

VALTER ABRAÃO BARBOSA DE OLIVEIRA

**Emprego de células mononucleares da medula óssea em terapia
experimental do enfisema pulmonar**

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

São Paulo
2013

VALTER ABRAÃO BARBOSA DE OLIVEIRA

**Emprego de células mononucleares da medula óssea em terapia
experimental do enfisema pulmonar**

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

Orientador: Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro
Paes

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Barbosa de Oliveira, Valter Abraão.

Emprego de células mononucleares da medula óssea em terapia experimental do enfisema pulmonar / Valter Abraão Barbosa de Oliveira. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes.

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: Aplicações terapêuticas das células-tronco em doenças pulmonares.

Versão do título para o inglês: Employment of bone marrow mononuclear cells in experimental therapy of pulmonary emphysema.

1. DPOC 2. Enfisema pulmonar 3. Célula-tronco 4. Células da medula óssea 5. Modelos animais de doenças 6. Fumo I. Ribeiro-Paes, Prof. Dr. João Tadeu II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0117/2013

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

Candidato(a): Valter Abraão Barbosa de Oliveira.

Título da Dissertação: Emprego de células mononucleares da medula óssea em terapia experimental do enfisema pulmonar.

Orientador(a): Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes.

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:

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Projeto "*Emprego de células mononucleares da medula óssea em terapia experimental do enfisema pulmonar*", Registro nº 020/2011, 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 Novembro/2011 a Julho/2012, sendo que o Relatório Final deverá ser entregue em Agosto/2012.

Assis, 21 de outubro de 2011.



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

Aos meus familiares, namorada, colegas e amigos
por todo conhecimento, experiência e apoio.

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. João Tadeu Ribeiro Paes pela valiosa oportunidade de adquirir conhecimento e desenvolvimento pessoal.

A Dra. Elisabete por todo o apoio e paciência.

A equipe do Laboratório de Genética e Terapia Celular, GenTe Cel, Rodrigo de las Heras Kozma, Nathalia Longhini dos Santos, Guilherme Ferreira Caetano, Talita Stessuk, Edson Marcelino, Camila Yamashita, Ana Catarina Stenico, Antônio Assay e Laila Mariê Francisco, por toda ajuda durante a execução do projeto, bem como pela amistosa companhia.

A minha namorada Daniela Ré Franguelli pelo apoio nos momentos de dificuldade e incerteza.

A minha família pela paciência e compreensão.

Aos funcionários da secretaria de biotecnologia (Marcos, Fábiana e Eliana) pelo apoio e atenção.

A Dra. Isabel Cristina Cherice Camargo, por todo o auxílio.

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.

Ao Cristiano Marcello Vaz Barbosa (Unifesp) pelo suporte técnico oferecido.

*“A superação das dificuldades é a prova
que forma o caráter.”*
(Anthony Robbins)

RESUMO

Barbosa de Oliveira VA. Emprego de células mononucleares da medula óssea em terapia experimental do enfisema pulmonar. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) destaca-se como uma das doenças de maior prevalência, mortalidade e incapacitação, em termos globais. Dentro do espectro da DPOC podem ser citadas duas entidades nosológicas: a bronquite obstrutiva crônica e o enfisema. O principal fator de risco para o enfisema pulmonar vincula-se à exposição a partículas e gases nocivos encontrados no ambiente, sendo o tabagismo responsável pela maioria dos casos da doença. Apesar dos avanços significativos resultantes da introdução de novas estratégias terapêuticas e de reabilitação, não se logrou até o presente uma forma de tratamento clínico eficaz. Neste contexto as células-tronco representam uma nova alternativa terapêutica potencialmente promissora. Partindo-se dessas premissas, foi proposto, neste estudo, o emprego de um modelo animal de enfisema pulmonar que busca mimetizar as condições patológicas de pacientes tabagistas, permitindo testar, in vivo, os efeitos terapêuticos do transplante de células-tronco mononucleares da medula óssea. Visando avaliar a patologia induzida no modelo animal, bem como, a recuperação dos animais tratados com células mononucleares, foram realizados testes de fisiologia respiratória (mecânica ventilatória), morfometria pulmonar e contagem de células presentes no lavado bronco alveolar. A fim de rastrear as células-tronco infundidas (marcadas com EGFP) foi empregada a técnica de fluorescência direta. Os resultados obtidos demonstraram que os animais expostos à fumaça de cigarro desenvolveram os aspectos histomorfológicos do enfisema pulmonar. Além disso, nos animais tratados com células-tronco foi observada a recuperação da histomorfologia pulmonar. A fluorescência direta revelou que as células infundidas migraram para os pulmões, esse achado, em concomitância com a recuperação pulmonar permite sugerir que as células-tronco atuaram na regeneração do órgão. Consolidou-se, neste estudo, um novo aparato e um modelo experimental que permita avaliar o tratamento com células-tronco na terapia experimental do enfisema pulmonar. Além disso, demonstrou-se a potencialidade terapêutica das células-tronco da medula óssea no tratamento do enfisema pulmonar.

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

ABSTRACT

Barbosa de Oliveira VA. Employment of bone marrow mononuclear cells in experimental therapy of pulmonary emphysema. [Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) stands out as one of the most prevalent diseases, mortality and disability, overall. Within the spectrum of COPD may be cited two nosologic entities: chronic obstructive bronchitis and emphysema. The main risk factor for emphysema is linked to exposure to noxious particles and gases found in the environment, and smoking is responsible for most cases of the disease. Despite significant advances resulting from the introduction of new therapeutic strategies and rehabilitation not achieved until the present one form of effective clinical treatment. In this context stem cells represents a potentially promising new therapeutic approach. Starting from these premises, it has been proposed, in our study, the use of an animal model of pulmonary emphysema which seeks to mimic the pathological conditions of smokers, allowing testing in vivo therapeutic effects of transplantation of stem cells from bone marrow mononuclear. To evaluate the pathology induced in the animal model as well as the recovery of the animals treated with mononuclear cells, tests were performed respiratory physiology (mechanical ventilation), lung morphometry and enumeration of cells present in bronchoalveolar lavage. In order to track stem cells infused (marked with EGFP) was used to direct fluorescence technique. The results showed that animals exposed to cigarette smoke developed the histopathological aspects of pulmonary emphysema. Furthermore, animals treated with stem cells was observed recovery of pulmonary histomorphology. The direct fluorescence revealed that the infused cells engraft to the lungs, this finding, in tandem with the recovering lung suggest that stem cells may act in organ regeneration. Was consolidated in this study, a new apparatus and a experimental model to evaluate the experimental cell therapy with stem cells in treatment of pulmonary emphysema. Furthermore, it was demonstrated the therapeutic potential of stem cells from bone marrow in therapeutics of pulmonary emphysema.

KeyWords: Pulmonary emphysema. Animal model. Cigarette smoke. Cell Therapy. Stem Cells from Bone Marrow

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Delineamento experimental.....	29
Figura 2	- Esquema do aparato para exposição à fumaça de cigarro.....	30
Figura 3	- Citometria de fluxo do “pool” das células mononucleares utilizadas no tratamento do grupo BMMC.....	36
Figura 4	- Gráfico representativo dos valores de elastância do tecido pulmonar obtidos nos diferentes grupos experimentais.....	38
Figura 5	- Gráfico representativo dos valores de resistência do tecido pulmonar obtidos nos diferentes grupos experimentais.....	39
Figura 6	- Gráfico representativo dos valores de resistência das vias aéreas obtidos nos diferentes grupos experimentais.....	40
Figura 7	- Contagem do número total de células presentes no lavado bronco-alveolar dos animais.....	41
Figura 8	- Gráfico dos valores de intercepto linear médio (Lm)	43
Figura 9	- Fotomicrografia dos pulmões nos diversos grupos experimentais	44
Figura 10	- Análise do tecido pulmonar com microscopia de fluorescência confocal	45

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Trabalhos sobre a aplicação das células-tronco no tratamento de doenças pulmonares.....	25
Tabela 1 - Grupos experimentais.....	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C - Graus Celsius

bg - Beige mice

BMMC - Grupo de animais expostos à fumaça de cigarro que receberam tratamento com células-tronco mononucleares da medula óssea

CEUA - Comitê de Ética na Utilização de Animais

cm - Centímetro

cmH₂O - Centímetros de água

CT - Célula-Tronco

CTA - Célula-Tronco Adulta

CTE - Célula-Tronco Embrionária

CTH - Célula-Tronco Hematopoética

CTM - Célula-Tronco Mesenquimal

CTMO - Célula-Tronco da Medula Óssea

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 - Frequência

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

FISH - Hibridização in situ por Fluorescência, do inglês Fluorescence in situ hybridization

FSC - Forward Scatter Chanel

g - aceleração da gravidade

G-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócitos, do inglês Granulocyte Colony-Stimulating Factor

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

Gtis - Resistência tecidual

Htis - Elastância do tecido pulmonar

Hz - Hertz

i - Unidade imaginária

Iaw - Inertância das vias aéreas

IFN- γ - Gama Interferon

IL - Interleucina

kg - Quilogramas

LBA - Lavado Bronco-Alveolar

Lm - Intercepto linear médio

mg - miligramas

mL - mililitros

MMP - Metaloproteinase de matriz

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

pa - Pallid mice

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

PEEP - Pressão Positiva Final de Expiração

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

p.p.m - Partes por milhão

R0 - representa a população de células que apresenta tamanho celular relativo e granulosidade/complexidade relativas compatíveis com as células mononucleares

R1 - população de células FLK-2⁻

R2 - população de células Sca-1⁺ e c-kit⁺

R_{aw} - Resistência das vias aéreas

SSC - Side Scatter Chanel

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral

Tsk - Tight skin

μm - micrômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Doença pulmonar obstrutiva crônica e enfisema pulmonar	16
1.2 Modelos experimentais de DPOC	18
<i>1.2.1 Indução de DPOC pelo do uso de proteases</i>	18
<i>1.2.2 Modelos genéticos de DPOC</i>	19
<i>1.2.3 Modelos de DPOC induzida por exposição à fumaça de cigarro</i>	20
1.3 Células-tronco	22
1.4 Terapia celular	23
1.5 Terapia celular em DPOC	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo principal	27
2.2 Objetivos secundários	27
3 METODOLOGIA	28
3.1 Animais	28
3.2 Grupos experimentais	28
3.3 Aparato para exposição à fumaça de cigarro	29
3.4 Modelo experimental de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro	30
3.5 Obtenção de células mononucleares	31
3.6 Transplante celular	31
3.7 Citometria de fluxo	31
3.8 Mecânica ventilatória	32
3.9 Coleta e análise do lavado bronco-alveolar	33
3.10 Procedimento para retirada dos pulmões	33
3.11 Análise histológica	34
3.12 Morfometria – medida do intercepto linear (Lm)	34
3.13 Florescência direta	35
3.14 Análise estatística	35
3.15 Aspectos éticos do projeto	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Citometria de fluxo	36
4.2 Análise funcional	37

4.3 Contagem de células no lavado bronco-alveolar (LBA)	40
4.4 Morfologia pulmonar	41
4.5 Florescência direta	44
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença pulmonar obstrutiva crônica e enfisema pulmonar

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) representa um grave problema de saúde pública mundial (Iniciativa Global para Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (GOLD), 2013). Estima-se que a DPOC seja a quinta principal causa de morte no mundo, e projeta-se que poderá alcançar a terceira posição em 2020 (Murray, Lopez, 1997). No Brasil, a Associação Latino-Americana de Tórax realizou, em 2003, um estudo sobre a prevalência da DPOC, foi demonstrado que 15,8% da população com idade superior a 40 anos apresentava a doença, sendo assim, pode-se propor que existem aproximadamente 6 milhões de pessoas acometidas em todo o país (Jardim, Nascimento, 2006). A alta morbidade, associada aos gastos com medicamentos e internações fazem da DPOC uma patologia com elevados custos econômicos, de acordo com ministério da saúde (DATASUS) calcula-se que em 2003 foram realizadas 196.698 internações, totalizando 72 milhões de reais (Jardim, Nascimento, 2006).

Conforme a Iniciativa Global para Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (GOLD), o termo DPOC refere-se a patologias que apresentam, concomitantemente, caráter crônico e obstrutivo, com limitação da capacidade respiratória não totalmente reversível, sendo geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas ou gases tóxicos. De acordo com essas características, a DPOC é composta pela bronquite crônica e pelo enfisema pulmonar (Cosio, Agustí, 2011; GOLD, 2013; Mannino, 2011; Sangani, Ghio, 2011).

O enfisema pulmonar pode ser basicamente caracterizado pelo alargamento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, sem fibrose significativa (GOLD, 2013). Em concomitância ocorre o aumento da complacência pulmonar. Somando-se a perda da eficiência nas trocas gasosas, oriunda do alargamento alveolar, com o prejuízo na ventilação pulmonar ocasionado pela redução da elastância pulmonar, tem-se a dispneia, que corresponde ao principal sintoma da doença (Barnes et al., 2003; GOLD, 2013; Lee et al., 2011; Oliveira et al., 2000).

