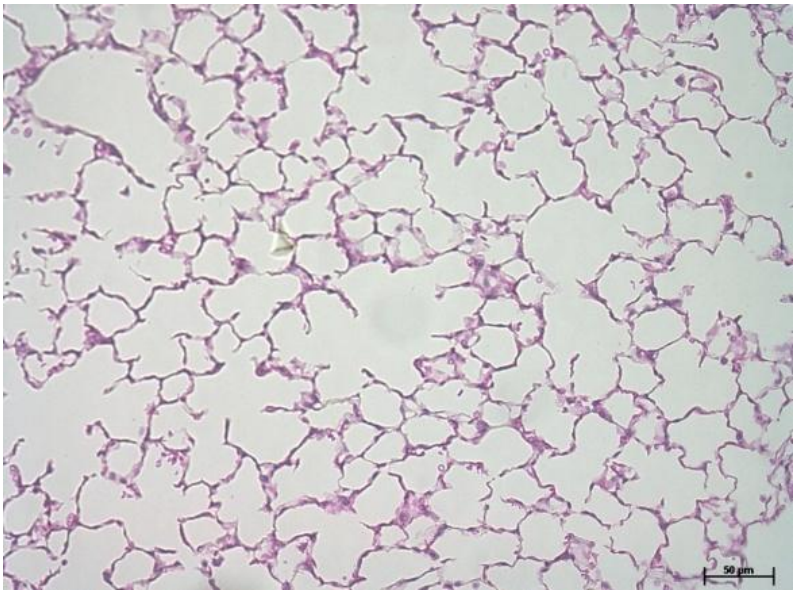
F



PL



BMMC



CTM

4.6 Migração das células para o pulmão

Para verificar se houve migração das células infundidas para o pulmão, no 30° dia após a infusão celular, dois animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical, para extração dos pulmões que foram congelados, contracorados com DAPI e analisados por meio de fluorescência direta.

Figura 16 – Análise do tecido pulmonar com micrsoscopia de fluorescência e coloração com DAPI (azul). Grupo N. Aumento de 200x.

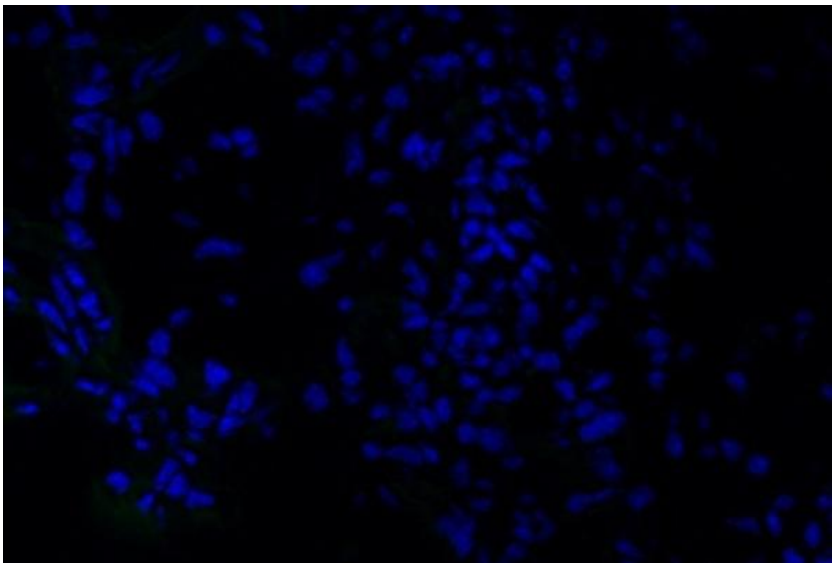
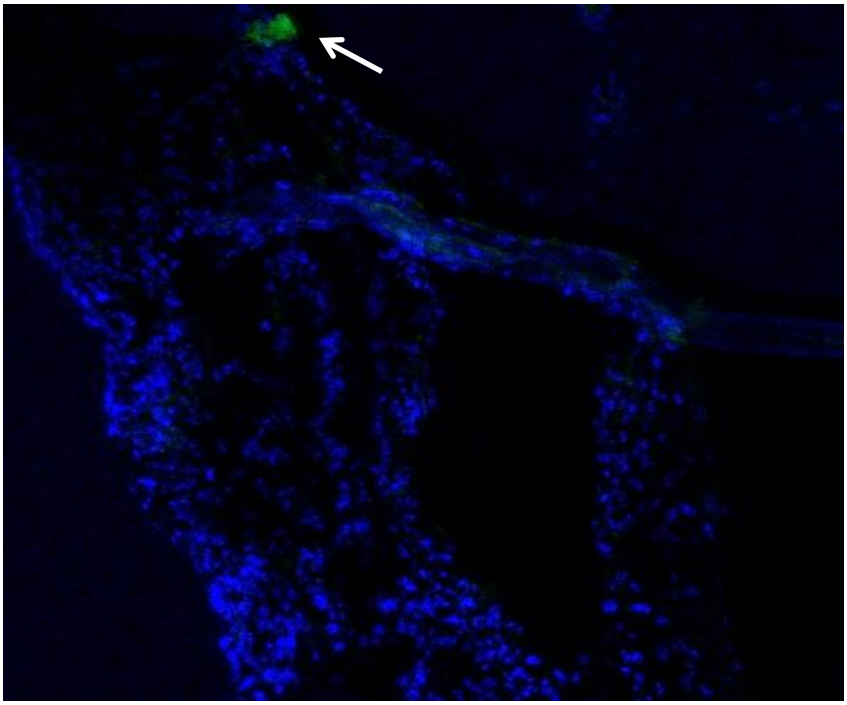
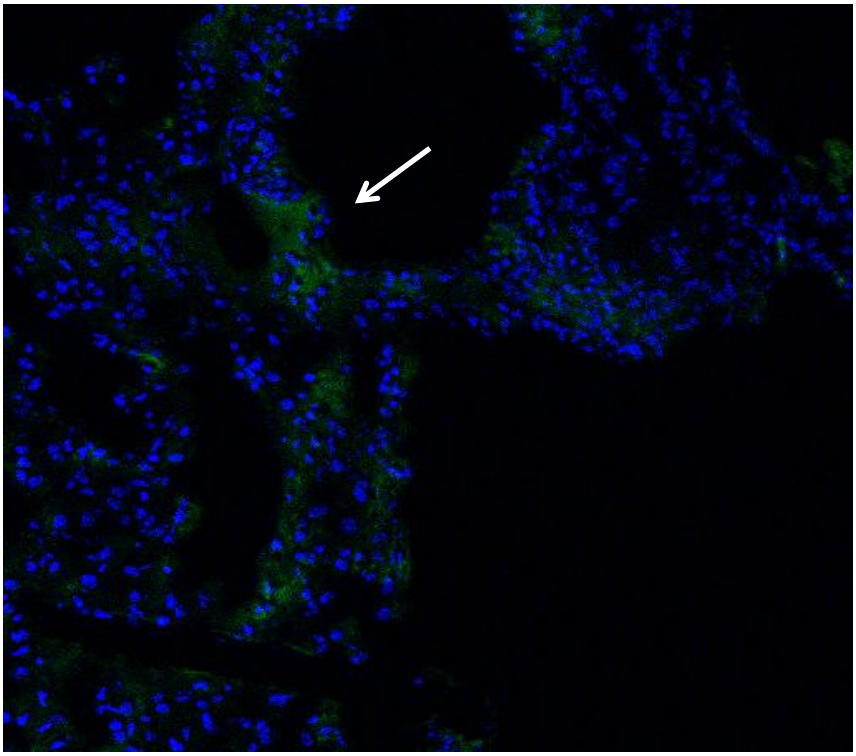


Figura 17 – Análise do tecido pulmonar com micrsoscopia de fluorescência e coloração com DAPI (azul). A e B - Presença de células GFP (verde). Grupo BMMC. Aumento de 200x.

