CAROLINA ARRUDA DE FARIA

**Terapêutica experimental com células mononucleares da medula óssea em modelo
animal de 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
2011

CAROLINA ARRUDA DE FARIA

**Terapêutica experimental com células mononucleares da medula óssea em modelo
animal de 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:
Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

Versão Original

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Faria, Carolina Arruda de.

Terapêutica experimental com células mononucleares da medula óssea em modelo animal de enfisema pulmonar / Carolina Arruda de Faria. -- São Paulo, 2011.

Orientador: 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: Terapia celular.

Versão do título para o inglês: Experimental therapy with bone marrow mononuclear cells in na animal model of pulmonary emphysema.

Descritores: 1. Célula-tronco 2. Pulmão 3. Enfisema pulmonar animal 4. Células da medula óssea 5. Modelos animais 6. I. Paes, João Tadeu Ribeiro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butanta III. Título.

ICB/SBIB0141/2011

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

Candidato(a): Carolina Arruda de Faria.

Título da Dissertação: Terapêutica experimental com células mononucleares da medula óssea em modelo animal de enfisema pulmonar.

Orientador(a): 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:

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CEP/FCL/UNESP/CAMPUS DE ASSIS

Processo nº 480/2009

Registro no CEP nº 013/2009

Título da Pesquisa: "TERAPÊUTICA COM CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM MODELO EXPERIMENTAL DE ENFISEMA PULMONAR"

Pesquisador Responsável: CAROLINA ARRUDA DE FARIA

Acadêmico: JOÃO TADEU RIBEIRO PAES

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa acima especificado, apresentado a este Comitê de Ética em Pesquisa, foi enquadrado na seguinte categoria:

- ☒ **Aprovado.**
- ☐ **Com pendência**, recomendando-se uma revisão específica ou solicitando-se modificações ou informações relevantes, conforme parecer do relator, que deverão ser atendidas pelo pesquisador no prazo máximo de 60 dias, contados a partir desta data.
- ☐ **Não aprovado.**
- ☐ **Retirado**: quando, transcorrido o prazo, o protocolo permanece pendente.

Resumo dos pareceres dos Relatores (em casos especiais, o parecer será anexado a este formulário, assegurado o sigilo da identidade do relator).

PROPOSIÇÃO OU OBJETIVOS – O objetivo proposto é claro e pode ser testado experimentalmente, a saber: avaliar os efeitos morfométricos da inoculação de células mononucleares da medula óssea (BMMC) em diferentes doses em camundongos submetidos à indução experimental de enfiseма pulmonar por meio de elastase.

A hipótese proposta é a de que as células da medula óssea seja atraídas ao local da lesão pulmonar por fatores quimiotáticos e que sejam capazes de regenerar o tecido lesionado.

REVISÃO DA LITERATURA – Atualizada e abrangente. Apresenta de forma clara a fundamentação e importância do trabalho proposto. No entanto, falta a inserção de três autores na citação bibliográfica: Hautamaki et al. (1997); Miguell et al. (2001) e Suratt et al. (2003), os quais são citados na metodologia.

MATERIAL E MÉTODOS – A metodologia está bem descrita. Os animais serão subdivididos em duas fases de experimentação, com 8 grupos na Fase I (80 fêmeas) e 7 grupos na Fase II (100 fêmeas e 60 machos), totalizando-se 240 camundongos. Serão efetuadas várias análises (histológica, morfométrica, histoquímica e

imunohistoquímica) do tecido pulmonar, assim como o emprego da técnica de FISH para rastreamento e verificação da migração de células para o pulmão.

As condições de alojamento serão adequadas à espécie, a saber: grupos de cinco animais serão acondicionados em caixa de polipropileno, em biotério com sistema de exaustão, a temperatura de 22° C e ciclo claro-escuro 12:12h. Os animais receberão ração industrial e a água será suplementada com 12 gotas de Vitagold®/200 ml.

O laboratório do orientador possui a infra-estrutura necessária ao desenvolvimento da pesquisa.

A duração prevista do projeto é de 18 meses.

CURRÍCULO DO PESQUISADOR – A pesquisadora (aluna de Mestrado) tem conhecimento das técnicas a serem aplicadas no projeto, já que trabalhou na mesma linha de pesquisa na execução de sua monografia. O orientador da pesquisa possui amplo conhecimento na área a qual está inserida a pesquisa.

PARECER FINAL - O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Letras – UNESP/Assis, após acatar os pareceres dos membros-relatores, previamente designados, e as discussões realizadas, atendendo o disposto no Regimento Interno do Comitê considerou o protocolo **APROVADO**.

RELATÓRIOS – De acordo com o Inciso III do artigo 20 do Regimento Interno do CEP, o pesquisador responsável assume o compromisso do envio de Relatórios Parciais e/ou Final de sua pesquisa, informando o andamento da mesma e comunicando, também, eventos adversos e eventuais modificações no protocolo. **O não encaminhamento dos relatórios, nos prazos estabelecidos pelo CEP, implicará no impedimento temporário da apresentação de novos protocolos pelo pesquisador responsável, até que este regularize a situação pendente.** O formulário para apresentação do relatório pode ser encontrado na página do Comitê de Ética em Pesquisa/ formulários (<http://www.assis.unesp.br>).

Os Relatórios deverão ser apresentados, em 03 (três) vias, nas seguintes datas:

Até Dezembro de 2009 – Relatório Parcial

Até Dezembro de 2010 – Relatório Final

Faculdade de Ciências e Letras – UNESP/Assis, 25 de junho de 2009.

Miriam Mendonça Morato de Andrade
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

À minha família que tanto me apoia com seu amor
e à equipe do GenTe Cel, minha segunda família.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter permitido a realização deste trabalho. Agradeço também a todo apoio recebido de minha família, toda sua paciência e suporte durante a árdua caminhada ao longo dos meus dias no laboratório. Sem eles, nada seria possível.

Devo muito à minha segunda família, a equipe do GenTe Cel, motivo da existência deste trabalho e de poder chamá-lo de “nosso”. Devo mais ainda ao meu orientador, prof. Dr. João Tadeu Ribeiro-Paes, que carinhosamente adotou-me em seu laboratório.

Este trabalho não seria possível sem a colaboração do Laboratório de Histologia da Unesp FCL-Assis, sob coordenação da professora Isabel Cherizzi Camargo, que gentilmente nos abriu as portas e apostou em nossa empreitada. Também apostaram em nosso trabalho o professor Dr. Sérgio Felisbino e a pós-doutoranda Flavia Dellela, responsáveis pela imunohistoquímica. É preciso também agradecer a Christiano Barbosa, do laboratório de Biofísica da Unifesp, que nos auxiliou com a citometria de fluxo. Agradeço muito a prestatividade e colaboração de todos.

É preciso ainda agradecer ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia e a todos os funcionários e professores que aceitaram nossa proposta e colaboraram para que fosse possível tornar realidade um “projeto de sonho”. Sonho este que foi acolhido prontamente nas dependências da Unesp – FCL Assis.

Por último, e mais importante, agradeço aos que tornaram este sonho realidade com suas próprias vidas, os camundongos. A eles, e a todos, meu mais terno “Obrigada!”.

“The rabbit hole went straight on like a tunnel for some way, and then dipped suddenly down, so suddenly that Alice had not a moment to think about stopping herself before she found herself falling down what seemed to be a very deep well”.

“A toca do coelho seguia em linha reta como um túnel de alguma forma, e depois mergulhou de repente para baixo, tão repentinamente que Alice não teve um momento para pensar em parar antes que ela caísse no que parecia ser um poço muito fundo”.

(Lewis Carroll in “Alice in Wonderland”)

RESUMO

Faria CA. Terapêutica experimental com células mononucleares da medula óssea em modelo animal de enfisema pulmonar [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é caracterizada pela obstrução crônica do fluxo aéreo, não totalmente reversível, associada a resposta inflamatória exacerbada do tecido pulmonar à inalação de partículas e gases tóxicos. Encontra-se no espectro da DPOC duas entidades nosológicas, a bronquite e o enfisema pulmonar. O enfisema pulmonar pode ser definido como a destruição das paredes alveolares e consequente quadro de dispneia progressiva. Trata-se, portanto, a uma doença prevenível e tratável, porém que possui elevada morbimortalidade em nível mundial. As terapias existentes envolvem diferentes abordagens, porém, não se logrou, até o presente, uma terapêutica eficaz. As células-tronco vêm sendo cada vez mais utilizadas por diferentes grupos de pesquisadores, visando a regeneração de tecidos lesados ou correção funcional de tecidos primariamente acometidos por diferentes patologias. Neste aspecto, as células-tronco poderiam representar uma nova abordagem terapêutica com grande potencial de aplicabilidade para o enfisema pulmonar. O presente trabalho objetivou a adequação de um modelo experimental de transplante celular *in vivo* de células mononucleares oriundas de medula óssea em camundongos com enfisema pulmonar. O enfisema foi induzido por meio de instilação nasal de elastase (4 UI por animal) em camundongos da linhagem C57BL/6 divididos em grupos controle e experimental. Estes grupos foram avaliados comparativamente, considerando-se os parâmetros morfométricos e por meio de imunohistoquímica para caracterização dos parâmetros de expressão de metaloproteinases características do processo inflamatório e de proteína fluorescente verde (GFP) expressa nos doadores. O diâmetro alveolar médio para os grupos não tratados e tratados com elastase para indução do enfisema apresentou diferença estatisticamente significativa, indicando que mudanças morfológicas condizentes com o enfisema pulmonar em camundongos podem ser obtidas 21 dias após a instilação intranasal de uma dose de elastase. Houve também mudanças no padrão de expressão de metaloproteinases envolvidas no processo inflamatório, indicando que a instilação de elastase pode promover o aumento do processo inflamatório no parênquima pulmonar. Utilizando-se o modelo de enfisema experimental descrito, aplicou-se uma dose de 0,4ml por animal da suspensão de células mononucleares da medula óssea (BMMC) contendo 7×10^6 células por ml. Amostras de células

foram avaliadas por citometria de fluxo, indicando que a separação da fase mononuclear foi realizada adequadamente. Após 21 dias, não se observou mudanças morfológicas, bem como no padrão de expressão de metaloproteinases no grupo controle. No grupo tratado com células, foram observadas mudanças morfológicas e no padrão de expressão de metaloproteinases características do processo inflamatório, indicando melhora na evolução da lesão pulmonar. Foi possível também detectar por meio de imunohistoquímica a presença de células GFP⁺ em todos os grupos que receberam infusão de células. Foram ainda avaliadas duas e três doses do pool de BMMC, porém os resultados das análises mostraram que não há diferenças entre estes grupos e os grupos controle. Este trabalho enquadra-se dentro da linha de pesquisa geral com emprego de diferentes abordagens metodológicas de indução de enfisema pulmonar em modelos animais e posterior emprego de terapia celular com diferentes tipos celulares, visando, em última análise, fundamentar a proposição de novas alternativas terapêuticas em DPOC.

Palavras-chave: Terapia celular. Células mononucleares da medula óssea. Enfisema pulmonar. Modelos animais.

ABSTRACT

Faria CA. Experimental therapy with bone marrow mononuclear cells in animal model of emphysema [Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is characterized by chronic airflow obstruction, not fully reversible, associated with an exaggerated inflammatory response of lung tissue to inhaled particles and gases. It lies on the spectrum of COPD two nosological entities, bronchitis and emphysema. Pulmonary emphysema can be defined as the destruction of alveolar walls and consequent chronic progressive dyspnea. Emphysema refers, therefore, to a preventable and treatable disease, but that has high morbidity and mortality worldwide. Existing therapies involve different approaches, however, until the present, no effective therapy has been achieved. Stem cells are being increasingly used by different groups of researchers seeking to regenerate damaged tissue or functional repair tissue primarily affected by different pathologies. In this respect, stem cells could represent a new therapeutic approach with great potential applicability. This work aimed at the adequacy of an experimental model of in vivo cell transplantation of mononuclear cells derived from bone marrow in mice with pulmonary emphysema. Emphysema was induced by nasal instillation of elastase (4 IU per animal) in mice of C57BL / 6 divided into control and experimental groups. These groups were comparatively evaluated, considering the morphometric parameters by means of paraffin-embedded and hematoxylin-eosin (HE) stained histological sections and by immunohistochemistry to characterize the parameters of metalloproteinase expression characteristics of the inflammatory process and the presence of de Green Fluorescent Protein (GFP), expressed by the donor animals. The mean alveolar diameter obtained for the untreated groups and the one obtained for the groups that received doses of elastase to induce emphysema showed statistically significant differences, indicating that morphological changes consistent with pulmonary emphysema in mice can be obtained 21 days after intranasal instillation of a dose of elastase. There were also changes in the pattern of expression of metalloproteinases involved in the inflammatory process, indicating that the instillation of elastase may promote the increase of inflammation in the lung parenchyma. Using the established model, a dose of 0.4 ml of a suspension of bone marrow mononuclear cells (BMMC) containing 7×10^6 cells per ml was applied. Cells samples were analyzed through flow cytometry, indicating that the mononuclear cells isolation was properly performed. After 21 days, there was no morphological changes and the pattern of expression of

metalloproteinases in the control group. After the same period (21 days), morphometric changes and in the pattern of metalloproteinase expression characteristics of inflammation were observed in the experimental group, indicating an amelioration in the evolution of lung injury in experimental groups. It was possible to observe, through immunohistochemistry, the presence of GFP⁺ cells in all the groups that received cell infusion. Two and three doses of a pool of BMMC were also tested, but the results were not favorable. This work fits within a general line of research with the use of different methodological approaches to induce emphysema in animal models and subsequent use of cell therapy with different cell types in order, ultimately, support the proposition of new therapies in COPD.

Keywords: Cell therapy. Bone Marrow Mononuclear Cells. Pulmonary emphysema. Animal models.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fisiopatologia da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.	17
Figura 2 – Aspectos morfológicos do enfisema pulmonar.....	18
Figura 3 – Camundongo da linhagem C57Bl/6.....	32
Figura 4 – Instilação intranasal.....	33
Figura 5 – Apresentação sequencial das etapas de obtenção das células mononucleares da medula óssea..	34
Figura 6 – Contenção do camundongo e infusão de células mononucleares pela veia caudal.....	35
Figura 7 – (a) Fotomicrografia do Retículo de Weibel, (b) Retículo de Weibel sobreposto a uma lâmina de tecido pulmonar de camundongo. (100x)	41
Figura 8 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido pulmonar corados com Hematoxilina-Eosina	45
Figura 9 – Análise comparativa do diâmetro alveolar médio obtido por meio da análise com o retículo de	46
Figura 10 – Fotomicrografias de tecido pulmonar corado com Hematoxilina-Eosina (HE) em microscópio de.....	48
Figura 11 – Análise comparativa do diâmetro alveolar médio obtido por meio de cortes histológicos de tecido.....	49
Figura 12 – Fotomicrografias de tecido pulmonar corado com Hematoxilina-Eosina (HE) em microscópio de.....	51
Figura 13 - Análise comparativa do diâmetro alveolar médio obtido por meio de cortes histológicos de tecido.....	52
Figura 14 – Fotomicrografias de tecido pulmonar corado com Hematoxilina-Eosina (HE) em microscópio de.....	54
Figura 15- Análise comparativa do diâmetro alveolar médio obtido por meio de cortes histológicos de tecido.....	55
Figura 16– Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para metaloproteinase 09 (Santa	57
Figura 17 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para metaloproteinase 12 (Santa	58
Figura 18 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para metaloproteinase 09 (Santa	60
Figura 19 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para metaloproteinase 12 (Santa	61
Figura 20 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para metaloproteinase 09 (Santa	63
Figura 21 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para metaloproteinase 12 (Santa	65
Figura 22 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para a proteína EGFP, expressa	67
Figura 23 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para a proteína EGFP, expressa	68
Figura 24 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para a proteína EGFP, expressa pelas.....	69
Figura 25 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para a proteína EGFP, expressa	70
Figura 26 – Porcentagem das células presentes na fração mononuclear e total da MO de animais GFP+. 72	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais da fase de padronização da fixação do tecido pulmonar	36
Tabela 2 – Grupos experimentais da fase de padronização do modelo animal.	37
Tabela 3 – Grupos experimentais da fase de padronização da terapia celular.....	38
Tabela 4 – Grupos experimentais da fase de avaliação do número de doses de BMMC.....	39
Tabela 5 – Total de animais nas diferentes fases do estudo.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMMC – “Bone Marrow Mononuclear Cells”
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CF – Citometria de Fluxo
COPD – “Chronic Obstructive Pulmonary Disease”
CPP – “Cell-Penetrating Peptides”
CT – Célula-tronco
CTEPH – “Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension”
CTH – Célula-tronco Hematopoética
CTM – Célula-tronco Mesenquimal
DEMEM – “Dulbeco's Modified Eagles Medium”
DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EGFP – “Enhanced Green Fluorescent Protein”
EPP – Elastase Pancreática Porcina
FEVE – Fração de Ejeção Ventricular Esquerda
FITC - Isotiocianato de Fluoresceína
GOLD – “Global initiative on Obstructive Lung Disease”
GFP – “Green Fluorescent Protein”
HE – Hematoxilina-eosina
IMC – Índice de Massa Corporal
LM – “Mean Linear Intercept”
MMP – “Matrix Metalloproteinase”
NIH – “National Institutes of Health”
NK – “Natural Killer”
PBS – “Phosphate Balanced Saline”
PCR – “Polymerase Chain Reaction”
PE – Ficoeritrina
PLATINO – “Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar”
RT-PCR – “Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction”
SFB – Soro Fetal Bovino
TIMP – “Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases”
UI – Unidade Internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica – DPOC.....	17
1.2 Indução experimental do enfisema.....	22
1.3 Células-tronco e terapia celular	25
1.4 Terapia celular e pulmão.....	28
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1 Animais.....	32
2.2 Modelo experimental de enfisema pulmonar	32
2.3 Obtenção de Células Mononucleares.....	33
2.4 Infusão de Células Mononucleares da Medula Óssea – BMMC.....	35
2.5 Grupos Experimentais.....	36
2.6 Fixação do Tecido Pulmonar e Análise Histológica	40
2.7 Morfometria.....	40
2.7.1 Medida do Intercepto Linear Médio – LM	40
2.8 Imunofenotipagem por citometria de Fluxo.....	42
2.9 Imunohistoquímica.....	42
2.10 Análise estatística.....	43
2.11 Aspectos éticos	43
3 RESULTADOS.....	44
3.1 Morfometria.....	44
3.1.1 Fase preliminar de padronização da fixação do tecido pulmonar	44
3.1.2 Fase de estabelecimento do modelo animal.....	47
3.1.3 Fase de estabelecimento da terapia celular.....	49
3.1.4 Fase de avaliação do número de doses de BMMC.....	52
3.2 Imunohistoquímica para metaloproteinases 9 e 12.....	56
3.2.1 Fase de estabelecimento do modelo animal.....	56
3.2.2 Fase de estabelecimento da terapia celular.....	59
3.2.3 Fase de avaliação do número de doses de BMMC.....	62
3.3 Imunohistoquímica para GFP.....	66
3.3.1 Fase de estabelecimento da terapia celular.....	66
3.3.2 Fase de avaliação do número de doses de BMMC.....	68
3.4 Citometria de Fluxo.....	70
4 DISCUSSÃO	73
5 CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS	85
ANEXO A – Citometria de fluxo.....	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica – DPOC

Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é um termo utilizado para definir um grupo de patologias caracterizadas principalmente pela limitação do fluxo aéreo decorrente de uma síndrome inflamatória crônica do tecido pulmonar, em resposta a agentes agressores, como partículas e gases nocivos, com consequente mudanças estruturais das vias aéreas e parênquima pulmonar.(Gold, 2009; Lucattelli et al., 2010; Mortaz et al., 2010; Sueblinvong e Weiss, 2010; Mannino, 2011).