A hipótese mais aceita para explicar a patogênese do enfisema pulmonar propõe um possível desequilíbrio entre proteases, responsáveis pela destruição do parênquima pulmonar, e antiproteases que inibem a ação das enzimas proteolíticas (Rufino, Silva, 2006). Em geral, a presença exacerbada de proteases nos pulmões é ocasionada por um processo inflamatório

crônico que tem origem na exposição contínua do trato respiratório a partículas e gases tóxicos (GOLD, 2013; Leuenberger et al., 1997).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do enfisema pulmonar são: tabagismo, vapores e resíduos ocupacionais, poluição atmosférica, infecções, idade, asma e fatores socioeconômicos (GOLD, 2013; Leuenberger et al., 1997). O tabagismo, contudo, corresponde ao principal causador da doença, estimado em 15 a 20% dos casos clínicos de enfisema pulmonar. A interação entre fatores genéticos e agentes agressores está relacionada a 90% dos casos de DPOC, sendo que 1 a 3% dos casos apresentam um distúrbio genético, diagnosticado pela deficiência de α 1-antitripsina, uma antiprotease produzida no fígado (Ribeiro-Paes et al., 2009).

O componente inflamatório responsável pelo desenvolvimento do enfisema pulmonar é composto principalmente por neutrófilos, macrófagos e linfócitos T CD 8+. Os neutrófilos secretam enzimas elastolíticas como a elastase neutrofílica, catepsina G, Metaloproteinases de matriz (MMP) e proteinase-3, além disso, liberam substâncias quimiotáticas como a interleucina 8 (IL-8), que promove o recrutamento de novos neutrófilos e agrava o processo inflamatório. Os macrófagos, por sua vez, secretam elastase, metaloproteinases de matriz (MMP), IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF- α). Os linfócitos T CD 8+ realizam a citólise de células alteradas em presença de TNF- α e gama interferon (IFN- γ). Estudos em modelos animais sugerem uma possível correlação entre a atividade dos linfócitos T CD 8+ e formas mais graves da doença (Barnes, 2003; Do, Chin, 2012; Rufino, Silva, 2006; Russel, 2002).

Ao observar todas as variáveis relacionadas ao desenvolvimento do enfisema pulmonar, nota-se que se trata de uma patologia de etiologia complexa. As substâncias tóxicas inaladas com frequência, principalmente a fumaça de cigarro, causam danos oxidativos aos pulmões, além disso, desencadeiam a resposta imunológica, que, por sua vez, é responsável pelo aumento do estresse oxidativo, da lise celular, bem como pela liberação exacerbada de proteases. Dentro desse contexto, pode ocorrer o desenvolvimento de um processo inflamatório auto-imune, em que os fragmentos resultantes da lise celular estimulam as células de defesa presentes no pulmão, culminando com a liberação de proteases e quimiocinas que amplificam continuamente a degeneração e o recrutamento celular (Barnes, 2003; Demets et al., 1994; Rufino, Silva, 2006).

No enfisema pulmonar tem sido notada a existência de eventos que tornam as condições teciduais desfavoráveis ao reparo e homeostase do parênquima pulmonar. Churg et al. (2008) propuseram, em seus estudos, fenômenos como: a perda da capacidade proliferativa

das células, alteração da quimiotaxia e ausência da capacidade de produzir componentes da matriz.

As diversas estratégias clínicas, associadas às técnicas de reabilitação pulmonar, têm, inegavelmente, contribuído para o prolongamento e melhora na qualidade de vida dos portadores de enfisema. Apesar dos avanços significativos resultantes da introdução de novas abordagens terapêuticas medicamentosas e de reabilitação, não se logrou até o presente uma forma de tratamento eficaz, que não componha a esfera paliativa. O tratamento cirúrgico envolve procedimentos de alta complexidade e, no caso específico do transplante pulmonar, a escassez de doadores. Considerando esses aspectos, vários modelos experimentais têm sido propostos, objetivando o avanço no conhecimento sobre os processos fisiopatológicos e novas abordagens terapêuticas do enfisema pulmonar (Fusco et al., 2005; GOLD, 2013; Mahadeva, Shapiro, 2002; Ribeiro-Paes et al., 2009; Ribeiro-Paes et al., 2011, Faria et al. , 2012).

1.2 Modelos experimentais de DPOC

Os modelos animais são uma ferramenta de grande importância, pois, permitem estudar a etiopatogenia da DPOC. Outro aspecto interessante da manipulação animal em laboratório compreende a possibilidade de desenvolver novas terapias. Dentre os modelos animais de enfisema pulmonar existentes na literatura, destacam-se o uso de proteases, exposição à fumaça de cigarro e a utilização de linhagens que apresentam mutações naturais ou induzidas por manipulação genética (Dawkins, Stockley, 2001; Ribeiro-Paes et al., 2009; Wright et al., 2008).

1.2.1 Indução de DPOC pelo uso de proteases

A instilação de proteases foi pioneiramente executada por Gross e colaboradores, em 1965, representando um modelo original para indução de enfisema pulmonar. No estudo, foi administrada a enzima proteolítica papaína, responsável pelo desenvolvimento da doença nos animais. Os dados obtidos pelo grupo tiveram grande influência sobre a hipótese do desequilíbrio protease e antiprotease.

A partir das proposições apresentadas por Gross et al. (1965), uma série de modelos de indução de enfisema por instilação de proteases foram utilizados, buscando ampliar as bases do conhecimento sobre as características fisiopatológicas da doença, bem como na busca de

novas vertentes terapêuticas para o tecido pulmonar lesado aguda ou cronicamente (Anciães et al., 2011; Fló et al., 2006; Fujita, Nakanishi, 2007; Fusco et al., 2002).

Em relação à praticidade, o uso de proteases representa um método vantajoso. Trata-se de uma técnica de fácil emprego e reprodutibilidade. Além disso, as alterações morfológicas (destruição do parênquima pulmonar) surgem em um período curto de tempo (21 dias) (Fujita, Nakanishi, 2007; March et al., 2000; Shapiro, 2000).

Dentre as proteases descritas na literatura, a mais utilizada para a indução do enfisema pulmonar corresponde à elastase. A preferência por essa enzima é justificada por seu envolvimento fisiológico no desenvolvimento da doença. A instilação de elastase resulta no alargamento rápido dos espaços aéreos pulmonares, com posterior acúmulo neutrofílico e macrofágico no pulmão, além disso, ocorrem hemorragias (Fujita, Nakanishi, 2007, Kawakami et al., 2008; Shapiro, 2000). As alterações morfológicas e funcionais derivadas do processo de indução por elastase são detectáveis após longos períodos, sendo que a lesão estrutural e a inflamação sistêmica apresentam semelhança com o enfisema pulmonar humano (Antunes, Rocco, 2011).

Apesar das diversas vantagens apresentadas sobre indução do enfisema pela administração de proteases, existem alguns argumentos desfavoráveis a este modelo animal. Em geral, a administração de proteases resulta numa lesão com posterior presença do componente inflamatório, o que não simula exatamente os eventos responsáveis pelo desenvolvimento da doença em humanos. Além disso, a patologia obtida não apresenta caráter progressivo (Fló et al., 2006; Fujita e Nakanishi, 2007; March et al., 2000).

1.2.2 Modelos genéticos de DPOC

Os modelos genéticos de DPOC consistem na utilização de animais com alterações genéticas relacionadas à produção disfuncional ou ausente de proteínas importantes para o desenvolvimento e/ou a homeostase pulmonar. As alterações genéticas presentes nos animais podem ser de origem natural ou induzida (*gene targeting*) (Brusselle et al., 2006; Mahadeva e Shapiro, 2002; Tuder et al., 2003; Vlahos et al., 2006).

As linhagens mais utilizadas são Tight skin (Tsk-/+), Pallid mice (pa/pa) e Beige mice (bg). Tsk e pa, por exemplo, apresentam produção deficiente da antiprotease α 1-antitripsina, desse modo, possuem uma tendência ao desenvolvimento do enfisema pulmonar (Kielty et al., 1998; March et al., 2000; Martorana et al., 1989).

A criação e utilização de modelos genéticos representa uma abordagem interessante e inovadora para o estudo da DPOC, uma vez que, as linhagens mimetizam uma série de aspectos ligados à fisiopatologia da doença humana. Além disso, permitem estudar a atuação de determinada molécula no desenvolvimento patológico. Com a criação de linhagens deficientes na produção de uma protease alvo, por exemplo, é possível entender seu papel no desenvolvimento e na evolução da DPOC (Brusselle et al., 2006; Mahadeva e Shapiro, 2002; Tudor et al., 2003; Vlahos et al., 2006; Wright et al., 2008).

1.2.3 Modelos de DPOC induzida por exposição à fumaça de cigarro

Sabendo que o tabagismo representa o principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC em humanos, seria lógico expor animais à fumaça de cigarro a fim de obter um modelo que se aproxime o quanto possível da doença humana. Huber e colegas, em 1981, propuseram o primeiro modelo animal por exposição à fumaça de cigarro. Os autores realizaram um estudo detalhado sobre a indução do enfisema pulmonar, servindo de marco inicial para os trabalhos realizados posteriormente.

A exposição crônica dos animais à fumaça de cigarro estimula o surgimento do infiltrado inflamatório que está diretamente envolvido com a degeneração do parênquima pulmonar. Como resultado, podem ser visualizados aspectos anatômicos e fisiopatológicos semelhantes aos da DPOC humana (infiltrado inflamatório, enfisema, remodelamento das vias aéreas inferiores e hipertensão pulmonar) (Wright, Churg, 2010).

Apesar de ser o método que melhor mimetiza as condições da DPOC humana, o emprego dos modelos animais por exposição à fumaça de cigarro é uma prática ainda em desenvolvimento, não havendo, portanto, consenso entre os pesquisadores quanto a uma série de parâmetros, tais como: forma como o animal é exposto à fumaça, origem da fumaça inalada, tipo de câmara de exposição, número de cigarros utilizados, período total de exposição, bem como espécie ou linhagem de animal utilizado (Bracke et al., 2006; Cendon et al., 1997; Gosker et al., 2009; Guerassimov et al., 2004; Rinaldi et al., 2012; Schweitzer et al., 2011; Wrigth et al., 2008; Zheng et al., 2009).

Existem, na literatura, duas formas de exposição animal à fumaça de cigarro, sendo elas: exposição do animal como um todo em ambiente contendo fumaça (Cendon et al., 1997; Huh et al., 2011; Zheng et al., 2009) ou inalação por via exclusivamente nasal (Jardim et al., 2010; Rinaldi et al., 2012; Xu et al., 2004). A exposição do animal como um todo é uma

prática contestada por alguns autores, pois, após uma sessão de exposição o animal executa o comportamento de auto limpeza, desse modo, ocorre a ingestão de nicotina e alcatrão presentes no corpo do animal, o que resultaria na alteração dos resultados. Apesar dessa limitação, os dois procedimentos têm sido empregados como modelo de estudo da fisiopatologia do enfisema pulmonar (Wright et al., 2008).

A fumaça que entra em contato com os animais pode ser originada de duas maneiras, sendo: a partir da queima lenta do cigarro ou da combustão acelerada pela aspiração (“tragada”). É proposto na literatura, que a exposição à fumaça oriunda da queima lenta do cigarro parece simular as condições fisiológicas de um “fumante passivo”. Enquanto que, a utilização de um aparato de aspiração ou “tragada” do cigarro, poderia reproduzir as condições presentes em um “fumante ativo”. Levando-se em conta que é interessante mimetizar as condições encontradas em fumantes humanos, mostra-se mais vantajosa a utilização da combustão acelerada por aspiração (Huh et al., 2011; Jardim et al., 2010; Toledo et al., 2012; Zhang et al., 2011; Zheng et al., 2009). Não há, no entanto, nenhum estudo comparativo entre dois métodos. Em geral, a exposição a qualquer um desses tipos de fumaça tem induzido enfisema em animais, sendo que, o grau da doença está relacionado, basicamente, ao período total de exposição (Wright et al., 2008).

Dentre as espécies de animais já empregadas em modelos de enfisema, os camundongos se destacam como a ferramenta que apresenta aspectos vantajosos. Existem diversas linhagens de camundongos com mutações relacionadas ao desenvolvimento do enfisema. Além disso, há grande disponibilidade de testes e marcadores moleculares. O tamanho do animal, entretanto, pode representar um problema em relação a testes de fisiologia respiratória. Outras vantagens consistem na fácil obtenção, manutenção e no curto tempo para o surgimento da doença em relação às demais espécies, como ratos e coelhos (Bracke et al., 2006; Guerassov et al., 2004; Wright et al., 2008).