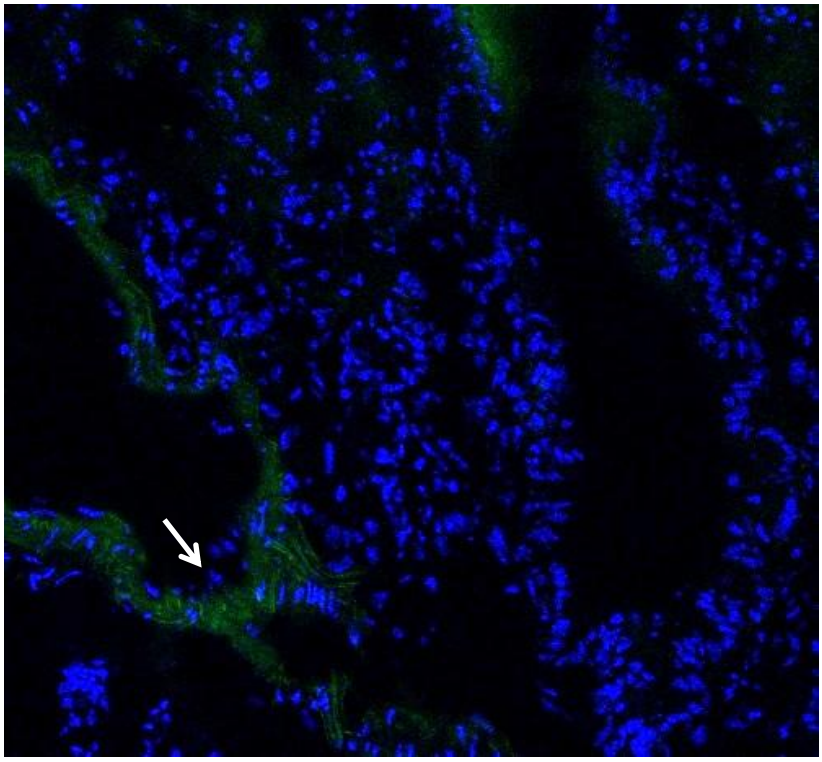


A

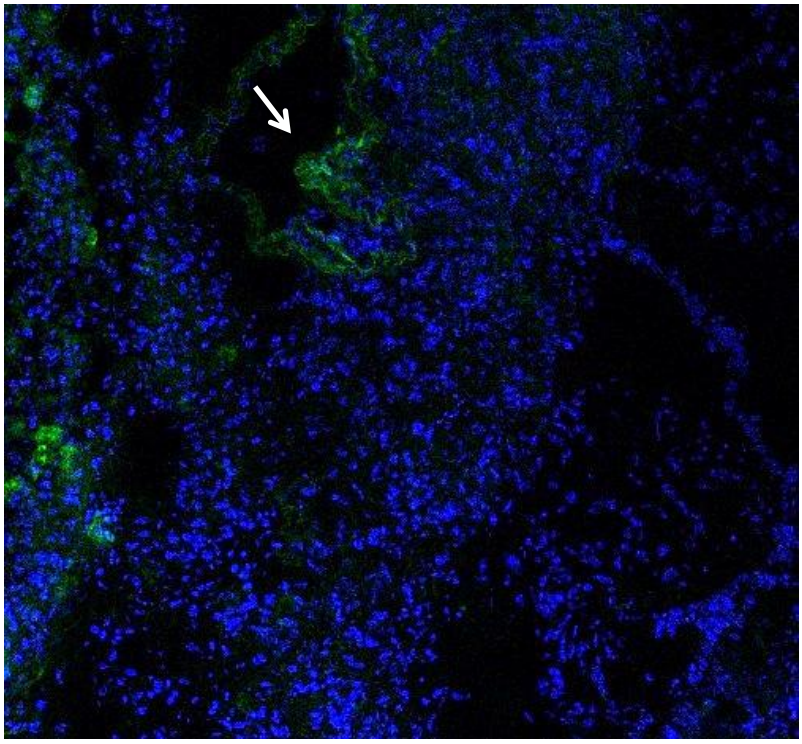


B

Figura 18 – Análise do tecido pulmonar com micrsoscopia de fluorescência e coloração com DAPI (azul). A e B - Presença de células GFP (verde). Grupo CTM. Aumento de 200x.



A



B

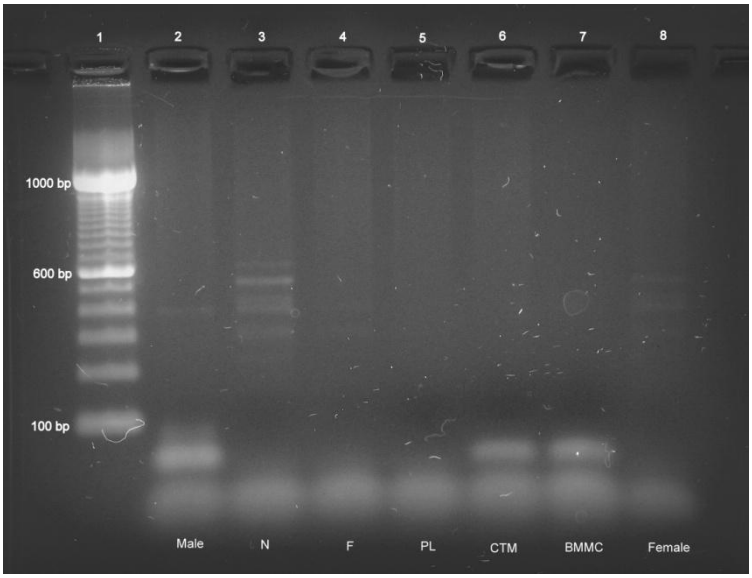
Como pode ser observado nas Figuras 16 a 18, houve marcação dos núcleos com DAPI (azul). O grupo N, que não recebeu infusão celular, não apresentou fluorescência, e representa o controle negativo (Figura 16). Os grupos BMMC (Figura 17) e CTM (Figura 18), que foram tratados com as células, apresentaram fluorescência verde, característica do GFP, no parênquima pulmonar marcado com DAPI (azul).

Esses dados demonstram que houve migração das células infundidas por via sistêmica para o pulmão.

4.7 Detecção do cromossomo Y no pulmão das fêmeas receptoras

Foi empregado o PCR do gene SRY como uma nova alternativa para verificação da migração celular para o pulmão, evidenciada pela marcação do cromossomo Y (proveniente das células dos animais machos doadores) encontrado nos pulmões das fêmeas receptoras. Como pode ser observado na Figura 19, os grupos que receberam tratamento com células (CTM e BMMC) apresentaram bandas equivalentes ao tamanho do gene SRY de um camundongo macho, que não recebeu tratamento com células tronco. Este resultado elucida a presença no pulmão das células infundidas, demonstrando a migração.