Figura 1 – Fisiopatologia da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.

Fonte: Modificado de Gold, 2009.

Segundo GOLD – Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease – o termo Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica – DPOC – inclui duas entidades nosológicas: a bronquite crônica e o enfisema pulmonar. A bronquite crônica é definida pelo aumento das secreções brônquicas por um período de, ao menos, três meses por ano, durante dois anos sucessivos. O enfisema, por sua vez, é caracterizado pela destruição das paredes alveolares e pelo aumento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal (Gold, 2009).

O enfisema pulmonar foi descrito pela primeira vez por Laënnec em 1834, a partir de suas observações do tecido pulmonar de cadáveres preservados em estado de insuflação. A destruição das paredes alveolares observada por Laënnec permaneceu por muito tempo associada principalmente a broncopneumonia pré-terminal e a artefatos decorrentes do processo de preservação do tecido pulmonar para análise (Hogg, 2008; Petta, 2010).

Figura 2 – Aspectos morfológicos do enfisema pulmonar.

Quanto à etiopatogenia do enfisema pulmonar, a exposição a poluição, gases tóxicos, fumaça de cigarro, dentre outros agentes agressores, inicia uma resposta inflamatória crônica

do tecido pulmonar (Gold, 2009; Ribeiro-Paes et al., 2009). Fazem parte deste processo diversas células inflamatórias, bem como seus respectivos mediadores, tanto da imunidade inata quanto adaptativa. Esta resposta inflamatória está indissociavelmente ligada a um processo dinâmico de reparo e remodelamento estrutural do tecido pulmonar. Desta forma, têm papel fundamental na patogenia do enfisema pulmonar células como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, bem como citocinas pró-inflamatórias e enzimas, como a elastase neutrofílica. Este processo inflamatório leva a eventos irreversíveis, tais como apoptose de células epiteliais, proteólise do espaço aéreo terminal e de componentes da matriz extracelular, dentre outros. Os fatores inflamatórios estão portanto envolvidos com a severidade da doença (Abraham e Hogg, 2010; D'Agostino et al., 2010; Mannino, 2011).

Dentre os principais mediadores da resposta inflamatória, em pacientes com enfisema pulmonar, encontra-se exacerbada no tecido pulmonar a expressão de elastase neutrofílica, catepsinas G, B, K, L e S, proteinase 3 e metaloproteinases 08, 09 e 12. Por outro lado, encontra-se diminuída a expressão de fatores protetores como alfa-1 antitripsina, alfa-1 antiquimiotripsina, cistatinas, inibidores de metaloproteinases 1-4 e inibidor de leucoproteinase secretória. Esta inflamação crônica das vias aéreas pulmonares com alterações estruturais importantes do tecido pulmonar determina uma limitação crônica do fluxo aéreo, ou seja, dispnéia progressiva (Cotran et al., 1991; Gold, 2009; Ribeiro-Paes et al., 2009; Abraham e Hogg, 2010; Lucattelli et al., 2010; Mortaz et al., 2010; Sueblinvong e Weiss, 2010; Taylor, 2010). São consequências da destruição do tecido alveolar causada por reação inflamatória, acompanhada de remodelamento das paredes alveolares, o aumento da resistência ao fluxo aéreo e presença de muco no lúmen das vias aéreas. (Gold, 2009; Ribeiro-Paes et al., 2009; Abraham e Hogg, 2010; D'Agostino et al., 2010; Lucattelli et al., 2010; Mortaz et al., 2010; Sueblinvong e Weiss, 2010; Taylor, 2010; Mannino, 2011).

Um aumento de incidência de enfisema pulmonar na população que possuía níveis séricos baixos de alfa-1 globulinas foi relatado por Laurell e Erikson em 1963. Em 1965, Gross e colaboradores observaram o aparecimento de enfisema em ratos após instilação intra-traqueal de protease elastolítica (papaína). A partir destes relatos, vários trabalhos objetivando elucidar o papel das proteases na patogenia do enfisema pulmonar foram realizados, culminando com a formulação da hipótese atual de que um desequilíbrio entre os níveis de elastase e anti-elastase seria o principal mecanismo responsável pelo desenvolvimento do

enfisema (Laurell e Erikson, 1963; Gross et al., 1965; Dallegri e Ottonello, 1997; Wagner e Roth, 2000; Barnes, 2003).

Este desequilíbrio promoveria a destruição da matriz rica em elastina, levando a uma destruição dos septos e vasos alveolares. Outra hipótese sobre a etiopatogenia do enfisema refere-se à perda inicial das células epiteliais vasculares, acompanhada de morte celular e consequente degradação dos septos alveolares. Uma terceira hipótese relaciona as mudanças estruturais observadas no enfisema pulmonar a um processo acelerado de senescência das células, culminando com o travamento do ciclo celular. (Mahadeva e Shapiro, 2002; Yoshida e Tuder, 2007; Churg et al., 2007; Gold, 2009; Hackett et al., 2010; Mannino, 2011).

A destruição dos septos alveolares dos bronquíolos terminais e a redução da capacidade de troca gasosa e capacidade elástica do pulmão levam a dispneia progressiva crônica (Hackett et al., 2010). Em indivíduos fumantes de longa data, ou em indivíduos que estão constantemente expostos a fatores de risco adicionais, os sintomas originam-se por volta dos 40 anos de idade. Iniciam-se por dispneia aos grandes e médios esforços, como subir escadas e caminhar. Nos estágios mais avançado da doença, instala-se a dispneia aos pequenos esforços, tais como tomar banho, vestir-se, dentre outros (Gold, 2009; Taylor, 2010; Mannino, 2011).

Os sintomas da DPOC, para efeito de diagnóstico, podem ser divididos em quatro categorias, segundo critérios clínico-laboratoriais (provas de função pulmonar): no estágio I (leve) o paciente apresenta tosse e catarro recorrente, sem sintomatologia clínica exuberante. No estágio II (moderado) ocorre um agravamento no fluxo aéreo e é exigido um maior esforço respiratório. O estágio III (severo) é caracterizado por uma piora no quadro do fluxo aéreo, o que reduz a qualidade de vida do paciente devido à fadiga e dificuldade nos exercícios físicos. E, finalmente, o estágio IV (muito severo) no qual o paciente apresenta uma avançada limitação do fluxo aéreo e *cor pulmonale* (Gold, 2009).

Devido a seu caráter crônico e sintomatologia debilitante, a DPOC pode ser considerada um problema de saúde pública, pois reduz a qualidade de vida, prorroga o período de ausência no trabalho, aumenta o número e o tempo de internações hospitalares e majora as chances de morte prematura. Acomete principalmente pacientes tabagistas, é irreversível e induz uma perda progressiva da função pulmonar com consequente e drástica diminuição da qualidade de vida. Um estudo em cidades latino-americanas intitulado PLATINO - Proyecto Latinoamericano de Investigacion en Obstrucción Pulmonar –

relacionou a DPOC a uma diminuição do Índice de Massa Corporal (IMC) dos pacientes (Oca et al., 2008; Gold, 2009; Abraham e Hogg, 2010; Taylor, 2010; Sueblinvong e Weiss, 2010; Mannino, 2011).

Apesar dos recentes avanços nas pesquisas envolvendo DPOC, ainda não se logrou o estabelecimento de uma intervenção que comprovadamente prolongue o tempo de vida do paciente com enfisema pulmonar ou terapias que possam reverter a perda de função pulmonar associada à DPOC. A terapêutica atual do enfisema pulmonar inclui: i) medicações, como broncodilatadores, corticoesteroides ou anticolinérgicos, levando a uma melhora parcial e transitória; ii) terapia de reabilitação, visando a utilização da musculatura respiratória com menor gasto de oxigênio, que permita a execução dos afazeres diários e melhore a qualidade de vida; iii) oxigenoterapia, aumentando a expectativa de vida, principalmente daqueles que estão em fase mais avançada do desenvolvimento da doença e iv) controle do cor pulmonale, com terapias cardiovasculares e ventilação assistida nos períodos de crise de dispneia e broncoespasmo (Gold, 2009; D'Agostino et al., 2010; Taylor, 2010; Raghavan et al., 2011).

Técnicas mais invasivas e radicais, como cirurgia redutora do volume pulmonar e transplante têm sido empregadas com relativo sucesso, porém, os riscos cirúrgicos e a escassez de doadores são fatores que limitam o emprego destas abordagens terapêuticas (Leuenberger, 1997; Fusco, 2005; D'Agostino et al., 2010; Sueblinvong e Weiss, 2010).

Desta forma, a terapêutica atual tem apenas efeito paliativo sobre os sintomas do enfisema pulmonar. Considerando o insucesso a longo prazo e, como consequência, a necessidade de novas abordagens terapêuticas, uma série de modelos animais de DPOC têm sido propostos por diferentes grupos de pesquisadores, visando o entendimento etiopatogênico, bem como o estabelecimento de métodos terapêuticos mais eficazes (Hele, 2002; Gold, 2009; D'Agostino et al., 2010; Hackett et al., 2010; Lee et al, 2010; Taylor, 2010; Mannino, 2011).

Estudos em modelos animais tem fornecido a maior parte do conhecimento sobre o potencial da elastase para produzir enfisema, promovendo embasamento teórico para estudos com pacientes humanos. As metaloproteinases compreendem pelo menos 20 enzimas proteolíticas que apresentam papel fundamental no remodelamento e reparo tecidual associados ao processo inflamatório pela degradação do colágeno, laminina e elastina (Yoshida e Turder, 2007).

Buscando elucidar o papel das proteases e metaloproteinases no desenvolvimento do enfisema pulmonar, Churg e colegas, em 2007, submeteram cobaias à exposição à fumaça de

cigarro e administraram a um dos grupos experimentais, inibidores seletivos das metaloproteinases 9 e 12. Os animais pertencentes a este grupo, diferentemente dos pertencentes a outros grupos experimentais, não desenvolveram o enfisema. Em 2010, Ganesan e colegas administraram quercetina, um anti-inflamatório de origem vegetal, a animais com enfisema induzido por elastase. Os autores observaram que a quercetina promove um efeito protetor contra a lesão do tecido pulmonar por meio da redução da expressão de metaloproteinases 09 e 12. Estes resultados falam a favor da hipótese do desequilíbrio proteinase-antiproteinase na etiopatogenia do enfisema e evidenciam o papel relevante das metaloproteinases na DPOC, mais especificamente, no enfisema (Churg, 2007; Ganesan et al., 2010). Diversas evidências do papel das metaloproteinases no enfisema foram avaliadas desde então.

1.2 Indução experimental do enfisema

Os trabalhos de Gross, iniciados na década de 60, com a obtenção de enfisema pulmonar pela instilação intratraqueal de papaína, representaram uma grande contribuição ao estudo dos processos fisiopatológicos do enfisema (Gross et al., 1965). Nestes trabalhos pioneiros, verificou-se destruição significativa do tecido alveolar pelo tratamento com papaína, o que representou um forte argumento em favor da hipótese do desequilíbrio protease-antiprotease (Shapiro, 2000; Dawkins e Stockley, 2001; Mahadeva e Shapiro, 2002).

Desde então, diferentes modelos experimentais de enfisema pulmonar vêm sendo estudados por vários grupos de pesquisadores. Usualmente, a indução é realizada por instilação intratraqueal de agentes exógenos como proteases, principalmente a elastase pancreática de porco, papaína e elastase de neutrófilo humano. Além destas metodologias, a indução por meio da exposição à fumaça do cigarro, animais transgênicos e/ou “Knockouts” também buscam reproduzir o enfisema pulmonar humano (Mahadeva e Shapiro, 2002; Fehrenbach, 2006).

Buscando elucidar a etiopatogenia do enfisema pulmonar, Nikula et al. (2000) obtiveram resultados promissores a partir da indução de enfisema pulmonar em ratos submetidos à fumaça de cigarro, após 7 a 13 meses de exposição. Este método tem como vantagem uma semelhança fisiopatológica na indução de enfisema com um fumante crônico (Nikula et al., 2000).

Na Primeira Conferência Internacional em Modelos Animais de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, realizada na Universidade de Siena (Itália) em 2001, foi relatada a indução de enfisema após quarenta e cinco dias a partir da instilação de elastase. (Hele, 2002). Fusco et al. (2002), por sua vez, obtiveram um modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína, demonstrando manifestação fisiopatológica do enfisema após um curto período de tempo, aproximadamente 40 dias (Fusco et al., 2002).

De forma pioneira, em 2000, Kasahara et al. obtiveram a indução de enfisema pulmonar em modelo animal em ratos após a indução da apoptose das células endoteliais do tecido pulmonar por meio do bloqueio do receptor de fator de crescimento endotelial 2. A destruição dos alvéolos pulmonares obtida neste modelo corrobora a hipótese da etiopatogenia do enfisema pulmonar pela perda inicial das células epiteliais pulmonares com consequente morte celular e degradação dos septos alveolares (Kasahara et al, 2000, Fehrenbach, 2006).

Os modelos experimentais em camundongos gerados por mutações naturais ou por indução com agentes exógenos (papaína, elastase e fumaça de cigarro) são de grande importância para o estudo de aspectos patológicos pulmonares, em especial, do enfisema (Mahadeva e Shapiro, 2002; Fehrenbach, 2006). Encontra-se nos modelos com camundongos uma série de vantagens para o estudo de diferentes parâmetros etiopatogênicos, bem como para a proposição de novas terapias, salientando-se a fácil manipulação e reprodução rápida dos animais (Dawkins e Stockley, 2001; Brusselle et al., 2006; Fehrenbach, 2006).

Hautamaki et al. (1997), ao trabalhar com a indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro em linhagens MME^{-/-} (camundongos geneticamente modificados, deficientes na produção de elastase pelos macrófagos), observaram que, após um período de 6 meses, os camundongos MME^{-/-} não apresentavam mudanças na dimensão do alvéolos. Os autores postularam, a partir desses achados, a importância da elastase de macrófagos no estabelecimento do enfisema (Hautamaki et al., 1997).

A elastase é uma protease sintetizada e secretada por neutrófilos após sua ativação em um processo inflamatório. Tem como função principal a degradação das proteínas da matriz extracelular. A elastase também atua aumentando a atividade de metaloproteinases, como as metaloproteinases 9 e 12 e inativando inibidores endógenos de metaloproteinases (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases – TIMP). Em consequência, a elastase potencializa o papel das metaloproteinases na DPOC, a degradação da matriz extracelular do tecido pulmonar (Yao et al., 2008).

A elastase pancreática porcina (EPP) provoca um alargamento significativo nos espaços aéreos de animais como roedores, cobaias, cães e primatas, atraindo ao pulmão macrófagos e neutrófilos. Desta forma, a instilação de elastase promove, em modelos animais, lesão estrutural e resposta inflamatória no tecido pulmonar semelhantes ao enfisema pulmonar em pacientes humanos. A instilação e indução do enfisema por proteases apresenta como vantagens a praticidade e rapidez do procedimento e corrobora a hipótese do desequilíbrio protease-antiprotease na etiopatogenia do enfisema (Fusco et al., 2002; Hantos et al., 2008; Kawakami et al., 2008; Inoue et al., 2010).

Em 2007, Churg e colaboradores analisaram o papel das metaloproteinases no desenvolvimento do enfisema pulmonar induzido por fumaça de cigarro. Os autores analisaram os efeitos da inibição de metaloproteinases 09 e 12 durante a exposição de ratos à fumaça de cigarro por 06 meses. Os resultados permitiram observar que a inibição das metaloproteinases 09 e 12 podem substancialmente diminuir os efeitos morfológicos do enfisema, remodelamento das vias aéreas e consequências funcionais da lesão pulmonar gerada por fumaça de cigarro em modelo murino. Estes resultados são também favoráveis à hipótese protease-antiprotease na etiopatogenia do enfisema pulmonar (Churg et al., 2007).

Estudo em modelos animais também permitiram concluir que o estresse oxidativo está relacionado com o processo inflamatório na patogenia do enfisema pulmonar, sendo também um importante fator a ser considerado no estudo e entendimento do enfisema pulmonar (Rangasamy et al., 2009)

Os estudos de Wilson e colaboradores, em 2008, demonstram que a transdução lentiviral de um pequeno número de células-tronco derivadas da medula óssea de camundongos foi capaz de sustentar a produção *in vivo* de α -1-antitripsina humana em camundongos receptores. Estes camundongos apresentaram menor propensão ao desenvolvimento do enfisema pulmonar e mostraram-se uma ferramenta valiosa no estudo do papel de anti-proteases na mobilização de células-progenitoras da medula óssea e sua habilidade na prevenção do enfisema pulmonar (Wilson et al., 2008).

Embora os métodos de indução de enfisema pulmonar em modelo animal não mimetizem perfeitamente o enfisema humano, representam uma abordagem metodológica de grande utilidade e exequibilidade para a pesquisa sobre a fisiopatologia e etiopatogenia do enfisema pulmonar. Representa ainda excelente ferramenta no desenvolvimento e estudo de novas abordagens terapêuticas, como a terapia celular com células-tronco (Fehrenbach, 2006; Ribeiro-Paes et al., 2009).

1.3 Células-tronco e terapia celular

A terapia celular pode ser descrita, de forma geral, como a utilização de células no tratamento de doenças. Assim, os primórdios da terapia celular remontam ao emprego da transfusão sanguínea e da utilização do concentrado de plaquetas (Ribeiro-Paes et al., 2009).

Durante a última década, células-tronco (CT) tornaram-se objeto de grande interesse para a medicina regenerativa, em especial na terapia celular. Estas células combinam duas propriedades especialmente atrativas para a medicina regenerativa: 1) não são diferenciadas e possuem a capacidade de auto-renovação por divisão celular e 2) sob determinadas condições fisiológicas ou experimentais específicas, podem ser induzidas a assumir características de células especializadas (NIH, 2001; Teo e Vallier, 2010; Watt e Driskell, 2010; Forraz e McGuckin, 2011; Leeb et al., 2011).