Apesar do modelo de indução do enfisema por exposição à fumaça de cigarro representar uma metodologia ainda em desenvolvimento, deve-se levar em conta que corresponde a uma prática promissora no que concerne à aproximação com um modelo de patologia humana, principalmente quanto aos aspectos fisiopatológicos e morfológicos que caracterizam a doença (March et al., 2000, Wright et al., 2008; Wright, Churg, 2010).

1.3 Células-tronco

De acordo com o National Institute of Health (NIH), as Células-Tronco (CT) são definidas por três características básicas: capacidade de autorrenovação por longos períodos, estado indiferenciado, bem como possuir capacidade para originar diferentes tipos celulares (NIH, 2009).

Atualmente, as CT podem ser subdivididas em dois grandes grupos, Células-Tronco Embrionárias (CTE) e Células-Tronco Adultas (CTA). As CTE correspondem às células encontradas em tecidos embrionários antes da formação dos 3 folhetos germinativos. Já as CTA são encontradas em diferentes tecidos adultos, podendo, também, ser isoladas do cordão umbilical e da placenta (Leeb et al., 2011; Teo, Vallier, 2010; Watt, Driskell, 2010).

Uma das restrições ao emprego das CTE refere-se à sua capacidade de pluripotência, que pode levar à formação de teratomas (NIH, 2009; Nussbaum et al., 2007; Prokhorova et al., 2009). Acredita-se que esse fenômeno ocorra, porque, comparado ao desenvolvimento embrionário, onde as células encontram a sinalização adequada para se diferenciar corretamente, um organismo adulto apresenta apenas estímulos específicos para o funcionamento e homeostase tecidual, desse modo, o organismo adulto não está capacitado a induzir corretamente a diferenciação das CTE (Nussbaum et al., 2007).

Admite-se que as CTA tenham função repositória no organismo, desta maneira, possuem papel importante na homeostase tecidual em condições normais, bem como no reparo de lesões ou comprometimentos de ordem patológica (Giangreco et al., 2009). Devido à diversidade tecidual existente no organismo, pode-se prever a existência de uma vasta gama de CTA.

Dentre as linhagens de CTA conhecidas, as Células-Tronco da Medula Óssea (CTMO) representam as mais estudadas. São bem caracterizadas dois tipos de CTMO, as Células-Tronco Hematopoéticas (CTH) e as Células-Tronco Mesenquimais (CTM). As CTH são responsáveis pela produção de células do tecido linfóide e mielóide. Em condições padrões de cultura correspondem à porção não aderente. As CTH expressam o imunofenótipo CD34⁺, CD38⁻, CD133⁺, CD90⁺, Rho^{low}, c-kit⁺, lin⁻ e FLK-2⁻ (Bryder et al., 2006; Kirschstein et al., 2001; Wognum et al., 2003). Conforme a Sociedade Internacional de Terapia Celular as CTM apresentam, como características fundamentais, capacidade de aderência ao plástico em condições padrões de cultura, aspecto fibroblastóide e podem derivar osso, cartilagem, músculo, tendão, estroma medular e tecido adiposo. Em relação aos marcadores de superfície,

as CTM expressam CD105, CD73 e CD90, e não expressam CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR (Bydlowsky et al., 2009; Dominici et al., 2006).

1.4 Terapia celular

A terapia celular pode ser basicamente definida como o emprego de células para o tratamento de doenças. Esta abordagem corresponde a uma antiga prática médica, iniciada com as transfusões de sangue total ou concentrado de plaquetas. Já o emprego das CT na terapia celular tem origem nos primeiros relatos científicos de Lorenz et al. em 1951, que estudou a recomposição do tecido hematopoético, após irradiação, a partir da infusão de células da medula óssea.

Um avanço significativo para a terapia celular, bem como para o estabelecimento do conceito de CT, adveio com os trabalhos de Till e McCulloch, em 1961. Os autores observaram a reconstituição do sistema hematopoético de animais letalmente irradiados após o transplante de medula óssea de animais singênicos normais. A reconstituição da medula dos animais irradiados indicou a presença de células na medula óssea capazes de reconstituir o sistema hematopoético, bem como originar todos os tipos de células sanguíneas. Estas capacidades, posteriormente denominadas auto-renovação e diferenciação, são algumas das características atribuídas aos tipos celulares definidos, após os trabalhos de Till e McCulloch, como CT (Faria et al., 2012; Till e McCulloch, 2011).

Com as descobertas científicas obtidas nos modelos animais de transplante de medula óssea, surgiram os primeiros relatos sobre o emprego experimental da terapia celular com CTMO em pacientes humanos que apresentavam patologias graves do tecido hematopoético, tais como: imunodeficiência combinada grave (Gatti et al., 1969), imunodeficiência (Bortin et al., 1994), leucemia (Buckner et al., 1970; Thomas et al., 1977) e anemia aplásica (Thomas et al., 1972). A partir do desenvolvimento científico obtido por esses estudos e por trabalhos posteriores, o transplante de medula óssea tornou-se uma prática terapêutica consolidada (Voltarelli, 2009). No final dos anos 90, o emprego da terapia celular com CT foi proposto em novos campos experimentais visando o tratamento de patologias graves e/ou incuráveis (Barbosa da Fonseca et al., 2009; Dohmann et al., 2005; Faria et al., 2012; Forraz et al., 2012; Kalil et al., 2008; Lyra et al., 2009; Maron-Guiterrez et al., 2007; Ribeiro-Paes et al., 2011; Ribeiro-Paes 2012; Silva et al., 2007).

1.5 Terapia celular em DPOC

A DPOC apresenta uma alta prevalência e um elevado custo econômico e social (Campos, 2003). Apesar da inegável contribuição para o prolongamento e melhora na qualidade de vida dos portadores de enfisema, resultantes da introdução de novas abordagens terapêuticas clínicas, não se logrou até o presente uma forma de tratamento eficaz, que não seja apenas paliativa. As alternativas de tratamento cirúrgico, por sua vez, apresentam uma série de limitações vinculadas à complexidade e exequibilidade dos procedimentos cirúrgicos. Considerando esses aspectos, o emprego da terapia celular visando o tratamento de pacientes com DPOC apresenta-se como uma prática promissora (Faria et al., 2012; Ribeiro-Paes et al., 2009; Ribeiro-Paes et al., 2012).

Os estudos de Pereira e colaboradores, em 1995, demonstraram, de forma pioneira, que as CTMO infundidas em camundongos poderiam ser detectadas no tecido pulmonar. De maneira semelhante, outros grupos relataram que as CT administradas por via sistêmica, em camundongos, poderiam ser detectadas nos pulmões (Kotton et al., 2001; Krause et al., 2001). O fenômeno também pôde ser observado em pacientes humanos, a partir da detecção do cromossomo Y em mulheres que receberam transplante de medula de doadores do sexo masculino (Lama et al., 2007; Suratt et al., 2003).

Um evento marcante nos estudos sobre a migração das CT para o pulmão foi a constatação de que a presença de uma injúria ou lesão pulmonar resulta no recrutamento dessas células (Giangreco et al., 2009; Ishizawa et al., 2004; Krause et al., 2001; MacPherson et al., 2005; MacPherson et al., 2006; Yamada et al., 2004). Esse achado poderia ser justificado pela liberação de quimiocinas, bem como a 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). A partir dessas premissas, sugeriu-se um provável envolvimento das CT no reparo tecidual pulmonar.

As primeiras evidências de que as CT poderiam atuar na recuperação do parênquima pulmonar perante injúrias foram apresentadas nos estudos de Krause et al. (2001), que realizaram o transplante de células de doadores machos para receptoras fêmeas previamente irradiadas. Pela aplicação das técnicas de FISH e imunohistoquímica, foram observadas, nos brônquios e alvéolos, células contendo o cromossomo Y. Os autores propuseram que os altos níveis de incorporação no tecido pulmonar poderiam estar vinculados a um dano significativo nos pulmões, decorrente da irradiação (Krause et al., 2001). Posteriormente a esse estudo,

diversos outros trabalhos foram propostos buscando ampliar o conhecimento acerca das potencialidades regenerativas das CT nos pulmões, uma síntese desses trabalhos está apresentado no quadro 1.

Quadro 1- Trabalhos sobre a aplicação das células-tronco no tratamento de doenças pulmonares.

Autor	Metodologia	Resultados
Kotton et al., 2001	Animais instilados com bleomicina receberam infusão de CTM.	CTM migraram para o pulmão, apresentando características de pneumócitos tipo I.
Ortiz et al., 2003	Animais instilados com bleomicina receberam infusão de CTM.	CTM apresentaram efeito protetor, reduzindo o quadro inflamatório e a fibrose
Ishizawa et al., 2004	Animais com medula óssea marcada (EGFP) foram instilados com elastase e tratados com ácido retinóico ou fator estimulante de colônica de granulócitos (G-CSF).	Os tratamentos resultaram na recuperação do parênquima pulmonar. As CTMO migraram para os pulmões e apresentaram fenótipos epiteliais e endoteliais.
Yamada et al., 2004	Animais com medula óssea marcada (EGFP) e animais irradiados, tiveram o pulmão lesionado por lipopolissacarídeo.	A presença da medula óssea atuou de maneira protetora. As CTMO migraram para os pulmões e apresentaram fenótipos epiteliais e endoteliais.
MacPherson et al., 2005 e MacPherson et al., 2006	Camundongos com medula óssea marcada (ROSA26) foram instilados com polidocanol ou detergente.	As CTMO migraram para os pulmões e apresentaram marcação para citoqueratina.
Rojas et al., 2005	Instilou bleomicina nos animais e, posteriormente, administrou CTM.	CTM apresentaram efeito protetor. As análises realizadas sugerem que as CT tem capacidade modulatória.
Shigemura et al., 2006	Animais enfisematosos submetidos à cirurgia de redução volumétrica pulmonar receberam a aplicação de “scaffold” contendo CTM.	A técnica acelerou a regeneração pulmonar, bem como conduziu a um período pós-cirúrgico melhor.
Kahler et al., 2007	Infusão sistêmica de células progenitoras endoteliais em modelo animal de lesão aguda.	Migração das células para o local da lesão, seguido por rápida reestruturação vascular.
Katsha et al., 2011	Emprego de CTM em modelo animal de enfisema pulmonar induzido por elastase.	Foi constatada a regeneração pulmonar nos animais tratados com CTM. Observou-se também a participação modulatória das CT.
Schweitzer et al., 2011	Emprego de CTM em modelo animal de enfisema pulmonar induzido por exposição à fumaça de cigarro.	O tratamento com CTM resultou na recuperação do parênquima pulmonar e na melhora de outros aspectos da DPOC.
Ribeiro-Paes et al., 2011	Infusão de CTH (autólogas) em pacientes com enfisema avançado (estágio IV de dispnéia)	O procedimento é seguro. Houve melhora dos parâmetros da gasometria, bem como na qualidade de vida.
Osiris Therapeutics Inc.	Infusão alogênica de CTM em pacientes com DPOC moderada e severa	O procedimento é seguro, apresentando melhora da função respiratória, da dispneia e da qualidade de vida.
Longhini-dos-Santos et al., 2012	Infusão de CTMO em animais com enfisema pulmonar induzido por instilação de elastase.	As CTMO atuaram na recuperação da morfologia pulmonar. Células infundidas foram detectadas nos pulmões dos animais tratados.

Existem poucos relatos científicos sobre o tratamento com CT em modelos animais de enfisema induzido por exposição à fumaça de cigarro, além disso, há discrepâncias entre os resultados encontrados em modelos animais e em pacientes humanos (quadro 1). Seguindo essas premissas, nosso grupo propôs um modelo animal de DPOC induzida por exposição à fumaça de cigarro, objetivando simular a etiopatogenia do enfisema pulmonar presente em pacientes humanos. A partir do modelo adotado, foi empregado o tratamento com CTMO, posteriormente, os animais passaram por avaliações fisiológicas e histológicas a fim de estudar as potencialidades terapêuticas e validar os resultados do tratamento com “pool” de CT mononucleares da medula óssea.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Realizar tratamento com “pool” de células mononucleares da medula óssea em animais com enfisema pulmonar induzido por exposição à fumaça de cigarro, a fim de avaliar as potencialidades terapêuticas do emprego da terapia celular neste tipo de patologia.

2.2 Objetivos secundários

Utilizar um modelo animal de enfisema pulmonar que mimetize os aspectos patológicos apresentados em pacientes humanos.

Verificar a migração, até os pulmões, das CTMO infundidas por via sistêmica, pelo emprego da técnica de Fluorescência Direta.

Analisar a influência do tratamento com CTMO sobre o quadro inflamatório pulmonar.

Verificar a resposta fisiológica dos animais com enfisema induzido que, posteriormente, foram tratados com CTMO.