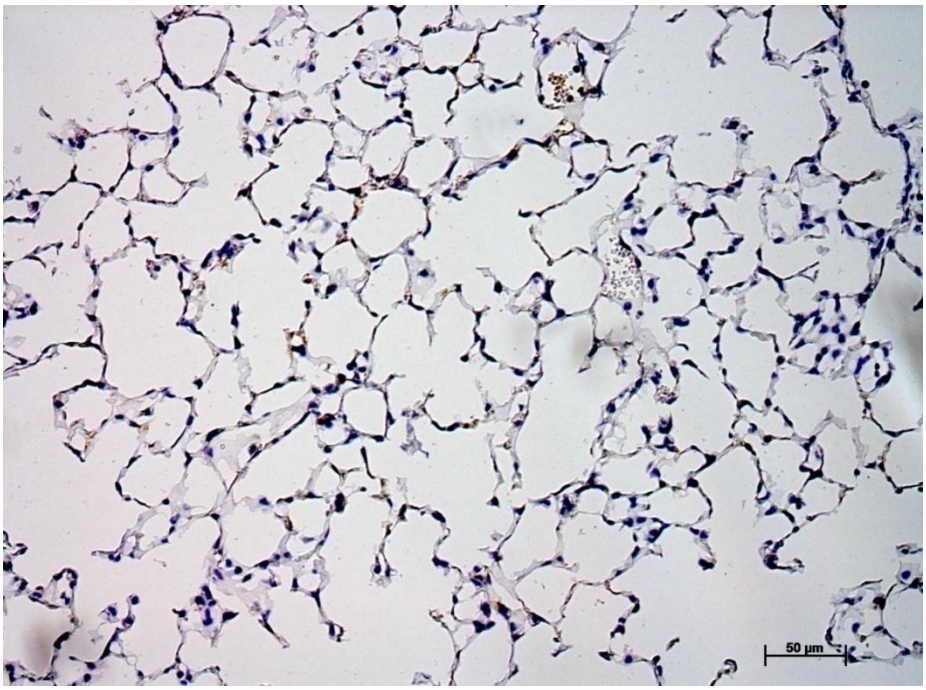
Figura 19 – PCR. Análise do cromossomo Y no tecido pulmonar. 1- Peso molecular (100bp DNA); 2- Male: controle positivo macho/marcação do cromossomo Y; 3,4 e 5 - Grupos N, F, PL: não há marcação do cromossomoY; 6 e 7- CTM e BMMC: grupos tratados com células – marcação do cromossomo Y; 8- Female – controle negativo fêmea: não há marcação do cromossomo Y.



4.8 A análise imunohistoquímica evidencia positividade do tratamento

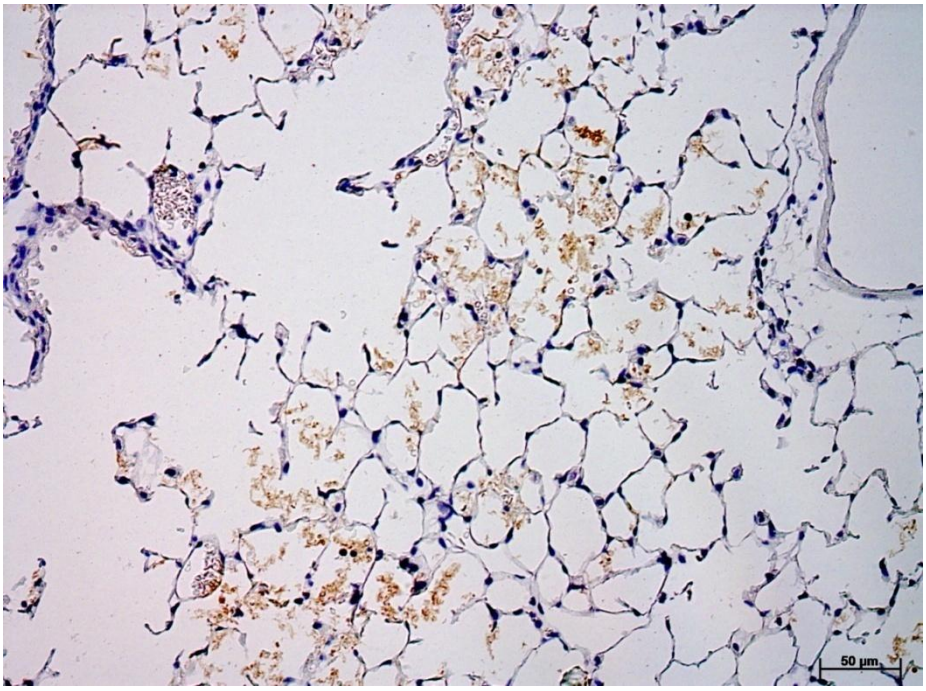
Para caracterizar o modelo animal utilizado quanto aos padrões de expressão da metaloproteinase 09, indicadora do processo inflamatório, os grupos foram investigados por meio de imunohistoquímica. Como pode ser observado nas Figuras 20 a 24, houve mudanças nos padrões de expressão desta proteína de matriz, indicando, nos grupos que não receberam tratamento celular, a presença de processo inflamatório inerente ao enfisema pulmonar.

Figura 20 – Imunohistoquímica para metaloproteinase de matriz 09 – MMP9. Presença de marcação de mmp9 (em marrom). Grupo N. Aumento de 200x.



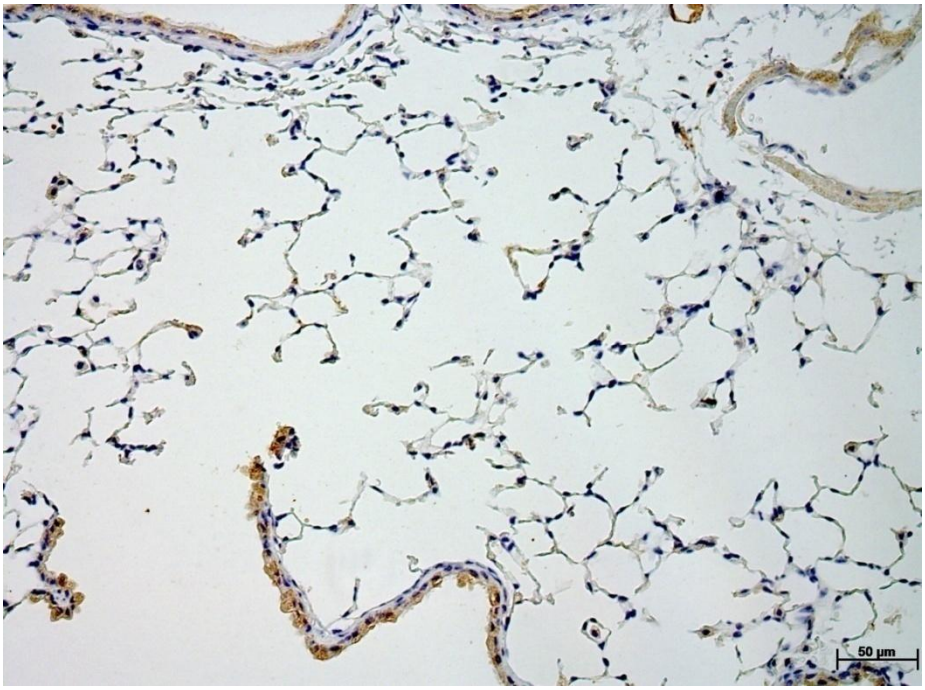
N

Figura 21 – Imunohistoquímica para metaloproteinase de matriz 09 – MMP9. Presença de marcação de mmp9 (em marrom). Grupo F. Aumento de 200x.