Melton e Cowan (2004) propuseram uma “working definition”, em que as células-tronco poderiam ser entendidas como “....uma entidade clonal auto-renovável que é multipotente e pode dar origem a vários tipos de células diferenciadas”. Apesar de variações conceituais, em síntese, há duas propriedades fundamentais que caracterizam as células-tronco: auto-renovação e diferenciação (Melton e Cowan, 2004; Weiss et al., 2008; Abreu et al., 2008; Ribeiro-Paes et al., 2009).

Tomando-se como referencial os aspectos relativos ao potencial de diferenciação, pode-se classificar as células-tronco em: i) Totipotentes – capazes de originar os tecidos embrionários e extraembrionários, como a célula ovo ou zigoto; ii) Pluripotentes - aquelas que poderiam gerar todos os diferentes tipos celulares, como as células da massa celular interna do blastocisto; iii) Multipotentes - precursoras de diferentes tipos celulares de uma mesma linhagem do tecido onde se insere, como por exemplo as células-tronco hematopoéticas e iv) Oligopotentes - que podem originar células de alguns poucos subtipos celulares de um mesmo tecido, como as células-tronco neurais. Há, ainda, aquelas que originam apenas um tipo celular, com função repositora, como as células-tronco da epiderme, chamadas unipotentes (NIH, 2001; Weiss et al., 2008; Teo e Vallier, 2010; Watt e Driskell, 2010; Forraz e McGuckin, 2011).

Considerando-se a origem, pode-se definir 3 tipos gerais de células-tronco: oriundas da massa celular interna do blastocisto, denominadas células-tronco embrionárias; as oriundas da crista gonadal, células-tronco germinativas, e aquelas encontradas em meio a tecidos adultos

(incluindo-se as células do cordão umbilical), denominadas células-tronco adultas (NIH, 2001; Weiss et al., 2008; Teo e Vallier, 2010; Watt e Driskell, 2010; Forraz e McGuckin, 2011; Leeb et al., 2011).

Há ainda um outro tipo de célula-tronco, as células-tronco pluripotentes induzidas. Em 2006, Takahashi e Yamanaka estabeleceram uma cultura de células pluripotentes induzidas a partir de fibroblastos murinos. Esta técnica consiste na reprogramação gênica, por meio de vetores virais, dos fibroblastos com ativação dos fatores Oct3/4, Sox2, Nanog e c-Myc (Takahashi e Yamanaka, 2006). Desde então, a existência das células-tronco pluripotentes induzidas foi reforçada por trabalhos posteriores. As células-tronco pluripotentes induzidas apresentaram capacidade proliferativa e de diferenciação semelhantes às células-tronco embrionárias pluripotentes (Okita et al., 2010; Forraz e McGuckin, 2011). Porém, células-tronco pluripotentes induzidas e células-tronco embrionárias derivadas da massa celular interna do blastocisto apresentam diferenças quanto ao imprinting genético e epigenética (Chin et al., 2009).

As características atribuídas às células-tronco foram primeiramente observadas *in vivo* no tecido hematopoético, sendo este o modelo clássico e mais estudado. No início do século XX, Maximov foi o primeiro pesquisador a propor que os leucócitos agiriam como células-tronco e migrariam por entre os tecidos dando origem aos componentes do sistema circulatório (Forraz e McGuckin, 2011).

Ensaio de cultura de células provenientes da medula óssea permitem a obtenção de duas principais linhagens celulares: i) células não aderentes ao plástico, onde encontram-se as células-tronco hematopoéticas e ii) colônias heterogêneas de células aderentes ao plástico, dentre elas, células diferenciadas da linhagem endotelial (arredondadas e pequenas) e células maiores com aspecto fibroblástico, as células-tronco mesenquimais (Prockop, 1997; Bianco e Robey, 2000; NIH, 2001). Assim, a fração mononuclear da medula óssea é composta por células diferenciadas (linfócitos e outros) e indiferenciadas (células-tronco hematopoéticas e mesenquimais) e apresentam papel repositivo no organismo adulto. Esta função repositiva pode ser observada *in vivo* por meio da regeneração do tecido hematopoético após transplante medular em animais letalmente irradiados. A evolução do conhecimento acerca do tecido hematopoético e seu potencial regenerativo permitiu o advento do transplante de células-tronco na reposição da medula óssea de pacientes humanos (Till e McCulloch, 1961, Alison et al., 1961, Nardi e Alfonso, 2006, Weiss et al., 2008, Bydlowski et al., 2009, Forraz e McGuckin, 2011).

No contexto de transplante celular, as células-tronco têm sido extensivamente estudadas por diferentes grupos de pesquisadores. Estudos estão sendo realizados para se elucidar o funcionamento e os mecanismos controladores da diferenciação, pela geração de camundongos transgênicos e “Knockout”. Outros aspectos de grande interesse como a regeneração de tecidos e órgãos acometidos por diferentes patologias estão sendo abordados em diversos estudos ao redor do mundo (Bittencourt e Rocha, 2006; Weiss et al., 2008; Ribeiro-Paes et al., 2009; Grove et al., 2010; Teo e Vallier, 2010; Ribeiro-Paes et al., 2011).

Terapias envolvendo o uso de células tecido-específicas ou isoladas a partir de tecidos de doadores apresentam-se como alternativa promissora no tratamento de doenças degenerativas e injúrias. As terapias celulares existentes envolvem substituição celular, como transplante de medula óssea em pacientes com desordens relacionadas ao tecido sanguíneo. No entanto, desafios ainda existem a serem superados, como por exemplo a dificuldade em obter células para o transplante e questões imunológicas e de compatibilidade, além do controle preciso do destino celular em condições definidas *ex vivo* (Xu et al., 2008; Teo e Vallier, 2010; Watt e Driskell, 2010).

É possível verificar que grande número de trabalhos com células-tronco tem sido realizados ou direcionados para correção de danos e regeneração de tecido muscular cardíaco pós-infarto do miocárdio ou na insuficiência cardíaca por diferentes causas. Pesquisas e resultados promissores e concretos de estudos referentes à terapia celular para tratamento da insuficiência cardíaca por diferentes etiologias permitiram, em vários centros de pesquisa, a implementação de testes clínicos em nível I (Segers e Lee, 2008; Boudoulas e Hatzopoulos, 2009). Os estudos de triagem realizados na Alemanha (TOPCARE-AMI) indicaram regeneração funcional, após a aplicação local de células da medula óssea, em ventrículos de pacientes que sofreram infarto (Schächinger et al., 2004). O emprego de diferentes tipos de células-tronco na terapia celular para o tratamento da insuficiência cardíaca é discutido por diferentes autores (Joggerst e Hatzopoulos, 2009; Guyette et al., 2010).

O emprego de células-tronco pluripotentes induzidas na terapia celular em pacientes, no entanto, ainda não é recomendável, devido à utilização de vetores virais no processo de reprogramação gênica. Buscando solucionar este problema, Kim et al. (2009), utilizaram peptídeos que apresentam a capacidade de penetrar nas células (Cell-Penetrating Peptides – CPP) como vetores da reprogramação gênica. Os autores obtiveram sucesso no estabelecimento de cultura de células-tronco pluripotentes induzidas humanas. Entretanto,

esta técnica ainda necessita ser avaliada quanto à reprodutibilidade por outras equipes de pesquisa (Kim et al., 2009; Leeb et al., 2011).

Quanto às células-tronco residentes no tecido pulmonar, apesar dos recentes avanços no estudo destas células, pouco ainda se sabe sobre suas características e capacidades funcionais relacionadas ao processo de reparo do tecido pulmonar. Desta forma, estudos pré-clínicos e clínicos estão em andamento na tentativa de entender o papel das células-tronco no reparo do tecido pulmonar (Hackett et al., 2010; Lee et al., 2011; Ribeiro-Paes et al., 2011).

1.4 Terapia celular e pulmão

Um grande número de trabalhos recentes tem aventado a possibilidade de terapia celular com células-tronco, principalmente hematopoéticas, mesenquimais e endoteliais, no tratamento do enfisema pulmonar. Porém, vários aspectos da terapia celular com células-tronco ainda precisam ser elucidados (Ribeiro-Paes et al., 2009; D'Agostino, 2010; Hid e Maden, 2011; Ingenito et al., 2011; Moodley et al., 2011).

Os estudos envolvendo células-tronco e o tecido pulmonar foram pioneiramente iniciados por Pereira e colaboradores em 1995. Por meio de PCR, os autores mostraram a migração de células-tronco derivadas da medula óssea para o tecido pulmonar de camundongos receptores. Foi possível observar a presença das células-tronco da medula óssea no tecido pulmonar do camundongo receptor por um período de até 5 meses, indicando que as células transplantadas teriam se incorporado ao tecido do receptor, difundindo-se pelo parênquima (Pereira et al., 1995).

Um fato de interesse e de grande relevância para os estudos envolvendo células-tronco derivadas da medula óssea e doenças pulmonares refere-se ao trabalho desenvolvido por Krause et al. (2001). Os autores, após transplante de células-tronco, detectaram células positivas para o cromossomo Y em pulmões de fêmeas receptoras por meio da técnica de FISH (Krause et al., 2001). A migração de células-tronco para o tecido pulmonar após infusão intravenosa foi também evidenciada pelos trabalhos de Kotton et al. (2001). Os autores utilizaram células marcadas com Lac-Z e observaram a presença destas células no tecido pulmonar dos camundongos receptores por meio da incubação em meio contendo X-gal (Kotton et al., 2001).

A migração de células oriundas da medula óssea para o tecido pulmonar de receptores após transplante foi observado em pacientes humanos após transplante de medula por Suratt e

colaboradores (Suratt et al., 2003). Os autores detectaram a presença de células contendo o cromossomo Y em pacientes do sexo feminino após terem recebido, por diferentes razões, transplante de medula óssea de doadores do sexo masculino. De forma semelhante, Lama e colaboradores avaliaram pacientes que haviam recebido transplante de medula óssea de doadores de sexos diferentes. Os autores verificaram a presença no tecido pulmonar de receptores de células com características do doador por diferentes técnicas, como imunohistoquímica e RT-PCR. Um dado interessante foi a detecção destas células até onze anos e meio após o transplante (Lama et al., 2007).

Outros trabalhos também mostraram a presença de células da medula óssea de doadores no pulmão de receptores, por meio de diferentes técnicas de marcação e rastreamento (Suratt et al., 2003; Neuringer e Radell, 2004; Schrepfer et al., 2007; Lama et al., 2007; Ribeiro-Paes et al., 2009; Sueblinvong e Weiss, 2010)

A fim de estudar a relação entre a migração de células-tronco e as lesões no tecido pulmonar, Yamada et al. (2004) transplantaram medula de camundongos EGFP para camundongos não-EGFP com medula irradiada. Posteriormente induziram lesão pulmonar por meio de lipopolissacarídeo derivado de *E. coli* e analisaram a mobilização das células progenitoras de medula óssea. Após diferentes análises, encontraram número maior de células doadoras nos receptores com pulmões lesados. Demonstraram assim, de forma pioneira, a correlação entre lesões e a migração de células-tronco (Yamada et al., 2004)

É preciso salientar também o trabalho de Adachi et al. (2006). Os autores obtêm sucesso ao transferir uma lesão pulmonar similar à causada pelo enfisema entre diferentes linhagens de camundongos, bem como impedir sua progressão e até mesmo regredir a lesão pelo transplante intra-medular de células-tronco hematopoéticas (Adachi et al., 2006).

Estudos recentes mostram que células-tronco mesenquimais têm a capacidade de modular as respostas imunológicas locais em modelos animais de lesão pulmonar aguda e fibrose pulmonar, bem como em pacientes humanos. Desta forma, aventa-se a possibilidade de que as células-tronco mesenquimais presentes na medula óssea poderiam auxiliar na prevenção da evolução da lesão do tecido pulmonar no enfisema pulmonar. Isto ocorreria devido a propriedade imunomoduladora sobre o componente inflamatório da lesão do enfisema pulmonar, bem como de outras doenças inflamatórias do tecido pulmonar. As células-tronco mesenquimais atuariam induzindo, por meio de fatores parácrinos, a diminuição da produção de fatores pró-inflamatórios. Atuariam também aumentando a expressão de fatores protetores, como anti-proteases (Ohnishi e Nagaya, 2008; Iyer et al.,

2009; Sueblinvong e Weiss, 2009; Hackett et al., 2010; Ingenito et al., 2011; Katsha et al., 2011; Moodley et al., 2011).

Um estudo em andamento avalia a utilização do Prochymal[®], células-tronco mesenquimais humanas derivadas de doadores adultos hígidos. Este produto é comercializado e avaliado pela empresa Osiris Therapeutics Inc. Porém, não foram publicadas, em periódicos especializados da área, maiores informações acerca deste estudo com o produto ou dos resultados obtidos pela empresa (<http://www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00683722>, <http://www.osiris.com/therapeutics.php>).

Ao infundir por via intratraqueal células mesenquimais provenientes da medula óssea alogênicas em ratos portadores de hipertensão pulmonar tromboembólica crônica (CTEPH – Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension), Jungebluth e colaboradores observaram melhora significativa e duradoura dos parâmetros clínicos avaliados, bem como mudanças significativas nos padrões de expressão de proteínas nos tecidos pulmonar e hepático dos animais tratados. Estes resultados indicam que a terapia celular poderia ser capaz de restabelecer a função pulmonar e que os efeitos terapêuticos das células-tronco mesenquimais podem estar relacionados ao estímulo parácrino de processos reconstituintes baseados em proteínas (Jungebluth et al., 2011).

Um estudo baseado no uso de células-tronco no tratamento de pacientes acometidos por DPOC em sua forma moderada ou severa está em andamento para a determinação da segurança e eficácia desta abordagem terapêutica. Este estudo baseia-se na infusão intravenosa de células mononucleares isoladas do aspirado medular do próprio paciente. Os resultados até o momento permitem concluir que trata-se de um procedimento seguro. Apesar da importante melhora clínica apresentada pelos pacientes submetidos ao procedimento, devido ao pequeno número de pacientes tratados, conclusões quanto à eficácia do procedimento ainda não puderam ser alcançadas (Ribeiro-Paes et al., 2011).

Neste contexto, propõe-se no presente trabalho a análise dos parâmetros morfológicos do enfisema por meio da indução por elastase, bem como da resposta dessa lesão à inoculação de um “pool” de células mononucleares da medula óssea em diferentes tempos de análise e número de doses. Pretende-se, para tanto, estruturar um modelo de estudo altamente reprodutível, especificamente formulado para a aplicação da terapia celular, com células-tronco da medula óssea, em modelos de DPOC induzidos experimentalmente por instilação intranasal de elastase.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram empregados, neste estudo: a) Camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6 e b) Camundongos machos C57Bl/6 – “Enhanced Green Fluorescent Protein” (EGFP), gentilmente cedidos pelo professor Masaru Okabe (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita, Japan) (Okabe et al., 1997). Os animais utilizados tinham, no início do experimento, dois meses de idade e peso médio de 15g a 25g. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno forradas com serragem, em sala com temperatura e luminosidade controladas (22 °C e 12 h – luz e 12 h – escuro). Durante o procedimento experimental, receberam dieta sólida (ração NuvilabCR1® – Nuvital (Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, PR, Brasil) e água suplementada com Vitagold® - Tortuga (Tortuga Cia Zootécnica e Veterinária, São Paulo, SP, Brasil) *ad libitum*.

Figura 3 – Camundongo da linhagem C57Bl/6

2.2 Modelo experimental de enfisema pulmonar

Animais fêmeas foram submetidos à instilação intranasal de elastase pancreática porcina tipo IV Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA). Cada animal recebeu 50 µl de solução fisiológica contendo 4,0 UI de elastase. O número de doses variou de 1 a 3, de acordo com o grupo experimental. O grupo controle recebeu 50 µl do veículo, solução fisiológica.

A instilação intranasal do volume de 50 µl foi realizada depositando-se cinco gotas de 10 µl cada na narina do animal com a ajuda de um pipetador automático, como pode ser observado na Figura 4 a seguir.

Figura 4 – Instilação intranasal.

2.3 Obtenção de Células Mononucleares

Para a obtenção de células mononucleares, foram utilizados camundongos C57BL6 – EGFP⁺ machos adultos de aproximadamente 2 meses de idade. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram os fêmures extraídos, as epífises seccionadas e, com o uso de uma seringa contendo meio de cultura “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” - DMEM – Low Glucose – LGC (LGC Biotecnologia Ltda., Cotia, SP, Brasil), a medula óssea foi retirada (“flushing”). A suspensão resultante foi homogeneizada e submetida à separação por densidade em gradiente de Ficoll-Hypaque - Sepcell®- LGC (LGC Biotecnologia Ltda., Cotia, SP, Brasil), centrifugando por 26 minutos, à 1500 G. O concentrado de células mononucleares de medula óssea, presente na interface do meio de cultura com Ficoll, foi recolhido, lavado em solução salina tamponada com fosfato (“Phosphate Buffered Saline” - PBS – LGC). A concentração foi estimada em câmara hematimétrica de Neubauer. Foi então feita a diluição das células obtidas, em meio DMEM – Low Glucose - LGC para concentração final de 7×10^6 células/ml.

Figura 5 – Apresentação sequencial das etapas de obtenção das células mononucleares da medula óssea.

2.4 Infusão de Células Mononucleares da Medula Óssea – BMMC

Para a infusão, foram utilizadas BMMC de obtidas animais machos da linhagem C57BL6 – EGFP⁺ (doadores), sendo os animais receptores C57BL6 fêmeas. A infusão das células mononucleares foi feita por via intravenosa (veia caudal). Para infusão, os animais foram contidos em caixa de polipropileno forrada com algodão, conforme Figura 5 a seguir.

Figura 6 – Contenção do camundongo e infusão de células mononucleares pela veia caudal.

Os grupos tratados receberam 0,4 ml da suspensão celular em DMEM – Low Glucose - LGC, na concentração de 7×10^6 céls./ml, a cada dose. O número de doses variou de 1 a 3 de acordo com o grupo experimental e foram aplicadas com um intervalo de 7 dias. Os grupos controle receberam tratamento similar, porém, infundido apenas com o veículo (DMEM – Low Glucose – LGC).

