



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Avaliação do potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais de medula óssea e do meio condicionado em modelo experimental de enfisema pulmonar

Dulce de Santana-Neta

Salvador (Bahia)
Novembro, 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

(elaborada pela Bibl. **SONIA ABREU**, da Bibliotheca Gonçalo Moniz : Memória da Saúde Brasileira/SIBI-UFBA/FMB-UFBA)

Santana-Neta, Dulce

S232

Avaliação do potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais de medula óssea e do meio condicionado em modelo experimental de enfisema pulmonar/ Dulce de Santana-Neta. (Salvador, Bahia): D, Santana-Neta, 2015

VIII; 57 fls.: il.

Monografia, como exigência parcial e obrigatória para conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB), da Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Professor orientador: Simone Garcia Macambira

Palavras chaves: 1. Enfisema pulmonar. 2. Célula mesenquimal. 3. Meio condicionado. I. Macambira, Simone Garcia. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Título.

CDU - 616.24-007.63



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Avaliação do potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais de medula óssea e do meio condicionado em modelo experimental de enfisema pulmonar

Dulce de Santana-Neta

Professor orientador: **Simone Garcia Macambira**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2015.1, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)
Novembro, 2015

Monografia: Avaliação do potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais de medula óssea e do meio condicionado em modelo experimental de enfisema pulmonar, de **Dulce de Santana-Neta**.

Professor orientador: **Simone Garcia Macambira**

COMISSÃO REVISORA:

- **Simone Garcia Macambira** (Presidente, Professor orientador), Professora do Departamento de Biofunção do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.
- **Ana Quênia Gomes da Silva**, Professora do Departamento de Biorregulação do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.
- **Severino Bezerra da Silva Filho**, Doutorando do Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde (PPgMS) da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO:

Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no IX Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em ____ de _____ de 2015.

“Deus nos ensinou a amar o próximo como a si mesmo, mas é como a si mesmo grifado. Não como a si mesmo que dá uma esmola, um pão, um café. Como a si mesmo a gente quer mais que isso: quer amar, quer cuidado, quer carinho!” (Irmã Dulce)

Aos Meus Pais, **Hilda Uruga e Valcides Santana**, por sempre acreditarem no meu potencial e investirem nos meus estudos.

EQUIPE

- Dulce de Santana-Neta, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: dulce_sn@hotmail.com;
- Simone Garcia Macambira. Professora orientadora. Professora do Departamento de Biofunção do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia;
- Milena Botelho Pereira Soares – Chefe do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia/CpqGM/FIOCRUZ e Coordenadora Científica do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular/Hospital São Rafael;
- Pâmela Santana Daltro – Doutoranda do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM) – Departamento de Biofunção – ICS/UFBA;
- Pedro Humberto Felix – Bolsista PIBITI/CNPq/UFBA – Graduando do curso de medicina da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)
- Instituto de Ciências da Saúde (ICS)

CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ (CPQGM) / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)

- Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI)

FUNDAÇÃO MONTE TABOR - HOSPITAL SÃO RAFAEL

- Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC)

FONTES DE FINANCIAMENTO

1. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
2. Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB);
3. Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

AGRADECIMENTOS

- ◆ À minha Professora orientadora, Doutora Simone Garcia Macambira, pela presença constante, paciência e pelas inúmeras orientações acadêmicas e à minha vida profissional de futura médica
- ◆ À Doutora Milena Botelho Pereira Soares, por todas as oportunidades que me foram oferecidas.
- ◆ À Doutoranda Pâmela Santana Daltro, pelo exemplo de trabalho e dedicação e por todas as orientações concebidas.
- ◆ À Alberto de Siqueira Santos Barbosa Neto, pela paciência ao me ensinar a dar os primeiros passos na pesquisa, pela orientação na realização dos experimentos.
- ◆ Aos Colegas Paulo Chenaud e Pedro Humberto Filho, por toda a ajuda concebida durante a realização do projeto.
- ◆ À equipe do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, do Hospital São Rafael, pelo suporte, pela ajuda e por todas as orientações para a realização dos experimentos.
- ◆ À Doutora Ana Quênia Gomes da Silva e ao Doutorando Severino Bezerra da Silva Filho, membros da comissão revisora desta monografia. Agradeço pela disponibilidade em colaborar com a conclusão deste projeto.
- ◆ À Géssica Uruga e à Isadora Mathias, pela prestimosa ajuda na revisão e auxílio na correção final desta monografia.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELA	2
ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS	3
I. RESUMO	5
II. OBJETIVOS	6
III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
IV. REVISÃO DE LITERATURA	9
IV.1. A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	9
IV.1.1. Epidemiologia	10
IV.1.2. Patogênese	11
IV.2. Modelos experimentais de enfisema pulmonar	12
IV.3. Engenharia tecidual	12
IV.3.1. Células-tronco	13
IV.3.2. Meio condicionado	15
IV.4. Terapia celular em doenças pulmonares	15
V. METODOLOGIA	18
VI. RESULTADOS	24
VI.1. Avaliação das populações celulares por citometria de fluxo	24
VI.2. Análise funcional	25
VI.2.1. Ergometria	25
VI.2.2. Eletrocardiografia	26
VI.2.3. Ecocardiografia	26
VI.3. Análise morfométrica	27
VI.4. Avaliação das células-tronco transplantadas.	28
VI.5. Avaliação da expressão gênica	29
VII. DISCUSSÃO	30
VIII. CONCLUSÕES	38
IX. SUMMARY	39
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
XI. ANEXO	49
• ANEXO I: Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELA

FIGURAS

FIGURA 1. Delineamento experimental	23
FIGURA 2. Imunofenotipagem das MSCs	24
FIGURA 3. Distância percorrida na esteira ergométrica pelos camundongos	25
FIGURA 4. Registros eletrocardiográficos	26
FIGURA 5. Imagens histológicas pulmonares dos camundongos	27
FIGURA 6. Medida linear intersepto	28
FIGURA 7. Imunofluorescência de corte de pulmão de camundongos enfisematosos tratados com MSCs	28
FIGURA 8. Expressão do RNAm de ALPL em animais enfisematodos tratados com MSC	29

TABELA

TABELA 1. Caracterização das MSCs por citometria de fluxo	24
---	----

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALPL – Fosfatase alcalina

ATS – do inglês *American Thoracic Society*

CD105 – Endogлина, marcador angiogênico

CD117 – Receptor da tirosina quinase

CD11b – Marcador de célula imune – integrina

CD133 – Marcador de célula hematopoiética

CD14 – Receptor de lipopolissacarídeo LPS

CD166 – Moléculas de adesão de leucócitos ativados

CD19 – Receptor de antígeno dos linfócitos B

CD29 – Integrina beta-1

CD34 – Receptor de células endoteliais

CD44 – Receptor de hialuronato

CD45 – Marcador de célula hematopoiética

CD73 – Enzima 5'-nucleotidase

CD79 – Proteína transmembranar

CD90/Thy 1 – Antígenos de diferenciação de timócitos 1

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CT – Células-tronco

Ct – Limiar de ciclagem

DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

ELN - Endotelina

EP – Enfisema pulmonar

ERS – do inglês *European Respiratory Society*

GAPDH – Gliceraldeído-e-fosfato dehidrogenase

G-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos

GFP – Proteína fluorescente verde

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos

GOLD – Iniciativa Global para Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

HE – Hematoxila e eosina

IL – Interleucina

INF- γ – Interferon gama

Lm – Medida linear intersepto

LTB4 – Leucotrieno B4

MC – Meio condicionado de cultura de células mesenquimais

MC-Fib – Meio condicionado de fibroblastos

MIP-3 α – Proteínas inflamatórias de macrófagos 3 α

MSCs – Células-tronco mesenquimais

NaCl – Cloreto de sódio

NK – Células Natural Killer

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Reação de polimerização em cadeia

PGE2 – Prostaglandina E2

RNA – Ácido Ribonucléico

RT-PCR – Reação da transcriptase reversa em cadeia de polimerase

Sca-1 – Antígeno 1 de células-tronco

SCF – Fator de células estaminais

Stro-1 – Estroma de suporte da hematopoese

SUS – Sistema Único de Saúde

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

I. RESUMO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA E DO MEIO CONDICIONADO EM MODELO EXPERIMENTAL DE ENFISEMA PULMONAR

Introdução: O enfisema pulmonar (EP) é uma doença respiratória crônica associada a um processo inflamatório exacerbado em resposta a agentes tóxicos. A medicina regenerativa, através do transplante de células-tronco mesenquimais (MSCs) e do uso do meio condicionado (MC), tem apresentado avanços no reparo e regeneração tecidual.

Objetivo: avaliar o potencial terapêutico das MSCs e do MC da cultura destas células na recuperação funcional e estrutural dos pulmões dos camundongos enfisematosos.

Metodologia: 40 camundongos fêmeas C57BL/6 (Protocolo CEUA 016/2012) foram avaliados antes e após a indução do enfisema e posteriormente ao tratamento, por eletrocardiografia, ecocardiografia e ergometria. Foi realizada análise morfométrica através da medida linear intersepto (Lm) e por análise microscópica das células inflamatórias. A investigação dos possíveis mecanismos de ação na regeneração tecidual foi feita por avaliação da expressão gênica. A presença de células fluorescentes no pulmão foi avaliada em microscópio com sistema de epifluorescência. **Resultados:**

Antes da indução do enfisema, os camundongos foram capazes de percorrer $395,9 \pm 15,82$ m, após 28 dias os camundongos percorreram uma distância menor ($252,4 \pm 13,33$ m; $p < 0,001$). O tratamento com MSCs aumentou a capacidade de exercício ($318,2 \pm 26,96$ m; $p < 0,001$), bem como, com o uso do MC ($344,45 \pm 21,88$ m; $p < 0,01$). O que não foi observado no grupo que foi administrado salina ($263,5 \pm 26,58$ m). Em relação à Lm, no grupo controle foi mensurado ($27,96 \pm 0,54$ μ m), no grupo tratado com salina observou-se um aumento significativo dos espaços aéreos ($46,80 \pm 0,70$ μ m; $p < 0,0001$). A Lm foi reduzida ($38,70 \pm 0,44$ μ m; $p < 0,0001$) nos animais que receberam MSCs, observando-se o mesmo no grupo tratado com MC ($33,75 \pm 0,44$ μ m; $p < 0,0001$). A imunofluorescência revelou a presença de MSCs no tecido pulmonar. **Conclusão:** O tratamento com MSCs e MC compensou os efeitos funcionais deletérios do enfisema induzido por elastase, revertendo o alargamento da estrutura alveolar e promovendo a recuperação da capacidade de exercício, provavelmente devido a ação parácrina.

Palavras chaves: 1. Enfisema pulmonar; 2. Célula mesenquimal; 3. Meio condicionado.

II. OBJETIVOS

PRINCIPAL:

Avaliar o potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais de medula óssea e/ou do meio condicionado na regeneração estrutural e recuperação funcional do tecido pulmonar em modelo experimental de enfisema pulmonar induzido em camundongos C57BL/6 por instilação intratraqueal de elastase pancreática porcina.

SECUNDÁRIOS:

1. Avaliar a função cardiorespiratória dos camundongos por ergometria, eletrocardiografia e ecocardiografia antes da indução do enfisema pulmonar.
2. Caracterizar funcionalmente o desenvolvimento do enfisema pulmonar pela técnica de ergometria.
3. Caracterizar a lesão enfisematosa ao nível estrutural por morfometria, mensurando a medida linear intersepto.
4. Avaliar o grau de comprometimento cardíaco dos camundongos enfisematosos por ecocardiografia e eletrocardiografia a fim de investigar o desenvolvimento do *cor pulmonale* nos camundongos enfisematosos.
5. Avaliar o perfil de expressão de citocinas e fatores de crescimento por reação da transcriptase reversa em cadeia de polimerase (RT-PCR) no tecido pulmonar de camundongos.
6. Caracterizar as populações de células mesenquimais por citometria de fluxo e fenotipagem por imunofluorescência.