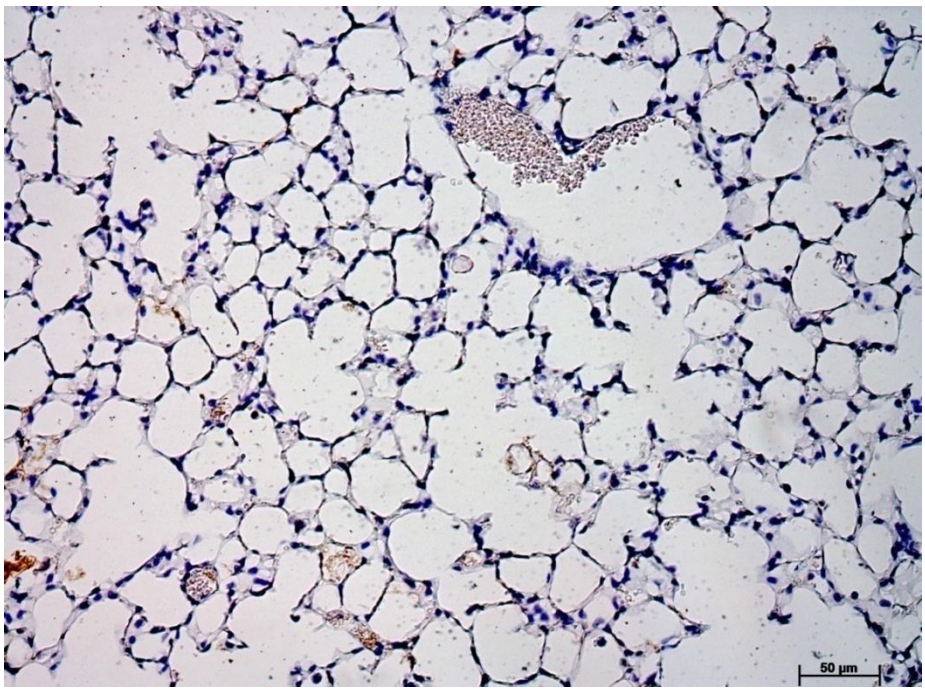
F

Figura 22 – Imunohistoquímica para metaloproteinase de matriz 09 – MMP9. Presença de marcação de mmp9 (em marrom). Grupo PL. Aumento de 200x.



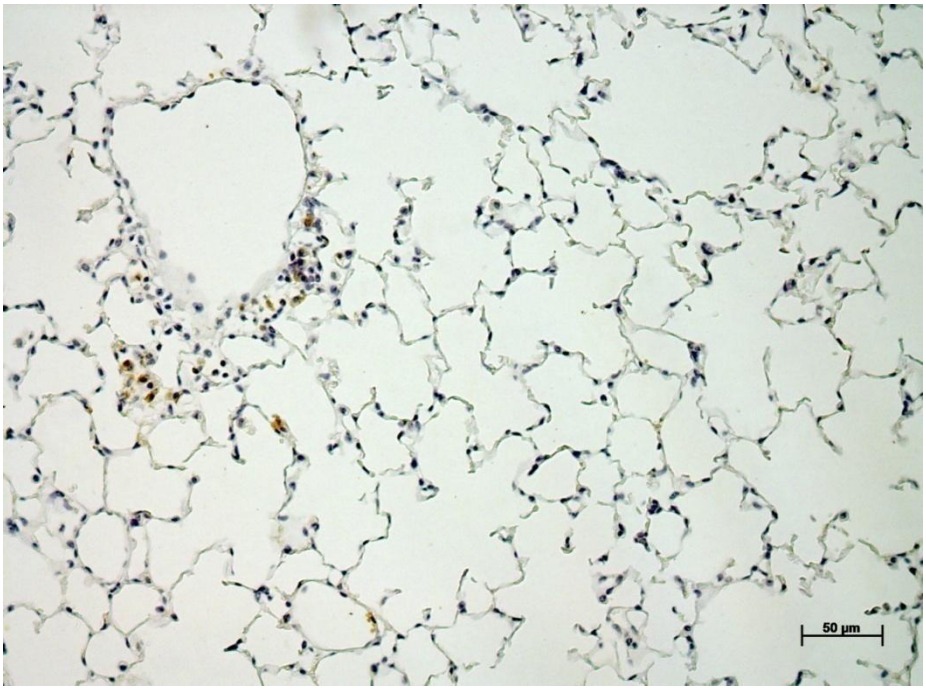
PL

Figura 23 – Imunohistoquímica para metaloproteinase de matriz 09 – MMP9. Presença de marcação de mmp9 (em marrom). Grupo BMMC. Aumento de 200x.



BMMC

Figura 24 – Imunohistoquímica para metaloproteinase de matriz 09 – MMP9. Presença de marcação de mmp9 (em marrom). Grupo CTM. Aumento de 200x.



CTM

É possível observar nas Figuras 21 e 22 que a marcação para metaloproteinase 9 pode ser detectada na matriz extracelular e no lúmen das vias aéreas (em marrom) dos animais pertencentes aos grupos controle F e PL, que não receberam tratamento com células. Em contra partida, é possível constatar a mínima presença da metaloproteinase 9 (em marrom) na matriz extracelular e no lúmen das vias aéreas dos animais pertencentes ao grupo N, assim como nos grupos CTM e BMMC que receberam tratamento celular (Figuras 20, 23 e 24). Desta forma, fica evidenciado que os tratamentos com as células mononucleares da medula óssea ou mesenquimais diminuíram o padrão inflamatório, característico do enfisema pulmonar, nos pulmões dos animais tratados.

5 DISCUSSÃO

Entre as diferentes abordagens para indução do enfisema pulmonar em modelos experimentais, o método de indução por exposição à fumaça de cigarro, vem ganhando maior destaque na literatura, considerando que este modelo aproxima-se e busca mimetizar, de forma mais fidedigna as características fisiopatológicas da doença humana (Cendon et al., 1997; Huh et al., 2011; Jardim et al., 2010; March et al., 2000; Nikula et al., 2000; Toledo et al., 2011; Xu et al., 2004; Zheng et al., 2009).

Embora ainda haja muitos questionamentos em relação a alguns parâmetros utilizados em modelos experimentais, como número de cigarros tempo e intensidade de exposição à fumaça, há, praticamente, um consenso na literatura sobre o aumento de infiltrado inflamatório nos pulmões dos animais expostos, bem como a degeneração do parênquima (enfisema) pulmonar (Bracke et al., 2006; Huh et al., 2011; Jardim et al., 2010; Wright et al., 2008; Xu et al., 2004; Zheng et al., 2009).