2.5 Grupos Experimentais

Em fase preliminar, para padronizar o método de extração e fixação do tecido pulmonar, os animais foram divididos em quatro grupos. O primeiro grupo (G 1) recebeu instilação de 50 µl de elastase e teve o pulmão extraído e fixado em aparato de fixação com solução a 4% de formol. O segundo grupo (G 2) recebeu instilação de 50 µl de elastase e teve o pulmão perfundido por 5 minuto com solução de formol a 4% por meio de um funil acoplado à traqueia por uma cânula. Após a perfusão, o pulmão foi extraído e fixado em aparato de fixação com solução a 4% de formol. O terceiro grupo (G 3) recebeu instilação de 50 µl de solução salina e teve o pulmão extraído e fixado em aparato de fixação com solução de formol a 4%. Finalmente, o quarto grupo (G 4), recebeu instilação de 50 µl de solução salina e teve o pulmão perfundido por 5 minutos com solução de formol a 4% e só então extraído e perfundido, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Grupos experimentais da fase de padronização da fixação do tecido pulmonar

Grupos	Dia instilação	Solução Instilada	Númerode receptores fêmeas C57-BL/6	Dia Extração	Perfusão de solução fixadora
G 1	0	Elastase	11	21	pós-extração
G 2	0	Elastase	10	21	pré-extração
G 3	0	Solução Fisiológica	12	21	pós-extração
G 4	0	Solução Fisiológica	11	21	pré-extração

Na primeira fase, objetivando estabelecer o número adequado de doses de elastase para a indução de enfisema pulmonar, os animais foram divididos nos seguintes grupos: grupo controle (E0), em que os animais receberam apenas uma dose do veículo (solução salina), grupo E1, animais que receberam apenas uma dose de 50 µl de elastase, grupo E2, em que os animais receberam duas doses de elastase e grupo E3, composto por animais que receberam três doses de elastase, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Grupos experimentais da fase de padronização do modelo animal.

Grupos	Dia instilação	Solução Instilada	Número de receptores fêmeas C57BL/6	Extração e perfusão do pulmão
EO	0	Solução Fisiológica	9	21
E1	0	Elastase	10	21
E2	0 – 7	Elastase	9	21
E3	0 – 7 – 14	Elastase	9	21

Na fase posterior, a fim de se avaliar a ação da infusão de um pool de BMNC em animais com enfisema experimentalmente induzido em diferentes períodos, todos animais receberam instilação intranasal de elastase e, após 21 dias, foram divididos nos seguintes grupos: animais expostos à elastase, infundidos com o veículo (meio de cultura DEMEM) e sacrificados após 7 dias (EME 7), 14 dias (EME14) e 21 dias (EME21) e animais expostos à elastase, infundidos com 0,4 ml de suspensão de BMNC contendo 7×10^6 cels./ml e sacrificados após 7 dias (EPO 7), 14 dias (EPO14) e 21 dias (EPO21), como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Grupos experimentais da fase de padronização da terapia celular.

Grupos	Dia Trans- plante*	Solução Transplantada	Número de recep- tores fêmeas C57BL/6	Doadores ma- chos/ marcador	sacrifício
EME7	0	DMEM	6	-----	7
EPO7	0	DMEM + BMMC	10	5 C57BL/6 – EGFP	7
EME14	0	DMEM	6	-----	14
EPO14	0	DMEM + BMMC	8	5 C57BL/6 - EGFP	14
EME21	0	DMEM	8	-----	21
EPO21	0	DMEM + BMMC	9	5 C57BL/6 - EGFP	21

*21 dias após a instilação de elastase

Na fase seguinte, novamente todos os animais receberam instilação intranasal de 50µl de elastase. Após 21 dias, para verificar a influência de doses repetidas de um “pool” de BMMC, os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle - animais que receberam uma (EME1), duas (EME2) ou três doses (EME3) do veículo (meio de cultura DEMEM) e tratados - animais que receberam uma (EPO1), duas (EPO2) ou três (EPO3) doses da suspensão celular. As doses foram administradas com um intervalo de 7 dias e o sacrifício realizado 21 dias após a última infusão, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Grupos experimentais da fase de avaliação do número de doses de BMMC.

Grupos	Dia Transplante*	Solução Transplantada	Número de receptores fêmeas C57BL/6	Doadores machos/ marcador	sacrifício
EME1	0	DMEM	8	-----	21
EPO1	0	DMEM + BMMC	9	5 C57BL/6 – EGFP	21
EME2	0 – 7	DMEM	9	-----	28
EPO2	0 - 7	DMEM + BMMC	7	10 C57BL/6 - EGFP	28
EME3	0 - 7 - 14	DMEM	6	-----	35
EPO3	0 - 7 - 14	DMEM + BMMC	9	15 C57BL/6 - EGFP	35

* 21 dias após a instilação de elastase

Tabela 5 – Total de animais nas diferentes fases do estudo.

Total de animais na fase de padronização da fixação do tecido pulmonar	44 camundongos C57BL/6 fêmeas
Total de animais na fase de estabelecimento do modelo animal	37 camundongos C57BL/6 fêmeas
Total de animais na fase de estabelecimento da terapia celular	50 C57BL/6 fêmeas + 30 C57BL/6 EGFP machos
Total de animais na fase de avaliação do número de doses de BMMC	48 C57BL/6 fêmeas + 15 C57BL/6 EGFP machos
TOTAL GERAL DE ANIMAIS	179 C57BL/6 fêmeas + 45 C57BL/6 EGFP machos

2.6 Fixação do Tecido Pulmonar e Análise Histológica

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. A traqueia foi canulada utilizando-se cateter intravenoso Angiocath 20G x 1.16" 1,1 x 30 mm BD (Becton Dickinson Ind. Cir. LTDA – Juiz de Fora – MG – Brasil). O pulmão foi insuflado com pressão positiva constante de 20 cm de uma solução de formol a 4% tamponada, por de 24 horas, utilizando-se aparato para fixação pulmonar. Aparato este que foi adaptado e modificado pelo grupo do Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel - da Faculdade de Ciências e Letras da Unesp – Campus de Assis com o objetivo de manter uma pressão constante de 20 cm de solução fixadora sobre o tecido pulmonar para mantê-lo inflado de forma uniforme para análise do diâmetro alveolar. Seguiu-se a rotina histológica com desidratação progressiva em álcool etílico (70%, 80%, 90% e 99%), diafanização em xilol e parafinização. Os tecidos foram incubados em parafina e feitos cortes de 6 µm.

O material fixado foi corado com Hematoxilina-Eosina (HE) para análises morfométricas ou preparado para imunohistoquímica.

2.7 Morfometria

As análises morfométricas foram realizadas por um único investigador, sendo a contagem das lâminas realizada em teste cego. Foram analisados dez campos aleatórios não coincidentes das lâminas do tecido pulmonar de cada animal em aumento de 400 vezes para a medida do intercepto linear médio em microscópio óptico de campo claro da marca Zeiss.

2.7.1 Medida do Intercepto Linear Médio – LM

A análise histológica do enfisema foi feita por intermédio do LM (em micrômetros), indicador do diâmetro alveolar médio, conforme proposto por Weibel em 1963. Esta técnica morfométrica consiste na determinação do número de vezes que estruturas do parênquima de troca gasosa, coradas com Hematoxilina-Eosina, interceptam um conjunto de retas coerentes, por meio de um retículo junto à ocular do microscópio com sistema de 50 linhas e 100 pontos. Portanto, se houver degeneração do tecido dos animais dos grupos tratados com elastase, o número de interseptos das estruturas alveolares será menor com relação ao dos animais controle, por conseguinte, o LM será menor. A Figuras 6 e 7 apresenta fotomicrografia do

retículo - Retículo de Weibel, Eikonol (Eikonol do Brasil, Instrumentos ópticos e científico, Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

Figura 7 – (a) Fotomicrografia do Retículo de Weibel, (b) Retículo de Weibel sobreposto a uma lâmina de tecido pulmonar de camundongo. (100x)

A partir das contagens do número de interseptos em cada lâmina histológica, determinou-se o valor de LM a partir da equação:

$$LM = \frac{L_{tot}}{Li}$$

Onde:

Ltot - comprimento total das retas do retículo, considerando-se o aumento (200 X - 1250nm)

Li - o número de interseptos de estruturas alveolares com as retas do retículo.

2.8 Imunofenotipagem por citometria de Fluxo

As células da medula óssea de animais portadores da “green fluorescence protein” (GFP⁺) foram obtidas por “flushing”. Foram então homogeneizadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Uma amostra da suspensão de células da medula total foi retirada. O restante da suspensão celular foi submetido à centrifugação por gradiente de densidade, utilizando Ficoll-Histopaque (1,077 g/cm³). As células presentes na interface entre o meio de cultura e o Ficoll (mononucleares) foram recolhidas e lavadas em PBS. Ambas as amostras obtidas foram marcadas. As células-tronco hematopoéticas (CTH) foram reconhecidas utilizando os marcadores de superfície característicos desta linhagem celular - B220, CD3, Ter-119, CD11b, Gr-1 (conjugados a PE) e os anticorpos anti-Flk2-PE, anti-Sca-1-Cy7/PE e anti-c-Kit (conjugados a APC). As células-tronco mesenquimais foram reconhecidas utilizando-se marcadores para seleção negativa (anti-CD45, anti-Ter-119, anti-CD11b, anti-cKit conjugados a APC) e os anticorpos anti-CD90, anti-CD73 e anti-Sca-1-Cy7 conjugados a PE. As células mielóides maduras foram reconhecidas com os anticorpos anti-Gr-1-PE, anti-CD11b-Cy7/PE e anti-Ter-119-APC, enquanto as células linfóides foram identificadas com os anticorpos anti-B220-PE e anti-CD3-APC. As leituras foram realizadas no citômetro de fluxo FACsCalibur (Becton Dickinson, USA) e as análises foram realizadas no programa WinMDi 2.8.

2.9 Imunohistoquímica

Neste estudo foram empregados anti-metaloproteinase 09 Santa Cruz e anti-metaloproteinase 12 Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) para detecção das metaloproteinases características da reação inflamatória na matriz extracelular do tecido pulmonar. Para todos os grupos, a recuperação antigênica foi realizada em micro-ondas, e a diluição do anticorpo primário foi 1:100. Empregou-se como anticorpo secundário Anti-Goat biotinilado IgG B7014 (Sigma-Aldrich). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina, desidratados e as lâminas foram montadas, conforme a rotina histológica descrita anteriormete. A seguir, as lâminas foram analisadas em microscópio de campo claro modelo SCOPE A1 – Axio e sistema Axio Vision 4.7 de captura da marca Zeiss (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, USA) em aumento de 200X. Foi adotado, em linhas gerais, o protocolo descrito por Suratt et al. (2003). Foram também utilizados anticorpos específicos da reação

imunohistoquímica fluorescente anti-GFP específico para o “pool” de BMMC inoculadas de camundongos que expressam a proteína fluorescente verde – GFP – IgG Alexaflúor 488 – Invitrogen (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para análise do tecido pulmonar das fêmeas receptoras.

2.10 Análise estatística

Foram analisados e comparados os resultados pela aplicação da Análise de Variância de Kruskal Wallis, por meio do teste de ANOVA, teste de post-Hoc de Dunn, com nível de significância 5%.

2.11 Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados seguindo as normas éticas para pesquisas com animais, visando a utilização do menor número de animais e manejo da dor e sofrimento durante o estudo e eutanásia. Houve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Unesp - Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Processo nº 480/2009, registro 013/2009.

3 RESULTADOS

3.1 Morfometria

3.1.1 Fase preliminar de padronização da fixação do tecido pulmonar

A fim de se verificar a adequação do método proposto de fixação do tecido pulmonar, animais foram divididos em grupos experimentais e controles a fim de se comparar os métodos de fixação do tecido pulmonar de animais expostos à elastase e não expostos à elastase. Os grupos foram os seguintes: i) G1 – tecido de animal exposto à elastase fixado no aparato de fixação após a extração; ii) G2 – tecido de animal exposto à elastase e fixado antes da extração (perfundido por 5 minutos com solução a 4% de formol com ajuda de um funil antes da extração); iii) G3 – tecido de animal não exposto à elastase fixado após a extração e iv) G4 – tecido de animal não exposto à elastase fixado antes da extração.

Os cortes histológicos de tecido pulmonar de todos os grupos foram comparados, considerando-se o diâmetro alveolar médio (LM) por meio do retículo de Weibel. Os valores de LM foram tratados estatisticamente por meio de Análise de Variância de Kruskal-Wallis com teste de post hoc de Dunn com nível de significância de 5%. A Figura 9 ilustra os resultados. É possível observar que não há diferença significativa entre os valores de LM encontrados para os grupos controle que tiveram o tecido pulmonar fixado de acordo com as duas metodologias propostas na literatura. Também não houve diferença significativa entre os valores de LM para os grupos expostos à elastase que tiveram o tecido pulmonar fixados conforme as duas formas propostas na literatura. Houve porém, diferença estatisticamente significativa entre os valores de LM encontrados para os grupos controle e expostos à elastase. É possível ainda observar que mediana referente ao diâmetro alveolar médio dos grupos que receberam elastase (G1 e G2) é maior que a mediana dos grupos que não receberam elastase (G3 e G4).

Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido pulmonar dos quatro grupos da fase preliminar corados com Hematoxilina-Eosina (HE) em aumento de 200x em microscópio de campo claro e sistema Axio Vision 4.7 modelo SCOPE A1 – Axio – Zeiss são apresentadas na Figura 8 a seguir.

Figura 8 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido pulmonar corados com Hematoxilina-Eosina (HE) em microscópio de campo claro dos grupos de animais expostos à elastase que tiveram o tecido pulmonar fixado após a extração (G1) ou antes da extração (G2) e de animais não expostos à elastase que tiveram o tecido pulmonar fixado após a extração (G3) ou antes da extração (G4). (200X)

Figura 9 – Análise comparativa do diâmetro alveolar médio obtido por meio da análise com o retículo de Weibel em cortes histológicos de tecido pulmonar corados com Hematoxilina-Eosina (HE) em aumento de 400x em microscópio de campo claro, dos grupos de animais expostos à elastase que tiveram o tecido pulmonar fixado após a extração (G1) ou antes da extração (G2) e de animais não expostos à elastase que tiveram o tecido pulmonar fixado após a extração (G3) ou antes da extração (G4).

*letras iguais indicam medianas iguais, com $p > 0,001$

3.1.2 Fase de estabelecimento do modelo animal

Após a adequação do método de fixação do tecido pulmonar na fase preliminar do projeto, seguiu-se para a fase de estabelecimento do modelo animal. O objetivo desta fase foi determinar o número adequado de doses de elastase para indução do enfisema pulmonar em camundongos. Para tanto, avaliou-se comparativamente o diâmetro alveolar médio dos seguintes grupos: i) Grupo E0, grupo controle, que recebeu instilação intranasal de 50 µl do veículo, solução salina; ii) Grupo E1: uma dose de elastase; iii) Grupo E2: duas doses de elastase com um intervalo de 7 dias entre cada dose; iv) Grupo E3: três doses de elastase com um intervalo de 7 dias entre cada dose e v) CN: controle normal, animais sem nenhum tratamento. Todos os animais foram sacrificados 21 dias após a primeira dose para análise morfométrica.

Os dados de LM de cada grupo experimental e controle foram comparados estatisticamente por meio de Análise de Variância de Kruskal-Wallis com teste de post hoc de Dunn com nível de significância de 5%. Pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e todos os grupos experimentais, conforme apresentado na Figura 11. Pode-se verificar ainda diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam uma dose de elastase e os que receberam duas ou três doses. Porém, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dados do grupo que recebeu duas doses de elastase e o que recebeu três doses. Analisando-se as medianas dos grupos, é possível constatar que as medianas referente ao diâmetro alveolar médio dos grupos que receberam duas ou três doses de elastase (E3 e E2) é significativamente maior que a do grupo que recebeu apenas uma dose de elastase (E1) e a do grupo que recebeu solução fisiológica (E0). Por sua vez, a mediana do grupo que recebeu apenas uma dose de elastase (E1) é maior que a mediana do grupo que recebeu solução fisiológica (E0).

A Figura 10 apresenta fotomicrografias de tecido pulmonar dos grupos da fase de avaliação das doses de elastase, corados com Hematoxilina-Eosina (HE) em aumento de 200x em microscópio de campo claro.

Figura 10 – Fotomicrografias de tecido pulmonar corado com Hematoxilina-Eosina (HE) em microscópio de campo claro dos grupos que receberam 0 (E0), uma (E1), duas (E2) ou três (E3) doses de elastase. (200X).

Figura 11 – Análise comparativa do diâmetro alveolar médio obtido por meio de cortes histológicos de tecido pulmonar corados com Hematoxilina-Eosina (HE) em aumento de 400x em microscópio de campo claro, dos grupos que receberam 0 (E0), uma (E1), duas (E2) ou três (E3) doses de elastase e controle, sem tratamento (CN).

*uma letra igual, medianas iguais, com $p > 0,001$

3.1.3 Fase de estabelecimento da terapia celular

Após o estabelecimento do modelo animal de enfisema pulmonar com uma dose de elastase, seguiu-se para a análise dos efeitos da terapia celular com células mononucleares da medula óssea na morfologia do tecido pulmonar dos animais submetidos à indução experimental do enfisema pulmonar.

Para realizar as análises dos efeitos morfométricos da infusão de um pool de células mononucleares da medula óssea em animais com enfisema pulmonar induzido experimentalmente por instilação intranasal de uma dose de elastase, comparou-se as medidas do diâmetro alveolar médio dos animais expostos à elastase divididos nos seguintes grupos: i) EME7 – submetidos à infusão de uma dose do veículo (meio de cultura DEMEM) e sacrificados após 7 dias; ii) EME14 – submetidos à infusão de uma dose de meio de cultura e

sacrificados após 14 dias; iii) EME21 – submetidos à infusão de uma dose de meio de cultura e sacrificados após 21 dias; iv) EPO7 – submetidos à infusão de uma dose de células mononucleares da medula óssea e sacrificados após 7 dias; v) EPO14 – submetidos à infusão de uma dose de células e sacrificados após 14 dias e vi) EPO21 – submetidos à infusão de uma dose de células e sacrificados após 21 dias.

Os resultados, apresentados na Figura 13 mostram que não houve diferença estatisticamente significativas entre o diâmetro alveolar médio dos grupos controle, infundidos com meio de cultura e sacrificados após 7, 14 e 21 dias, e dos grupos infundidos com células mononucleares da medula óssea (BMMC) e sacrificados após 7 e 14 dias. Houve porém, diferença estatisticamente significativa entre estes grupos e o grupo infundido com BMMC e sacrificado após 21 dias, sendo que a mediana relativa ao diâmetro alveolar médio do grupo é significativamente menor que as medianas dos demais grupos.

Na Figura 12 observa-se fotomicrografias ilustrativas de cada um dos grupos da fase de estabelecimento da terapia celular.