III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O pulmão é um órgão altamente especializado responsável pela troca gasosa e capaz de restabelecer a própria estrutura após diferentes tipos de lesões. A reparação inadequada ou um insulto persistente ao parênquima pulmonar pode resultar em doenças pulmonares crônicas, como o enfisema (Abboud, 2008).

O enfisema pulmonar (EP) é definido como um aumento dos espaços aéreos distais aos bronquíolos, e uma redução na área de troca alvéolo-capilar, decorrentes da destruição da matriz extracelular alveolar. Esta destruição ocorre por diversas causas entre elas a exposição a substâncias tóxicas, tais como a fumaça do cigarro e inalação de poluentes, induzindo a uma inflamação, com acúmulo de células, neutrófilos, macrófagos e linfócitos que liberam proteases e citocinas, causando lesão epitelial. Também pode ser causada por fatores genéticos como a deficiência de alfa 1; antitripsina, levando a um desequilíbrio enzimático proteinase – antiproteinase; ou por uma falha no processo de reparo do tecido pulmonar, devido a perda de células e componentes importantes para a manutenção da estrutura da parede alveolar, como as MSCs, responsáveis pela reparação adequada da matriz extracelular (Hogg, 2004; Rufino & Costa, 2013).

Essa destruição progressiva do parênquima, limita a capacidade pulmonar, pois ocorre uma diminuição da elasticidade pulmonar e aumento da complacência, dificultando assim a respiração. Visto que, há uma redução no volume expiratório, levando a uma hiperinsuflação pulmonar, prejudicando as trocas gasosas (Inoue et al., 2010).

Essa limitação pode resultar em algumas complicações, como: a insuficiência respiratória e o *cor pulmonale*, principal complicação cardiovascular da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). O *cor pulmonale* se desenvolve tardiamente no curso do enfisema, em consequência do aumento da resistência vascular pulmonar, levando a uma hipertensão pulmonar com hipertrofia ventricular direita e insuficiência cardíaca (Monteiro et al., 2004).

As abordagens terapêuticas clínicas existentes têm contribuído para o prolongamento e melhora na qualidade de vida dos portadores de enfisema. Porém, até

o momento nenhum tratamento clínico tem sido capaz de alterar o curso da doença e resultar em cura do doente.

Atualmente, a opção terapêutica para o tratamento do enfisema em fase terminal é o transplante pulmonar, modalidade terapêutica com alta morbi-mortalidade. Tratamentos experimentais visando regenerar ou substituir parte de diferentes órgãos, através do uso de células-tronco (CT), fatores de crescimento ou a utilização de materiais biológicos (biomateriais) tem despertado o interesse em vários centros de pesquisa. Baseado em dados da literatura, opções atrativas para serem avaliadas em modelo de enfisema pulmonar seria a administração de MSCs células mesenquimais (MSCs) ou meio condicionante de cultura de células mesenquimais (MC) a fim de restituir a função e estrutura pulmonar (Peinado et al., 2006).

Devido à importância socioeconômica, morbidade, mortalidade associada ao enfisema e uma falta de eficácia terapêutica conducente à regeneração tecidual é necessário estabelecer um modelo experimental adequado para a realização de estudos para investigar uma terapia eficaz.

Apesar dos resultados conflitantes acerca do emprego das MSCs de medula óssea e do MC como opções de terapia regenerativa, muitos fatores justificam o desenvolvimento de projetos que investiguem a capacidade reparadora desta terapia em casos de doenças crônico-degenerativas. Entre estes fatores estão: a acessibilidade fácil, a plasticidade destas células, a exequibilidade e a segurança da técnica de transplante celular, ser um método não invasivo, poder ser administrado sem a necessidade de sedação, facilidade na repetição do procedimento.

Nesse estudo, foi proposto a investigação do potencial terapêutico do transplante de MSCs e do uso do MC com o intuito de promover a regeneração estrutural e a recuperação da função respiratória.

IV. REVISÃO DE LITERATURA

IV.1. A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A DPOC é uma enfermidade de característica progressiva, que tem grande impacto nas atividades diárias do paciente, promovendo, em estágios mais avançados, a insuficiência respiratória e incapacitação funcional do mesmo (GOLD, 2013).

Segundo *American Thoracic Society (ATS)* e *European Respiratory Society (ERS)*, a DPOC é caracterizada por limitação do fluxo aéreo, geralmente progressiva e associado à resposta inflamatória anormal dos pulmões às partículas ou gases irritantes, principalmente à fumaça do cigarro. A denominação DPOC engloba basicamente duas apresentações clínicas distintas, o enfisema pulmonar (EP) e a bronquite crônica. A obstrução do fluxo aéreo não é completamente reversível e é comum em ambas as formas, porém no EP, além da alteração de fluxo, predomina a destruição alveolar levando a hiperinsuflação pulmonar (GOLD, 2013; Ribeiro-Paes et al., 2012).

A síndrome clínica da DPOC inclui tanto manifestações pulmonares, como a obstrução do fluxo aéreo, inflamação de pequenas vias aéreas (bronquiolite) e destruição do parênquima pulmonar alveolar (Pawels et al., 2001) quanto manifestações extrapulmonares, incluindo perda de massa muscular, osteoporose e anemia (Pawels et al., 2001; Inoue et al., 2010).

O EP é caracterizado por uma destruição da matriz extracelular alveolar, resultando em alargamento do espaço aéreo distal ao bronquíolo terminal, acompanhado por destruição de suas paredes e redução da área de troca alveolar (Inoue et al., 2010).

O EP constitui um dos problemas de saúde mais importantes no mundo, uma vez que não há cura. Adicionalmente, a destruição progressiva do parênquima pulmonar e da rede vascular limitam a capacidade pulmonar e acarretam alta morbidade e mortalidade nos indivíduos acometidos. Estas alterações induzem a limitação ao fluxo aéreo, provavelmente devido a um desequilíbrio entre moléculas proteolíticas e anti-proteolíticas pulmonares, resultante do aumento da liberação de enzimas proteolíticas pelas células inflamatórias. A diminuição anormal e permanente das vias aéreas distais aos bronquíolos terminais implica em perda progressiva da capacidade de troca gasosa

resultando, quando em estágios terminais do EP crônico, em insuficiência respiratória. (Barnes, 2003).

Atualmente, não há tratamento específico para o EP crônico (Celli, 2006). A única opção terapêutica para o tratamento do enfisema em fase terminal é o transplante pulmonar. Apesar dos avanços nos últimos 10 anos, o transplante pulmonar permanece como uma modalidade terapêutica com alta morbi-mortalidade (Inoue et al., 2010).

Como a DPOC é caracterizada pela perda de tecido pulmonar e remodelação das vias aéreas, há um crescente entusiasmo por uso de CT e progenitoras para regenerar o parênquima e células das vias respiratórias, e restaurar a função pulmonar em pacientes com DPOC.

A medicina regenerativa tem apresentado muitos avanços na cicatrização e regeneração tecidual em diferentes doenças, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, através do transplante de CT, administração de fatores de crescimento e aplicação de MC (Barnes, 2003).

IV.1.1 Epidemiologia

Do ponto de vista epidemiológico, a DPOC representa um sério problema de saúde pública e um grande desafio terapêutico para pneumologistas e clínicos gerais. Ela acomete predominantemente indivíduos entre 50 e 75 anos, existindo uma importante relação desta com o tabagismo, o qual se estima ser responsável por 75% a 95% de todos os casos. É a patologia que apresenta maior custo econômico diretamente relacionado a problemas de saúde determinados pelo tabagismo e, ainda, por custos indiretos de morbidade, perda salarial, aposentadoria e morte precoce (Pawels et al., 2001).

Estima-se que a prevalência global desta patologia é de cerca de 210 milhões de pacientes com 80 milhões já em estágios moderados ou graves da doença. Figura-se a DPOC como a quarta principal causa de morte no mundo e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que a doença será a terceira causa de morte em 2020 (Murray et al., 1997; Gard, 2008; GOLD, 2013).

Atualmente, a DPOC afeta 5,5 milhões de brasileiros - um aumento de 40% em relação aos últimos 20 anos (Macintyre, 2004). Segundo dados da DATASUS de 2004, a cada ano são hospitalizados 280 mil brasileiros com DPOC, sendo gastos cerca de 90 milhões de reais com internação destes pacientes (DATASUS, 2008).

Na Bahia, dados epidemiológicos atestam que existem cerca de 511.736 portadores da DPOC, sendo que 183.493 apresentam-se nos estágios moderado e grave, com 10.268 internamentos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e com 898 óbitos anuais. Esses números demonstram a importância da identificação precoce e tratamento da doença, assim como da compreensão da patogênese e das manifestações sistêmicas (Ribeiro, 2008).

IV.1.2 Patogênese

A patogênese do EP envolve uma combinação de inflamação, aumento da produção e secreção da elastase pulmonar, desequilíbrio entre as metaloproteinases, estímulo à apoptose celular e estresse oxidativo (Groneberg et al., 2004), muitas vezes mediada pelo hábito de fumar.

A fumaça de cigarro é uma mistura complexa com mais de 4.000 constituintes químicos, sendo o maior fator de risco para a DPOC e EP, que parece ser a lesão mais grave (Borgerding et al., 2005). De acordo com a hipótese do desequilíbrio entre proteases e antiproteases, o fumo induz ao aumento do número de neutrófilos e macrófagos no pulmão e conseqüente liberação de enzimas proteolíticas dessas células. Essa liberação de proteases não é totalmente inibida pelas antiproteases, levando a proteólise do tecido conjuntivo (mais especificamente elastina) e, conseqüentemente, ao EP (Churg et al., 2005; Abboud, 2008).

Dessa forma, a destruição das paredes alveolares resulta da ação das enzimas proteolíticas ativas que degradam a matriz extracelular e afetam a integridade de seus componentes, particularmente as fibras de colágeno e elastina (Groneberg et al., 2004).

IV.2. Modelos experimentais de enfisema pulmonar

Os modelos experimentais assumem uma relevância crescente a cada dia, permitindo a investigação dos mecanismos patogênicos de diversas doenças e do potencial terapêutico de novas drogas ou procedimentos. É importante que o modelo experimental seja funcionalmente o mais próximo possível daquele manifestado no ser humano e que permita a avaliação dos fenômenos biológicos ou comportamentais, naturais ou induzidos (Ferreira et al., 2005). Dentre estes, os modelos desenvolvidos em camundongos são a melhor opção, pois (i) o genoma dos camundongos é conhecido e apresenta similaridades com o genoma humano, (ii) há disponibilidade de sondas e anticorpos monoclonais, (iii) apresenta um ciclo de vida rápido e curto, permitindo que os estudos sejam concluídos em meses e (iv) tem custo viável para criação. Especificamente, os modelos animais de EP são de grande importância, pois nos auxiliam no entendimento da fisiopatologia, bem como, na investigação de novas condutas terapêuticas para o tratamento desta patologia (Knudsen et al., 2004; Lüthje et al., 2009; Vidal et al., 2012).

IV.3. Engenharia tecidual

Terapia celular é o conjunto de métodos e abordagens tecnológicas com a utilização de células no tratamento de doenças como: diabetes melito, câncer, pneumopatias, doenças genéticas, cardíacas e neurodegenerativas (Zago, 2005).