Um fator relevante e digno de nota, para efeito de uma análise comparativa entre os resultados de diferentes grupos de pesquisa, refere-se ao tipo de exposição adotado. Dentre os métodos adotados, destacam-se a exposição à fumaça proveniente da queima do cigarro, que promove a simulação de um fumante passivo (Cendon et al., 1997; Zheng et al., 2009), ou, como adotado neste trabalho, a fumaça pode ser proveniente da sucção do cigarro, promovendo a simulação (“tragada”) de um fumante ativo.

O aparato utilizado neste trabalho, desenvolvido pela equipe do Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel – Unesp Assis, conforme apresentado nas Figuras 1 e 2, mostrou-se eficiente e vantajoso em relação aos demais equipamentos utilizados em modelos animais de indução do enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro, pois além do baixo custo (até 20 vezes mais barato que os modelos existentes no mercado) apresenta facilidade operacional (Kozma, 2012). Em nosso aparato, os animais são distribuídos aleatoriamente, em quatro gaiolas com capacidade para até 15 animais cada, e recebem um fluxo de fumaça proveniente da aspiração (ou sucção) do cigarro. Desta forma, os animais podem transitar livremente, sem contenção, pelo espaço em que estão alocados, evitando-se ou minimizando-se, assim, um fator adicional de “stress” dos animais.

A fumaça de cigarro promove a ativação de mediadores inflamatórios, como macrófagos e neutrófilos, desencadeando a produção de enzimas que favorecem o desequilíbrio entre proteases e antiproteases, levando ao alargamento dos espaços aéreos e consequente destruição do parênquima pulmonar (Anciães et al., 2011; Toledo et al., 2011;

Wright et al., 2008). Proposta no clássico trabalho publicado por Weibel em 1963, a medida do intercepto linear médio (Lm) representa, até hoje, a abordagem metodológica mais segura para avaliar de forma quantitativa a destruição do parênquima pulmonar, diretamente vinculado ao desenvolvimento do enfisema pulmonar.

Os resultados obtidos na análise do Lm mostraram um aumento significativo no diâmetro alveolar dos animais expostos à fumaça de cigarro, que não receberam nenhum tipo de tratamento após a exposição (Grupo F), em relação aos animais que não sofreram exposição (Grupo N), como pode ser observado na Figura 14. Estes resultados mostram que o modelo proposto, de exposição à fumaça de cigarro no aparato desenvolvido por nossa equipe, foi eficiente na indução do enfisema pulmonar. Na literatura, são encontrados modelos animais de enfisema com tempo de exposição à fumaça de cigarro que variam entre 3 a 9 meses (Gosker et al., 2009; Guerassimov et al., 2003; Maeno et al., 2007; Marumo et al., 2009; Rinaldi et al., 2011; Schweitzer et al., 2011). Com a finalidade de manter a frequência no hábito tabagista semelhante aos seres humanos, os animais foram expostos três vezes ao dia à fumaça de cigarro, em três períodos (manhã, tarde e noite) durante 90 dias ininterruptos.

Em 2008, Valença e colaboradores observaram um aumento no diâmetro alveolar de animais expostos à fumaça de cigarro a partir do décimo dia de exposição (Valença et al., 2008). Corroborando nossos resultados, Rinaldi et al., (2011) confirmaram a indução do enfisema pulmonar em animais da linhagem C57Bl/6J expostos à fumaça de cigarro durante 3 meses.

Embora os dados morfológicos indiquem a destruição do parênquima pulmonar e uma tendência ao aumento da resistência das vias aéreas e tecido pulmonar, os resultados obtidos do teste funcional não apresentaram diferença estatística nos padrões de elastância e resistência do tecido e vias aéreas (Figuras 10 a 12). Tal fato pode ser justificado pela dificuldade de análises funcionais mais detalhadas em camundongos, em função das dificuldades técnicas de mensuração dos parâmetros respiratórios dado o reduzido tamanho dos animais. Outra questão a ser discutida é o grau da doença. Em 2005, Foronjy et al. expuseram duas linhagens de camundongos C57 à fumaça de cigarro por longo tempo e obteve um aumento significativo nos valores de Lm desses animais em relação aos seus respectivos grupos controle. Apesar disso, também não houve alteração nos parâmetros respiratórios dos animais expostos (Foronjy et al., 2005). Posteriormente, Wrigth et al. mostraram que animais com enfisema em grau moderado apresentaram valores funcionais normais, enquanto somente animais com grau avançado de enfisema pulmonar tinham parâmetros alterados (Wrigth et al., 2008).

A terapia celular com células tronco adultas (CTA) apresenta-se, atualmente, como uma alternativa bastante interessante e promissora no tratamento do enfisema pulmonar (Caramori et al., 2012; D'Agostino, 2010, Hind, Maden, 2011, Longhini-dos-Santos et al., 2013; Moodley et al., 2011; Ribeiro-Paes et al., 2009, 2011, 2012; Xian, McKeon, 2012). Há vários estudos na literatura que mostram a migração celular para o pulmão, após a infusão de células em vasos periféricos (Adachi et al., 2006; Faria et al., 2012; Katsha et al., 2011; Kotton et al.,2001; Krause et al., 2001; Lama et al.,2007; Longhini-dos-Santos et al., 2013; Neuringer, Radell, 2004; Pereira et al.,1995; Ribeiro-Paes et al., 2009, 2011, 2012; Schrepfer et al., 2007; Sueblinvong, Weiss, 2010; Suratt et al.,2003; Yamada et al.,2004). Células infundidas na circulação periférica são levadas diretamente para o pulmão, o que torna esta estratégia de infusão passível de ser aplicada em modelos experimentais e terapia celular experimental em pacientes humanos.

Dentre os estudos envolvendo transplantes celulares no tratamento de doenças pulmonares, um fenômeno marcante é a migração celular mediada por uma injúria no órgão. O recrutamento das células tronco está possivelmente associado à presença de quimiocinas liberadas após a lesão, bem como, a ativação de mediadores celulares ainda pouco conhecidos, que compõem um mecanismo de estímulo ao reparo tecidual do órgão (Longhini-dos-Santos et al., 2013). Com o propósito de rastrear as células infundidas, foram utilizadas células da medula óssea de camundongos machos, da linhagem EGFP com background C57Bl6/J. Desta forma, a presença das células no parênquima pulmonar dos animais infundidos foi verificada pela fluorescência direta (Figura 16 a 18), mostrando que houve migração celular para o pulmão. Em 2013, nosso grupo mostrou que células da medula óssea de doadores machos foram encontradas em pulmões de fêmeas receptoras, por meio de PCR, a partir de 24 horas após a infusão celular (Longhini-dos-Santos et al., 2013). Neste trabalho, o teste de PCR foi utilizado para verificação da migração celular para o pulmão, evidenciada pela marcação do cromossomo Y (Locus SRY) proveniente das células dos animais machos doadores, encontrado nos pulmões das fêmeas receptoras. Conforme apresentado na figura 19, os grupos que receberam tratamento com células (CTM e BMMC) apresentaram bandas equivalentes ao gene SRY de um camundongo macho que não recebeu tratamento, evidenciando a migração das células infundidas para o parênquima pulmonar.