Figura 12 – Fotomicrografias de tecido pulmonar corado com Hematoxilina-Eosina (HE) em microscópio de campo claro dos grupos de animais expostos à elastase infundidos com meio de cultura e avaliados após 7 (EME7), 14 (EME14) ou 21 dias (EME21) e expostos à elastase infundidos com uma dose de células e avaliados após 7 (EPO7), 14 (EPO14) ou 21 dias (EPO21). (200X)

Figura 13 - Análise comparativa do diâmetro alveolar médio obtido por meio de cortes histológicos de tecido pulmonar corados com Hematoxilina-Eosina (HE) em aumento de 400x em microscópio de campo claro, dos grupos de animais expostos à elastase, infundidos com meio de cultura e avaliados após 7 (EME7), 14 (EME14) ou 21 dias (EME21) e expostos à elastase infundidos com uma dose de células e avaliados após 7 (EPO7), 14 (EPO14) ou 21 dias (EPO21).

*uma letra igual, medianas iguais, com $p > 0,001$

3.1.4 Fase de avaliação do número de doses de BMMC

Estabelecido o período de 21 dias para análise do tecido pulmonar após a terapia celular, partiu-se para o estudo dos efeitos de infusões repetidas de células mononucleares da medula óssea em modelo animal de enfisema pulmonar.

A fim de se avaliar os efeitos da terapia celular com repetidas infusões em animais expostos à elastase, camundongos fêmeas de aproximadamente dois meses de idade receberam instilação intranasal de elastase e, 21 dias depois, divididas nos seguintes grupos: grupos controle, que receberam uma (EME1), duas (EME2) ou três (EME3) doses do veículo,

meio de cultura DEMEM Low Glucose – LGC e grupos experimentais, que receberam uma (EPO1), duas (EPO2) ou três (EPO3) infusões de 0,4 ml de uma suspensão de BMMC contendo 0,4 cels./ml. As infusões foram realizadas com um intervalo de sete dias e os animais sacrificados por deslocamento cervical 21 dias após a última infusão. O tecido pulmonar dos animais foi extraído, corado com HE e o diâmetro alveolar médio (LM) dos grupos determinado por meio do retículo de Weibel para cada um dos grupos experimentais. Os valores de LM dos grupos foi comparado por meio da análise de variância de Kruskal-Wallis com teste de post-hoc de Dunn com nível de significância de 0,01%.

Os resultados, apresentados na Figura 15, mostram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle que receberam uma (EME1), duas (EME2) ou três (EME3) doses de meio de cultura. Houve porém diferença estatisticamente significativa entre todos grupos controle (que receberam até três doses de meio de cultura) e os grupos experimentais que receberam uma (EPO1), duas (EPO2), ou três (EPO3) doses de células. Ao comparar-se os grupos experimentais, verifica-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo que recebeu uma dose de células (EPO1) e os demais grupos. Comparando-se os grupos que receberam duas ou três doses de células (EPO2 e EPO3), não houve diferença estatisticamente significativa. Ao analisar-se, porém, as medianas dos grupos, é possível verificar que as medianas dos grupos que receberam duas (EPO2) ou três (EPO3) doses de células são estaticamente iguais entre si e maiores que as medianas dos grupos controle (EME 1, EME2 e EME3), iguais entre si e maiores que a mediana do grupo que recebeu uma dose de células (EPO1). A Figura 14 apresenta fotomicrografias de cortes histológicos de tecido pulmonar dos grupos da fase de determinação do número de doses de células corados com Hematoxilina-Eosina (HE) em aumento de 200x em microscópio de campo claro e sistema Axio Vision 4.7 modelo SCOPE A1 – Axio – Zeiss.

Figura 14 – Fotomicrografias de tecido pulmonar corado com Hematoxilina-Eosina (HE) em microscópio de campo claro dos grupos de animais expostos à elastase que receberam uma (EPO1), duas (EPO2) ou três (EPO3) infusões de BMMC e animais expostos à elastase que receberam uma (EME1), duas (EME2) ou três (EME3) infusões de meio de cultura. (200X)

Figura 15- Análise comparativa do diâmetro alveolar médio obtido por meio de cortes histológicos de tecido pulmonar corados com Hematoxilina-Eosina (HE) em aumento de 400x em microscópio de campo claro, dos grupos de animais expostos à elastase que receberam uma (EPO1), duas (EPO2) ou três (EPO3) infusões de BMMC e animais expostos à elastase que receberam uma (EME1), duas (EME2) ou três (EME3) infusões de meio de cultura.

*uma letra igual, medianas iguais, com $p > 0,001$.

3.2 Imunohistoquímica para metaloproteinases 9 e 12

3.2.1 Fase de estabelecimento do modelo animal

A fim de se caracterizar o modelo animal utilizado quanto aos padrões de expressão das metaloproteinases 09 e 12, características do processo inflamatório, investigou-se por meio de imunohistoquímica os grupos submetidos a diferentes doses de elastase. Como pode ser observado nas Figuras 16 e 17, houve mudanças nos padrões de expressão destas proteínas de matriz, indicando a presença de processo inflamatório inerente ao enfisema pulmonar nos grupos submetidos à instilação intranasal de elastase.

É possível observar na Figura 16, a presença da metaloproteinase 09 (em marrom) no grupo controle (E0) apenas no lúmen das vias aéreas, onde há secreção de muco protetor, enquanto nos grupos tratados com 1 (E1), 2 (E2) ou 3 (E3) doses de elastase pode-se observar presença da metaloproteinase 09 em grande parte da matriz extracelular do tecido pulmonar e não no lúmen das vias aéreas.

Figura 16– Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para metaloproteinase 09 (Santa Cruz – sc6840) contra-corado com hematoxilina em Microscópio de campo claro e sistema Axio Vision 4.7 modelo SCOPE A1 – Axio – Zeiss para os grupos que receberam 0 (E0), uma (E1), duas (E2) ou três (E3) doses de elastase. (200X)

Como pode-se observar na Figura 17, a presença de metaloproteinase 12 (em marrom) é fracamente detectada no grupo controle (E0) em algumas células do epitélio das vias aéreas, enquanto nos grupos experimentais com 1 (E1), 2 (E2) ou 3 (E3) doses de elastase, a presença da metaloproteinase 12 pode ser detectada de forma mais abundante em grande parte da matriz extracelular do tecido pulmonar.

Figura 17 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para metaloproteinase 12 (Santa Cruz – sc8839) contra-corado com hematoxilina em Microscópio de campo claro e sistema Axio Vision 4.7 modelo SCOPE A1 – Axio – Zeiss para os grupos que receberam 0 (E0), uma (E1), duas (E2) ou três (E3) doses de elastase. (200X)

3.2.2 Fase de estabelecimento da terapia celular

Os grupos submetidos à indução do enfisema pulmonar com elastase e infundidos com BMMC (experimentais) ou apenas com meio de cultura (controle) foram avaliados 7 (EPO7 e EME7), 14 (EPO14 e EME14) e 21 dias (EPO21 e EME21) após a infusão quanto à presença de metaloproteinases 09 e 12 na matriz extracelular, características do processo inflamatório pelo método de imunohistoquímica.

A Figura 18 apresenta fotomicrografias de cortes histológicos do tecido pulmonar submetidos à imunohistoquímica para metaloproteinase 09. É possível observar que a presença de metaloproteinase 09 nos grupos avaliados 7 dias após a infusão é fracamente detectada (marrom) na matriz extracelular tanto no grupo controle (EME7) quanto no grupo experimental (EPO7). Após 14 dias, verifica-se aumento na detecção de metaloproteinase 09 no grupo controle (EME14) e no grupo experimental (EPO14). No entanto, após 21 dias, é possível detectar a presença de metaloproteinase 09 (marrom) na matriz extracelular e no epitélio das vias aéreas do grupo controle (EME21) e no grupo tratado (EPO21), a marcação pode ser detectada apenas de forma leve no interstício do tecido pulmonar.

Figura 18 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para metaloproteinase 09 (Santa Cruz – sc6840) contra-corado com hematoxilina em microscópio de campo claro dos grupos de animais expostos à elastase infundidos com meio de cultura e avaliados após 7 (EME7), 14 (EME14) ou 21 dias (EME21) e expostos à elastase infundidos com uma dose de células e avaliados após 7 (EPO7), 14 (EPO14) ou 21 dias (EPO21). (200X)

É possível observar na Figura 19 que a presença da marcação para metaloproteinase 12 pode ser detectada na matriz extracelular e no lúmen das vias aéreas (em marrom) dos animais pertencentes aos grupos controle, avaliados após 7, 14 e 21 dias após a infusão de meio de cultura (EME 7, EME14 e EME 21). Nos grupos experimentais, é possível constatar a presença da metaloproteinase 12 (em marrom) na matriz extracelular e no lúmen das vias aéreas dos animais pertencentes aos grupos avaliados 7 e 14 dias (EPO7 e EPO14) após a infusão de um “pool” de células mononucleares da medula óssea. Porém, após 21 (EPO21) dias não se observa a presença da marcação na matriz extracelular do tecido, ou no lúmen das vias aéreas.

EME7

EPO7

EME14

EPO14

EME21

EPO21

Figura 19 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para metaloproteinase 12 (Santa Cruz – sc8839) contra-corado com hematoxilina em microscópio de campo claro dos grupos de animais expostos à elastase infundidos com meio de cultura e avaliados após 7 (EME7), 14 (EME14) ou 21 dias (EME21) e expostos à elastase infundidos com uma dose de células e avaliados após 7 (EPO7), 14 (EPO14) ou 21 dias (EPO21). (200X)

3.2.3 Fase de avaliação do número de doses de BMMC

Os grupos submetidos à indução do enfisema pulmonar com elastase e infundidos com uma (EPO1), duas (EPO2) ou três (EPO3) doses de BMMC (experimentais), e os grupos infundidos com uma (EME1), duas (EME2) ou três (EME3) doses de meio de cultura (controle) foram avaliados pelo método de imunohistoquímica quanto à presença de metaloproteinases 09 e 12 na matriz extracelular, características do processo inflamatório. Todos os animais foram sacrificados para análise 21 dias após a última infusão.

A figura 20 apresenta fotomicrografias de cortes histológicos do tecido pulmonar submetidos à imunohistoquímica para metaloproteinase 09. É possível observar a presença da marcação para metaloproteinase 09 (em marrom) em todo o tecido pulmonar para os grupos que receberam 1 (EME1), duas (EME2) ou três (EME3) doses de meio de cultura. Ao verificar-se porém os grupos experimentais, é possível constatar a presença da marcação para metaloproteinase 09 em todo o tecido nos grupos que receberam 2 (EPO2) ou três (EPO3) doses de células. Ao avaliar-se o grupo que recebeu apenas uma dose de células (EPO1), a presença da marcação para metaloproteinase 09 ocorre de forma branda apenas no interstício do tecido pulmonar e epitélio das vias aéreas.

Figura 20 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para metaloproteinase 09 (Santa Cruz – sc6840) contra-corado com hematoxilina em microscópio de campo claro dos grupos de animais expostos à elastase que receberam uma (EPO1), duas (EPO2) ou três (EPO3) infusões de BMMC e animais expostos à elastase que receberam uma (EME1), duas (EME2) ou três (EME3) infusões de meio de cultura. (200X)

É possível observar na Figura 21 que a presença da metaloproteinase 12 pode ser detectada na matriz extracelular e no lúmen das vias aéreas (em marrom) dos animais pertencentes aos grupos controle, que recebera uma (EME1), duas (EME2), ou três doses de meio de cultura. Nos grupos experimentais, é possível verificar a presença da marcação para metaloproteinase 12 (em marrom) na matriz extracelular e no lúmen das vias aéreas dos animais pertencentes aos grupos que receberam duas (EPO2) ou três (EPO3) doses de células. Porém, ao avaliar-se o tecido dos animais que receberam apenas uma dose de células, observa-se a presença da marcação para metaloproteinase 12 não pôde ser detectada.

Figura 21 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para metaloproteinase 12 (Santa Cruz – sc8839) contra-corado com hematoxilina em microscópio de campo claro dos grupos de animais expostos à elastase que receberam uma (EPO1), duas (EPO2) ou três (EPO3) infusões de BMMC e animais expostos à elastase que receberam uma (EME1), duas (EME2) ou três (EME3) infusões de meio de cultura. (200X)

3.3 Imunohistoquímica para GFP

3.3.1 Fase de estabelecimento da terapia celular

A fim de validar o modelo de infusão de células pela via sistêmica e detectar a presença das células infundidas no tecido pulmonar dos animais receptores, realizou-se imunohistoquímica para a proteína fluorescente verde (GFP- “Green Fluorescent Protein”). As células mononucleares infundidas foram provenientes de animais transgênicos EGFP⁺, que têm como característica a produção endógena da proteína fluorescente verde (GFP) por todas as células.

Como é possível observar na Figura 22, a presença de células positivas para GFP (em verde) não foi detectada nos grupos controle, expostos à elastase e infundidos com meio de cultura e avaliados após 7 (EME7), 14 (14) ou 21 (EME21) dias. Há porém marcação do tecido pulmonar dos receptores com DAPI (em azul) para os mesmos grupos, demonstrando que a imunohistoquímica foi realizada de forma adequada.

Figura 22 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para a proteína EGFP, expressa pelas células infundidas, e corados com DAPI para os grupos de animais expostos à elastase infundidos com meio de cultura e avaliados após 7 (EME7), 14 (EME14) ou 21 dias (EME21). (200X)

Na Figura 23, é possível a presença da marcação para GFP, em verde, no tecido pulmonar dos animais expostos à elastase submetidos à infusão de BMMC e avaliados após 7 (EPO7), 14 (EPO14) e 21 dias (EPO21). Pode-se observar também a marcação do tecido pulmonar com DAPI, em azul, indicando que a imunohistoquímica foi realizada adequadamente. A terceira parte da figura evidencia a co-marcação da sonda para GFP e DAPI. Estes resultados evidenciam a presença das células infundidas no tecido pulmonar dos animais receptores 7, 14 e 21 dias após a infusão.

Figura 23 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para a proteína EGFP, expressa pelas células infundidas, e corados com DAPI para os grupos de animais expostos à elastase infundidos com uma dose de células e avaliados após 7 (EPO7), 14 (EPO14) ou 21 dias (EPO21). (200X)

3.3.2 Fase de avaliação do número de doses de BMMC

Com a verificação da presença das células infundidas no tecido pulmonar dos animais receptores após 7, 14 e 21 dias, procedeu-se à avaliação de animais submetidos a uma, duas ou três infusões. Observa-se na Figura 24 que a presença de marcação para GFP, em verde, não pode ser detectada nos grupos controle, que receberam uma (EME1), duas (EME2) ou três (EME3) doses meio de cultura. Pode-se detectar, porém, a presença de marcação com DAPI, em azul, indicando que a imunohistoquímica foi realizada adequadamente.

Figura 24 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para a proteína EGFP, expressa pelas células infundidas, e corados com DAPI para os grupos de animais expostos à elastase que receberam uma (EME1), duas (EME2) ou três (EME3) infusões de meio de cultura. (200X)

Na Figura 25, observa-se a marcação para GFP, em verde, no tecido pulmonar de animais submetidos a uma (EPO1), duas (EPO2) ou três (EPO3) infusões de células. -se ainda a presença da marcação para DAPI, em azul, indicando que a imunohistoquímica foi realizada de forma adequada. A terceira parte da figura mostra a co-marcação da sonda para GFP e DAPI. Estes resultados evidenciam a presença das células infundidas no tecido pulmonar de animais submetidos a uma, duas ou três infusões de BMMC.

Figura 25 – Fotomicrografias de tecido pulmonar em imunohistoquímica para a proteína EGFP, expressa pelas células infundidas, e corados com DAPI para os grupos de animais expostos à elastase que receberam uma (EPO1), duas (EPO2) ou três (EPO3) infusões de BMMC. (200X)

3.4 Citometria de Fluxo

A fim de se avaliar a eficiência da separação da fase de células mononucleares da medula óssea por meio do gradiente de Ficoll, procedeu-se à análise das células e seus marcadores de superfície por meio de citometria de fluxo. A medula óssea de 05 camundongos machos da linhagem C57Bl/6 - GFP⁺ de aproximadamente 45 dias de idade foi extraída. Obteve-se um volume de 3 ml de suspensão celular, sendo que 1,5 ml desta suspensão foi rotulado como “Medula Total” e o restante passou por separação por gradiente de Ficoll. Obteve-se 2 ml de suspensão celular da fase mononuclear, rotulada como “Mononucleares”. As duas amostras obtidas foram submetidas à teste de viabilidade com azul de trypan. Estas amostras foram submetidas a citometria de fluxo. As células-tronco hematopoéticas (CTH) foram reconhecidas utilizando o coquetel de linhagens maduras (B220, CD3, Ter-119, CD11b, Gr-1-todos conjugados a PE) e os anticorpos anti-Flk2-PE, anti-Sca-1-

Cy7/PE e anti-c-Kit-APC. As células-tronco mesenquimais (CTM) foram reconhecidas utilizando-se marcadores para seleção negativa (anti-CD45, anti-Ter-119, anti-CD11b, anti-cKit -todos conjugados a APC) e os anticorpos anti-CD90-PE, anti-CD73-PE e anti-Sca-1-Cy7/PE. As células mielóides maduras foram reconhecidas com os anticorpos anti-Gr-1-PE (granulócitos), anti-CD11b-Cy7/PE (monócitos/macrófagos) e anti-Ter-119-APC (eritrócitos), enquanto as células linfóides foram identificadas com os anticorpos anti-B220-PE (característico de linfócitos B) e anti-CD3-APC (característico de linfócitos T). Os resultados são apresentados na Figura 26 a seguir.

É possível observar que as duas amostras diferem tanto pelo volume celular quanto pelo padrão de expressão dos marcadores avaliados, indicando que o processo de obtenção da fase mononuclear de células da medula óssea foi adequado.

Figura 26 – Porcentagem das células presentes na fração mononuclear e total da MO de animais GFP⁺.

(A) Estratégia de seleção das células-tronco hematopoéticas e células-tronco mesenquimais (B). (C,D) Porcentagem de CTH, CTM e células maduras presentes na fração mononuclear e total da MO.

4 DISCUSSÃO

O enfisema resulta da ação proteolítica imediata da elastase sobre o tecido pulmonar. Nesse processo há duas fases distintas: a fase aguda, resultante do ataque enzimático sobre o tecido conjuntivo com formação de edema pulmonar e a fase crônica, de reestruturação não organizada das fibras elásticas (Kuhn et al., 1976). Assim, o desenvolvimento crônico do enfisema por elastase é decorrente de um processo inflamatório gradual e lento. Participam deste processo diferentes células inflamatórias, com a liberação de diversos fatores, como elastase neutrofílica e metaloproteinases de macrófagos, principalmente MMP9 e MMP12 (Abboue e Vimalanathan, 2008; Ganesan et al., 2010).

Modelos animais de enfisema pulmonar obtidos por meio de instilação de proteases foram propostos por diferentes autores. Trabalhos previamente relatados com modelos animais de enfisema pulmonar induzido por proteases reportam métodos de fixação do tecido pulmonar antes (Ishizawa et al., 2003; Yamada et al., 2004) ou após a extração (Arantes, 2007; Faria e Ribeiro-Paes, 2007). Também são citados diferentes tempos de indução, tais como: 28 dias (Arantes, 2007), 40 dias (Fusco et al., 2002) e 45 dias (Hele et al., 2002).