Há uma vasta literatura acerca do uso de CT adultas e embrionárias, evidenciando resultados promissores e perspectivas terapêuticas em diferentes patologias humanas e modelos experimentais (Souza et al., 2010; Amorin et al., 2012; Pinto Filho et al., 2013). Apesar de um número não tão expressivo de pesquisas tendo o pulmão como objeto de estudo na terapia celular, há dados na literatura, em modelos experimentais, que evidenciam a presença de CT transplantadas e marcadas com anticorpos específicos, nos pulmões de animais (Ferreira et al., 1997; Ribeiro-Paes et al., 2009). Esses trabalhos evidenciaram a migração de células da medula óssea para o pulmão, fornecendo arcabouço conceitual e referencial teórico para fundamentar o emprego das CT na regeneração do tecido pulmonar (Allers et al., 2004; Lee et al., 2007; Gandia et al., 2008; Ribeiro-Paes et al., 2009).

IV.3.1 Células-tronco

O desenvolvimento corpóreo se inicia na fase embrionária após a formação do zigoto, resultado da fecundação dos gametas parentais. Este componente celular ao ser formado apresenta uma intensa divisão, seguido em um segundo momento por uma marcante diferenciação celular, originando assim a enorme diversidade orgânica. Esta capacidade é necessária para o desenvolvimento corpóreo, mas apresenta uma significativa redução deste potencial ao atingir maturação. Tecidos especializados apresentam um controle homeostático da sua população celular na fase adulta, realizando assim a reposição das células mortas pelo processo de envelhecimento ou dano tecidual (Van et al., 2008).

A plasticidade celular encontrada no zigoto ainda permanece na fase adulta em algumas células de órgãos especializados como medula óssea e fígado. As CT possuem essa característica de capacidade de diferenciação tanto na fase embrionária como na adulta (Fuchs & Segre, 2000).

As CT apresentam características que as distinguem dos demais tipos celulares encontrados no organismo, como o caráter indiferenciado e não especializado destas células, permitindo a sua multiplicação e mantendo uma população indiferenciada por longo período (tanto *in vivo* quanto *in vitro*). Estas particularidades permitem que, diante de um estímulo ambiental, estas células apresentem a capacidade de originar múltiplas populações celulares idênticas, agregadas a um enorme potencial de diferenciação. Elas possuem a capacidade de realizar divisões assimétricas originando novos precursores com capacidade restrita de diferenciação, ao mesmo tempo em que repõem a população de CT com a produção de células indiferenciadas, ou seja, auto-renovação (Zago, 2005).

Inúmeras são as fontes de CT e encontrar a mais apropriada para uso terapêutico depende da investigação de diversos fatores como suas características fenotípicas, potencial de diferenciação, sua capacidade de proliferação e estabilidade citogenética, quando expandidas *in vitro*. As CT são classificadas como embrionárias ou adultas de acordo com sua fonte e estágio de desenvolvimento (Van et al., 2008).

As CT adultas têm a capacidade de assumir características de células que se desenvolvem a partir da mesma camada germinativa primária ou de camadas diferentes. Muitos experimentos que envolvem a plasticidade celular demonstram que CT derivadas da medula óssea, que é proveniente do mesoderma podem se diferenciar em outros tecidos provenientes da mesma camada, tais como: do músculo esquelético, do músculo cardíaco e do fígado; mas também podem se diferenciar em tecido neural, que é derivado de camada embrionária diferente: o ectoderma (Ferreira et al., 2005).

Na medula óssea podem ser observadas três populações de CT: as hematopoiéticas, as mesenquimais (estromais) e provavelmente células progenitoras endoteliais (Shi et al., 1992). As hematopoiéticas são responsáveis pela formação do tecido sanguíneo e as MSCs encontram-se imersas no estroma medular e podem dar origem a diferentes tipos celulares (Körbling et al., 2003).

As MSCs podem se diferenciar em vários tipos celulares incluindo cardiomiócitos e células endoteliais vasculares, e podem ser facilmente isoladas de medula óssea e expandidas em cultura (Shi et al., 1992).

Sendo assim, estas MSCs podem oferecer potencial terapêutico para pacientes com DPOC, fazendo parte da terapia celular mais estudada para as doenças pulmonares. Estas células apresentam as seguintes características: expressão de CD105 (endoglina), CD73 (enzima 5'-nucleotidase), e CD90/Thy 1 (antígenos de diferenciação de timócitos 1); ausência de expressão superficial de CD45 (marcador de célula hematopoiética), CD34 (receptor de células endoteliais), CD14 (receptor de lipopolissacarídeo LPS), CD11b (marcador de célula imune – integrina), CD79 (proteína transmembranar), CD19 (receptor de antígeno dos linfócitos B), e HLA-DR; e a capacidade de se diferenciar em adipócitos, condrócitos, osteócitos *in vitro* (Dominici et al., 2006).

As terapias atuais visam controlar os sintomas, limitar a inflamação e melhorar a capacidade funcional em pacientes com DPOC. No entanto, nenhuma terapia disponível tem sido capaz de reconstituir a arquitetura alveolar ou interromper o processo fibrogênico. Em vários estudos pré-clínicos, o tratamento com MSCs tem sido demonstrado como uma estratégia imunomoduladora, atenuando a inflamação, diminuindo os níveis de mediadores inflamatórios, tais como a interleucina 1 beta (IL-

1b), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL-8), assim como a diminuição da apoptose (Zhen et al., 2010; Huh et al., 2011), melhora na regeneração do parênquima e aumento na perfusão pulmonar (Guan et al., 2003; Shigemura et al., 2006. Huh et al., 2011).

IV.3.2. Meio condicionado

O MC refere-se a um conjunto de proteínas que contêm um peptídeo sinalizador e são processadas através do retículo endoplasmático e complexo de Golgi através da via de secreção clássica. De um modo geral, o MC também engloba proteínas contidas na superfície das células e as proteínas intracelulares liberadas através da via de secreção não-clássica ou exossomos. Estas proteínas incluem numerosas enzimas, fatores de crescimento, citocinas e outros mediadores solúveis. Eles são fundamentais para os processos de crescimento celular, diferenciação e angiogênese através da regulação nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular (Dowling et al., 2011).

Os efeitos benéficos e protetores do MC sobre o coração e fígado *in vitro* e *in vivo* incluem indução de arteriogênese por migração e proliferação de células endoteliais em modelo de isquemia de músculo esquelético, redução da apoptose em cardiomiócitos submetidos à hipóxia, redução do infiltrado leucocitário, da apoptose de hepatócitos e da duplicação do ducto biliar em hepatite fulminante experimental (Davani et al., 2003; Monteiro et al., 2004).

IV.4. Terapia celular em doenças pulmonares

A medicina regenerativa, através do transplante de CT, tem apresentado muitos avanços na cicatrização e regeneração tecidual em diferentes doenças tanto em humanos quanto em modelos experimentais (Shintani et al., 2001; Tateishi-Yuyama et al., 2002; Nerem, 2004). No caso específico do EP, os modelos animais têm sido empregados a fim de investigar os mecanismos patogênicos das doenças crônicas pulmonares constrictivas bem como avaliar a eficácia da nova opção terapêutica (Finkelstein et al., 1995; Barnes, 2005). O desafio de induzir o reparo funcional do tecido pulmonar implica não somente em regenerar a estrutura alveolar, mas seu

suprimento sanguíneo tanto para nutrição celular como para troca gasosa restituindo a função pulmonar.

Vários modelos animais e, também, em humanos têm demonstrado deposição de CT em vários tipos de lesões específicas e não específicas pulmonares, tais como fibrose pulmonar induzida por bleomicina, hipertensão pulmonar induzida por hipóxia, enfisema induzido por elastase (Cote et al., 2007; Sabit et al., 2007). Desde meados dos anos 90, diferentes grupos têm apresentado evidências de CT detectadas no pulmão submetido ao tratamento como células semelhantes aos fibroblastos (Groneberg et al., 2004; Abboud, 2008).

Células aderentes obtidas a partir de cultura de CT da medula óssea podem ser divididas a nível morfológico em populações celulares heterogêneas. Uma destas populações é composta por células poligonais grandes, tipo fibroblastos que sintetizam proteínas de matriz tais como colágeno tipo I e IV, laminina e fibronectina (Gruber et al., 2004; Celli, 2006). Em 2001, Krause et al. geraram mais evidências a respeito do potencial terapêutico das CT de medula óssea para regenerar o tecido pulmonar, quando demonstraram que esta população de células aderentes é capaz de se diferenciar em epitélio brônquico e pneumócitos alveolares tipo II. Células aderentes obtidas de cultura de CT transplantadas em camundongos utilizados como modelo experimental de fibrose assumem características morfológicas e moleculares de pneumócitos tipo I constituintes do epitélio alveolar (Cote et al., 2007).

Os resultados destes diferentes estudos têm sido conflitantes, pois relatam diferentes frequências de deposição e diferentes células formadas como resultado do transplante das CT de medula óssea. É provável que estas diferenças estejam associadas à diversidade dos métodos de detecção empregados e aos diferentes modelos experimentais utilizados. Por exemplo, Kotton et al. (2004) demonstraram que as CT de medula óssea depositaram-se no interior dos pulmões de camundongos e estas foram capazes de diferenciar-se em pneumócitos tipo I expressando β galactosidase e marcadores para pneumócitos tipo I, mas não tipo II em seu modelo utilizando bleomicina. Krause et al. (2005), utilizando transplante de células da medula óssea após irradiação da medula do animal, encontraram pelo método de FISH (hibridização in situ fluorescente) para o cromossomo Y e imunohistoquímica com vimentina que 20%

destas células depositadas diferenciaram-se em pneumócitos tipo II e 4% foram encontradas no epitélio brônquico.

Apesar destes resultados promissores, uma das limitações da utilização de CT é a modesta quantidade de células transplantadas encontradas no pulmão, apenas 23 a 35 células em cada pulmão (Cote et al., 2007). Baseado nos achados da literatura, um interessante enfoque seria a investigação de estratégias que aumentassem a população de células transplantadas no pulmão. Desta forma, haveria pelo menos duas estratégias principais: promover um microambiente pulmonar mais propício à proliferação celular através da administração de substâncias que aumentassem a migração celular para tecidos danificados ou através da manipulação celular com ativação de sinais diretamente envolvidos no processo da transdiferenciação.

V. METODOLOGIA

Detalhamento da metodologia

I) Animais - Foram utilizados para o desenvolvimento deste projeto camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 entre 6-8 semanas de idade mantidos no biotério do CPqGM/FIOCRUZ e camundongos machos transgênicos C57BL/6 EGFP 4-6 semanas (disponíveis no biotério do CBTC/HSR) com temperatura controlada e água e ração *ad libitum*. Os animais foram avaliados funcional e estruturalmente antes da indução do enfisema, 28 dias após a administração de elastase para confirmar o desenvolvimento da lesão enfisematosa, e 8 semanas após o tratamento (Ishizawa et al., 2004).

II) O projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela lei 11.784/2008, sendo aprovado e licenciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do CPQGM/ FIOCRUZ / Ba (Protocolo 016/2012 – 14/03/2013 à 14/03/2015).