Avaliar os aspectos morfológicos dos animais com enfisema induzido que, posteriormente, foram tratados com CTMO.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram empregados camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6 de aproximadamente 8 semanas e machos C57Bl/6 de 8 semanas – “Enhanced Green Fluorescent Protein” (EGFP). Os camundongos 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 camundongos foram divididos nos seguintes grupos: animais mantidos no biotério sem nenhum tipo de tratamento (N), animais expostos à fumaça de cigarro (F), animais expostos à fumaça de cigarro que receberam meio de cultura (PL) e animais expostos à fumaça de cigarro que receberam “pool” de células mononucleares da medula óssea (BMMC). Cada grupo era composto por 15 animais. Os dados referentes aos grupos experimentais estão apresentados de forma resumida na tabela 1. O delineamento experimental pode ser visualizado na figura 1.

Tabela 1 - Grupos experimentais.

Grupo	Aparato de Exposição	Receberam Infusão
N	Não (Ar ambiente)	Não
F	Sim (Expostos à fumaça de cigarro)	Não
PL	Sim (Expostos à fumaça de cigarro)	Sim (Veículo)
BMMC	Sim (Expostos à fumaça de cigarro)	Sim (Veículo + “Pool” de CTMO)

Legenda: F - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro e que não receberam nenhum tratamento. PL - grupo em que os animais foram expostos à fumaça de cigarro e, posteriormente, receberam infusão de meio de cultura (placebo). N - grupo de animais que não foi exposto à fumaça e não recebeu nenhum tratamento. BMMC - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro que receberam tratamento com CTMO.

Delineamento Experimental

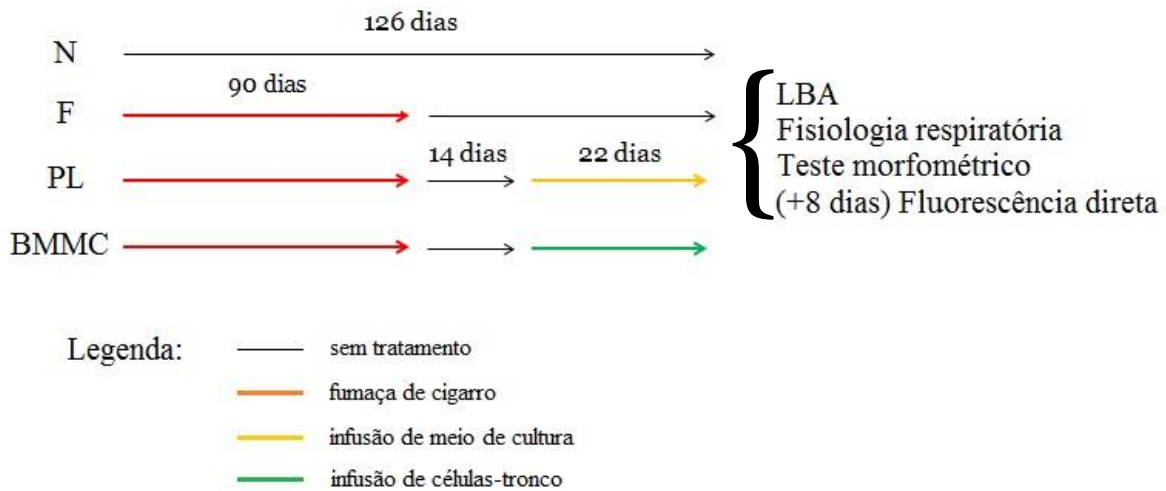


Figura 1 - Delineamento experimental. Legenda: LBA- Lavado Bronco-Alveolar. F - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro e que não receberam nenhum tratamento. PL - grupo em que os animais foram expostos à fumaça de cigarro e, posteriormente, receberam infusão de meio de cultura (placebo). N - grupo de animais que não foi exposto à fumaça e não recebeu nenhum tratamento. BMMC - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro que receberam tratamento com CTMO.

3.3 Aparato para exposição à fumaça de cigarro

O aparelho consiste em um sistema de contenção de animais e um de captação e distribuição da fumaça de cigarro (Figura 2). O sistema de contenção dos animais compreende quatro gaiolas cúbicas de metal 24 cm x 17 cm x 15 cm, superiormente fechadas, cada uma com capacidade para até 15 camundongos. O aparelho permite, desta maneira, aplicar a metodologia em um total de 60 animais simultaneamente. As quatro gaiolas encontram-se equidistantes no interior de uma caixa de acrílico (70 cm x 70 cm x 20 cm) com tampa hermeticamente fechada. 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. 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. Destarte, 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. A mangueira, já no interior da caixa de acrílico, ramifica-se, com o auxílio de um

distribuidor de vidro, em quatro direções perpendiculares coplanares de modo que cada uma das direções alimenta 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 (Kozma, 2012).

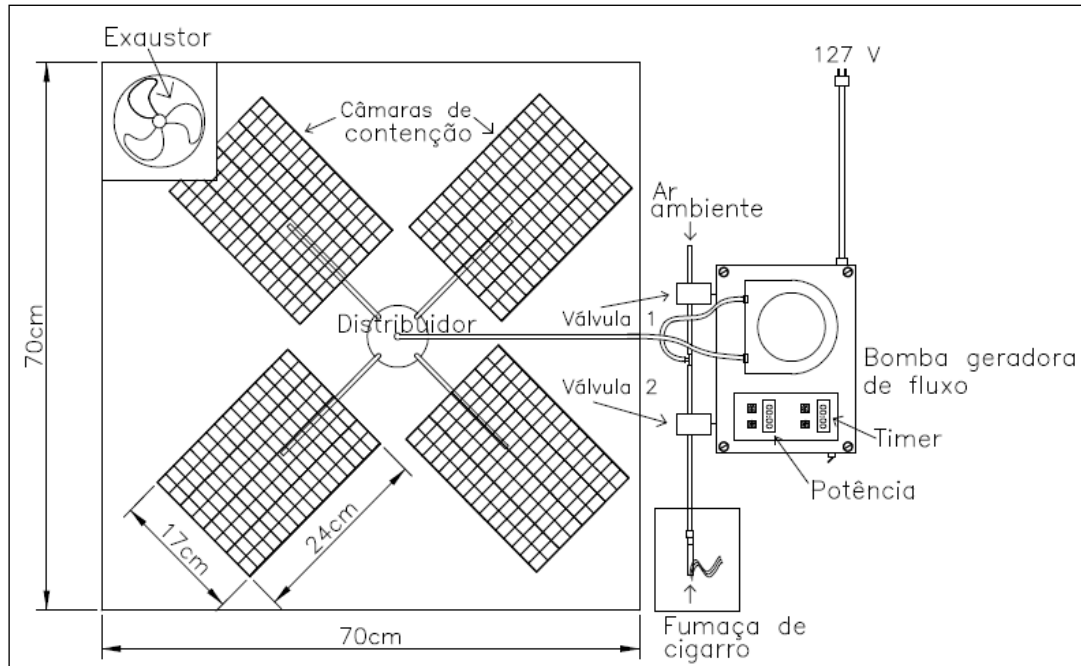


Figura 2 - Esquema do aparato para exposição à fumaça de cigarro. Vista superior do aparato. Ao lado direito pode ser observado o módulo de combustão e tragada do cigarro. À esquerda estão situadas as gaiolas para contenção dos animais, que permanecem dentro da caixa de acrílico.

Fonte: Kozma (2012).

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

Camundongos C57BL/6 fêmeas com aproximadamente 8 semanas de idade foram expostos diariamente, durante 90 dias, à fumaça de cigarro (7 dias por semana). O procedimento foi realizado três vezes ao dia, às 8, 12 e 16 horas, totalizando assim, três horas de exposição diária. Durante cada hora de exposição, eram feitas três ciclos de 20 minutos, cada ciclo apresentava 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 p.p.m durante os períodos de exposição. Foram utilizados cigarros comerciais da marca Derby - Vibrante® (Souza Cruz S. A., Rio de Janeiro, RJ, 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.

3.5 Obtenção de células mononucleares

Foram utilizados camundongos C57BL6 – EGFP+, machos, com aproximadamente 8 semanas de idade para a obtenção e isolamento das células mononucleares da medula. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para a extração dos fêmures. As epífises foram seccionadas e, com o uso de uma seringa contendo meio de cultura “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” – DMEM (LGC Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil) a medula óssea foi retirada (“flushing”). A suspensão celular foi homogeneizada em meio de cultura (DMEM) e foi separada por gradiente de densidade utilizando o SepCell (LGC Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil), mediante centrifugação durante 26 minutos a 1500 g. O concentrado contendo o “pool” de células mononucleares da medula óssea, presente na interface entre o meio de cultura e o SepCell, foi recolhido para lavagem em meio DMEM e ressuspenso. Uma alíquota foi retirada para contagem em câmara hemantimétrica de Neubauer. Em seguida foi feita a diluição das células em meio DMEM, ajustado para uma concentração final de 7×10^6 células/mL.

3.6 Transplante celular

Duas semanas após o fim da exposição à fumaça de cigarro, foi realizada a técnica para obtenção de células mononucleares. Em seguida, a solução contendo células mononucleares foi infundida por via intravenosa (veia caudal). O grupo tratado (BMCC) recebeu 0,4 mL de solução celular diluída em DMEM, na concentração de 7×10^6 céls./mL. O grupo placebo (PL) recebeu tratamento similar, porém, infundido apenas com o veículo (DMEM). A realização dos testes ocorreu 22 dias após o transplante.

3.7 Citometria de fluxo

Após a obtenção das células mononucleares da medula óssea em gradiente de densidade, uma amostra foi colhida e fixada em solução de paraformaldeído 2%. As células foram reconhecidas utilizando os anticorpos anti-Flk2-PE, anti-Sca-1-Cy7/PE e anti-c-Kit-

APC. As leituras foram realizadas no citômetro de fluxo FACsCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, Estados Unidos) e as análises realizadas no programa WinMDi 2.8.

3.8 Mecânica ventilatória

No 22º 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 Tiopentax® (Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA, São Paulo, SP, Brasil) (250 mg/kg), traqueotomizados e conectados a um ventilador para animais pequenos (flexiVent, SCIREQ, Montreal, QC, Canadá) para coleta dos dados referentes a parâmetros respiratórios.

Os animais foram ventilados com um volume corrente de 10 mL/kg e frequência respiratória de 120 ciclos/minuto. Utilizou-se um PEEP de 5 cmH₂O conectado à válvula expiratória do ventilador. Posteriormente foi induzida uma paralisia muscular através de uma injeção intraperitoneal de Brometo de Pancurônio (1 mg/kg).

Foi calculada a impedância do sistema respiratório (Z_{rs}) dos animais de cada grupo, para tanto foi utilizado um sinal de perturbação em volume de 16 segundos. A ventilação mecânica foi interrompida somente para a aplicação das perturbações. Após a perturbação, os dados foram coletados.

Foram coletados: a posição do pistão (V_{cyl}) e a pressão interna do cilindro (P_{cyl}) durante os 16 segundos de perturbação.

A perturbação de 16 segundos é composta por uma soma de senóides com frequências primas que vão de 0,25 a 19,625 Hz, evitando, assim, distorção harmônica (Hantos et al., 1992). As amplitudes das senóides decrescem hiperbolicamente com a frequência.

Para o cálculo dos dados foram feitas correções, considerando as perdas devido à compressibilidade dos gases (Bates et al., 1989). V_{cyl} foi corrigido para obtermos o volume que efetivamente chega ao animal (V) e P_{cyl} foi corrigido, nos dando o valor de P_{ao} , pressão de abertura das vias aéreas. Através da derivação no tempo de V , obtivemos o fluxo (V').

Para análise das impedâncias obtidas, utilizamos o modelo de fase constante, descrito por Hantos et al. (1992):

$$Z(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}$$

Nota: Legenda

Raw: resistência das vias aéreas

I_{aw} : inertância das vias aéreas

i : unidade imaginária,

f : frequência.

G: amortecimento/resistência do tecido pulmonar

H: elastância do tecido pulmonar

Fonte: Kozma (2012).

$$\alpha = 2/\pi \cdot \arctan(H/G)$$

Nota: Legenda

G: amortecimento/resistência do tecido pulmonar

H: elastância do tecido pulmonar

Fonte: Kozma (2012).

Diferentemente do modelo que utiliza a equação do movimento para a obtenção dos dados de resistência e da elastância do sistema respiratório, no tempo, este modelo de fase-constante considera o sistema pulmonar de forma multicompartmentar, permitindo a obtenção de parâmetros de diferentes compartimentos dos pulmões; o parâmetro Raw (resistência de vias aéreas), nos permite a análise, isoladamente das vias aéreas, sem a interferência do tecido pulmonar. O parâmetro G_{tis} avalia a resistência tecidual, enquanto que o parâmetro H_{tis} seria a elastância do tecido pulmonar.

3.9 Coleta e análise do lavado bronco-alveolar

Após o teste de fisiologia respiratória os animais foram exsanguinados, em seguida, foram instilados nos pulmões 2 alíquotas de 0,5 mL de solução fisiológica, posteriormente à cada instilação o líquido era recolhido com uma seringa. O material coletado foi centrifugado sob uma rotação de 800 g por 10 minutos a 5 °C. O botão celular foi ressuspensionado com 0.3 mL de PBS para a contagem, em câmara de Neubauer, do número total e absoluto de células por mililitro de lavado.