Os procedimentos experimentais deste estudo foram divididos em 4 fases para fins organizacionais. As fases iniciais compreendem às análises morfométricas e imunohistoquímicas do tecido pulmonar de animais expostos ou não à elastase a fim de se caracterizar o modelo animal de enfisema pulmonar. As fases posteriores constituem-se das análises morfométricas e imunohistoquímicas do tecido pulmonar de animais com enfisema induzido experimentalmente por elastase e submetidos a infusão de células mononucleares da medula óssea (BMMC) pela via sistêmica. Objetivou-se assim caracterizar os efeitos da terapia celular em animais com enfisema pulmonar induzido experimentalmente.

Na fase preliminar, foram analisados os métodos de fixação do tecido pulmonar antes e após a extração para avaliar comparativamente os dados da literatura envolvendo o modelo animal de enfisema pulmonar por instilação de protease. Para tanto, fixou-se pulmões de animais expostos ou não à elastase antes da extração, conforme descrito por Ishizawa et al. (2003) e Yamada et al. (2004), ou após a extração, conforme descrito por Fusco et al. (2002), Faria e Ribeiro-Paes (2007) e Longhini-dos-Santos et al. (2010).

O tecido pulmonar fixado antes ou após a extração foi comparado quanto à morfometria (LM). Os resultados são apresentados nas Figuras 8 e 9. A análise destes resultados mostra que não há diferença estatisticamente significativa entre o diâmetro alveolar

médio (LM) dos grupos que tiveram o tecido pulmonar fixado antes ou após a extração, expostos ou não à elastase. Logo, é possível propor que o método de fixação antes ou após a extração do tecido não interfere na análise dos padrões morfométricos do tecido pulmonar de animais expostos ou não à elastase. Desta forma, nas fases posteriores do estudo, utilizou-se a fixação do tecido pulmonar após a extração. Essa abordagem oferece como principais vantagens maior facilidade técnica e redução do tempo total do procedimento.

Um outro aspecto que permitiu a redução do tempo total do experimento foi a adoção de um período de 21 dias para estabelecimento do enfisema pulmonar após instilação de uma dose de elastase, conforme resultados prévios obtidos em nosso laboratório (Faria e Ribeiro-Paes, 2007; Longhini-dosSantos et al., 2010). Deve-se ressaltar que trabalhos anteriores relataram diferentes tempos de indução do enfisema pulmonar após instilação de protease, tais como: 28 dias (Arantes, 2007), 40 dias (Fusco et al., 2002) e 45 dias (Hele et al., 2002).

Após o estabelecimento do método de fixação do tecido pulmonar e do período para indução do enfisema em camundongos por instilação intranasal de elastase, seguiu-se a fase posterior do estudo. A cronicidade do enfisema é decorrente, dentre outros fatores, da constante liberação de fatores agressores, como elastase neutrofílica e metaloproteínases macrofágicas, durante o processo inflamatório inerente ao enfisema pulmonar (Abboue e Vimalanathan, 2008; Ganesan et al., 2010). Em função desses achados, foram comparados nessa fase, morfometricamente e por meio de imunohistoquímica, o tecido pulmonar de animais não expostos a elastase (E0) ou expostos a uma (E1), duas (E2) ou três (E3) doses de elastase e sacrificados após 21 dias para análise. O objetivo desta fase foi investigar os efeitos de doses repetidas de elastase no tecido pulmonar de camundongos. Não há relatos prévios de indução de enfisema em modelos animais com mais de uma dose de elastase. Nesse estudo, relata-se, portanto, um procedimento inédito para indução do enfisema em camundongos por meio da instilação intranasal de mais de uma dose de elastase.

Os resultados da análise morfométrica são apresentados nas Figuras 10 e 11. Comparando-se o diâmetro alveolar médio (LM) dos grupos, foi possível verificar diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle, normal (CN) e instilado com solução salina (E0), e os demais grupos, tratados com elastase (E1, E2 e E3). Desta forma, é possível verificar que uma dose de elastase causa mudanças morfométricas consistentes com o padrão histopatológico do enfisema pulmonar. Este dado está em consonância com os resultados obtidos por outros autores com a indução do enfisema pulmonar com uma dose de elastase (Ishizawa et al., 2003; Yamada et al., 2004; Fusco et al., 2002; Hele et al., 2002; Arantes,

2007; Faria e Ribeiro-Paes, 2007). Foi possível ainda verificar diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam uma (E1), duas (E2) ou três (E3) doses de elastase. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam duas (E2) e três (E3) doses de elastase. Desta forma, estes dados mostram que uma dose intranasal de elastase é suficiente para a indução do enfisema, sendo que duas ou mais doses causam lesão severa no tecido pulmonar.

A metaloproteinase 9 tem papel importante no processo de infiltração do tecido pulmonar pelas células inflamatórias, principalmente macrófagos (Amalinei et al., 2010). As análises das fotomicrografias de imunohistoquímica para as metaloproteinases 9 (MMP9) apresentadas na Figura 16, permitem verificar diferenças entre o grupo controle (E0) e os tratados com uma (E1), duas (E2) ou três (E3) doses de elastase. No grupo tratado apenas com o veículo (E0), a presença da marcação para MMP9 é detectada apenas no lúmen das vias aéreas, enquanto nos grupos tratados com elastase, detecta-se a presença da marcação de MMP9 no interstício do tecido pulmonar, entre os alvéolos. Este dado é consistente com o papel da MMP9 na infiltração dos macrófagos no tecido pulmonar durante o processo inflamatório (Finlay et al., 1997; Amalinei et al., 2010; Ganesan et al., 2010). Ou seja, os dados mostram que houve aumento da expressão da MMP9 em todo o tecido pulmonar dos animais expostos a uma dose intranasal de elastase, como é característico no enfisema pulmonar.

A metaloproteinase 12, uma metaloelastase, atua no processo de digestão da matriz extracelular, sendo liberada por macrófagos durante o processo inflamatório (Amalinei et al., 2010). Foi possível observar diferenças entre o grupo não tratado e os demais, tratados com diferentes doses de elastase, quanto à presença de metaloproteinase 12 no tecido pulmonar detectada por meio de imunohistoquímica. Como apresentado na Figura 17, no grupo controle foi possível observar a presença da marcação para MMP12 apenas no epitélio das vias aéreas e de forma inexpressiva. Por sua vez, nos grupos tratados com elastase, foi possível detectar a marcação para MMP12 tanto no lúmen das vias aéreas quanto no interstício alveolar. Este dado é consistente com a atividade elastolítica da metaloproteinase 12 durante o processo inflamatório inerente ao enfisema pulmonar (Amalinei et al., 2010, Ganesan et al., 2010).

Conclui-se, portanto, que uma dose intranasal de elastase foi suficiente para causar mudanças nos padrões de expressão da metaloproteinase 12 consistentes com o enfisema pulmonar. Estes dados estão em consonância com o papel das metaloproteinases na formação do infiltrado inflamatório e digestão do tecido pulmonar no enfisema, como discutido por

outros autores (Demedts et al., 2005; Churg et al., 2007; Amalinei et al., 2010; Ganesan et al., 2010). Os dados encontrados também estão de acordo com os obtidos por Finlay et al. (1997). Os autores detectaram a presença de elevados níveis de metaloproteinases, dentre elas MMP9 e MMP12, no lavado bronco alveolar de pacientes com enfisema pulmonar. Desta forma, propuseram uma relação entre níveis elevados de MMP9 e MMP12 e o enfisema pulmonar (Finlay et al., 1997).

Os resultados, tanto nas análises morfométricas quanto na imunohistoquímica, permitiram postular que uma dose de elastase é suficiente para provocar lesão no tecido pulmonar e induzir resposta inflamatória semelhante ao enfisema em camundongos. Permitiram, também, observar que a administração de duas e três doses de elastase promovem uma lesão severa. Essa verificação representa resultado inédito, posto que não há relatos prévios na literatura quanto à utilização de duas/três doses de elastase.

Com o estabelecimento do modelo animal de enfisema pulmonar 21 dias após a instilação intranasal de uma dose de elastase, seguiu-se para as fases posteriores do estudo. Procurou-se nestas fases, a adequação de um protocolo de terapia celular com “pool” de BMMC em modelo animal de enfisema pulmonar.

A terapia celular com células-tronco tem sido objeto de grande atenção, sobretudo na última década. Uma série de pesquisas em modelos experimentais e em pacientes humanos têm evidenciado o grande potencial de aplicabilidade das células-tronco. Um outro aspecto relevante refere-se ao estabelecimento de novas linhas de pesquisa e ampliação do conhecimento sobre aspectos relativos à biologia do desenvolvimento e diferenciação celular (Ribeiro-Paes et al., 2009; D'Agostino et al., 2010; Moodley et al., 2011).

Um grande número de trabalhos com terapia celular tem sido objeto de pesquisa em diferentes áreas e patologias humanas, sobretudo em cardiologia (Schächinger et al., 2004; Segers e Lee, 2008; Boudoulas e Hatzopoulos, 2009; Joggerst e Hatzopoulos, 2009; Cho et al., 2010; Guyette et al., 2010) e neurologia (Bahat-Stroomza et al., 2009; Peng et al., 2010; Reekmans et al., 2010; Xiong et al., 2010). Há, no entanto, em termos proporcionais, um número bem menos expressivo no que se refere ao emprego de terapia celular em doenças pulmonares (Ribeiro-Paes et al., 2009; Agostini, 2010; Sueblinvong e Weiss, 2010; Moodley et al., 2011; Ribeiro-Paes et al., 2011). Trabalhos prévios de nosso grupo de pesquisa mostraram, de forma quali e quantitativa, a melhora nos padrões morfológicos do tecido pulmonar de animais expostos à elastase tratados com “pool” de células mononucleares da

medula óssea (Arantes, 2007; Faria e Ribeiro-Paes, 2007; Ribeiro-Paes et al., 2009), resultados estes que se confirmaram neste estudo.

A fim de se verificar se as células mononucleares foram adequadamente separadas, 05 camundongos da linhagem C57Bl/6 tiveram os fêmures extraídos e a medula removida. Obteve-se 3 ml de suspensão celular, dos quais 1,5ml foi separado e o restante passou pelo processo de separação por gradiente de Ficoll. As duas amostras, de medula total e da fração mononuclear foram então comparadas por citometria de fluxo. Células-tronco da medula óssea caracterizam-se pela positividade para os marcadores Sca-1 e CD90 e ausência dos marcadores CD14, CD34 e CD45 (Xu et al., 2010; Cheng, 2011). Quando se compara os resultados, apresentados na Figura 26, observa-se que houve diferença entre as duas amostras quanto ao volume celular médio e quanto à expressão dos marcadores de superfície Sca-1, CD90 e CD45. Desta forma, é possível inferir que o processo de separação das células da medula óssea por gradiente de Ficoll foi adequadamente realizado e enriqueceu a amostra em células-tronco.

Após a adequação do processo de obtenção das células-tronco, foi realizada análise dos efeitos da infusão do “pool” de células mononucleares no tecido pulmonar de camundongos expostos à elastase. Conforme apresentado nas Figuras 12 e 13, não foi observada diferença estatisticamente significativa da medida do diâmetro alveolar médio (LM) entre os grupos controle infundidos com meio de cultura e avaliados após 7 (EME7), 14 (EME14 ou 21 dias (EME21)). O LM obtido para os grupos tratados e analisados após 7 (EPO7) e 14 dias (EPO14) também não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos controles. Porém, o LM obtido para os animais tratados após 21 dias (EPO21) apresentou diferença estatisticamente significativa para com os demais grupos. Desta forma, pode-se propor que diferenças no diâmetro alveolar médio de animais submetidos à indução experimental do enfisema pulmonar podem ser observadas 21 dias após a infusão de um pool de células mononucleares da medula óssea pela via sistêmica (veia caudal). Ou seja, a influência do tratamento com BMMC pode ser verificada no 21º dia após a infusão (EPO21). Estes resultados estão em consonância com os dados prévios de nosso laboratório com a recuperação dos padrões morfológicos do tecido pulmonar 21 dias após a infusão de um “pool” de BMMC (Faria e Ribeiro-Paes, 2007; Longhini-dos-Santos e Ribeiro-Paes, 2010).

Estes grupos foram também avaliados quanto à expressão de metaloproteinases 9 e 12. A relação entre o aumento da expressão de MMP9 e a progressão do enfisema pulmonar foi

aventada por vários autores, tanto em modelos animais quanto em pacientes humanos (Finlay et al., 1997; Amalinei et al., 2010; Ganesan et al., 2010). Foronjy et al. (2008) produziram uma linhagem transgênica de camundongos tendo como característica a expressão aumentada de metaloproteinase 9 por macrófagos. Os animais, após dois meses de idade, apresentaram lesões pulmonares consistentes com o enfisema pulmonar. Estes dados evidenciam a relação entre o aumento da expressão de MMP9 macrofágica e o enfisema pulmonar (Foronjy et al., 2008). Conforme apresentado na Figura 18, a presença da marcação para metaloproteinase 9 pode ser detectada tanto no epitélio das vias aéreas quanto no interstício alveolar dos grupos controle (infundidos com meio de cultura) e avaliados após 7 (EME7), 14 (EME14) e 21 dias (EME21). Da mesma forma, a presença da marcação para metaloproteinase 9 pode ser verificada tanto no epitélio das vias aéreas quanto no interstício alveolar dos cortes histológicos dos grupos tratados (infundidos com um “pool” de BMMC) e avaliados após 7 (EPO7) e 14 dias (EPO14). Quando observa-se, porém, o grupo tratado e analisado após 21 dias (EPO21), é possível notar que a presença da marcação para metaloproteinase 9 ocorre do ponto de vista qualitativo de forma menos expressiva nos alvéolos e não ocorre no lúmen das vias aéreas, diferentemente dos demais grupos. Assim, pode-se constatar que a infusão de BMMC acarreta uma diminuição progressiva dos níveis de expressão da metaloproteinase 9 em animais expostos à elastase. Essa diminuição poderia ser resultante de um efeito protetor do tecido pulmonar dos animais tratados ao avanço da lesão característica do enfisema pulmonar.

Níveis aumentados de MMP12 foram constatados em pacientes com DPOC por Babusyte et al. (2007). A relação entre a metaloproteinase 12 e o aumento da lesão pulmonar no enfisema também foi avaliada por outros autores (Finlay et al., 1997; Amalinei et al., 2010; Ganesan et al., 2010). Como apresentado na Figura 19, foi possível verificar, por meio de imunohistoquímica, a presença da marcação para MMP 12 no lúmen das vias aéreas e no interstício dos grupos controles infundidos com meio de cultura e avaliados após 7 (EME7, 14 (EME 14) e 21 dias (EME21). Da mesma forma, constata-se a presença da marcação para metaloproteinase 12 no lúmen das vias aéreas e nos alvéolos dos grupos tratados, infundidos com um “pool” de BMMC e avaliados após 7 (EPO) e 14 dias (EPO14). Porém, observando-se o grupo tratado e avaliado após 21 dias (EPO21), nota-se que a presença da marcação para MMP12 está diminuída e restrita ao lúmen de bronquíolos terminais. Logo, é possível propor que a infusão de BMMC em camundongos com enfisema induzido por elastase leva a uma diminuição gradual da expressão de MMP12 no tecido pulmonar e consequente proteção do

tecido pulmonar contra o avanço da lesão característica do enfisema pulmonar. Estes resultados estão em consonância com os dados da análise morfométrica, pois, da mesma forma, diferenças com os grupos controles são observadas apenas após 21 dias do tratamento.

Juntamente com as análises morfométricas e imunohistoquímicas para metaloproteinases, realizou-se também a detecção das células infundidas no tecido pulmonar dos animais receptores. Na obtenção das células-tronco da medula óssea para infusão, foram utilizados camundongos da linhagem transgênica desenvolvida por Okabe et al. (1997). Estes camundongos expressam em todas as suas células a Proteína Fluorescente Verde (Green Fluorescent Protein – GFP), proveniente da água viva *Aequorea victoria* (Okabe et al., 1997).

Para detectar a presença das células GFP⁺ infundidas, utilizou-se anticorpos específicos da reação imunohistoquímica fluorescente anti-GFP – IgG Alexaflúor 488 Invitrogen (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para análise do tecido pulmonar das fêmeas receptoras. Os resultados, apresentados nas Figuras 22 e 23, permitem observar a presença de células do doador (em verde) no tecido pulmonar dos camundongos que receberam infusão de células e foram avaliados 7 (EPO7), 14 (EPO14) e 21 (EPO21) dias após a infusão. Não se verifica a presença destas células no tecido dos camundongos que receberam apenas meio de cultura e foram avaliados 7 (EME7), 14 (EME14) e 21 (EME21) dias após a infusão. Nestes grupos, é possível constatar apenas a presença do controle positivo da reação, a marcação com DAPI das células dos camundongos receptores, em azul.

A partir dos resultados, é possível aventar a hipótese de que a atuação da terapia celular ocorre de forma gradual e lenta e pode ser mais evidentemente verificada 21 dias após a infusão de BMMC. Novas análises, no entanto, serão necessárias, em tempos superiores a 21 dias após a infusão, para avaliar ou estabelecer uma cinética de recuperação do tecido pulmonar longitudinalmente.

Após a determinação de um período de 21 dias para a detecção dos efeitos da infusão de um “pool” de BMMC sobre o tecido pulmonar de animais com enfisema pulmonar induzido por elastase na fase anterior do estudo, seguiu-se para a análise dos efeitos de duas e três infusões de BMMC. Não existem relatos anteriores na literatura sobre a análise dos efeitos de infusões repetidas de células na terapia para doenças pulmonares. Trata-se portanto de um delineamento experimental inédito.

Foram então avaliados por meio de análise morfométrica o tecido pulmonar de animais expostos à elastase e submetidos a uma (EME1), duas (EME2) e três (EME3) infusões de meio de cultura ou uma (EPO1), duas (EPO2) ou três (EPO3) infusões de células. Os

resultados são apresentados nas Figuras 14 e 15 e permitem verificar que há diminuição estatisticamente significativa no diâmetro alveolar médio 21 dias após uma infusão de BMMC. É possível ainda constatar que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle, que receberam uma, duas ou três infusões de meio de cultura. Porém, é também possível observar que houve um aumento do diâmetro alveolar médio 21 dias após a infusão de duas ou três infusões de células, indicando um aumento da lesão pulmonar.