Embora as análises do lavado bronco alveolar (LBA), referentes ao quadro inflamatório pulmonar, tenham mostrado maior número de células inflamatórias nos animais expostos à fumaça de cigarro (Grupos F e PL) em relação aos animais expostos à fumaça e que receberam tratamento com células (Grupos BMMC e CTM) e os animais que não foram

expostos a tratamento (Grupo N), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 13). Vale lembrar que o sacrifício dos animais foi realizado 37 dias após o fim da exposição à fumaça de cigarro. Em 2010, Braber et al. mostraram que camundongos da linhagem A/J apresentaram redução nos padrões inflamatórios 8 semanas após os fim da exposição. Desta forma, pode-se inferir que o período decorrente entre o término da exposição e as análises laboratoriais, executadas após 37 dias, justificaria os resultados obtidos.

Em contrapartida, a análise dos padrões de expressão das metaloproteinases (MMP-9), característica do processo inflamatório, mostrou diferenças nos padrões de expressão destas proteínas de matriz, indicando a presença de processo inflamatório inerente ao enfisema pulmonar nos grupos que foram expostos à fumaça de cigarro e não receberam tratamento com células (Grupos F e PL). A presença de marcação para MMP-9 (em marrom) pode ser observada na matriz extracelular e no lúmen das vias aéreas dos grupos F e PL nas figuras 21 e 22. Já os grupos N, BMMC e CTM apresentam poucos focos de marcações, em pontos específicos, como pode ser observado nas figuras 20, 23 e 24. Desta forma, pode-se sugerir que, de forma qualitativa, que o tratamento com células mononucleares da medula óssea (BMMC) ou mesenquimais (CTM) pode diminuir os padrões inflamatórios característicos da DPOC.

Vale ressaltar que, após 21 dias da infusão das células, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de Lm dos grupos que receberam tratamento com as células (BMMC e CTM) em relação ao grupo controle (N) que não recebeu nenhum tipo de tratamento, como pode ser observado na Figura 14. De acordo com os dados obtidos, é possível aventar a hipótese de que a atuação das células ocorre por, pelo menos, 21 dias após a infusão.

Em síntese, pode-se dizer que os resultados obtidos neste trabalho, mostram, do ponto de vista qualitativo e quantitativo, a recuperação histomorfológica do parênquima pulmonar dos animais expostos à fumaça de cigarro e tratados com pool de células mononucleares (BMMC) ou células mesenquimais (CTM) provenientes da medula óssea (Figuras 14 e 15).

6 CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados nos permitiu chegar às seguintes conclusões:

- O modelo experimental de indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro mostrou-se exequível e reprodutível, permitindo consolidar esta metodologia em camundongos;

- Houve migração celular da via sistêmica para o pulmão;

- A utilização de células mononucleares da medula óssea é morfologicamente eficaz no tratamento de enfisema pulmonar em camundongos e se apresenta como uma terapia bastante promissora para o tratamento da DPOC;

- A utilização de células tronco mesenquimais provenientes da medula óssea é morfologicamente eficaz no tratamento de enfisema pulmonar em camundongos e se apresenta como uma terapia bastante promissora para o tratamento de DPOC.

REFERÊNCIAS*

Adachi Y, Oyazu H, Taketani S, Minamino K, Yamaguchi K, Shultz LD, Iwasaki M, Tomita M, Suzuki Y, Nakano K, Koike Y, Yasumizu R, Sata M, Hirama N, Kubota I. Treatment and transfer of emphysema by a new bone marrow transplantation method from normal mice to tsk mice and vice versa. Stem Cells. 2006;24:2071-77.

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 2005;105(4):1815-22.

Anciães AM, Olivo CR, Prado CM, Kagohara KH, Pinto TS, Moriya HT, Mauad T, Martins MA, Lopes FDTQS. Respiratory mechanics do not always mirror pulmonary histological changes in emphysema. Clinics. 2011;66(10):1797-803.

Antunes MA, Rocco PRM. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. An Acad Bras Cienc. 2011;83(4)1385-95.

Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine. 2008;2(4):169-83.

Barbosa de Oliveira VA, Ribeiro-Paes JT, Kozma RH, Longhini dos Santos N, Faria CA, Ribeiro-Paes MJO. Estudo comparativo de dois procedimentos de fixação histológica para análise de enfisema pulmonar induzido experimentalmente. Ciência Pesquisa e Consciência. 2011;3:7-11.

Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and celular mechanisms. Eur Resp J. 2003;22:672-88.

Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, Wang CY. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. Nature Medicine. 2013;19:35–42.

Braber S, Henricks PAJ, Nijkamp FP, Kraneveld AD, Folkerts G. Inflammatory changes in the airways of mice caused by cigarette smoke exposure are only partially reversed after smoking cessation. Resp Res. 2010;11:99.

Bracke KR, D'hulst AI, Maes T, Moerloose KB, Demedts IK, Lebecque S, et al . Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. J Immunol. 2006;177:4350–59.

Brusselle GG, Bracke KR, Maes T, D'hulst AI, Moerloose KB, Joos GF, Pauwels RA. Murine models of COPD. Pulm Pharmacol Ther. 2006;19:155–65.

---

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

Bydlowski, SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. Rev Bras Hematol Hemoter. 2009;31(1):25-35.

Campos HS. O preço da DPOC. Pulmão. 2003;12:04-5-7.

Caramori G, Casolari P, Garofano E, Mazzoni F, Marchi I, Contoli M, Papi A. Role of stem cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease and of pulmonary emphysema. Recenti Prog Med. 2012;103(1):31-40.

Carrion F, Nova E, Ruiz C, Dias F, Inostroza C, Rojo D, Mönckeberg G, Figueroa FE. Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients. Lupus. 2010;19:317–22.

Cazzola M, Donner CF, Hanania NA. One hundred years of chronic pulmonary disease (COPD). Respiratory Medicine. 2007;101(6):1049-65.

Cendon S, Battlehner C, Lorenzi-Filho G, Dohlnikoff M, Pereira P, Conceição G, Beppu O, Saldiva P. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1997;30,1241-47.

Chandar N, Viselli S. Biologia celular e molecular. Porto Alegre: Artmed; 2011.

Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. Eur Respir J. 2008;31:1334-56.

Cosio BG, Agustí A. Update in chronic obstrutive pulmonar disease. Am Respir Crit Care Med. 2010;181:655-60.

D'Agostino B, Sullo N, Siniscalco D, De Angelis A, Rossi F. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. Expert Opin Biol Ther. 2010; 10(5):681-87.

Dawkins PA, Stockley RA. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. Thorax. 2001;56:972-77.

Demets DL, Lan KKG. Interim analiysis: The alpha spending function approach. Statist Med. 1994;13:1341-52.

Do NL, Chin BY. Chronic obstructive pulmonary disease: emphysema revised. In: Ong CK, editor. Chronic obstructive pulmonary disease: current concepts and practice. Croácia: InTech; 2012. Cap 3, p. 33-46.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for fining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-17.

Eslaminejad B, Vahabi S, Shariati M, Nazarian H. In vitro growth and characterization of stem cells from human dental pulp of deciduous versus permanent teeth. Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences. 2010;7(4):185-95.