III) Indução do enfisema – Os camundongos foram anestesiados por inalação de isoflurano (0,5-2%). A concentração do anestésico oferecido foi controlada através da monitorização do ritmo cardíaco, que foi mantida acima de 350 bpm. Os animais foram colocados em posição supina numa mesa aquecida e submetidos à instilação de 100 μ l de solução de elastase pancreática porcina (2U/100g de massa corporal) dissolvido em solução salina (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Alemanha). Os camundongos do grupo controle não manipulado foram apenas submetidos aos exames funcionais. Para indução do enfisema, os animais foram submetidos à incisão cervical anterior e o músculo divulsionado, a fim de visualizar a traqueia e fazer a punção traqueal para administrar a solução. O procedimento durou cerca de 10 minutos por animal. Em seguida, os camundongos foram suturados e mantidos numa placa quente (30°C) até o restabelecimento da respiração espontânea e extubação.

IV) Análise da função cardiorrespiratória por ergometria – O animal foi colocado em uma esteira ergométrica, dentro de uma câmara de acrílico munida de estímulo elétrico e com controlador de velocidade da esteira e a magnitude do choque (LE 8700 treadmill control, Panlab, Barcelona, Espanha). Os dados foram enviados ao

computador através de um amplificador contendo uma placa analógico-digital (ML 820, PowerLab). Os dados foram armazenados em computador para análise no programa Chart 5 for Windows – Metabolism for PowerLab System. Os animais foram colocados na esteira 5 minutos antes do início do exercício. A velocidade inicial foi de 6 cm/s com incrementos na velocidade de 6 cm/s a cada 5 minutos. O teste foi realizado até os animais entrarem em exaustão, isto é, permanecer por 10 segundos ou mais na área de choque. O parâmetro avaliado foi a distância percorrida.

V) Análise funcional do coração de camundongos enfisematosos por aquisição de imagens *in vivo* – Após a indução de anestesia geral utilizando o sistema de anestesia inalatória com administração de isoflurano foi iniciada a aquisição das imagens do coração que permitiu a detecção e quantificação dos parâmetros hemodinâmicos. Neste estudo foi utilizado o sistema Vevo da Visual Sonics (Toronto, Canadá) para pesquisas científicas em modelos experimentais com animais pequenos. Este sistema permite a avaliação das estruturas anatômicas e da função hemodinâmica em animais experimentais. Os programas de análise deste sistema incluem:

B-Mode – permite a visualização de estruturas anatômicas com até 30 μ de resolução detectando alterações morfológicas.

M-Mode – permite a visualização e mensuração da mobilidade da parede ventricular detectando anormalidades mecânicas numa frequência de amostragem de quatro KHZ.

Pulse Wave Doppler Mode - permite a quantificação da hemodinâmica do sistema cardiovascular através da mensuração do fluxo sanguíneo em uma rede vascular, como em vasos individuais como arteríola ou vênula.

Os parâmetros avaliados foram o diâmetro das câmaras cardíacas; a fração de encurtamento; a velocidade de encurtamento; a estrutura e funcionamento das válvulas; a fração de ejeção e a velocidade do fluxo sanguíneo.

VI) Análise funcional cardíaca por eletrocardiografia - Após a indução de anestesia geral utilizando o sistema de anestesia inalatória com administração de isoflurano, foi iniciada a aquisição dos registros eletrocardiográficos. Estes registros foram obtidos pelo equipamento Bio Amp PowerLab (PowerLab, ADInstruments, Austrália) que permite o registro de sinais biológicos em animais com total isolamento elétrico. Os dados foram adquiridos e armazenados em computador para análise no

programa Chart 5 for Windows. Os parâmetros avaliados foram, presença de arritmias, amplitude das ondas, intervalo PR, duração do QT, intervalo RR e frequência cardíaca (FC).

VII) Obtenção e cultura das MSCs - As CT da medula óssea foram obtidas a partir do fêmur de camundongos machos com 4-6 semanas de idade da linhagem C57BL/6 EGFP (disponíveis no biotério do CBTC/HSR), após serem eutanasiados em câmara de CO₂ (Protocolo de Procedimento CEUA 016/2012). As células mononucleares da medula foram separadas por centrifugação em gradiente de Ficoll a 2500 rpm por 15 minutos, ressuspensas em meio e filtradas em lã de nylon (Soares et al., 2004). Estas células de medula óssea foram cultivadas em frascos de cultura a uma densidade de 10⁶ células/ml em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal, sendo as células não aderentes removidas por lavagens em meio DMEM após 3 dias de cultura. Após atingirem cerca de 80% de confluência, as células foram tripsinizadas e semeadas em novos frascos para expansão (Krampera et al., 2003).

VIII) Obtenção do MC - Foi obtido através da coleta de soro livre médio (suplementado com 0,05% de albumina bovina para evitar a agregação de proteína) após 24 horas de cultura de células de diferentes massas. A maioria dos experimentos foram realizados com a massa celular ideal de 2x10⁶ células. O meio foi então concentrado, cerca de 25 vezes, com unidades de ultrafiltração (Amicon Ultra-PL 3, Millipore, Bedford, MA, EUA), com 10 kDa (peso molecular de corte). As frações concentradas foram coletadas e reconcentradas usando o mesmo sistema de ultrafiltração. Um volume total de 250 µl de meio condicionante foi infundido na veia caudal 28 dias após a indução do EP.

IX) Avaliação das populações celulares por citometria de fluxo - As populações celulares utilizadas no tratamento dos camundongos enfisematosos foram caracterizadas por citometria de fluxo, utilizando anticorpos para detecção dos seguintes marcadores: CD45, CD34, CD105, CD117 (receptor da tirosina quinase), CD29 (integrina beta-1), CD73, CD11b, CD44 (receptor de hialuronato), CD90, Sca-1 (Antígeno 1 de células-tronco) e GFP (proteína fluorescente verde). As análises foram feitas em um FACScalibur utilizando o programa CellQuest (Becton Dickinson).

X) Avaliação por microscopia de fluorescência das CT transplantadas (GFP+) que migraram para o pulmão – Foram utilizados cortes de 5mm de pulmão incluídos em parafina. Após desparafinização com xilol e re-hidratação o tecido foi marcado com anticorpo específico. Esta marcação foi utilizada para a avaliação da expressão da GFP. A fluorescência das células GFP+ foi intensificada pela utilização de anticorpos anti-GFP conjugados com Alexa-Fluor 488 (Molecular Probes). Após lavagem as lâminas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI (Vectashield, Vector Laboratories).

A presença de células fluorescentes foi avaliada em microscópio BX61 (Olympus) com sistema de epifluorescência e *grid* para aumento da resolução (Optigrid®, Structured- light Imaging System, Thales Optem inc, USA) utilizando filtros apropriados (Olympus). As imagens foram capturadas utilizando-se uma câmera digital SPOT Flexo Camera (15.2, 64 Mp, Shifting Pixel, Diagnostic Instruments inc, USA).

XI) Avaliação morfológica - os animais foram sacrificados 2 meses após o tratamento e os pulmões fixados em formalina 4%. As lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina (HE) e analisadas por microscopia de campo claro para contagem de células inflamatórias que foram quantificadas em 10 campos por corte de tecido pulmonar e integradas por mm², por avaliação morfológica digital. As imagens foram analisadas usando o programa Image Pro para que as células fossem contadas e integradas pela área. A extensão das lesões enfisematosas foi estimada através da medida linear intersepto (Lm) ou método de Thurlbeck modificado (Ishizawa et al., 2004).

XII) Avaliação da expressão gênica - A expressão gênica de citocinas, fatores de crescimento e da gliceraldeído-e-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi determinada pela técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR) em tempo real. A expressão gênica de GAPDH foi utilizada como controle interno da reação. Para realização desta técnica foi necessário extrair o RNA das amostras de pulmão e coração para sintetizar o DNA complementar (cDNA). Para obtenção do RNA foi utilizado o TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) conforme instruções do fabricante. O centrifugado final de RNA foi diluído em 30 µl de água ultra-pura. As concentrações de RNA foram determinadas por espectrofotometria em absorbância no comprimento de onda de 260

nm. A pureza do RNA foi determinada calculando a razão entre as absorbâncias medidas em 260 nm e 280 nm e através de gel de agarose corado com brometo de etídio. As amostras foram guardadas a -80°C até sintetizar o cDNA. As amostras foram convertidas a cDNA na presença da enzima ThermoScript RT reverse transcriptase (Invitrogen; Carlsbad, CA) segundo orientações do fabricante. A reação de PCR em tempo real foi realizada no termociclador de DNA (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400, Norwalk CT). A técnica de PCR é baseada na detecção e quantificação de um corante fluorescente (Lee et al., 1993; Livak et al., 1995). A fluorescência emitida pela reação é monitorada a cada ciclo da reação de PCR, o que permite saber o início da fase exponencial da reação. Para as reações de PCR em tempo real foi utilizado o reagente SYBR® green PCR master mix (Applied Biosystem, Foster city, CA), segundo as recomendações do fabricante. Durante o PCR TaqMan®, os sinais de fluorescência emitidos aumentam em intensidade e em proporção direta à quantidade de produto específico amplificado. O instrumento ABI Prism 5700 mede mudanças na fluorescência ciclo por ciclo em cada amostra. Os dados são inicialmente expressos como um limiar de ciclagem (Ct) que representa um patamar de detecção de fluorescência. Baseando-se no Ct obtido é possível estimar a quantidade inicial de cDNA contido nas diferentes amostras. Assim o valor do Ct correlaciona-se com os níveis de cDNA usados na reação.

XIII) Grupos experimentais

Grupo controle – 10 camundongos C57BL/6 fêmeas que não foram manipulados e foram utilizados como controle negativo.

Grupo enfisematoso tratado – 20 camundongos C57BL/6 fêmeas que foram submetidos à administração intratraqueal de 100 μl de solução de elastase (2U/100g) para posterior tratamento.

- 10 animais – tratados com meio condicionado.
- 10 animais – tratados com células mesenquimais.

Grupo enfisematoso não tratado – 10 camundongos C57BL/6 fêmeas foram submetidos à administração intratraqueal de 100 μl de solução de elastase (2U/100g), a

indução do enfisema e submetidos à administração via caudal de salina (100 µl salina) para acompanhamento sem tratamento.

XIV) Análise estatística – Foi utilizado o programa Graphpad prism 5.0. Realizando o teste ANOVA não-paramétrico e o pós-teste de Dunnet com a média \pm desvio padrão com níveis de significância de $p < 0,05$.

Plano de trabalho e delineamento experimental:

O plano de trabalho e o delineamento experimental contemplam 18 meses de execução de projeto. Foram utilizados 40 animais distribuídos entre os grupos experimentais discriminados acima. Antes e após a indução do enfisema, bem como, 2 meses após o tratamento, estes animais foram acompanhados, através de exames funcionais, imunológicos e bioquímicos (descritos em “Metodologia”) por 11 meses a fim de acompanhar longitudinalmente (i) o desenvolvimento e progressão da doença, (ii) a eficácia do tratamento, (iii) a função cardiorespiratória (iv) e a sobrevida dos animais (Figura 1). Após este período de avaliação, estes animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésico injetável (ketamina/xilasina) conforme Protocolo de Procedimento CEUA/CPQGM 016/2012, para obtenção do coração e do pulmão.