3.10 Procedimento para retirada dos pulmões

Após a coleta do lavado bronco-alveolar, os animais foram imobilizados em bandeja com parafina para o acesso e perfuração do diafragma. Foi aberta a caixa torácica para

liberação do conjunto coração-pulmão. Por fim acoplou-se a cânula com o pulmão ao aparato de perfusão (Barbosa de Oliveira et al., 2011).

3.11 Análise histológica

Os pulmões permaneceram por um período de 24 horas insuflados com pressão positiva constante de uma coluna líquida de 20 cm contendo uma solução de formalina a 4%, em um aparato adaptado e modificado pelo grupo do Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel (UNESP – Campus de Assis). Posteriormente, foram incubados em parafina, cortados com espessura de 5 μm e corados em hematoxilina-eosina.

3.12 Morfometria - medida do intercepto linear médio (Lm)

A avaliação histológica do enfisema pulmonar foi realizada mediante cálculo do Lm, ou seja, indicador do Intercepto linear médio, em micrômetros, consoante proposição de Weibel (1963). O intercepto linear médio é um índice do diâmetro médio dos espaços aéreos distais. Foram analisados vinte campos aleatórios não coincidentes das lâminas do tecido pulmonar em aumento de 400 vezes. Utilizando o retículo sobreposto ao parênquima pulmonar nas regiões mais periféricas do parênquima, foram contados o número de vezes que os interceptos cruzavam as paredes dos alvéolos. Foi feita uma média dos vinte campos para cada lâmina e calculado o Lm por meio da seguinte equação:

$$Lm = L_{tot} / NI$$

Onde NI = média do número de vezes que os interceptos cruzaram as paredes dos alvéolos.

O valor L_{tot} é obtido através da aferição do retículo utilizado, por meio de uma régua da fabricante Zeiss (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, LS, Alemanha). O tamanho de cada segmento de reta é medido utilizando-se a régua em um microscópio com o retículo. A somatória de todos os segmentos do retículo resulta no valor L_{tot} .

3.13 Fluorescência direta

No 30º dia após a infusão celular, dois animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical para extração dos pulmões, em ambiente com pouca luminosidade, os órgãos foram fixados com Tissue Tek, OCT® - Optimal Critical Temperature Compound (Sakura Finetek, Torrance, CA, Estados Unidos) e cortados a 3 µm de espessura, em criostato Leica CM3050 S (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Heidelberg, Baden-Württemberg, Alemanha). 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 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) (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, Göttingen, LS, Alemanha).

3.14 Análise estatística

Os resultados obtidos foram processados no software BioEstat 5.0. Utilizou-se análise de variância (ANOVA) Kruskal-Wallis - Post-Hoc Dunn com nível de significância de 5%.

3.15 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 Unesp-Campus de Assis. O projeto foi aprovado e possui número de registro: 020/2011.

4 RESULTADOS

4.1 Citometria de fluxo

A fim de avaliar a amostra de CTMO obtida por separação em gradiente de densidade, foi empregada a técnica de citometria de fluxo. As CTH de camundongo apresentam imunofenótipo Sca-1⁺, c-kit⁺ e FLK-2⁻ (Bryder et al., 2006), portanto, para quantificá-las foram empregados os anticorpos anti-Flk2-PE, anti-Sca-1-Cy7/PE e anti-c-Kit-APC. Os resultados são apresentados na Figura 3.

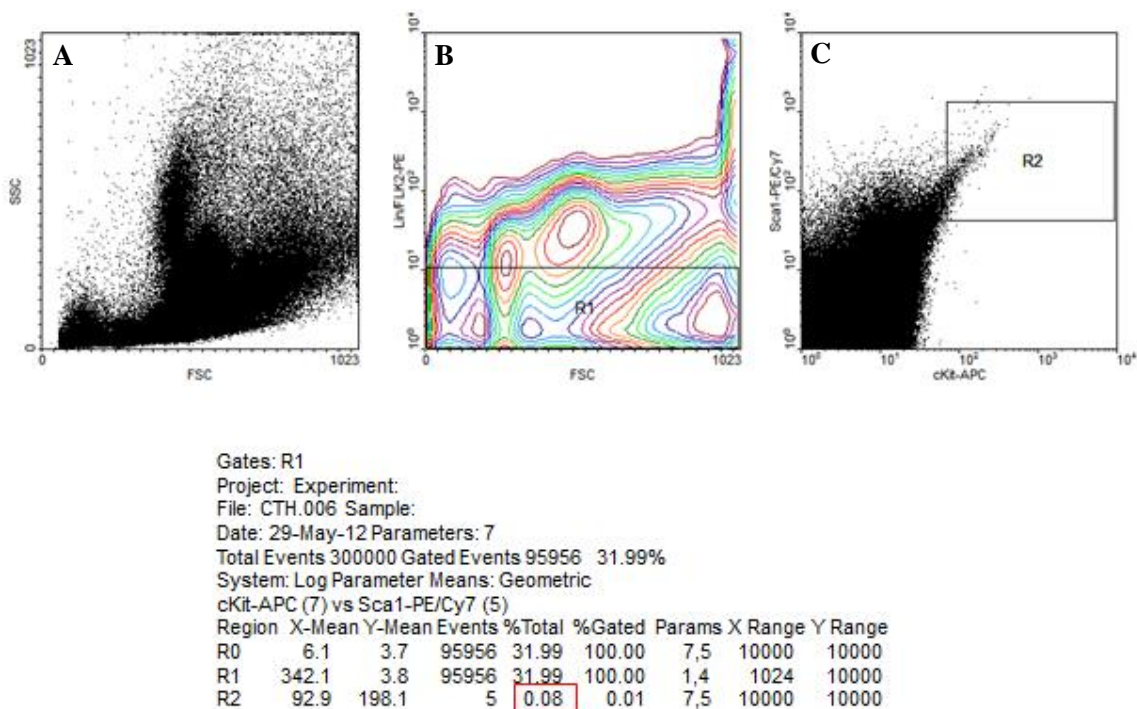


Figura 3 - Citometria de fluxo do “pool” das células mononucleares utilizadas no tratamento do grupo BMCC. Legenda: A – citograma de tamanho celular relativo (Forward Scatter Chanel “FSC” representado no eixo x) e granulosidade/complexidade relativas (Side Scatter Chanel “SSC” representado no eixo y). B – citograma representativo das leituras de anti-Flk2-PE (eixo y) e tamanho celular relativo (eixo x). C – citograma representativo das leituras de anti-Sca-1-Cy7/PE (eixo y) e anti-c-Kit-APC (eixo x). R0 – representa a população de células que apresenta tamanho celular relativo e granulosidade/complexidade relativos compatíveis com as células hematopóéticas. R1 – população de células FLK-2⁻. R2 – população de células Sca-1⁺ e c-kit⁺. Retângulo vermelho: porcentagem de células que apresentam imunofenótipo Sca-1⁺, c-kit⁺ e FLK-2⁻.

A análise dos marcadores de superfície da amostra contendo o “pool” de células mononucleares da medula óssea mostrou que 0,08% das células apresentam o imunofenótipo

Sca-1⁺, c-kit⁺ e FLK-2⁻, ou seja, 0,08% da amostra corresponde à porcentagem de CTH presentes no “pool” de células. Considerando que as CTH representam um tipo celular raro, estimado entre 0,01% e 0,001% das células presentes na medula óssea (Bonnet, 2002), pode-se afirmar que o processo de separação celular foi realizado com êxito.

4.2 Análise funcional

Com o objetivo de avaliar comparativamente os aspectos funcionais dos grupos experimentais, foi realizado o teste de mecânica respiratória. Os parâmetros avaliados foram: elastância do tecido pulmonar (H_{tis} – Figura 4), resistência do tecido pulmonar (G_{tis} – Figura 5) e resistência das vias aéreas (R_{aw} – Figura 6).

Os resultados obtidos no teste de mecânica ventilatória demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa dos parâmetros (H_{tis}, G_{tis} e R_{aw}) entre os grupos analisados. Sendo interessante ressaltar que pode ser observada uma tendência dos animais expostos à fumaça (F, PL e BMMC) apresentarem aumento dos valores de G_{tis} e R_{aw}, em relação aos animais não expostos à fumaça (N).

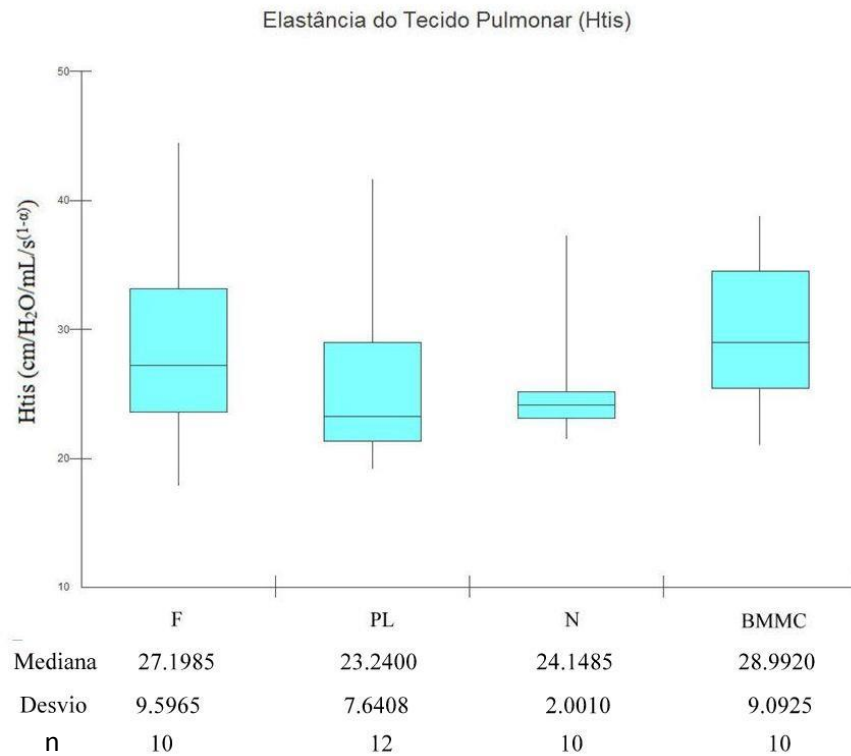


Figura 4 - Gráfico representativo dos valores de elastância do tecido pulmonar obtidos nos diferentes grupos experimentais. Legenda: F - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro e que não receberam nenhum tratamento. PL - grupo em que os animais foram expostos à fumaça de cigarro e, posteriormente, receberam infusão de meio de cultura (placebo). N - grupo de animais que não foi exposto à fumaça e não recebeu nenhum tratamento. BMMC - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro que receberam tratamento com CTMO. n - número de animais no grupo.

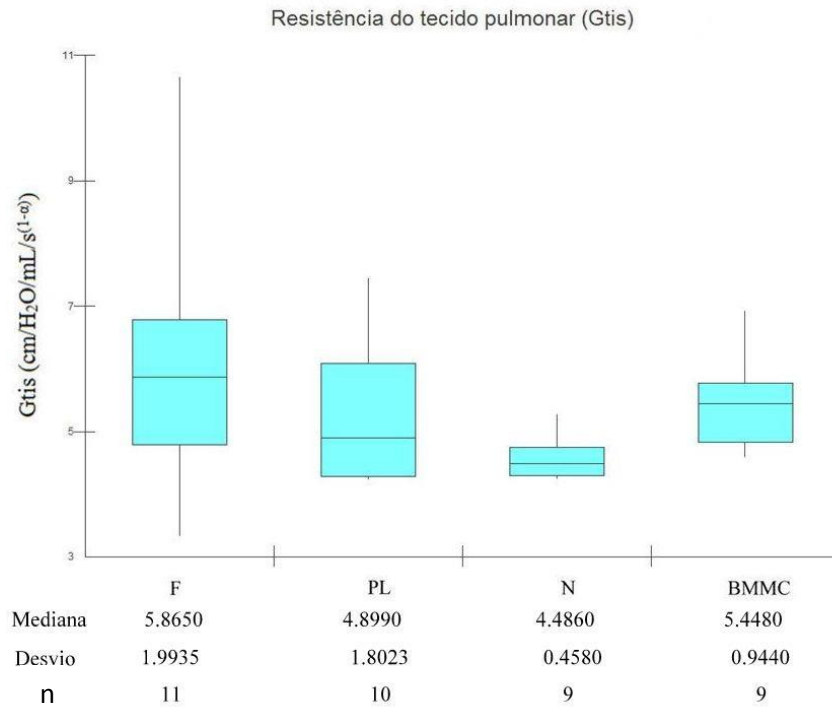


Figura 5 - Gráfico representativo dos valores de resistência do tecido pulmonar obtidos nos diferentes grupos experimentais. Legenda: F - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro e que não receberam nenhum tratamento. PL - grupo em que os animais foram expostos à fumaça de cigarro e, posteriormente, receberam infusão de meio de cultura (placebo). N - grupo de animais que não foi exposto à fumaça e não recebeu nenhum tratamento. BMMC - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro que receberam tratamento com CTMO. n - número de animais no grupo.