Faria CA, Kozma, RLH, Stessuk T, Ribeiro-Paes JT. Experimental basis and new insights for cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease. Stem Cell Reviews, v. 8, p. 1236-44, 2012.

Foronjy RF, Mercer BA, Maxfield MW, Powell CA, D'Armiento J. Structural emphysema does not correlate with lung compliance: lessons from the mouse smoking model. Exp Lung Res. 2005;31:547–62.

Fox JC, Fitzgerald MF. Models of chronic obstructive pulmonary disease: a review of current status. Elsevier. 2004;1,319-28.

Fujita M, Nakanishi Y. The pathogenesis of COPD: lessons learned from in vivo animal models. Medical Science Monitor. 2007;3:19-24.

Fusco L, Pêgo-Fernandes P, Xavier A, Pazetti R, Rivero D, Capelozzi V, Jatene F. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. Jornal de Pneumologia. 2002;28,1-7.

Fusco LB, Fonseca MH, Pêgo-Fernandes PM, Pazetti R, Capelozzi VL, Jatene FB, Oliveira SA.Cirurgia de redução do volume pulmonar em modelo experimental de enfisema em ratos. J Bras Pneumol. 2005;31,34-40.

Giangreco A, Arwert EN, Rosewell IR, Snyder J, Watt F M, Stripp BR. Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restaure airways after injury. Pnas. 2009;106(23): 9286-91.

Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease; 2009.

Global Initiative for Chronic Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease; 2010.

Global Initiative for Chronic Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (Revised 2011).

Gosker HR, Langen RC, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG, Steele C, Ward KA, Wouters EF, Schols AM. Extrapulmonary manifestations of chronic obstructive pulmonary disease in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure. Am J Respir Cell Mol Biol. 2009;40:710-16.

Gross P, Pfitzer E, Tolker M. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. Arch Environ Health. 1965;11,50-58.

Guerassimov A, Hoshino M, Takubo Y, Turcotte A, Yamamoto M, Ghezzo H, et al. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. Am J Respir Crit Care Med. 2004;170,974–80.

Hackett TL, Knight DA, Sin DD. Potential role of stem cells in management of COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2010;7;5:81-8.

Hackett TL, Scarci M, Zheng L, Tan W, Treasure T, Warner JA. Oxidative modification of albumin in the parenchymal lung tissue of current smokers with chronic obstructive pulmonary disease. Respir Res. 2010;22;11:180.

Hele D. First Siena International Conference on animal models of chronic obstructive pulmonary disease, Certosa di Pontignano.Universidade of Siena, Italy, September 30-October 2, 2001. Respiratory Research, Vol.3.

Hind M, Maden M. Is a regenerative approach viable for the treatment of COPD? Br J Pharmacol. 2011;163(1):106-15.

Hu KX, Sun QY, Guo M, Al HS. The radiation protection and therapy effects of mesenchymal stem cells in mice with acute radiation injury. The British Journal of Radiology, 2010;83:52–8.

Huh JW, Kim SY, Lee JH, Lee JS, Ta QV, Kim MJ, et al. Bone marrow cells repair cigarette smoke-induced emphysema in rats. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011;301(3):255-66.

Huber GL, Davies P, Zwilling GR, Pochay VE, Hinds WC, Nicholas HA, Mahajan VK, Hayashi M, First MW. A morphologic and physiologic bioassay for quantifying alterations in the lung following experimental chronic inhalantion of tobacco smoke. Bull Eur Physiopathol Respir. 1981;17:269-327.

Hyatt RE, Farkas G, Schroeder M. Pulmonary mechanics of papain emphysema in dogs. Chest. 2000;117,246-47.

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

Jardim JR, Oliveira JA, Nascimento O. II Consenso brasileiro sobre doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). J Bras Pneumol. 2007;30 Suppl 5:S1–S42.

Jardim JR, Bizeto L, FleigMayer A, Camelier A, Rosa FW, Oliveira D, et al. Modelo de cámara inhaladora para los estúdios controlados sobre la toxicidad del humo del tabaco em los roedores. Arch Bronconeumol. 2010;46(9):455–8.

Katsha AM, Ohkouchi S, Xin H, Kanehira M, Sun R, Nukiwa T, Saijo Y. Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model. Mol Ther. 2011;19(1):196-203.

Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. Biol Pharm Bull. 2008;31:1434–38.

Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. Development. 2001;128(24):5181-88.

Kozma R. Modelo experimental de indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis JS. Multi-organ, multi-linage enfragment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell. 2001;105:369-77.

Lakshmipathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. Blood Reviews. 2005;19:29-38.

Lama VN, Smith L, Badri L, Flint A, Andrei AC, Murray S, Wang Z, Liao H, Towes GB, Krebsbach PH, Peters-Golden M, Pinsky DJ, Martinez FJ, Thannickal VJ. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. The Journal of Clinical Ivestigation. 2007;117:989-96.

Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. Lancet. 2008;371(9624):1579-86.

Lee J, Sandford A, Man P. Is the aging process accelerated in chronic obstructive pulmonary disease?. Current Opinion in Pulmonary Medicine. 2011;17:90-7.

Leeb C, Jurga M, McGuckin C, Forraz N, Thallinger C, Moriggl R, Kenner L. New perspectives in stem cell research: beyond embryonic stem cells. Cell Prolif. 2011;44 Suppl 1:9-14.

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

Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hanssell AL, Held LS. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. Eur Resp J. 2006;27,397-412.

Lorenz E, Uphoff K, Reid TR, et al. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. J Natl Cancer Inst. 1951;12:197-201.

Lüthje L, Raupach T, Michels H, Unsold B, Hasenfuss G, Kogler H, Andreas S. Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. Respir Res. 2009;10:7.

MacPherson H, Keir P, Webb S, Samuel K, Boyle S, Bickmore W, Forrester L, Dorin J. Bone marrow derived SP cells can contribute to respiratory tract of mice in vivo. Journal of Cell Science. 2005;118:2441-50.

MacPherson H, Keir PA, Edwards CJ, Webb S, Dorin JR. Following damage, the majority of bone marrow-derived airway cells express epithelial marker. Respiratory Research. 2006;7:145.

Maeno T, Houghton AM, Quintero PA, Grumelli S, Owen CA, Shapiro SD. $CD8^+$ T cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. J Immunol. 2007;178:8090-96.

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

Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstrutive pulmonary disease: Experimental animal models of pulmonary emphysema. Thorax. 2002;57,908-14.

March T, Green F, Hahn F, Nikula K. Animal models of emphysema and their relevance to studies of particle-induced disease. Inhalation Toxicology. 2000;12:155–87.

Martorana PA, Even PV, Gardi C, Lungarella G. A 16-month study of development of genetic emphysema in tight-skin mice. Am Rev Respir Dis. 1989;139:226-32.

Marumo S, HosinoY, Tanabe N, et al. Pathophysiology of cigarette smoke induced emphysema after smoking cessation in a murine model. Am J Respir Crit Care Med. 2009; 179:A2223.

Mattos WLLD, Signori LGH, Borges FK, Bergamin JA, Machado V. Accuracy of clinical examination findings in the diagnosis of COPD. J Bras Pneumol. 2009;35(5):404-8.

Moodley Y, Manuelpillai U, Weiss DJ. Cellular therapies for lung disease: a distant horizon. Respirology. 2011;16:223–37.