Delineamento Experimental

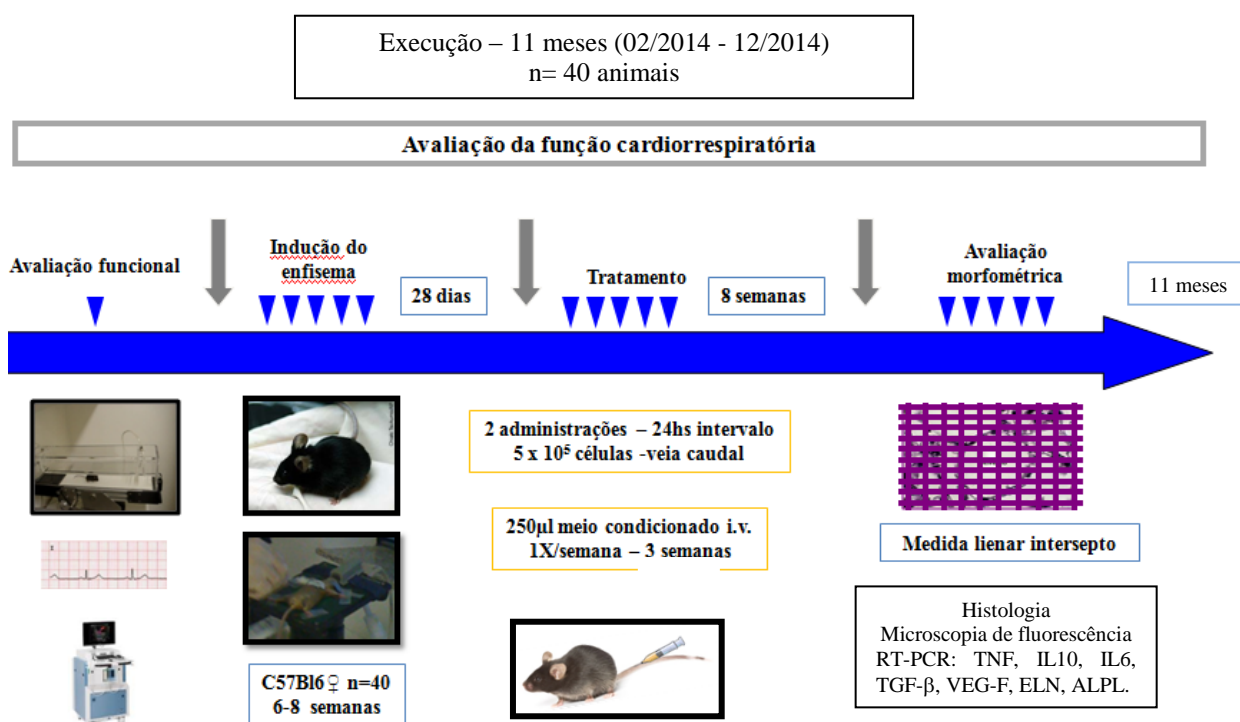


Figura 1: Delineamento experimental

VI. RESULTADOS

VI.1. Avaliação das populações celulares por citometria de fluxo

A citometria de fluxo revelou a presença dos seguintes marcadores de MSCs: GFP, Sca-1, CD73, CD90, CD44, CD29, CD105. A expressão foi baixa para os marcadores: CD45, CD117, CD11b, CD34 (Figura 2; Tabela 1).

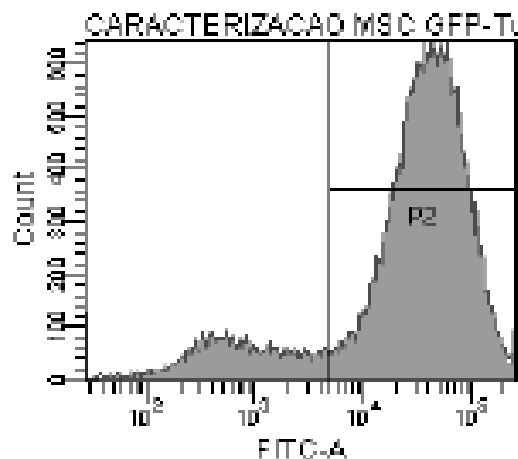


Figura 2: Imunofenotipagem das MSCs. Análise da expressão de GFP em MSC da medula óssea de camundongos, cultivadas em DMEM por citometria de fluxo após quatro repliques e confluência de 80% a 90% para caracterização fenotípica.

Tabela 1: Caracterização das MSCs por citometria de fluxo. Expressão dos marcadores de superfície em cultura de células-tronco de medula óssea na 6ª passagem.

Marcadores (BMSC)	Células marcadas (%)
GFP	97
Sca-1	87.2
CD73	83
CD45	0.7
CD117	1.4
CD11b	1.6
CD90	88.5
CD44	99
CD34	7.9
CD29	99
CD105	96.6

VI.2. Análise funcional:

VI.2.1. Ergometria

Antes da manipulação, todos os camundongos foram capazes de exercitar-se igualmente em esteira ergométrica, sem diferenças estatisticamente significantes. Os animais foram capazes de percorrer $395,9 \pm 15,82$ m na esteira ergométrica, enquanto que 28 dias após a administração intratraqueal de elastase, os camundongos percorreram uma distância significativamente menor ($252,4 \pm 13,33$ m; $p < 0,001$). Após 8 semanas do tratamento os animais que receberam o transplante de MSCs e MC melhoraram o desempenho no exercício. O tratamento com MSCs aumentou de forma significativa a capacidade de realizar exercício dos camundongos enfisematosos ($318,2 \pm 26,96$ m; $p < 0,001$), bem como com o MC ($344,45 \pm 21,88$ m; $p < 0,01$). O mesmo não foi observado no grupo em que foi administrado salina ($263,5 \pm 26,58$ m) (Figura 3).

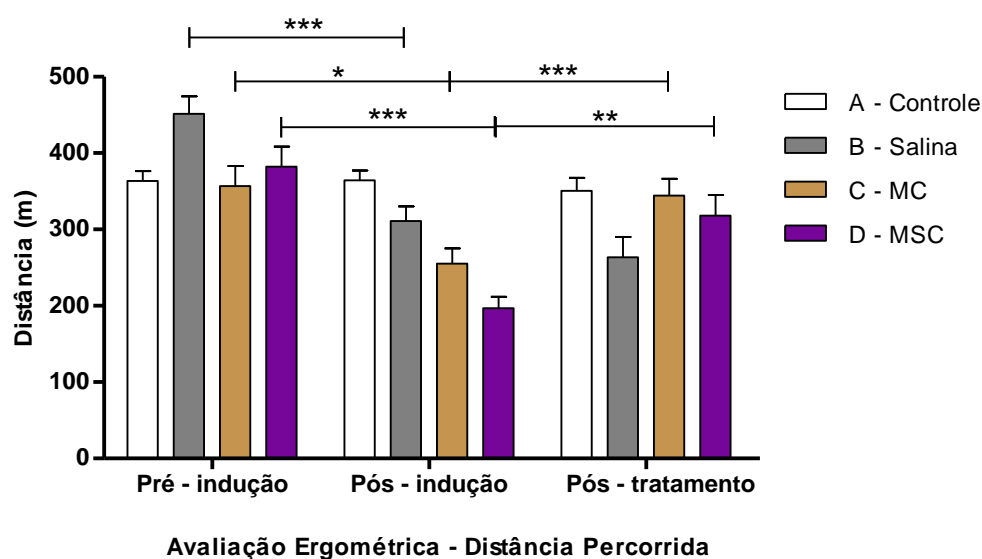


Figura 3: Medições de distância percorrida em camundongos normais e enfisematosos antes da indução de enfisema (Pré - indução); 28 dias após a indução do enfisema (Pós - indução) e 8 semanas depois do tratamento (Pós - tratamento). Os dados são apresentados como média \pm S.E.M. de 10 animais / grupo de *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

VI.2.2. Eletrocardiografia

Os registros eletrocardiográficos obtidos antes da indução do EP revelam animais com ritmo sinusal normal e os parâmetros mensurados dentro da normalidade (Figura 4A). Vinte oito dias após a indução do enfisema, não foi possível observar alterações significativas no traçado eletrocardiográfico (Figura 4B).

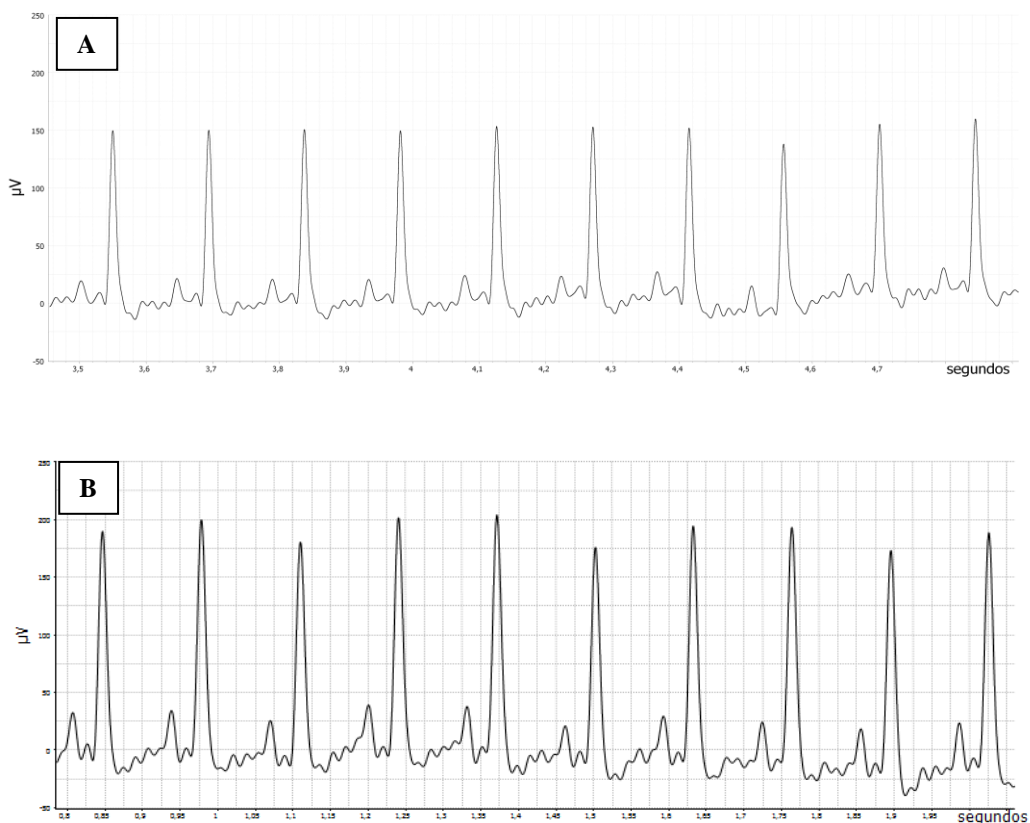


Figura 4: (A) Registro eletrocardiográfico obtido em um camundongo antes da indução do enfisema pulmonar. Ritmo sinusal normal. Frequência cardíaca – 417bpm. Intervalo PR – 35ms. Intervalo QT – 32ms. Intervalo RR – 144ms. (B) Registro eletrocardiográfico obtido em um camundongo 28 dias após a indução do enfisema pulmonar. Ritmo sinusal normal. Frequência cardíaca – 457bpm. Intervalo PR – 36ms. Intervalo QT – 36ms. Intervalo RR – 131ms.

VI.2.3. Ecocardiografia

Observou-se no estudo das imagens cardíacas, que não houve diferença significativa, em relação aos parâmetros ecocardiográficos, entre os grupos controle, enfisema e salina, neste período de indução.

VI.3. Análise morfométrica

Comparando-se os cortes histológicos pulmonares obtidos dos camundongos enfisematosos tratados com MC e MSC (Figuras 5C e 5D) com os tratados com salina (Figura 5B), observou-se que os grupos tratados com MC e MSC foram capazes de restaurar o parênquima pulmonar, comprovado pela restauração do septo alveolar, apresentando aspecto semelhante aos cortes histológicos dos camundongos normais (Figura 5A). Em contraste, a degeneração dos septos alveolares observado no enfisema induzido pela administração de elastase não foi revertida nos camundongos enfisematosos tratados com salina.