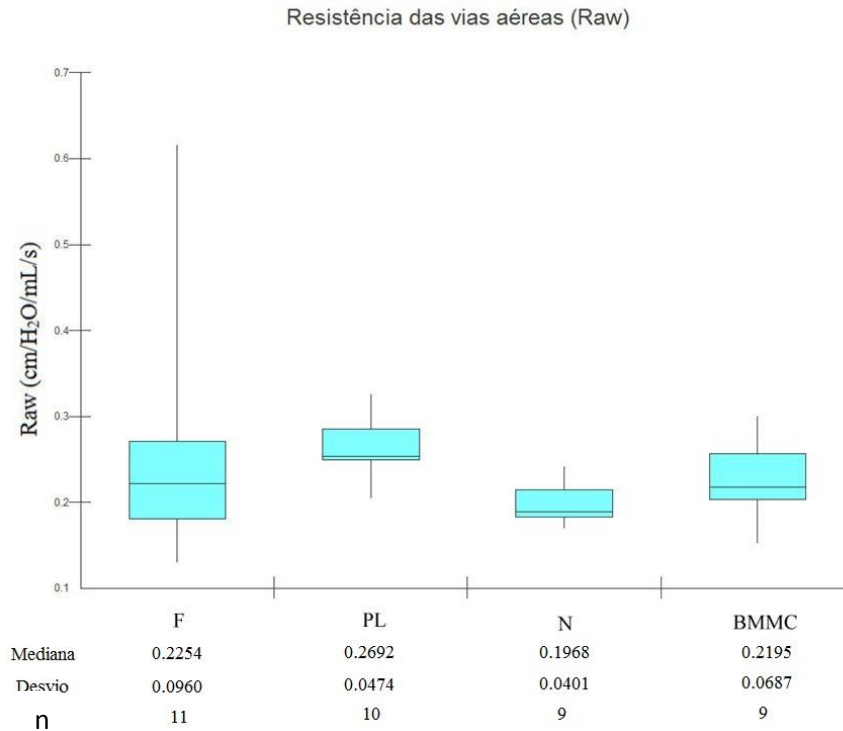


Figura 6 - Gráfico representativo dos valores de resistência das vias aéreas obtidos nos diferentes grupos experimentais. Legenda: F - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro e que não receberam nenhum tratamento. PL - grupo em que os animais foram expostos à fumaça de cigarro e, posteriormente, receberam infusão de meio de cultura (placebo). N - grupo de animais que não foi exposto à fumaça e não recebeu nenhum tratamento. BMMC - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro que receberam tratamento com CTMO. n - número de animais no grupo.

4.3 Contagem de células no lavado bronco-alveolar (LBA)

A fim de verificar uma possível influência da terapia com CTMO sobre o quadro inflamatório dos animais expostos à fumaça de cigarro, foi realizada a contagem de células presentes no lavado bronco-alveolar.

Os resultados referentes à contagem de células estão apresentados na Figura 7. Observa-se, que nos grupos cujos animais foram expostos à fumaça de cigarro (F, PL e BMMC) há uma quantidade maior de células inflamatórias em relação aos animais não expostos à fumaça (N). O grupo que recebeu tratamento com células-tronco apresentou valores mais baixos em relação a F e PL. Entretanto, apesar desses aspectos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

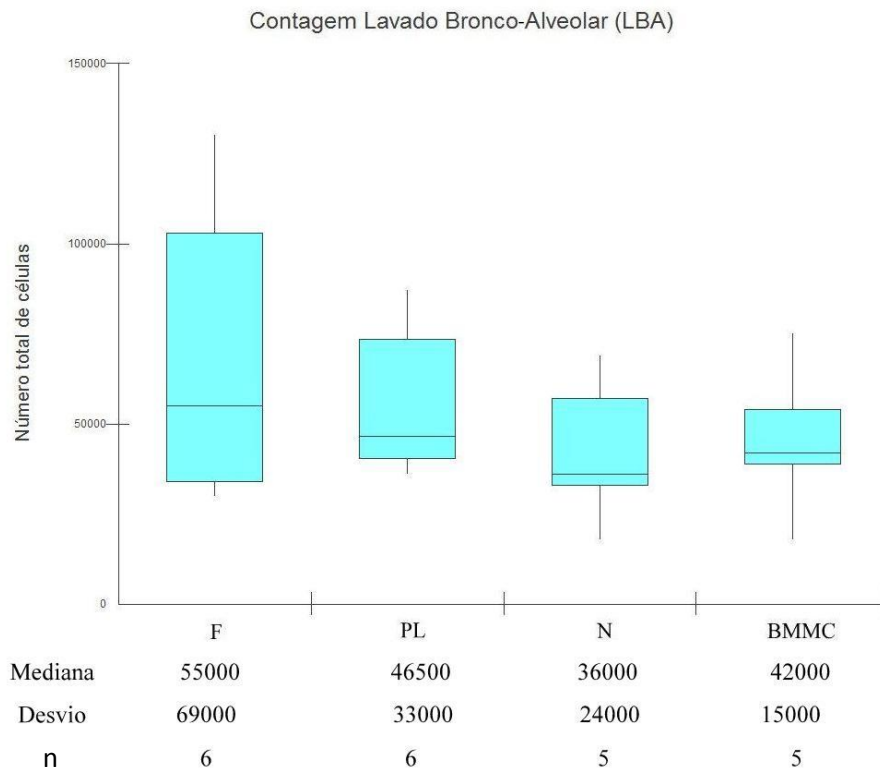


Figura 7 - Contagem do número total de células presentes no lavado bronco-alveolar dos animais. Legenda: F - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro e que não receberam nenhum tratamento. PL - grupo em que os animais foram expostos à fumaça de cigarro e, posteriormente, receberam infusão de meio de cultura (placebo). N - grupo de animais que não foi exposto à fumaça e não recebeu nenhum tratamento. BMMC - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro que receberam tratamento com CTMO. n - número de animais no grupo.

4.4 Morfologia pulmonar

Para verificar possíveis alterações na morfologia pulmonar dos animais expostos à fumaça de cigarro, bem como naqueles que receberam tratamento com células-tronco, foi empregado indicador do intercepto linear médio, conforme descrito 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. A Figura 8 apresenta os valores de Lm nos diferentes grupos experimentais.

De acordo com a Figura 8, há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre F (33.7838 ± 7.0028) e N (27.1739 ± 4.4461). Desse modo, a indução do enfisema pulmonar por exposição à fumaça resultou em alterações morfológicas características da doença. A fim de reforçar esse achado, pode-se realizar uma comparação qualitativa entre as lâminas dos pulmões pertencentes aos grupos N e F. A Figura 9-B corresponde a um animal pertencente

ao grupo F, na imagem podem ser observados alvéolos dilatados quando comparados aos encontrados na Figura 9-A, que corresponde a um pulmão pertencente a um animal do grupo N. Outro aspecto patológico característico do enfisema pulmonar notado na Figura 9-B (asterisco vermelho) é a presença de macrófagos.

Conforme a Figura 8, 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. As semelhanças morfológicas encontradas ao se comparar as lâminas referentes aos pulmões de F (Figura 9-B) e PL (Figura 9-C) reforçam esse achado.

O grupo BMMC (27.4758 ± 4.4461) apresentou uma redução significativa no valor de Lm em relação aos animais dos grupos F (33.7838 ± 7.0028) e PL (34.7222 ± 6.6288) (Figura 8). Em concordância a estes resultados, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de Lm de BMMC (27.4758 ± 4.4461) e o grupo controle N (27.1739 ± 5.2521). Desta forma, o tratamento com CTMO foi capaz de restaurar a arquitetura do parênquima pulmonar. As semelhanças morfológicas encontradas ao comparar as lâminas referentes aos grupos N (Figura 9-A) e BMMC (Figura 9-D) reforçam esse achado.

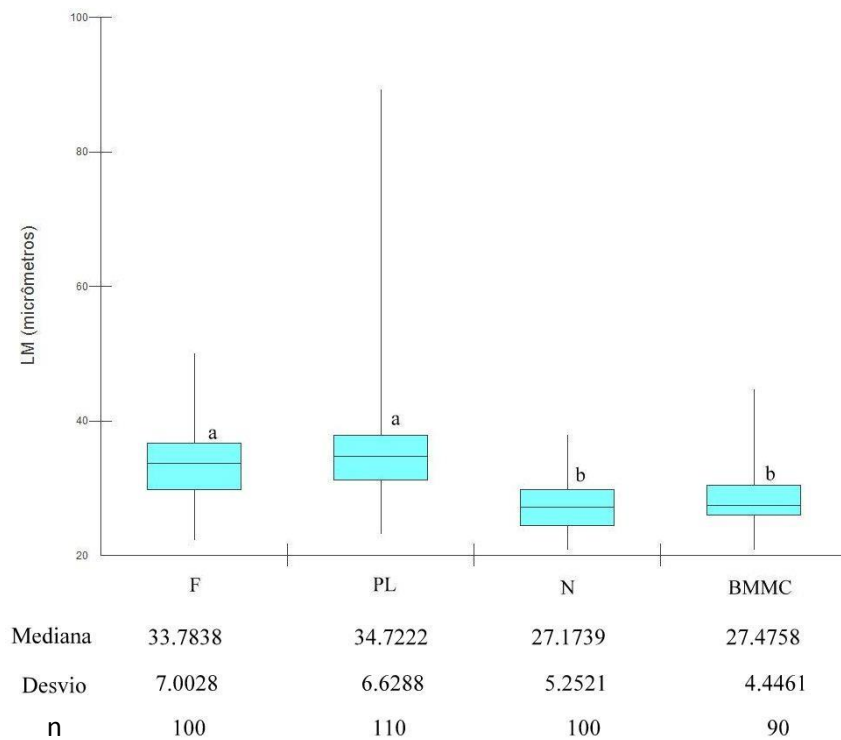


Figura 8 - Gráfico dos valores de intercepto linear médio (Lm). Legenda: F - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro e que não receberam nenhum tratamento. PL - grupo em que os animais foram expostos à fumaça de cigarro e, posteriormente, receberam infusão de meio de cultura (placebo). N - grupo de animais que não foi exposto à fumaça e não recebeu nenhum tratamento. BMMC - grupo de animais expostos à fumaça de cigarro que receberam tratamento com CTMO. n - número de animais no grupo. Letras diferentes $p < 0,001$.