Murray CJL, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. Lancet. 1997;349:1269-76.

National Institute Of Health (NHI). Stem cells: scientific progress and future research directions. Jun 2001.

Neuringer IP, Randell SH. Stem cells and repair of lung injuries. Respiratory Research. 2004; 5:6.

Nikula KL, March TH, Seagrave J, Finch G, Barr E, Menache M, Hahn F, Hobbs C. A mouse model of cigarette smoke-induced emphysema. Chest. 2000;117,246S-247S.

Oliveira JCA, Jardim JRB, Rufino. I Consenso brasileiro de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). J Pneumol. 2000;26,S1-S44.

Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. PNAS. 2003;100:8407-11.

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

Reinders MEJ, Fibbe WE, Rabelink TJ. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation. Nephrol Dial Transplant, 2010;25:17-24.

Ribeiro-Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Alves-de-Moraes LB, Stessuk T, Faria CA. Terapia celular em doenças pulmonares: existem perspectivas? Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2009;31:140-8.

Ribeiro-Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Marcelino MY, Stessuk T, et al. Unicentric study of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease/pulmonary emphysema. International Journal of COPD. 2011;6:63–71.

Ribeiro-Paes JT, Stessuk T, Kozma RH. Cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease: state of the art and perspectives. In: Ong Kian-Chung, editor. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Current Concepts and Practice. Croácia: InTech; 2012.Cap 23.455-74.

Ribeiro-Paes JT, Stessuk T, Marcelino MY, Faria CA, Marinelli TQ, Ribeiro-Paes MJO. Proposta de um protocolo de terapia celular para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica. Revista Portuguesa de Pneumologia. 2013;1-7.

Rinaldi M, Maes K, De Vleeschauwer S, Thomas D, Verbeken EK, Decramer M, Janssens W, Gayan-Ramirez GN. Long-term nose-only cigarette smoke exposure induces emphysema and mild skeletal muscle dysfunction in mice. Dis Model Mech. 2012;5(3):333-41.

Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. Experimental Cell Research 2008;314:1937–44.

Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears L, Roman J, Brigham KL. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. A J Respir Cell Mol Biol. 2005; 33:145-52.

Rubio ML, Martin-Mosquero MC, Ortega M, Peces-Barba G, González-Mangado N. Oral n-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. Chest. 2004; 125:1500-6.

Rufino R, Silva JRL. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. J Bras Pneumol. 2006;32(3):241-48.

Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri, L.M. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med, 2001;163:1304-09.

Sampsonas F, Kaparianos A, Lykouras D, Karkoulias K, Spiropoulos K. DNA sequence variations of metalloproteinases: their role in asthma and COPD. Postgrad Med J. 2007;83:244-50.

Sangani RG, Ghio AJ. Lung injury after cigarette smoking is particle related. International Journal of COPD. 2011;6,191–8.

Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein M P, Robbins RC, Pelletier MP. Stem Cell Transplantation: The Lung Barrier. Transplantation Proceedings 2007;39:573-76.

Schweitzer KS, Johnstone BH, Garrison J, Rush NI, Cooper S, Traktuev DO, Feng D, Adamowicz JJ, Demark MV, Fisher AJ, Kamocki K, Brown MB, Jr. RGP, Broxmeyer HE, March KL, Petrache I. Adipose stem cell treatment in mice attenuates lung and systemic injury induced by cigarette smoking. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183:215-25.

Selman M, Cisneros-Lira J, Gaxiola M, Ramírez R, Kudlacz EM, Mitchell PG, et al. Matrix mielloproteinases inhibition attenuates tobacco smoke-induced emphysema in guinea pigs. Chest. 2003;123:1633-41.

Shapiro, S. Animal models for COPD. Chest. 2000;117:223–7.

Sueblinvong V, Weiss DJ. Cell therapy approaches for lung diseases: current status. Curr Opin Pharmacol. 2009;9(3):268-73.

Suratt BT, Cool CD, Serls AE, Chen L, Varella-Garcia M, Shpall EJ, Brown KK, Worthen GS. Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168:318-22.

Takizawa H, Tanaka M, Takami K, Ohtoshi T, Ito K, Satoh M, Okada Y, Yamasawa F, Nakahara K, Umeda A. Increased expression of transforming growth factor-β1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Am J Respir Crit Care Med. 2001;163:1476-83.

Takubo Y, Guerassimov A, Ghezzo H, Triantafillopoulos A, Bates JHT, Hoidal JR, Cosio MG. α1-Antitrypsin determines the pattern of emphysema and function in tobacco smoke-exposed mice. Parallels with human disease. Am J Respir Crit Care Med. 2002;166:1596–603.

Tigges U, Komatsu M, Stallcup W B. Adventitial pericyte progenitor/mesenchymal stem cells participate in the restenotic response to arterial injury. J Vasc Res. 2013;50:134-44

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

Toledo AC, Magalhães RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli JC, Moriya HT, Mauad T, Lopes FDTQS, Martins MA. Aerobic exercise attenuate pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. ERJ Express. 2011;39(2):254-64.

Valença SS, Porto LC. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. J Bras Pneumol. 2008;34(10):787-95.

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

Wagers, AJ, Weissman, I. Plasticity of adult stem cells. Cell. 2004;116:639-48.

Watt, FM, Driskell, RR. The therapeutic potential of stem cells. Phil Trans R Soc B. 2010; 365:155-63.

Weibel E. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. Lab Invest. 1963;12:131-55.

Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. Arch Med Res. 2003;34(6):461-75.

Wong AP, Dultly AE, Sacher A, Lee H, Hwang DM, Liu M, Keshavjee S, Hu J, Waddel TK. Targeted cell replacement with bone marrow cells for airway epithelial regeneration. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007;293:740-52.

World Health Organization (WHO). Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases (GARD) General Meeting Report. Istambul, Turkey; 2008. p. 30-31.

Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008;295:L1-L15.

Wright JL, Churg A. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. Expert Rev Respir Med. 2010;4(6):723-34.

Xian W, McKeon. Adult stem cells underlying lung regeneration. Cell Cycle. 2012; 1;11(5):887-94.

Xiao Y. Mesenchymal stem cells. Cell Biology Research Progress. New York: Nova Science Publishers; 2012.

Xu L, Cai BQ, Zhu YJ. Pathogenesis of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic effects of glucocorticoids and N-acetylcysteine in rats. Chin Med J. 2004;117:1611–9.

Zhang X, Li JY, Cao K, Lu H, Hong M, Qian S, Wu H, Liu P, Xu W. Cotransplantation of HLA-identical mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in chinese patients with hematologic diseases. International Journal of Laboratory Hematology. 2009;32:256-64.

Zhang X, Zhang C, Sun Q, LI Dan, Luo R, Wan Z, Ye X, et al. Infliximab protects against pulmonary emphysema in smoking rats. Chin Med J. 2011;124(16):2502-6.

Zheng H, Liu Y, Huang, T, et al. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke. Toxicology Letters. 2009;189:225–34.

Zhu X-Y, Urbieta-Caceres V, Krier JD, Textor SC, Lerman A and Lerman LO. Mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells decrease renal injury in experimental swine renal artery stenosis through different mechanisms. Stem Cells. 2012;31:117–25.