O tecido pulmonar de animais expostos a elastase e submetidos a uma, duas ou três infusões também foi avaliado quanto à presença de metaloproteinases 9 e 12 por meio de imunohistoquímica. A relação entre a expressão aumentada de metaloproteinases 9 e 12 e a DPOC deve-se à infiltração de macrófagos e outras células inflamatórias no tecido pulmonar determinada pela atividade da metaloproteinase 9. Deve-se também à digestão das fibras colágenas e elásticas do tecido pulmonar por ação da metaloproteinase 12 (Amalinei et al., 2010; Ganesan et al., 2010).

Conforme apresentado nas Figuras 20 e 21, a presença de metaloproteinases 9 e 12 mostra-se elevada nos grupos controle (EME1, EME2 e EME3), que receberam infusão apenas de meio de cultura. As análises dos grupos experimentais evidenciam a presença de metaloproteinases 9 e 12 de forma pouco marcante no grupo que recebeu uma dose de células (EPO1). Porém, é possível observar um aumento da expressão de metaloproteinases 9 e 12 no tecido pulmonar dos grupos que receberam duas (EPO2) ou três (EPO3) infusões de células. Esta observação indica um aumento do processo inflamatório nos grupos que receberam mais de uma dose de células, dado que está em consonância com as análises morfométricas, que mostram o aumento do diâmetro alveolar médio destes grupos.

Com as análises morfométricas e imunohistoquímicas para metaloproteinases, realizou-se análise imunohistoquímica para a detecção das células infundidas no tecido pulmonar dos animais receptores. As células infundidas foram obtidas de camundongos da linhagem transgênica desenvolvida por Okabe et al. (1997). Estes camundongos expressam em todas as suas células a Proteína Fluorescente Verde (Green Fluorescent Protein – GFP), proveniente da água viva *Aequorea victoria* (Okabe et al., 1997).

Anticorpos específicos da reação imunohistoquímica fluorescente anti-GFP – IgG Alexaflúor 488 – Invitrogen – foram utilizados na análise do tecido pulmonar das fêmeas receptoras para detecção das células infundidas. Os resultados, apresentados nas Figuras 24 e 25, permitem constatar a presença de células do doador (em verde) no tecido pulmonar dos camundongos que receberam uma (EPO1), duas (EPO2) ou três (EPO3) infusões de células.

Não se observa a presença destas células no tecido dos camundongos pertencentes aos grupos controle, que receberam uma (EME1), duas (EME2) ou três infusões de meio de cultura. Nestes grupos, verifica-se apenas a presença do controle da reação, a marcação com DAPI das células dos camundongos receptores, em azul.

Outros grupos realizaram estudos envolvendo mais de uma dose de células no tratamento de diferentes patologias. Diederichsen et al. (2008) avaliaram 32 pacientes com falência cardíaca congestiva que receberam 2 infusões intra coronárias de células-tronco da medula óssea com um intervalo de 4 meses. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa antes e após as infusões. Em sua publicação, os autores evidenciam a necessidade de análises mais abrangentes para obtenção de dados mais precisos. Salientam ainda que há poucos estudos envolvendo terapia no tratamento de falência cardíaca, sendo que os resultados obtidos por estes são conflitantes, ora com recuperação ora sem recuperação significativa dos padrões cardíacos (Diederichsen et al., 2008).

O mesmo grupo, em estudo posterior, analisou pacientes que receberam duas infusões intra coronárias de células mononucleares da medula óssea após sofrerem infarto do miocárdio. O intervalo entre as doses novamente foi de 4 meses e, nestas condições, os autores puderam verificar melhora significativa nos padrões ecocardiográficos de preenchimento do ventrículo esquerdo antes e após as infusões. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa na Fração de Ejeção Ventricular Esquerda (FEVE). Estes dados sugerem que os efeitos de mais de uma dose de células podem variar em patologias diferentes e de acordo com as análises realizadas (Diederichsen et al., 2010).

Por sua vez, Velthoven e colaboradores constataram resultados conflitantes ao avaliar os efeitos de infusões repetidas de células-tronco mesenquimais em camundongos com hipóxia isquêmica neonatal. Os autores observaram, com uma dose de células no terceiro dia após a lesão, melhora nas funções sensitiva e motora e redução do tamanho da lesão. Os mesmos efeitos foram verificados após a segunda dose de células-tronco no décimo dia após a lesão. Porém, ao avaliar os efeitos de uma dose de células no décimo dia após a lesão, os autores constataram melhora nas funções sensitiva e motora bem como um aumento na formação celular. Os autores verificaram que os processo de recuperação ocorre por diferentes vias nos diferentes intervalos ao constatar mudanças na expressão genética das células do tecido receptor e das células infundidas. Ao publicarem seus resultados, os autores discutem a importância do ambiente em que as células foram infundidas (“milieu”) no controle da expressão gênica de todas as células envolvidas no processo regenerativo, incluindo as células

infundidas, o que poderia explicar os diferentes efeitos em diferentes tempos de infusão (Velthoven et al., 2010).

Lee e colaboradores avaliaram comparativamente os efeitos de uma ou 5 doses repetidas de células-tronco da medula óssea com intervalo de uma semana entre cada dose em ratos nefrectomizados. Os autores verificaram que houve efeitos diferentes para cada um dos grupos experimentais em relação ao grupo controle, que não recebeu tratamento. O grupo que recebeu apenas uma dose de células apresentou melhoras a curto prazo, enquanto o grupo que recebeu doses repetidas apresentou maior efeito protetor a longo prazo. Em sua publicação, os autores atribuíram os efeitos variados de acordo com as doses aos efeitos parácrinos das células-tronco infundidas e estimulação das células progenitoras locais (Lee et al., 2010).

Os resultados referentes à duas ou mais doses de células obtidos neste trabalho poderiam ser decorrentes do acúmulo de um grande número de células no tecido pulmonar devido ao curto intervalo de apenas sete dias entre as infusões. Foi possível constatar por meio das análises 7, 14 e 21 após a infusão de células, apresentadas anteriormente, que os efeitos da terapia celular são detectáveis apenas 21 dias após a administração. Desta forma, o intervalo de sete dias poderia não ser suficiente para que as células infundidas se incorporassem ao tecido, assim, as células infundidas nas doses posteriores poderiam ter se acumulado no parênquima pulmonar. Este acúmulo de células poderia ter agravado o quadro inflamatório inerente ao enfisema pulmonar, com consequente progresso da lesão. Este acúmulo de células em diferentes estágios de diferenciação devido ao curto intervalo entre as doses de células-tronco poderia também causar interferência nos sinais parácrinos destas células. Esta interferência da sinalização celular poderia interferir diretamente nos processos de regeneração do tecido pulmonar ao mudar o ambiente em que as células foram infundidas, agravando assim a lesão causada pelo enfisema pulmonar. Desta forma, novos estudos com diferentes intervalos de tempo entre as infusões de células mononucleares em animais com enfisema pulmonar induzido por elastase se fazem necessários.

Estes resultados são provenientes de um delineamento experimental inédito fornecem dados favoráveis ao emprego da terapia celular na regeneração do enfisema pulmonar induzido experimentalmente. Nas condições experimentais adotadas neste trabalho, o tratamento do enfisema pulmonar por meio das células-tronco adultas provenientes da medula óssea promoveu melhora crescente do padrão histológico do tecido pulmonar no decorrer do tempo de análise (21 dias). A infusão de BMMC promoveu ainda diminuição do processo inflamatório inerente ao enfisema pulmonar, observada por meio das análises

imunohistoquímicas das metaloproteinases 9 e 12, moléculas que se expressam caracteristicamente durante o processo inflamatório do tecido pulmonar.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, é possível concluir que o modelo animal de enfisema pulmonar adotado, com uma dose intranasal de elastase, é adequado para as avaliações morfométricas e de imunofenotipagem realizadas. Considerando-se os padrões histológicos e de expressão de metaloproteinases, características do processo inflamatório inerente ao enfisema, é possível também concluir que há influência da terapia celular com “pool” de BMNC na recuperação do tecido pulmonar de camundongos expostos à elastase 21 dias após a infusão. Com relação à infusão de duas e três doses de células mononucleares, foi possível observar que, nas condições e no modelo animal analisados, não se verificou regeneração do tecido pulmonar lesado. Desta forma, é fundamental que novos estudos sejam efetivados com novo desenho experimental que contemple a inserção de diferentes intervalos entre as infusões de células e em diferentes modelos animais e que, comprovadamente reprodutíveis, os resultados permitam a elaboração de hipóteses consistentes sobre os efeitos do modelo de terapia celular com “pool” de células mononucleares em infusões repetidas .

REFERÊNCIAS¹

- Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12(4):361-7.
- Abraham T, Hogg J. Extracellular matrix remodeling of lung alveolar walls in three dimensional space identified using second harmonic generation and multiphoton excitation fluorescence. *J Struct Biol.* 2010;171(2):189-96.
- Abreu SC, Passaro CP, Garcia CSNB, Morales, MM, Rocco, PRM. Terapia celular nas doenças respiratórias. *Pulmao RJ* 2008;17(2-4):91-7.
- Adachi Y, Oyazu H., Taketani S, Minamino K, Yamaguchi K, Shultz LD, Iwasaki M, Tomita M, Suzuki Y, Nakano K, Koike Y, Yasumizu R., Sata M, Hiramata N, Kubota I. Treatment and Transfer of Emphysema by a New Bone Marrow Transplantation Method from Normal Mice to Tsk Mice and Vice Versa. *Stem Cells.* 2006; 24:2071-7.
- Alison F, Prevot-Pignede J. The influence of blood transfusions on the bone marrow of premature infants. *Sem Hop Ther Paris.* 1961;37:57-60.
- Amălinei C, Căruntu ID, Giușcă SE, Bălan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol.* 2010;51(2):215-28
- Agostini C. Stem cell therapy for chronic lung diseases: hope and reality. *Respir Med.* 2010;104 (Suppl 1):S86-91.
- Arantes, PMM. Emprego de células mononucleares da medula óssea na terapêutica experimental do enfisema pulmonar. Mestrado [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.
- Babusyte A, Stravinskaite K, Jeroch J, Lötvall J, Sakalauskas R, Sitkauskienė B. Patterns of airway inflammation and MMP-12 expression in smokers and ex-smokers with COPD. *Respir Res.* 2007;14;8:81.
- Bahat-Stroomza M, Barhum Y, Levy YS, Karpov O, Bulvik S, Melamed E, Offen D. Induction of adult human bone marrow mesenchymal stromal cells into functional astrocyte-like cells: potential for restorative treatment in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci.* 2009;39(1-2):199-210
- Barnes PJ. New treatments for chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Ist Super Sanita.* 2003;39(4):573-82.
- Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.* 2000;105(12):1663-8.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- Bittencourt H, Rocha V. A Célula-tronco Hematopoética e seu Uso Clínico. In: Zago MA, Covas DT. (editor). Células-tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo: Atheneu; 2006. p. 115-30.
- Boudoulas KD, Hatzopoulos AK. Cardiac repair and regeneration: the Rubik's cube of cell therapy for heart disease. *Dis Model Mech*. 2009;2(7-8):344-58.
- 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.
- Bydlowski, SP, Debes, AA, Maselli, LMF, Janz, FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2009;31(Supl. 1):25-35
- Chen J. Hematopoietic stem cell development, aging and functional failure. *Int J Hematol*. 2011 Apr 27. [Epub ahead of print]
- Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimiwu O, Richter L, Zhang J, Khvorostov I, Ott V, Grunstein M, Lavon N, Benvenisty N, Croce CM, Clark AT, Baxter T, Pyle AD, Teitell MA, Pelegri M, Plath K, Lowry WE. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*. 2009; 2;5(1):111-23.
- Cho J, Zhai P, Maejima Y, Sadoshima J. Myocardial Injection With GSK-3{beta}-Overexpressing Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuates Cardiac Dysfunction After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2011 [Epub ahead of print].
- Churg A, Wright JL. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive lung disease. *Contrib Microbiol*. 2007;14:113-25.
- Churg A, Wang R, Wang X, Onnervik PO, Thim K, Wright JL. Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs. *Thorax*. 2007;62(8):706-13.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Robbins J. Patologia estrutural e funcional. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991.
- 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.
- Dallegrì F, Ottonello. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res*. 1997;46:382-91.
- Dawkins PA, Stockley RA. Animal models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Thorax*. 2001;56:972-7.
- Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pauwels RA. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol*. 2005;5(3):257-63.

Diederichsen AC, Møller JE, Thayssen P, Junker AB, Videbaek L, Saekmose SG, Barington T, Kristiansen M, Kassem M. Effect of repeated intracoronary injection of bone marrow cells in patients with ischaemic heart failure the Danish stem cell study--congestive heart failure trial (DanCell-CHF). *Eur J Heart Fail*. 2008;10(7):661-7.

Diederichsen AC, Møller JE, Thayssen P, Videbaek L, Saekmose SG, Barington T, Kassem M. Changes in left ventricular filling patterns after repeated injection of autologous bone marrow cells in heart failure patients. *Scand Cardiovasc J*. 2010;44(3):139-45.

Faria CA, Ribeiro-Paes JT, Modelo Animal de enfisema pulmonar induzido por elastase e terapia experimental com células mononucleares da medula óssea [Monografia]. Assis, SP: Faculdade de Ciências e Letras da Universidade Estadual Paulista; 2007.

Fehrenbach H. Animal models of pulmonary emphysema: a stereologist's perspective. *Eur Respir Rev*. 2006;15:136-47.

Finlay GA, Russell KJ, McMahon KJ, D'arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM. Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax*. 1997;52(6):502-6.

Foronjy R, Nkyimbeng T, Wallace A, Thankachen J, Okada Y, Lemaitre V, D'Armiento J. Transgenic expression of matrix metalloproteinase-9 causes adult-onset emphysema in mice associated with the loss of alveolar elastin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(6):L1149-57.

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

Fusco LB, Pego-Fernandes PM, Xavier AM, Pazetti R, Rivero DHRF, Capelozzi VL, Jatene FB. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaina. *J Penumol*. 2002;28:1-7.

Fusco L.B., Fonseca, M. H., Pêgo-Fernandes PM, Pazetti R., Capelozzi V.L., Jatene F.B. e Oliveira, S. A. Cirurgia de redução do volume pulmonar em modelo experimental de enfisema em ratos. *J Bras Pneumol*. 2005;31(1):34-40.

Ganesan S, Faris AN, Comstock AT, Chatteraj SS, Chatteraj A, Burgess JR, Curtis JL, Martinez FJ, Zick S, Hershenson MB, Sajjan US. Quercetin prevents progression of disease in elastase/LPS-exposed mice by negatively regulating MMP expression. *Respir Res*. 2010 Sep 28;11:131.

Global Initiative for Chronic Obstructive Disease – GOLD – Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2009.

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

- Grove DA, Xu J, Joodi R, Torres-Gonzales E, Neujahr D, Mora AL, Rojas M. Attenuation of early airway obstruction by mesenchymal stem cells in a murine model of heterotopic tracheal transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2010 Nov 17. [Epub ahead of print]
- Guyette JP, Cohen IS, Gaudette GR. Strategies for regeneration of heart muscle. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010;20(1):35-50.
- Hackett TL, Knight DA, Sin DD. Potential role of stem cells in management of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2010; 7;5:81-8.
- Hackett TL, Scarci M, Zheng L, Tan W, Treasure T, Warner JA. Oxidative modification of albumin in the parenchymal lung tissue of current smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2010;22:180.
- Hantos Z, Adamicza A, Jánosi TZ, Szabari MV, Tolnai J, Suki B. Lung volumes and respiratory mechanics in elastase-induced emphysema in mice. *J Appl Physiol*. 2008;105(6):1864-72.
- Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*. 1997;277:2002-4.
- Hele D. First Siena international conference on animal models of chronic obstructive pulmonary disease, Certosa di Pontignano. Universidade of Siena, Italy, September 30-October 2, 2001. *Respir Res*. 2002;3:12-5.
- Hind M, Maden M. Is a regenerative approach viable for the treatment of COPD? *Br J Pharmacol*. 2011;163(1):106-15.
- Hogg JC. Lung structure and function in COPD. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008;12(5):467-79.
- Ingenito EP, Tsai L, Murthy S, Tyagi S, Mazan M, Hoffman A. Autologous lung-derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental emphysema. *Cell Transplantation*, 2011 [Epub ahead of print].
- Inoue K, Koike E, Takano H. Comprehensive analysis of elastase-induced pulmonary emphysema in mice: effects of ambient existing particulate matters. *Int Immunopharmacol*. 2010;10(11):1380-9.
- Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Numasaki M, Ueda S, Suzuki T, Sasaki H. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. *FEBS Lett*. 2004;2;556(1-3):249-52.
- Iyer SS, Co C, Rojas M. Mesenchymal stem cells and inflammatory lung diseases. *Panminerva Med*. 2009;51(1):5-16
- Joggerst SJ, Hatzopoulos AK. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Expert Rev Mol Med*. 2009;8:e20.

- Jungebluth P, Luedde M, Ferrer E, Luedde T, Vucur M, Peinado VI, Go T, Schreiber C, Richthofen MV, Bader A, Haag J, Darsow KH, Bartel SJ, Lange HA, Furlani D, Steinhoff G, Macchiarini P. Mesenchymal stem cells restore lung function by recruiting resident and non-resident proteins. *Cell Transplantation*. 2011. In press.
- 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.
- Kasahara Y, Tudor RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest*. 2000;106(11):1311-9.
- Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. *Biol Pharm Bull*. 2008;31(7):1434-8.
- Krause DS, Theise ND, Collector M.I, 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;105:369-77.
- Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*. 2009;4(6):472-6.
- 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.
- Kuhn C, Yu SY, Chraplyvy M, Linder HE, Senior RM. The induction of emphysema with elastase. II Changes in connective tissue. *Lab Invest*. 1976;34(4):372-80.
- 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.
- Laurell CB, Eriksson SE. The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest* 1963; 15:132-140.
- Lee AL, Cecins N, Hill CJ, Holland AE, Rautela L, Stirling RG, Thompson PJ, McDonald CF, Jenkins S. The effects of pulmonary rehabilitation in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis: protocol for a randomised controlled trial. *BMC Pulm Med*. 2010; 2;10:5.
- Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A, Howard JP, Matthay MA. Mesenchymal Stem Cells for Acute Lung Injury: Role of Paracrine Soluble Factors. *Stem Cells*. 2011 [Epub ahead of print].