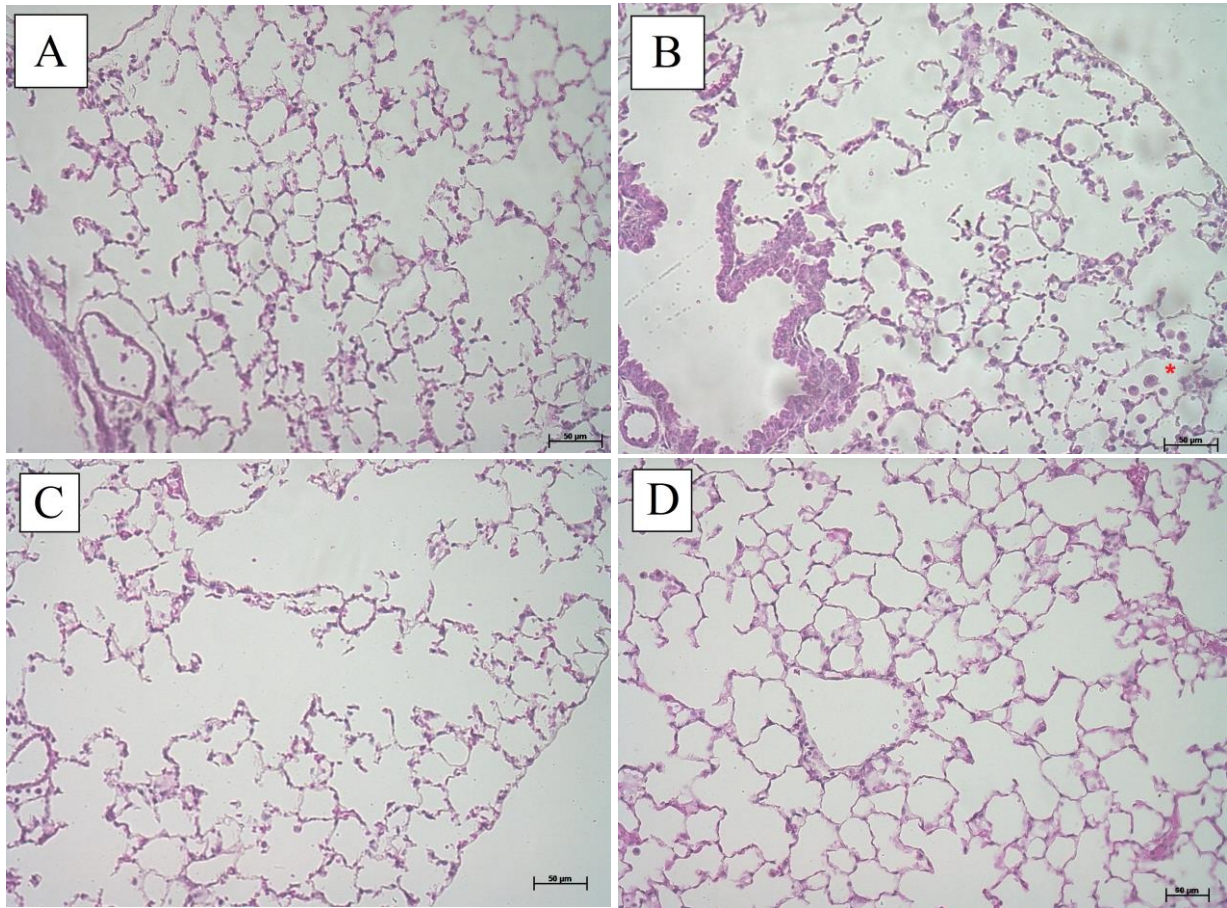


Figura 9 - Fotomicrografia dos pulmões nos diversos grupos experimentais. Legenda: A - foto correspondente a um corte histológico do grupo que não foi exposto à fumaça e não recebeu nenhum tratamento (N). B - foto de um corte histológico do grupo exposto à fumaça de cigarro que não receberam nenhum tratamento (F). C - foto de um corte histológico do grupo que foi exposto à fumaça de cigarro e, posteriormente, recebeu infusão de meio de cultura (PL). D – foto de um corte histológico do grupo exposto à fumaça de cigarro que recebeu tratamento com CTMO (BMMC). Asterisco vermelho (em B) indica infiltrado inflamatório. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Aumento: 200x.

4.5 Fluorescência direta

Buscando rastrear as CTMO infundidas, foi utilizada a análise da fluorescência direta em microscópio confocal. As lâminas foram tratadas com DAPI, que marca os núcleos celulares (em azul) e possibilita a visualização do tecido pulmonar. As células mononucleares possuem fluorescência (cor verde), uma vez que expressam a proteína EGFP.

Como pode ser observado na Figura 10, houve marcação dos núcleos com DAPI (azul). O grupo N, que não recebeu infusão celular, não apresentou fluorescência e representa o controle negativo (Figura 10-A). Já o grupo BMMC (Figura 10-B), que foi tratado com células-tronco marcadas, apresentou fluorescência verde característica do EGFP, bem como a

marcação dos núcleos pelo DAPI. A detecção da proteína EGFP indica que as CTMO administradas migraram para os pulmões dos animais.

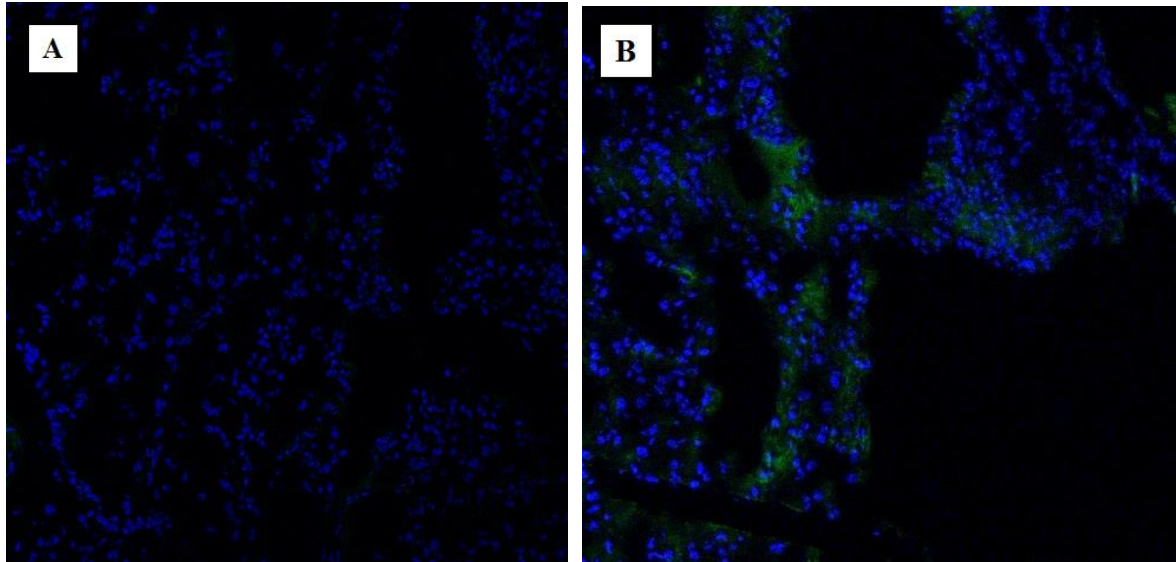


Figura 10 - Análise do tecido pulmonar com microscopia de fluorescência confocal. Legendas: A – fotomicrografia do pulmão de um animal pertencente ao grupo que não recebeu infusão de CTMO (N) e representa o controle. Apresenta núcleos corados por DAPI (em azul). B – fotomicrografia do pulmão de um animal pertencente ao grupo exposto à fumaça de cigarro que recebeu infusão de CTMO marcadas com EGFP (BMMC). Apresenta núcleos corados por DAPI (em azul), bem como fluorescência EGFP (em verde). Aumento: 200x.

5 DISCUSSÃO

A indução do enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro representa, em relação aos demais métodos de indução, o modelo que melhor mimetiza as condições patológicas dos pacientes acometidos por enfisema. Diferentemente dos outros métodos, a exposição à fumaça do cigarro estimula as células de defesa nos pulmões, que resulta no acúmulo do infiltrado inflamatório, com conseqüentemente liberação de enzimas proteolíticas responsáveis pelo desequilíbrio entre proteases e antiproteases. O padrão de degeneração do parênquima pulmonar, nesse caso, é do tipo crônico, com infiltrado inflamatório característico (Wright et al., 2008).

O modelo animal adotado neste trabalho busca mimetizar os aspectos encontrados em pacientes tabagistas. Seguindo esse foco, foi realizada a exposição diária à fumaça de cigarro (durante os sete dias da semana). Além disso, estabeleceu-se a exposição dos animais três vezes ao dia (manhã, tarde e início da noite) com a finalidade de manter um hábito tabagista frequente. O período total de exposição adotado (90 dias – 3 meses) está fundamentado na busca de um modelo que apresente maior reprodutibilidade em relação ao tempo. Os modelos animais encontrados na literatura, em geral, adotam o período total de 6 meses (Gosker et al., 2009; Guerassimov et al., 2003; Maeno et al., 2007; Schweitzer et al., 2011), podendo ser encontrados trabalhos em que a exposição pode chegar a 9 meses (Marumo et al., 2009).

Em relação ao aparato utilizado, buscou-se desenvolver um equipamento que se apresentasse eficiente, para o propósito do projeto, de fácil operação e, do ponto de vista econômico, de baixo custo em relação aos aparatos congêneres disponíveis no mercado (Kozma, 2012). A fumaça bombeada para a câmara de contenção dos animais resulta da aspiração ou sucção do cigarro, mimetizando, deste modo, a “tragada” de um fumante ativo. No aparato, toda superfície corpórea dos animais está exposta à fumaça. Embora esse procedimento apresente críticas e questionamentos (Wright et al., 2008), a adoção dessa conduta foi uma tentativa de minimizar o acentuado estresse e sofrimento dos animais quando se empregou, numa fase inicial do projeto, a contenção dos animais para exposição nasal direta à fumaça. Foi proposto, portanto, um sistema de contenção que realiza função intermediária entre contenção total (aspiração nasal) e ausência de contenção (exposição do corpo todo), desse modo, o animal fica confinado em um espaço que possibilita sua movimentação e recebe fluxo constante da aspiração do cigarro. Dentre os aspectos promissores referentes ao equipamento, devem ser ressaltados a praticidade, a funcionalidade

e o baixo custo. O aparato possui manuseio simples, os animais são colocados facilmente nos contentores. Podem ser acomodados, com conforto, até 60 animais (camundongos) em uma única sessão de exposição. Por fim, o custo do equipamento é baixo quando comparado aos demais aparatos. Outro aspecto interessante é a possibilidade de utilizar animais maiores, Kozma (2012) realizou a indução do enfisema pulmonar em ratos Wistar expondo os animais à fumaça de cigarro por 28 semanas.

O modelo animal de indução de enfisema pulmonar utilizado neste estudo apresentou o desenvolvimento de alterações histomorfológicas características da doença. Da mesma maneira, Rinaldi et al. (2011) realizaram a indução do enfisema pulmonar expondo camundongos C57Bl6 diariamente à fumaça de cigarro durante um período total de 90 dias. Em relação à fisiologia respiratória, no presente estudo, não puderam ser observadas alterações patológicas em nível estatístico, contudo, verifica-se nas Figuras 5 e 6, que o modelo animal adotado apresentou uma tendência ao aumento da resistência pulmonar, bem como da resistência nas vias aéreas. Deve-se ressaltar que o uso dos testes funcionais é uma ferramenta válida para avaliação do desenvolvimento do enfisema pulmonar em modelos experimentais. Entretanto, trata-se, nas condições e aparatos atualmente disponíveis, de uma metodologia com menor sensibilidade relativamente à análise morfológica (Lm), esta sim, com uma maior capacidade de resolução no que se refere à capacidade de verificação de danos causados ao parênquima. De acordo com Wrigth et al. (2008), animais que possuem enfisema moderado ou médio geralmente apresentam valores funcionais normais se comparados a animais saudáveis, enquanto que somente animais com grau avançado da doença possuem parâmetros respiratórios alterados de forma significativa. Essa proposição foi comprovada por diversos grupos de pesquisa. Foronjy et al. (2005) realizaram a exposição de duas linhagens de camundongos C57 à fumaça de cigarro por longo tempo, gerando aumento significativo nos valores de Lm desses animais em relação aos seus respectivos grupos controle. Apesar disso, não houve alteração nos parâmetros respiratórios dos animais expostos em relação aos grupos controles. Desse modo, sabe-se que os métodos de análise funcional existentes correspondem a ferramentas válidas para análise do enfisema pulmonar, visto que, são encontrados resultados consistentes na literatura. Entretanto, é proposto que em determinadas circunstâncias, os testes de fisiologia respiratória em pequenos animais podem não apresentar resultados estatisticamente significativos.

Em relação ao quadro inflamatório pulmonar, observado nas análises do lavado bronco-alveolar (figura 7), os animais expostos à fumaça de cigarro apresentaram quantidades

superiores de células inflamatórias em relação aos animais não expostos à fumaça. Contudo, os valores obtidos não possuem diferença estatística. Deve-se ressaltar que o sacrifício dos animais ocorreu 36 dias (5 semanas) após o fim da exposição à fumaça de cigarro. Os estudos de Braber et al. (2010) demonstraram que camundongos da linhagem A/J expostos à fumaça de cigarro por 20 semanas, apresentaram redução do quadro inflamatório 8 semanas após o fim da exposição. Com isso, é interessante ressaltar que os 36 dias (5 semanas) de espera para as análises possam ter resultado na redução do quadro inflamatório.

A terapia celular com CTA apresenta-se, atualmente, como uma alternativa promissora no tratamento do enfisema pulmonar (Caramori et al., 2012; D'Agostino, 2010; Hind e Maden, 2011; Moodley et al., 2011; Ribeiro-Paes et al., 2009; Xian e McKeon, 2012). Neste estudo, empregou-se a infusão do “pool” de células mononucleares da medula óssea em animais cujo hábito tabagista foi cessado por um breve período (14 dias), buscando simular o que acontece em pacientes humanos, ou seja, os pacientes tabagistas podem parar de fumar, sendo que a doença mantém seu curso progressivo, com sintomatologia surgindo vários anos após a cessação do hábito tabagista. Considerando proporcionalmente o tempo de vida entre as espécies (homem e camundongo), o período de 14 dias para um camundongo corresponderia a aproximadamente 2 anos sem tabagismo para um paciente humano.

Os resultados referentes à morfologia pulmonar mostram, qualitativamente e quantitativamente, a recuperação histomorfológica do parênquima pulmonar nos animais que passaram pela indução do enfisema e receberam tratamento com “pool” de células mononucleares (BMMC). Este achado foi confirmado anteriormente por outros autores (Faria et al., 2012; Katsha et al., 2011; Longhini-dos-Santos et al., 2012; Rojas et al., 2005; Ribeiro-Paes et al., 2012; Schwetizer et al., 2011).