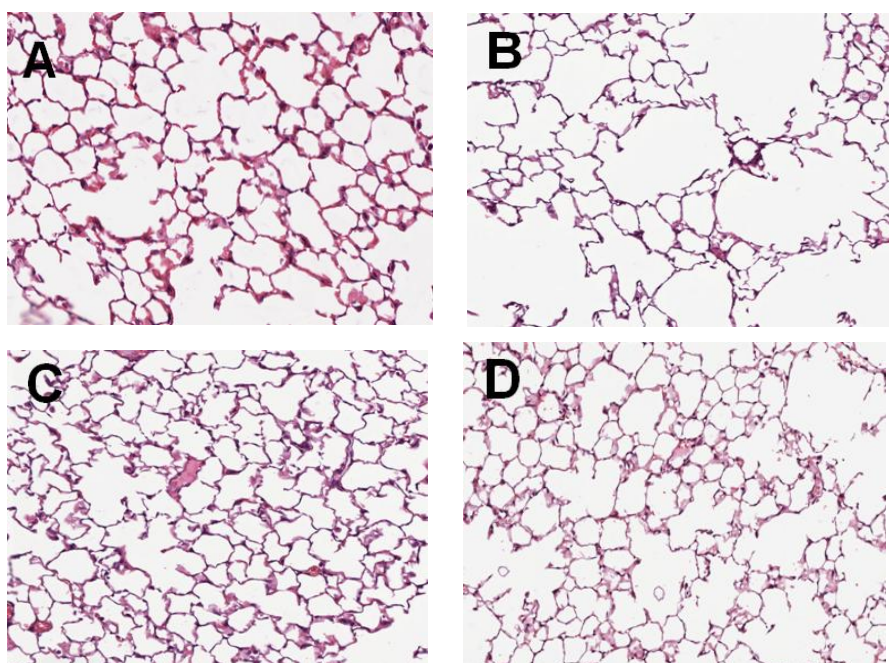


Figura 5: Cortes histológicos representativos de tecido de pulmonar de camundongo normal (A), camundongo enfisematoso tratado com solução salina (B), camundongo enfisematoso tratado com MC (C) e camundongo enfisematoso tratado com MSC (D). Cortes histológicos de animais enfisematosos tratados com salina mostraram grandes áreas de destruição alveolar. Coloração HE (200x).

A extensão das lesões enfisematosas foi estimada através da Lm. No grupo controle foi mensurado $27,96 \pm 0,54 \mu\text{m}$ e após a indução, observou-se que houve um aumento importante dos espaços aéreos, obtendo-se uma medida de $46,80 \pm 0,70 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$. Após o tratamento a Lm foi reduzida significativamente, com $38,70 \pm 0,44 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$ nos animais que receberam MSC, observando-se o mesmo nos animais tratados com MC $33,75 \pm 0,44 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$ (Figura 6).

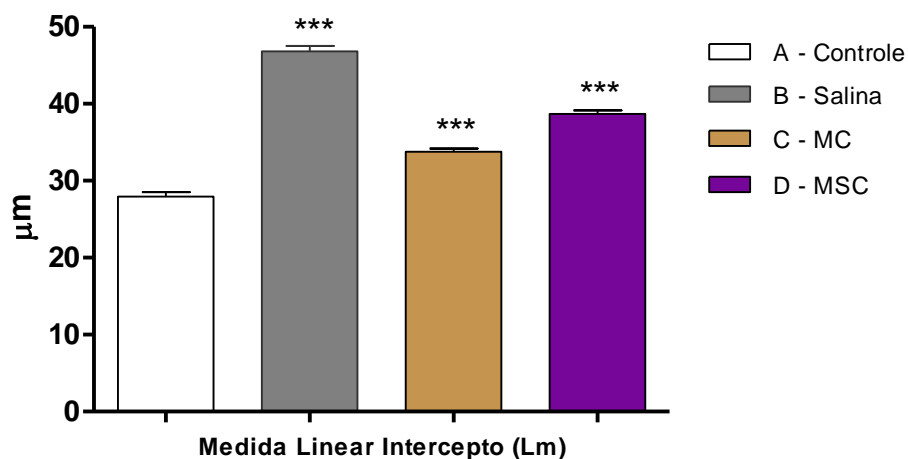


Figura 6: Comparação do comprimento da medida linear intercepto em camundongos normais (A), camundongos enfisematosos tratados com salina (B), camundongos enfisematosos tratados com MC (C) e camundongos enfisematosos tratados com MSC (D). Os dados são apresentados como média \pm S.E.M. de 10 animais / grupo *** $p < 0,0001$

VI.4. Avaliação por microscopia de fluorescência das células-tronco transplantadas (GFP+) que migraram para pulmão

A análise por imunofluorescência dos cortes histológicos dos tecidos pulmonares, através da marcação com anticorpo específico, anti-GFP, para a avaliação da expressão da GFP, revelou a presença de células fluorescentes nos cortes histológicos de pulmões.

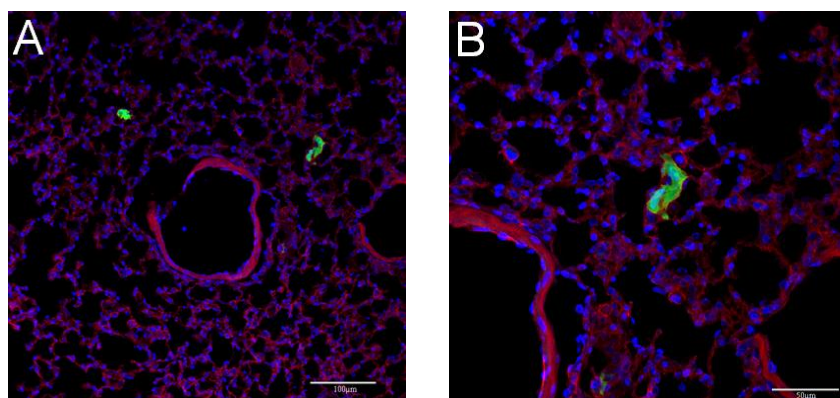


Figura 7: Imunofluorescência de corte de pulmão de camundongo enfisematoso após administração de células mesenquimais de E-GFP C57BL/6 de transplante de camundongos transgênicos. Os cortes foram corados com phalloidin (vermelho) anti-actina, DAPI (azul) para os núcleos e anti-GFP (verde). (A) e 200X (B) 400X.

VI.5. Avaliação da expressão gênica

Não foram encontradas alterações estatisticamente significantes na expressão gênica de TNF, Il10, Il6, fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), endotelina (ELN), quando comparado os grupos enfisematosos tratados com MSCs e MC e enfisematosos não tratados (controle). Em relação à mensuração da fosfatase alcalina (ALPL), houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o grupo enfisematoso submetido ao tratamento com MSCs.

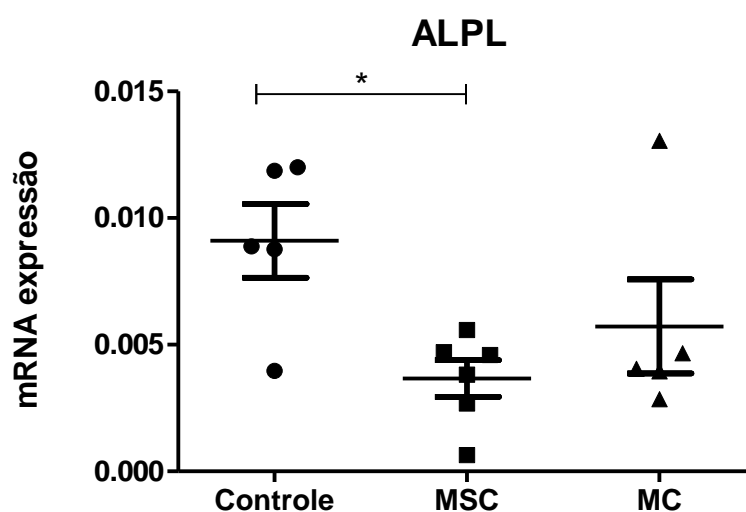


Figura 8: Avaliação quantitativa da expressão do RNAm de ALPL por análise de PCR em tempo real em camundongos do grupo controle, dos grupos tratados com MSC e MC. Redução da expressão do RNAm de ALPL em animais enfisematosos tratados com MSC. * $p < 0,05$ (Controle x MSC)

VII. DISCUSSÃO

Neste estudo, optou-se por desenvolver o modelo experimental de EP por instilação intratraqueal de elastase pancreática porcina em fêmeas C57Bl6 com base em evidências pré-clínicas que apontam as fêmeas como mais suscetíveis ao desenvolvimento de enfisema do que os machos (Hantos et al., 2008). Atualmente, os camundongos são considerados o padrão-ouro para reproduzir e estudar muitas doenças humanas, devido à grande semelhança entre o genoma desta espécie e o da espécie humana (Waterston et al., 2002), baixo custo para criação, disponibilidade de sondas moleculares e anticorpos, desenvolvimento de equipamentos para registro de sinais e imagens biológicas de alta sensibilidade e precisão. Além da expressiva quantidade de dados sobre a anatomia, biologia, imunologia e fisiologia desses animais.

A indução do EP em roedores através da instilação intratraqueal de elastase pancreática porcina tem sido utilizado por mais de três décadas. É considerado o modelo mais consistente para o desenvolvimento do enfisema (Hayes et al., 1972; Ken-ichiro et al., 2010; Vidal et al., 2012). Isto ocorre devido à ação da elastase sobre as fibras de elastina, conduzindo a inflamação pulmonar aguda e destruição do parênquima pulmonar. É um modelo muito apropriado para investigar e validar novas formas de avaliação da função e mecânica pulmonar em modelo experimental de enfisema (Fujita et al., 2004).

Os protocolos de indução do EP realizados pela administração de elastase são rápidos e baratos. Além de permitir que a gravidade da lesão seja modulada pela dosagem da enzima administrada, e as alterações morfológicas e funcionais detectáveis em curtos prazos. Várias características do EP, induzido por fumaça do cigarro ou genética, foram reproduzidos no EP induzido por elastase, incluindo a inflamação sistêmica e adaptações crônicas (Atunes et al., 2011; Vidal et al., 2012). Por conseguinte, o modelo de indução por elastase tornou-se uma ferramenta útil para validar uma variedade de novas drogas e intervenções (Takahashi et al., 2008), como a terapia com células derivadas da medula óssea (Ishizawa et al., 2004; Cruz et al., 2012), tratamento com o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) (Fortunato et al., 2014) ou para desenvolver investigações sobre a mecânica das anormalidades pulmonares no decorrer da doença (Sawada et al., 2007; Kawakami et al., 2008).

A destruição do septo alveolar é uma das alterações estruturais mais característica do EP na fase crônica. No estudo em discussão, observou-se que 28 dias após a administração de elastase a Lm média foi de 46,80 μm no grupo enfisematoso, sendo a diferença em relação a Lm mensurada no grupo controle não-enfisematoso, 27,96 μm , estatisticamente significativa $p < 0,0001$. Além da baixa mortalidade nos grupos experimentais. Este protocolo foi baseado num estudo prévio realizado por Vidal et al. (2012) no qual utilizou uma administração única intratraqueal de 100 μL de solução de elastase (2U/100g) para indução do enfisema experimental e, depois de 28 dias, observaram alterações pulmonares funcionais e estruturais, com baixa mortalidade.