- Lee SR, Lee SH, Moon JY, Park JY, Lee D, Lim SJ, Jeong KH, Park JK, Lee TW, Ihm CG. Repeated administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improved the protective effects on a remnant kidney model. *Ren Fail*. 2010;32(7):840-8.
- Leeb C, Jurga M, McGuckin C, Forraz N, Thallinger C, Moriggl R, Kenner L. New perspectives in stem cell research: beyond embryonic stem cells. *Cell Prolif*. 2011;44(Suppl 1):9-14
- Leuenberger P, Brandt R, Keller R, Knoblauch A, Kuhn M, Perruchoud AP, Rchat T, Russi E, Villiger B, Zeliwger JP. *Conduta na doença obstrutiva crônica*. 1997.
- Longhini-dos-Santos N, Ribeiro-Paes JT. Avaliação da eficiência da terapia celular em modelo murino de enfisema em períodos definidos de tempo [Monografia]. Assis, SP: Universidade Estadual Paulista; 2007.
- Lucattelli M, Cicko S, Müller T, Lommatzsch M, de Cunto G, Cardini S, Sundas W, Grimm M, Zeiser R, Dürk T, Zissel G, Sorichter S, Ferrari D, di Virgilio F, Virchow JC, Lungarella G, Idzko M. P2X7 Receptor Signalling in the Pathogenesis of Smoke-induced Lung Inflammation and Emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;Epub ahead of print.
- Mannino DM. The natural history of chronic obstructive pulmonary disease. *Pneumonol Alergol Pol*. 2011;79(2):139-43.
- Mahadeva R, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease: Experimental animal models of pulmonary emphysema. *Thorax*. 2002;57:908-14.
- Melton DA, Cowan C. "Stemness": Definitions, criteria, and standards. In: Lanza, R. (editor-in-chief). *Handbook of Stem Cells v.2*. New York: Elsevier/Academic Press; 2004. p. xxv-xxxi.
- Moodley Y, Manuelpillai U, Weiss DJ. Cellular therapies for lung disease: A distant horizon. *Respirology*. 2011;16:223-237.
- Mortaz E, Folkerts G, Nijkamp FP, Henricks PA. ATP and the pathogenesis of COPD. *Eur J Pharmacol*. 2010;25;638(1-3):1-4
- Nardi NB, Alfonso ZC. Células-Tronco Hematopoéticas. In: Zago MA, Covas DT, editors. *Células-tronco A Nova Fronteira da Medicina*. São Paulo: Atheneu; 2006. p. 49-66.
- National Institutes of Health Stem Cells: Scientific progress and future research directions. 2001;106 p.
- National Institutes of Health – NIH. 2011. Available from: <http://www.clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00683722>. [2011 Apr 24].
- National Institutes of Health – NIH. 2011. Available from: <http://www.osiris.com/therapeutics.php>. [2011 Apr 24].
- Neuringer IP, Randell SH. Stem cells and repair of lung injuries. *Respiratory Research*. 2004;5:6.

- Nikula KJ, March TH, Seagrave J, Finch G, Barr E, Ménache M, Hahn F, Hobbs C. A mouse model of cigarette smoke-induced emphysema. *Chest*. 2000;117:246S-247S.
- Oca MM, Tálamo C, Rogelio Perez-Padilla R, Jardim JRB, Muinõ A, Lopez MV, Valdivia G, Pertuzé J, Moreno D, Halbert RJ, Menezes AMB. Chronic obstructive pulmonary disease and body mass index in five Latin America cities: The PLATINO study. *Respiratory Medicine* 2008;102:642–50.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi N, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters*. 1997;407:313-9.
- Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc*. 2010;5(3):418-28.
- Ohnishi S, Nagaya N. Tissue regeneration as next-generation therapy for COPD--potential applications. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2008;3(4):509-14.
- Peng J, Wang Y, Zhang L, Zhao B, Zhao Z, Chen J, Guo Q, Liu S, Sui X, Xu W, Lu S. Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells differentiate into a Schwann-cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Brain Res Bull*. 2011 [Epub ahead of print].
- Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;23;92(11):4857-61.
- Petta AD. Patogenia do enfisema pulmonar – eventos celulares e moleculares. *Einstein*. 2010; 8(2 Pt 1):248-51
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276:71-4.
- Prockop DJ. Embryonic Stem Cells Versus Adult Stem Cells: Some Seemingly Simple Questions. In: Lanza, R. (editor-in-chief). *Handbook of Stem Cells v.2*. Elsevier/Academic Press, New York. 2004;pp.xxi-xxii.
- Raghavan N, Webb K, Amornputtisathaporn N, O'Donnell D. Recent advances in pharmacotherapy for dyspnea in COPD. *Current Opinion in Pharmacology* 2011, 11:1–7.
- Rangasamy T, Misra V, Zhen L, Tankersley CG, Tudor RM, Biswal S. Cigarette smoke-induced emphysema in A/J mice is associated with pulmonary oxidative stress, apoptosis of lung cells, and global alterations in gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;296(6):L888-900.
- Reekmans KP, Praet J, De Vocht N, Tambuyzer BR, Bergwerf I, Daans J, Baekelandt V, Vanhoutte G, Goossens H, Jorens PG, Ysebaert DK, Chatterjee S, Pauwels P, Van Marck E, Berneman ZN, Van der Linden A, Ponsaerts P. Clinical potential of intravenous neural stem

cell delivery for treatment of neuro-inflammatory disease in mice? *Cell Transplant*. 2010 [Epub ahead of print].

Ribeiro-Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz, MA, Alves-de-Moraes, LBC, Faria, CA, Stessuk, T. Terapia celular em doenças pulmonares: existem perspectivas? *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31 (Suppl 1):140–8.

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

Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehman R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44(8):1691-9.

Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fishbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem Cell Transplantation: The Lung Barrier. *Transplantation Proceedings*. 2007;39:573-6.

Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. 2008;451(7181):937-42.

Shapiro SD. Evolving concepts in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2000;21(4):621-32.

Suckoyan AM, Kerkis YuA, Mello BRM, Kerkis EI, Visintin AJ, Pereira LV. Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases. *Brazilian J of Medical and Biological Research*. 2002;35(5):535-42.

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

Sueblinvong V, Weiss DJ. Stem cells and cell therapy approaches in lung biology and diseases. *Transl Res*. 2010;156(3):188-205.

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;168:318-322.

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

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

Teo AK, Vallier L. Emerging use of stem cells in regenerative medicine. *Biochem J*. 2010;28;428(1):11-23.

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

- van Velthoven CT, Kavelaars A, van Bel F, Heijnen CJ. Repeated mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxia-ischemia has distinct effects on formation and maturation of new neurons and oligodendrocytes leading to restoration of damage, corticospinal motor tract activity, and sensorimotor function. *J Neurosci*. 2010; 14;30(28):9603-11.
- Watt FM, Driskell RR. The therapeutic potential of stem cells. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2010; 365:155-63.
- Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev*. 2000;52(3):349-74.
- Weibel ER. Principles and Methods for the Morphometric Study of the Lung and Other Organs. Laboratory Investigation. 1963;12:130-55.
- Weiss DJ, Kolls JK, Ortiz LA, Panoskaltsis-Mortari A, Prockop DJ. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc. Am. Thorac. Soc*. 2008;5:637-67
- Wilson AA, Kwok LW, Hovav A, Ohle SJ, Little FF, Fine A, Kotton DN. Sustained Expression of α 1-Antitrypsin after Transplantation of Manipulated Hematopoietic Stem Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;39:133–41.
- Xiong N, Zhang Z, Huang J, Chen C, Zhang Z, Jia M, Xiong J, Liu X, Wang F, Cao X, Liang Z, Sun S, Lin Z, Wang T. VEGF-expressing human umbilical cord mesenchymal stem cells, an improved therapy strategy for Parkinson's disease. *Gene Ther*. 2010 [Epub ahead of print].
- Xu S, De Becker A, Van Camp B, Vanderkerken K, Van Riet I. An improved harvest and in vitro expansion protocol for murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:105940.
- Xu Y, Shi Y, Ding S. A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine. *Nature*. 2008;15;453(7193):338-44
- 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.
- Yao H, de Boer WI, Rahman I. Targeting lung inflammation: novel therapies for the treatment of COPD. *Curr Respir Med Rev*. 2008;4(1):57-68.
- Yoshida T, Tuder RM. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol Rev*. 2007;87(3):1047-82.

ANEXO A – Citometria de fluxo

CTH

Mono

File: CTHmono.006 Sample:
Date: 09-May-11 Parameters: 7
Total Events 251685 Gated Events 189248 75.19%
System: Log Parameter Means: Geometric
ckit-APC (7) vs Sca1-PE/Cy7 (5)
Region X-Mean Y-Mean Events %Total %Gated Params X Range Y Range
R0 3.3 2.3 189248 75.19 100.00 7,5 10000 10000
R1 301.5 2.5 189248 75.19 100.00 1,4 1024 10000
R2 118.1 113.5 36 0.01 0.02 7,5 10000 10000

File: CTHmono2.007 Sample:
Date: 09-May-11 Parameters: 7
Total Events 245910 Gated Events 206228 83.86%
System: Log Parameter Means: Geometric
ckit-APC (7) vs Sca1-PE/Cy7 (5)
Region X-Mean Y-Mean Events %Total %Gated Params X Range Y Range
R0 3.7 2.1 206228 83.86 100.00 7,5 10000 10000
R1 293.3 2.3 206228 83.86 100.00 1,4 1024 10000
R2 104.3 106.2 62 0.03 0.03 7,5 10000 10000

Total

File: CTHtotal2.009 Sample:
Date: 09-May-11 Parameters: 7
Total Events 300000 Gated Events 298328 99.44%
System: Log Parameter Means: Geometric
ckit-APC (7) vs Sca1-PE/Cy7 (5)
Region X-Mean Y-Mean Events %Total %Gated Params X Range Y Range
R0 3.9 1.3 298328 99.44 100.00 7,5 10000 10000
R1 220.1 1.4 298328 99.44 100.00 1,4 1024 10000
R2 180.7 58.6 166 0.06 0.06 7,5 10000 10000

File: CTHtotal.008 Sample:
Date: 09-May-11 Parameters: 7
Total Events 300000 Gated Events 289580 96.53%
System: Log Parameter Means: Geometric
ckit-APC (7) vs Sca1-PE/Cy7 (5)
Region X-Mean Y-Mean Events %Total %Gated Params X Range Y Range
R0 3.6 1.7 289580 96.53 100.00 7,5 10000 10000
R1 217.3 2.7 289580 96.53 100.00 1,4 1024 10000
R2 122.3 93.2 313 0.10 0.11 7,5 10000 10000

CTM

Mono

File: ctmmmono.002 Sample:
Date: 09-May-11 Parameters: 7
Total Events 103605 Gated Events 373 0.36%
System: Log Parameter Means: Geometric
Sca1-PE/Cy7 (5) vs CD90/CD73-PE (4)
Region X-Mean Y-Mean Events %Total %Gated Params X Range Y Range
R0 1.2 2.4 373 0.36 100.00 5,4 10000 10000
R1 18.0 406.6 373 0.36 100.00 7,1 10000 1024
R2 71.7 142.7 2 0.02 0.54 5,4 10000 10000

File: ctmmmono2.003 Sample:
Date: 09-May-11 Parameters: 7
Total Events 97740 Gated Events 235 0.24%
System: Log Parameter Means: Geometric
Sca1-PE/Cy7 (5) vs CD90/CD73-PE (4)
Region X-Mean Y-Mean Events %Total %Gated Params X Range Y Range
R0 1.3 3.6 235 0.24 100.00 5,4 10000 10000
R1 15.1 416.1 235 0.24 100.00 7,1 10000 1024
R2 61.5 61.5 1 0.01 0.43 5,4 10000 10000

Total

File: ctmttotal.001 Sample:
Date: 09-May-11 Parameters: 7
Total Events 300000 Gated Events 2206 0.74%
System: Log Parameter Means: Geometric
Sca1-PE/Cy7 (5) vs CD90/CD73-PE (4)
Region X-Mean Y-Mean Events %Total %Gated Params X Range Y Range
R0 1.1 2.1 2206 0.74 100.00 5,4 10000 10000
R1 13.3 420.0 2206 0.74 100.00 7,1 10000 1024
R2 170.0 162.0 3 0.03 0.14 5,4 10000 10000

File: ctmttotal.005 Sample:
Date: 09-May-11 Parameters: 7
Total Events 300000 Gated Events 2443 0.81%
System: Log Parameter Means: Geometric
Sca1-PE/Cy7 (5) vs CD90/CD73-PE (4)
Region X-Mean Y-Mean Events %Total %Gated Params X Range Y Range
R0 1.1 2.0 2443 0.81 100.00 5,4 10000 10000
R1 14.9 423.8 2443 0.81 100.00 7,1 10000 1024
R2 0.0 0.0 0 0.00 0.00 5,4 10000 10000

MONONUCLEARES**Gr-1⁺Mac-1⁺**

File: mielomono.010 Sample:
 Date: 09-May-11 Parameters: 7
 Total Events 30000 Gated Events 30000 100.00%
 System: Log Parameter Means: Geometric
 Quad Stats
 CD11b-PE/Cy7(Log) vs Gr1-PE(Log)
 Quadrant x,y: 320,320

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	7.7	38.2	198	1.66	1.66
2 UR	228.4	77.2	3628	18.09	18.09
3 LL	1.3	1.3	18780	71.60	71.60
4 LR	126.3	2.0	7394	8.65	8.65

File: mielomono2.013 Sample:
 Date: 09-May-11 Parameters: 7
 Total Events 30000 Gated Events 30000 100.00%
 System: Log Parameter Means: Geometric
 Quad Stats
 CD11b-PE/Cy7(Log) vs Gr1-PE(Log)
 Quadrant x,y: 320,320

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	8.0	39.7	163	1.54	1.54
2 UR	239.1	80.3	3732	20.14	20.14
3 LL	1.3	1.3	18937	66.43	66.43
4 LR	124.8	2.1	7168	11.89	11.89

Ter-119⁺

File: mielomono.010 Sample:
 Date: 09-May-11 Parameters: 7
 Total Events 30000 Gated Events 30000 100.00%
 System: Log Parameter Means: Geometric
 Quad Stats
 Ter119-APC(Log) vs Gr1-PE(Log)
 Quadrant x,y: 320,320

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	5.7	69.6	3256	1.85	1.85
2 UR	38.8	109.8	570	1.90	1.90
3 LL	4.5	1.4	23682	87.94	87.94
4 LR	25.6	2.0	2492	8.31	8.31

File: mielomono2.013 Sample:
 Date: 09-May-11 Parameters: 7
 Total Events 30000 Gated Events 30000 100.00%
 System: Log Parameter Means: Geometric
 Quad Stats
 Ter119-APC(Log) vs Gr1-PE(Log)
 Quadrant x,y: 320,320

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	5.6	73.0	3416	2.39	2.39
2 UR	38.3	124.5	479	1.60	1.60
3 LL	4.4	1.4	23285	91.81	91.81
4 LR	27.5	1.9	2820	4.20	4.20

CÉLULAS MADURAS:**➤ SÉRIE LINFÓIDE****TOTAIS**

File: linfototal.016 Sample:
 Date: 09-May-11 Parameters: 7
 Total Events 30000 Gated Events 30000 100.00%
 System: Log Parameter Means: Geometric
 Quad Stats
 CD3-APC(Log) vs B220-PE(Log)
 Quadrant x,y: 320,320

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	3.9	55.9	3123	18.20	18.20
2 UR	29.8	121.3	264	5.88	5.88
3 LL	1.3	1.4	26519	69.62	69.62
4 LR	31.3	2.9	94	6.30	6.30

File: linfototal2.017 Sample:
 Date: 09-May-11 Parameters: 7
 Total Events 30000 Gated Events 30000 100.00%
 System: Log Parameter Means: Geometric
 Quad Stats
 CD3-APC(Log) vs B220-PE(Log)
 Quadrant x,y: 320,320

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	3.8	55.3	2991	11.97	11.97
2 UR	32.3	121.9	246	0.82	0.82
3 LL	1.3	1.4	26685	82.95	82.95
4 LR	36.3	2.6	78	4.26	4.26

MONONUCLEARES

File: linfomono.014 Sample:
 Date: 09-May-11 Parameters: 7
 Total Events 30000 Gated Events 30000 100.00%
 System: Log Parameter Means: Geometric
 Quad Stats
 CD3-APC(Log) vs B220-PE(Log)
 Quadrant x,y: 320,320

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	4.1	66.4	6332	18.11	18.11
2 UR	33.2	164.5	760	2.53	2.53
3 LL	1.3	1.4	22746	75.12	75.12
4 LR	30.8	3.1	162	4.24	4.24

File: linfomono2.015 Sample:
 Date: 09-May-11 Parameters: 7
 Total Events 30000 Gated Events 30000 100.00%
 System: Log Parameter Means: Geometric
 Quad Stats
 CD3-APC(Log) vs B220-PE(Log)
 Quadrant x,y: 320,320

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	4.1	54.0	5886	16.02	16.02
2 UR	30.4	134.5	595	1.98	1.98
3 LL	1.3	1.4	23348	80.13	80.13
4 LR	31.1	2.3	171	1.87	1.87

CÉLULAS MADURAS:

➤ SÉRIE MIELÓIDE

TOTAIS

Gr-1⁺Mac-1⁺

File: mielototal.011 Sample:
Date: 09-May-11 Parameters: 7
Total Events 30000 Gated Events 30000 100.00%
System: Log Parameter Means: Geometric
Quad Stats
CD11b-PE/Cy7(Log) vs Gr1-PE(Log)
Quadrant x,y: 320,320

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	7.3	27.8	73	3.24	3.24
2 UR	221.7	75.7	969	32.23	32.23
3 LL	1.4	1.6	23835	61.45	61.45
4 LR	132.4	1.8	5123	3.08	3.08

File: mielototal2.012 Sample:
Date: 09-May-11 Parameters: 7
Total Events 30000 Gated Events 30000 100.00%
System: Log Parameter Means: Geometric
Quad Stats
CD11b-PE/Cy7(Log) vs Gr1-PE(Log)
Quadrant x,y: 320,320

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	7.0	31.5	105	3.35	3.35
2 UR	243.3	70.1	1312	28.37	28.37
3 LL	1.4	1.7	23429	61.10	61.10
4 LR	141.7	2.0	5154	7.18	7.18

Ter-119⁺

File: mielototal.011 Sample:
Date: 09-May-11 Parameters: 7
Total Events 30000 Gated Events 30000 100.00%
System: Log Parameter Means: Geometric
Quad Stats
Ter119-APC(Log) vs Gr1-PE(Log)
Quadrant x,y: 320,320

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	5.9	51.4	681	4.27	4.27
2 UR	54.2	128.4	361	1.20	1.20
3 LL	6.5	1.6	21501	47.67	47.67
4 LR	24.5	1.9	7457	46.86	46.86

File: mielototal2.012 Sample:
Date: 09-May-11 Parameters: 7
Total Events 30000 Gated Events 30000 100.00%
System: Log Parameter Means: Geometric
Quad Stats
Ter119-APC(Log) vs Gr1-PE(Log)
Quadrant x,y: 320,320

Quad	X-Mean	Y-Mean	Events	%Total	%Gated
1 UL	6.0	51.2	975	5.25	5.25
2 UR	48.3	115.8	442	1.47	1.47
3 LL	6.5	1.6	19261	50.31	50.31
4 LR	25.6	1.9	9322	42.97	42.97