A fim de rastrear as células infundidas, foram utilizadas CT da medula óssea de camundongos machos da linhagem EGFP com background C57Bl6/J. Pelo emprego da fluorescência direta em microscópio confocal, puderam ser observados eventos de fluorescência característicos da proteína EGFP (Figura 10), desse modo, pode-se constatar que as células-tronco mononucleares administradas migraram para os pulmões, permanecendo no órgão por até 30 dias (período entre a infusão e sacrifício). Em relação a esse período, há relatos na literatura que reportam a presença das CT nos pulmões por períodos de até 120 dias (Katsha et al., 2011; Kotton et al., 2001; Krause et al., 2008; Longhini-dos-Santos et al., 2012; Rojas et al., 2005; Schweitzer et al., 2011; Wong et al., 2007). Com o objetivo de confirmar os resultados obtidos pelo emprego da técnica de fluorescência direta, será empregada a

técnica de PCR para amplificar o locus SRY presente nas células infundidas (doadores machos). De acordo com os estudos de Wong et al. (2007) as CTMO podem ser detectadas nos pulmões a partir de 24 horas após a infusão, sendo que a migração está associada a liberação de quimiocinas e mediadores celulares relacionados ao processo de regeneração, originados por algum trauma ou lesão tecidual (Giangreco et al., 2009; Sueblivong et al., 2009). Neste estudo, sugere-se que a exposição crônica ao cigarro ocasionou um processo inflamatório, responsável pela liberação de proteases que causaram lesões no tecido pulmonar, mediante essas condições, as CTMO receberam o estímulo adequado para migração e atuação no parênquima pulmonar.

Associando a presença das células mononucleares nos pulmões com a recuperação da morfologia pulmonar apresentada pelos animais tratados, é possível inferir que as células administradas tem função terapêutica. Os mecanismos pelos quais as CT atuam para recuperar tecidos danificados ainda não foram totalmente desvendados. Dentre as hipóteses elaboradas para explicar esses mecanismos, proposições como a transdiferenciação, diferenciação (Krause et al., 2001; Kotton et al., 2001; Abe et al., 2004) e fusão (Neuringer et al., 2004) tem sido contestadas. Estudos atuais sugerem fortemente que as CTA possuem efeito parácrino, desse modo, atuam liberando fatores de crescimento ou substâncias de atividade anti-inflamatória (Katsha et al., 2011; Rojas et al., 2005; Schweitzer et al., 2011). Na presente pesquisa, foi notado que os animais expostos à fumaça de cigarro apresentaram grande quantidade de células inflamatórias nos pulmões, contudo, observou-se no grupo tratado com CTMO (BMMC) uma redução na quantidade dessas células. A partir desses achados, é possível propor que as CTMO podem possuir efeito parácrino.

O conjunto de dados obtidos neste estudo mostra que o tratamento com CTMO resulta na recuperação significativa da histologia pulmonar em animais expostos à fumaça de cigarro. Desse modo, padronizou-se neste estudo, um modelo de indução do enfisema por exposição à fumaça de cigarro eficiente e reprodutível. Além disso, o aparato empregado para indução do enfisema apresenta, entre outras características, fácil manuseio e baixo custo em relação aos modelos comerciais disponíveis no mercado.

REFERÊNCIAS*

Abe S, Boyer C, Liu X, et al. Cells derived from the circulation contribute the repair of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:1158-63.

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.

Barbosa da Fonseca LM, Battistella V, de Feitas GR, Gutfilen B, Dos Santos Goldenberg RC, et al. Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after intra-arterial delivery in patients with chronic stroke. *Circulation*. 2009;120:539-41.

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 cellular mechanisms. *Eur Resp J*. 2003;22:672-88.

Bates JHT, Abe T, Romero PV, Sato J. Measurements of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. *J Appl Physiol*. 1989;67:488-92.

Bonnet D. Hematopoietic stem cells. *J Pathol*. 2002;197:430-40.

Bortin MM, Bach FH, van Bekkum DW, et al. 25th Anniversary of the first successful allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant*. 1994;14:211-2.

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;177:4350-9.

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.

Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cell. Paradigmatic tissue-specific stem cell. *The Am J of Pathology*. 2006;169(2):338-46.

Buckner CD, Epstein RB, Rudolph RH, et al. Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation a patient with leukemia. *Blood*. 1970;35:741-50.

*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(4):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.

Cendon S, Battlehner C, Lorenzi-Filho G, Dohnnikoff M, Pereira P, Conceição G, et al. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30:1241-7.

Churg A, Cosio M, Wright JL. Mechanisms of Cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. *Am J Physiol Lung Cel Mol Physiol.* 2008;294:612-31.

Cosio BG, Agustí A. Update in chronic obstructive pulmonary 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):681-7.

Dawkins PA, Stockley RA. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2001;56:972-7.

Demets DL, Lan KKG. Interim analysis: 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;3:33-46.

Dohmann HF, Perin EC, Takiya CM, Silva GV, Silva SA, Sousa AL, et al. Transendocardial autologous bone marrow mononuclear cell injection in ischemic heart failure: postmortem anatomicopathologic and immunohistochemical findings. *Circulation.* 2005;112:521-6.

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):315-7.

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.* 2012;8:1236-44.

Flo C, Lopes FDTQS, Kasahara DI, Silva ACD, Jesus RCC, Rivero DHRF, et al. Effects of exercise training on papain-induced pulmonary emphysema in wistar rats. *J Appl Physiol.* 2006;100:2815.

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.

Forraz N, Wright K, Jurga M, McGuckin C. Experimental therapies for repair of the central nervous system: stem cells and tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012 Mar 30. Doi:10.1002/term.552.

Fujita M, Nakanishi Y. The pathogenesis of COPD: lessons learned from in vivo animal models. *Med Sci Mon.* 2007;13:19-24.

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.

Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HK, et al. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet.* 1968;2:1366-9.

Giangreco A, Arwert EN, Rosewell IR, Snyder J, Watt FM, 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 Lung Disease - GOLD. [Internet]. Executive Summary: Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. 2013 [cited from: 2013 Mar 22]. Available from: <www.goldcopd.com>.

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;40:710-6.

Gross P, Pfitzer E, Tolker M. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. *Arch Environ Health.* 1965;11:50-8.

Guerassimov A, Hoshino M, Takubo Y, Turcotte A, Yamamoto M, Ghezzi 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.

Hantos Z, Daróczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol.* 1992;72(1):168-78.

Hind M, Maden M. Is a Regenerative Approach Viable for the Treatment of COPD? *Br J Pharmacol.* 2011;163(1):106-15.

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):L255-66.

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;556(1-3):249-52.

Jardim JR, Nascimento OA. Epidemiologia, impacto e tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) no Brasil. *Revista Racine*. 2006 [cited from: 2013 Jan 10]. Available from: <www.racine.com.br>.

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

Kahler CM, Wechselberg J, Hilbe W, Gschwendtner A, Colleselli D, Niederegger H, Boneberg E, Spizzo G, Wendel A, Gunsilius E, Patsch JR, Hamacher J. Peripheral infusion of rat bone marrow derived endothelial progenitors cells leads to homming in acute lung injury. *Respiratory Research*. 2007;8:50.

Kalil RA, Ott D, Sant'Anna R, Dias E, Marques-Pereira JP, Delgado-Cañedo A, et al. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear stem cells by minithoracotomy in dilated cardiomyopathy: technique and early results. *São Paulo Med J*. 2008;126:75-81.

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 Bul*. 2008;31:1434-8.

Kielty C, Raghunath M, Siracusa L, Sherratt M, Peters R, Shuttleworth C, Jimenez S. The tight skin mouse: demonstration of mutant. brillin-1 production and assembly into abnormal microfibrils. *J Cell Biol*. 1998;140:1159-66.

Kirschstein R, Skirboll LR. Stem cells: scientific progress and future research directions. National Institutes of Health, Department of Health and Human Services. 2001 [cited 2010 mar 31]. Available from: <<http://stemcells.nih.gov/info/basics>>.

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):5181-8.

Kozma R; et al. 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-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001;105:369-7.

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 Investigation*. 2007;117:989-96.

Lee J, Sandford A, Man P. Is the aging process accelerated in chronic obstructive pulmonary disease? *Curr Opin Pulm Med*. 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(1):9-14.

Leuenberger P, Anderhub HP, Brandli O, Keller R, Knoblauch A, Kuhn M, et al. Management 1997 of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Working group of the swiss society of pneumology. *Schweiz Med Wochenschr*. 1997;127(18):766-82.

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*. 2012 Dec 16. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23242964.

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.

Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Braga EL, Oliveira SA, Fortes MF, et al. Infusion of autologous marrow mononuclear cells through hepatic artery results in short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009, in press.

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.

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

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

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.

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;178:8090-6.

Maron-Guiterrez T, Lassance RM, Prota LFM, Castiglione RC, Xisto DG, Abreu SC, et al. Cellular therapy in a murine model of silicosis. *Pôsters do II Simpósio Internacional- Terapias Avançadas e Células tronco*; 2007; Rio de Janeiro, RJ. Rio de Janeiro, RJ; 2007. p. 17-23.

Murray CJL, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet.* 1997;349:1269-76.

Martorana PA, van Evan P, 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, Hosino Y, 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.

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

Neuringer IP, Randell SH. Stem cells and repair of lung injuries. *Respiratory Research.* 2004 [Cited 2010 Jul 13];5:6. Available from: <<http://respiratory-research.com/content/5/1/6>>.

Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JAI, Ware CB, Masino A, et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *The FASEB Journal.* 2007;21:1345-57.

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.

Osiris Therapeutics reports interim data for COPD stem cell study. 2009 [cited 2010 May 10]. Available from <<http://osir.client.shareholder.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=391580>>.

Prokhorova TA, Harkness LM, Frandsen U, Ditzel N, Schroder HD, Burns JS, Kassem M. Teratoma formation by human embryonic stem cells is site dependent and enhanced by the presence of matrigel. *Stem Cells Dev.* 2009;18(1):47-54.

Ribeiro-Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Alves-de-Moraes LB, Stessuk T, Faria CA. Terapia celular em doenças pulmonares: existem perspectivas? *Rev Bras Hematol Hemoter.* 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. *Int J 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 CK, editor. Chronic obstructive pulmonary disease: current concepts and practice. Croácia: InTech; 2012. Cap 23. p.455-74.

Rinaldi M, Maes K, Vleeschauwer S, Thomas D, Verbeken EK, Decramer M, et al. Long-term nose-only cigarette smoke exposure induces emphysema and mild skeletal muscle dysfunction in mice. *Dis Model Mech*. 2012;5:333-41.

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.

Rufino R, Lapa e Silva JR. cellular and biochemical bases of chronic obstructive pulmonary disease. *J Bras Pneumo*. 2006;32(3):241-8.

Russel RE, Thorley A, Culpitt SV. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metallo-proteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283:1867-73.

Sangani RG, Ghio AJ. Lung injury after cigarette smoking is particle related. *Int J COPD*. 2011;6:191-8.

Schweitzer KS, Johnstone BH, Garrison J, Rush NI, Cooper S, Traktuev DO, et al. 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.

Shapiro S. Animal models for COPD. *Chest*. 2000;117:223-7.

Shigemura N, Okumura M, Mizuno S, Imanishi Y, Matsuyama A, Shiono H, et al. Lung tissue engineering technique with adipose stromal cells improves surgical outcome for pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:1199-205.

Silva SA, Haddad AF, Moreira RC, et al. Melhora clínica sustentada após o transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea (TACMMO) em pacientes com insuficiência cardíaca isquêmica grave – seguimento de 4 anos. Posters do II Simpósio Internacional – Terapias Avançadas & Células tronco; 2007; Rio de Janeiro, RJ. Rio de Janeiro, RJ; 2007, p. 37-68.

Stem cell basics. In stem cell information [World Wide Web site]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2009 [cited 2012 Jul 10]. Available from <<http://stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage>>.

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.

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, et al. Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:318-22.

Teo AK, Vallier L. Emerging use of stem cells in regenerative medicine. *Biochem J.* 2010;428(1):11-23.

Thomas ED, Buckner CD, Storb R, et al. Aplastic anaemia treated by marrow transplantation. *Lancet.* 1972;1:284-9.

Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood.* 1977;49:511-33.

Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 2011;175(2):145-9.

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.* 2012;39(2):254-64.

Tuder RM, McGrath S, Neptune E. The pathobiological mechanisms of emphysema models: what do they have in common? *Pulm Pharmacol Ther.* 2003;16:67-78.

Vlahos R, Bozinovski S, Gualano RC, Ernst M, Anderson GP. Modelling COPD in mice. *Pulm Pharmacol Ther.* 2006;19:12-7.

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

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.

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.

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, et al. Targeted cell replacement with bone marrow cells for airway epithelial regeneration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293:740-52.

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

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

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.