Contudo, cabe ressaltar que há diversos ensaios pré-clínicos que utilizam diferentes concentrações de elastase para a indução do enfisema pulmonar, obtendo grau de lesão e nível de mortalidade mais elevados do que os apresentados neste estudo. Lüthje et al. (2009), usaram concentrações de 3,3U/100g em 5 instilações com intervalo de uma por semana em camundongos transgênicos NMRI com elevada atividade endógena anti-protease. Os animais desenvolveram enfisema com grande Lm de 270, 7 μm , porém, com alta taxa de mortalidade devido ao pneumotórax e a hemorragia pulmonar (30%). Em outro estudo, Kuhl et al. (2013), desenvolveram EP em camundongos fêmeas C57BL/6 com diferentes graus de lesão induzido por doses de elastase distintas. As doses variaram de 0,1U a 0,2U diluída em 50 μL de NaCl 0,9% em 4 instilações com intervalo de uma por semana. A dose maior de 0,2U resultou em alterações na mecânica respiratória associada com elastólise e hiperinsuflação alveolar. Enquanto que a de 0,15U resultou em apenas mudanças histológicas e as doses mais baixas não levaram a alterações significativas. A Lm média foi de 47,5 \pm 15,8 μm , semelhante a Lm mensurada no estudo aqui apresentado.

A gravidade das lesões do parênquima pulmonar, em modelos experimentais de EP, observada em relação ao desempenho nos exercícios pode ser avaliada por testes ergométricos, interpretados pioneiramente por Lüthje et al. (2009). Estes autores observaram, em relação ao grupo controle não-enfisematoso, uma redução significativa de 29,7%. na distância percorrida pelos camundongos enfisematosos que receberam instilação repetitiva de elastase.

No presente estudo, com uma única administração intratraqueal de elastase, observou-se uma redução do desempenho na ergometria, em relação a distância percorrida, de 36,03% quando comparada com este mesmo grupo no período pré-indução. Não houve alteração no grupo não-enfisematoso entre os períodos pré e pós-indução.

As limitações fisiológicas da tolerância ao exercício, na DPOC, ocorre devido à mecânica pulmonar deficiente, como resistência de vias aéreas elevadas, redução mecânica do diafragma pela hiperinsuflação, alterações nas trocas gasosas pulmonares (relação ventilação/perfusão; espaço morto alveolar). A intolerância ao exercício é um sintoma central em pacientes com EP, por isso é pertinente a avaliação desta patologia através do desempenho físico, e está relacionada com a qualidade de vida e ao prognóstico. Porém, há poucos estudos sobre a mecânica dessas alterações (Antônio et al., 2010).

As análises eletrocardiográficas e ecocardiográficas revelaram que não houve alterações cardíacas, no período de 28 dias pós-indução. Um aspecto a ser considerado é que o grau de comprometimento alveolar provocado na indução do enfisema pode não ter sido suficiente para provocar condições morfofisiológicas necessárias para o desenvolvimento do *cor pulmonale*. Porém, Edwards et al. (1971) e Ishikawa et al. (1972) relataram que não há relação entre a presença de hipertrofia ventricular direita e a porcentagem de pulmão destruído pelo EP.

Sulkowska et al. (1995) descrevem que os primeiros sinais de hipertrofia ventricular direita parecem estar presente três meses após a indução do EP, com evidente hipertrofia aos seis meses. Mostrando que é possível o desenvolvimento do *cor pulmonale* mais tardiamente, necessitando de um período maior de observação.

Num estudo realizado por Cruz et al. (2012), através da instilação intratraqueal de 50 µL de elastase 0,1U em camundongos C57BL/6, uma vez por semana durante quatro semanas, após 5 semanas de indução foi observado a presença de hipertrofia ventricular direita, mostrando que a concentração da elastase, bem como o método de instilações múltiplas podem interferir na progressão da doença e no desenvolvimento da hipertensão pulmonar, resultando no *cor pulmonale*.

Nesse estudo, foram utilizadas MSCs derivadas da medula óssea. Estas células apresentam atividade imunomoduladora (Zhao et al., 2010) e uma capacidade de diferenciação bem caracterizada (Wang et al., 2014), justificando a investigação quanto ao seu potencial terapêutico no tratamento do EP, patologia crônica mediada por resposta imune exacerbada com lesões teciduais progressivas. As MSCs podem ser obtidas de diferentes tecidos, mas a escolha por obtê-las a partir da medula óssea é devido a este ser um dos principais tecidos utilizados para a obtenção dessas células, por ter sido o primeiro empregado em terapia celular e o mais usado e caracterizado para o estudo das propriedades dessas células (Pinto Filho et al., 2013).

A caracterização fenotípica das células informa o grau de pureza da cultura, pois outros tipos celulares encontrados na medula óssea e no tecido adiposo podem apresentar características morfológicas similares às MSCs *in vitro*, como células hematopoéticas e fibroblastos (Bobis et al., 2006). Assim, ressalta-se a importância da caracterização, realizada nesse estudo, das MSCs obtidas através da medula óssea para a utilização como terapia celular no modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase.

De acordo com trabalhos realizados por diferentes grupos de pesquisa sobre a caracterização das MSCs, essa população expressa em sua superfície, marcadores como: CD44, CD105, CD29, CD73, CD90, CD166 (moléculas de adesão de leucócitos ativados), Stro-1 (fator estromal de suporte da hematopoese) e Sca-1 (Gronthos et al., 2003; Kolf et al., 2007; Monteiro et al., 2008; Amorin et al., 2012; Pinto Filho et al., 2013). Os marcadores hematopoiéticos e endoteliais que estão ausentes ou pouco expressos nessas células, são: CD11b, CD14, CD34, CD133 e CD45 (Kolf et al., 2007).

Nesse estudo, a caracterização imunofenotípica realizada por citometria de fluxo nas MSCs de medula óssea revelou células com alta expressão dos marcadores: CD105, CD73, CD44, CD90, CD29, Sca-1 e baixa expressão para CD45, CD34, CD11b. A expressão de CD117 foi baixa como também foi relatado em cultura de diferentes MSCs por Hong et al. (2005) e Meirelles et al. (2006).

Apesar de já terem sido identificados muitos marcadores de superfícies para caracterização das MSCs, a *International Society for Cellular Therapy* concorda que apenas a identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90, quando não estiverem

expressos marcadores hematopoiéticos, a capacidade de aderência ao plástico por longos períodos em culturas e o potencial de diferenciar-se em pelo menos três linhagens celulares distintas (osteoblastos, adipócitos e condroblastos) *in vitro*. é suficiente para a imunofenotipagem dessas células (Dominici et al., 2006).

Estudos anteriores demonstram que a eficácia terapêutica da administração das células sobre o EP ocorre gradualmente e, lentamente, por pelo menos 60 dias (Krause, 2008) e 120 dias (Wong et al., 2007) após a infusão. No presente estudo, após 56 dias foi possível analisar a capacidade de regeneração tecidual das MSCs, observando-se uma diminuição da Lm, uma restauração do parênquima pulmonar e aumento da capacidade de exercício.

A intolerância ao exercício físico foi revertida após a administração das células mesenquimais, fato que pode estar relacionado a melhora estrutural observada. A análise morfométrica através dos cortes histológicos pulmonares dos animais enfisematosos que não receberam tratamento, comparando-os com o grupo controle, revelou uma destruição do parênquima pulmonar o que condiz com a literatura que relata o EP como uma enfermidade caracterizada pela destruição da matriz extracelular alveolar, resultando em alargamento do espaço aéreo distal ao bronquíolo terminal, acompanhando de destruição das paredes, e uma redução da área de troca alveolar (Inoue et al., 2010). Nos cortes histológicos obtidos dos camundongos enfisematosos tratados com MSCs e MC observou-se uma restauração do septo alveolar, revelando assim, a capacidade de restauração do parênquima pulmonar, através do transplante de CT.

A extensão das lesões enfisematosas foi estimada através da Lm e, com uma única administração intratraqueal de 100µL de solução de elastase (2U/100g), foi obtido uma Lm de 46,80 µm. Esta medida foi comparável aos valores encontrados na literatura, variando de 35-85 µm (Ishikawa et al., 2004; Murakami et al., 2005; Foronjy et al., 2006; Hantos et al., 2008). Após o tratamento a Lm foi reduzida significativamente, com $38,70 \pm 0,44$ µm; $p < 0,0001$ nos animais que receberam MSCs, observando-se o mesmo nos animais tratados com MC $33,75 \pm 0,44$ µm; $p < 0,0001$, relevando assim a atividade imunomodulatória das MSCs.

A análise por imunofluorescência dos cortes histológicos dos tecidos pulmonares, através da marcação com anticorpo específico, anti-GFP, para a avaliação da expressão da GFP, revelou a presença de algumas células fluorescente nos cortes histológicos de pulmões. Demonstrando assim, que as células transplantadas por via veia caudal foram capazes de migrar sistemicamente para o tecido pulmonar lesionado. Estes resultados corroboram com outros estudos na literatura que relatam a capacidade de migração das CT para um local com lesão, diferenciando-se e regenerando tecidos ou produzindo fatores de crescimento que irão agir contra o dano tecidual (Hoehn et al., 2002; Devine et al., 2003; Allers et al., 2004; Lee et al., 2007; Gandia et al., 2008). A infiltração e adesão das MSCs no local da lesão são facilitadas pela presença de receptores expressos no tecido com lesão, como ocorre no recrutamento de leucócitos para um local com inflamação (Chamberlan et al., 2007).

Devido ao seu potencial imunomodulatório, as MSCs se tornaram foco de atenção terapêutica, devido à capacidade de atenuação da inflamação, diminuindo os níveis de mediadores inflamatórios, tais como Leucotrieno B4 (LTB4), TNF- α , IL-8, assim como a redução da apoptose (Zhen et al., 2010; Huh et al., 2011), melhora na reparação do parênquima e aumento na perfusão pulmonar (Guan et al., 2003; Shigemura et al., 2006. Huh et al., 2011).

Nesse estudo não foram encontradas alterações estatisticamente significantes na expressão gênica de TNF- α , IL-10, IL-6, TGF- β , VEGF, ELN, no tecido pulmonar. Porém, em relação à mensuração da ALPL, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o grupo enfisematoso que recebeu MSCs.

Nesse estudo, observou-se que houve uma menor expressão do RNAm de ALPL nos animais enfisematosos tratados com MSCs e MC em relação ao grupo controle (enfisematoso não tratado). Este resultado sugere um possível potencial de regeneração tecidual promovido por essa terapia celular, visto que no sistema respiratório a ALPL é um marcador para avaliar o grau de estimulação celular dos pneumócitos tipo II, diferenciação e danos teciduais (Edelson et al., 1988). Um estudo realizado por Inoue et al. (2010), revela a ALPL como um novo biomarcador para progressão da doença pulmonar enfisematosa.

Até o momento, os mecanismos de ação dessas células ainda não estão totalmente elucidados, porém, sabe-se que as MSCs podem atuar através da interação célula-célula ou ação parácrina (Monteiro et al., 2009; Amorin et al., 2012). Através da análise por imunofluorescência da migração dessas células para o tecido lesionado, foi possível observar que apesar de presentes, a quantidade de MSCs no local da lesão é ínfima, sugerindo que seu principal meio de modulação seria através da ação parácrina, desencadeando a liberação de citocinas e fatores de crescimento. Dentre esses fatores estão as prostaglandinas E2 (PGE2), interleucinas (IL-4, IL-6, IL-10), TGF- β , G-CSF e fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), que influenciam fibroblastos e células granulocíticas envolvidas no processo de inflamação e regeneração tecidual (Monteiro et al., 2009; Amorin et al., 2012).

Neste contexto, optou-se por investigar o potencial terapêutico do MC sobre o EP experimental. Observou-se que após a administração do MC os camundongos enfisematosos recuperam a capacidade de exercício e reduzem a Lm, indicando que a restauração estrutural pode ser um dos responsáveis pela melhora funcional. Este efeito foi comparável com a administração de um número equivalente de MSCs e um grupo controle que não recebeu tratamento, evidenciando que o MC possui fatores secretados pelas MSCs capazes de atenuar as lesões pulmonares com mais eficiência que as próprias MSCs e corroborando para a hipótese do efeito parácrino dessas células. Uma vez que não houve alteração no nível de expressão das citocinas no tecido pulmonar mensurado por RT-PCR em tempo real, sugere-se que os efeitos benéficos descritos neste estudo possam ser atribuídos a ação de fatores de crescimento e citocinas liberados pelas MSCs sobre a regeneração tecidual, prevalecendo sobre o efeito imunomodulatório.

Os resultados apresentados corroboram com o estudo realizado por Huh et al. (2011) que também revelou que as MSCs reparavam o EP induzido pela fumaça do cigarro através de efeitos parácrinos em vez da interação entre as células, pois utilizou meio condicionado de MSCs livre de células e obteve os mesmos resultados em relação a reparação tecidual. O crescente número de estudos sugere que a administração de meios condicionados obtidos a partir de MSCs podem melhorar muitos dos efeitos resultantes da administração de MSCs em diferentes modelos de lesão pulmonar (Lonescu et al., 2012).

A caracterização do MC utilizado no presente estudo ainda não está concluída, mas há evidências na literatura de que o MC é composto por substâncias bioativas que são conhecidas pelo seu potencial imunomodulador e regenerativo tecidual. Lonescu et al. (2012), realizaram uma análise comparativa entre os meios condicionados de fibroblastos (MC-Fib) e o de células mesenquimais (MC) em modelos de animais com lesões pulmonares. E observaram que o MC continha vários fatores que podem conferir benefícios terapêuticos: quimiocinas (31%), proteínas de ligação (27%), citocinas (21%), fatores de crescimento (14%), antagonistas de citocina (4%), e as moléculas envolvidas na reparação da matriz extracelular (3%). O MC continha concentrações mais elevadas de fator de células estaminais (SCF), IL-12p40 / p70, derivada de estroma o factor 1 α (SDF-1 α), IGF-I, e osteoprotegerina e concentrações mais baixas de IL-6, em proteínas inflamatórias de macrófagos 3 α (MIP-3 α) e timo, e regulada por ativação das quimiocinas (TARC), quando comparado ao MC-Fib.

VIII. CONCLUSÕES

1. A instilação intratraqueal única de elastase 2U/100g de massa corporal promoveu a indução do enfisema pulmonar em camundongos fêmeas da linhagem C57Bl6. Sendo comprovado através da análise funcional e estrutural. A indução promoveu redução na capacidade de se exercitarem na esteira ergométrica e aumento da Lm.
2. O tratamento com MSCs de medula óssea ou MC foi capaz de compensar os efeitos deletérios do EP induzido em camundongos fêmeas C57Bl6 por instilação intratraqueal de elastase, revertendo o alargamento da estrutura alveolar e promovendo a recuperação da capacidade de realizar exercício nestes animais.
3. No período de avaliação desse estudo, não houve alterações ecocardiográficas e eletrocardiográficas, apesar de haver evidências na literatura que o enfisema pulmonar pode desenvolver o *cor pulmonale*.
4. É necessário a realização de mais estudos, no decorrer da doença, para investigação de possíveis alterações cardíacas nos animais enfisematosos, visto que o *cor pulmonale* é uma manifestação cardíaca que ocorre mais frequentemente numa fase mais tardia da doença.
5. Há vantagens do uso do MC para o tratamento do EP, por tratar-se de um procedimento mais seguro que a infusão das células, além da real possibilidade de identificação das moléculas proteicas presentes neste meio, que isoladas ou em combinação com outras moléculas sejam responsáveis pela regeneração tecidual e vir a tornar-se futuramente um novo fármaco.

IX. SUMMARY

EVALUATION OF THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM BONE MARROW AND CONDITIONED MEDIUM IN THE EXPERIMENTAL MODEL OF PULMONARY EMPHYSEMA

Introduction: Pulmonary emphysema is a chronic respiratory disease associated with an inflammatory process exacerbated in response to toxic agents. Regenerative medicine has shown improvements in tissue repair and regeneration via transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) and the use of conditioned medium (MC).

Objective: to evaluate the therapeutic potential of MSCs and the MC of the culture of these cells in the functional and structural recovery of mice's emphysematous lungs.

Methods: 40 female mice C57BL / 6 (CEUA Protocol 016/2012) were evaluated before and after the induction of emphysema and after treatment, by electrocardiography, echocardiography and exercise testing. Morphometric analysis was performed using linear inter-septa measure (Lm) and microscopic analysis of inflammatory cells. The investigation of the possible mechanisms of action in tissue regeneration was performed by evaluation of gene expression. The presence of fluorescent cells in the lung was evaluated under a microscope with epifluorescence system. **Results:** Before emphysema induction, mice were able to run 395.9 ± 15.82 m on the treadmill, after 28 days the mice ran a shorter distance (252.4 ± 13.33 m, $p < 0.001$). The treatment with MSC increased their exercise capacity (318.2 ± 26.96 m; $p < 0.001$), as well as the use of the MC (344.45 ± 21.88 m; $p < 0.01$). These findings were not observed in the group treated with saline (263.5 ± 26.58 m). Regarding the Lm, the control group was measured (27.96 ± 0.54 mm). In the group treated with saline was observed a significant increase in air spaces (46.80 ± 0.70 mm, $p < 0.0001$). The Lm was reduced (38.70 ± 0.44 mm; $p < 0.0001$) in the animals that received MSC, the same in the group treated with MC (33.75 ± 0.44 mm; $p < 0.0001$). Immunofluorescence revealed the presence of MSCs in lung tissue. **Conclusion:** Treatment with MSC and CM-MSC compensated the deleterious effects of induced emphysema, reversing the enlargement of alveolar structure and promoting the recovery of exercise capacity in emphysematous mice possible due to paracrine effects.

Key words: 1. Pulmonary emphysema; 2. Mesenchymal cell; 3. Conditioned medium.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abboud RT. Pathogenesis of COPD. Part I. The Role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008; 12(4):361-7.
2. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005; v.105, p.1815-22.
3. Allers C, Sierralta WD, Neubauer S, Rivera F, Minguell JJ, Conget PA. Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation.* 2004; 78(4):503-8.
4. American Lung Association [website na internet]. COPD [acesso em 29 sept 2013]. Disponível em: <http://www.lungusa.org>.
5. Amorin B, Valim VS, Lemos NE, Júnior LM, Silva AMP, Silva MAL, Silla L. Células-tronco mesenquimais – caracterização, cultivo, propriedades imunológicas e aplicações clínicas. *Ver HCPA.* 2012; 31(1):71-81.
6. António C, Gonçalves AP, Tavares A. Doença pulmonar obstrutiva crônica e exercício físico. *Rev Port Pneumol* 2010; XVI (4): 649-58.
7. Antunes MA, Rocco PRM. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 2011, vol.83, n.4, pp. 1385-96.
8. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J.* 2003; 22:672-88.
9. Barnes PJ. New approaches to COPD. *Eur Respir Rev.* 2005; 14: 2-11.
10. Barnes PJ. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Med.* 2003; 54:113-29.
11. Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006; 44(4):215-30.
12. Borgerding M, Klus H. Analysis of complex mixtures - cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol.* 2005; 57(Suppl 1):43-73.
13. Celli BR. Chronic obstructive pulmonary disease: from unjustified nihilism to evidencebased optimism. *Proc. Am. Thorac.* 2006; 3:58-65.
14. Chamberlain G, Fox J, Ashton B. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features an potencial horning. *Stem Cell.* 2007; 25: 2739-49.

15. Churg A, Wright JL. Proteases and emphysema. *Curr Opin Pulm Med.* 2005; 11: 152-9.
16. Cote C, Zilberberg MD, Mody SH, Dordelly LJ, Celli B. Haemoglobin level and its clinical impact in a cohort of patients with COPD. *Eur. Respir. J.* 2007; 29:923-9.
17. Cruz FF, Antunes MA, Abreu SC, Fujisaki LC, Silva JD, Xisto DG, et al. Protective effects of bone marrow mononuclear cell therapy on lung and heart in an elastase-induced emphysema model. *Respir Physiol Neurobiol.* 2012; 182(1):26-36.
18. Datasus. Ministério da Saúde, Brasil, 2008. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>.
19. Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Herve P, et al. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation.* 2003; 108(suppl I):II-253-8.
20. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8:315-7.
21. Dowling P, Clynes M. Conditioned media from cell lines: a complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomic.* 2011; 11(4):794-804.
22. Edelson JD, Shannon JM, Mason RJ. Alkaline phosphatase: a marker of alveolar type II cell differentiation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988; 138:1268-75.
23. Edwards C, Heath D, Harris P. The carotid body in emphysema and left ventricular hypertrophy. *J Pathol.* 1971; 104:1-13.
24. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres. *Rev. Med. Brasil.* 1997; 43(1): 61-68.
25. Ferreira L, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir Bras.* 2005; vol.20, suppl.2, pp. 28-34.
26. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152(5 Pt 1):1666-72.

27. Foronjy RF, Mirochnitchenko O, Propokenko O, Lemaitre V, Jia Y, Inouye M, et al. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(6):623-31.
28. Fortunato G, Vidal DTA, Souza BS, Ribeiro-dos-Santos R, Soares MBP, Macambira SG, et al. Recovery of pulmonary structure and exercise capacity by treatment with granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in a mouse model of emphysema. *Pulm Pharmacol & Ther.* 2014; 27:144-9.
29. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell.* 2000; 100(1):143-55.
30. Fujita M, Ye Q, Ouchi H, Nakashima N, Hamada N, Hagimoto N, et al. Retinoic acid fails to reverse emphysema in adult mouse models. *Thorax.* 2004; 59: 224-30.
31. Gandia C, Arminñan A, Garcia-Verdugo JM. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem cells.* 2008; 26: 638-45.
32. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease GOLD. Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [Internet]. [cited 2013 June 02]. Available from: http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2013_Feb20.pdf
33. Groneberg DA, Chung KF. Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2004; 5:18.
34. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves Se, Kortesidis A. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 9): 1827-35.
35. Gruber R, Karreth F, Kandler B, Fuerst G, Rot A, Fischer MB, et al. Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets.* 2004; 15(1):29-35.
36. Guan XJ, Song L, Han FF, Cui ZL, Chen X, Guo XJ, Xu WG. Mesenchymal stem cells protect cigarette smoke-damaged lung and pulmonary function partly via VEGF-VEGF receptors. *J Cell Biochem.* 2003; 114:323-35.
37. Hantos Z, Adamicza A, János T, Szabari MV, Tolnai J, Suki B. Lung volumes and respiratory mechanics in elastase-induced mice. *J Appl Physiol.* 2008; 105:1864-72.

38. Hayes JA, Korthy A, Snider GL. The pathology of elastase-induced panacinar emphysema in hamsters. *J Pathol* 1975; 117:1-14.
39. Hoehn M, Kustermann E, Blunk J. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo? A highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *PNAS* 99. 2002; (25): 16267-72.
40. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2004; 364(9435):709-21.
41. Hong SH, Gang EJ, Jeong JA. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 330: 1153-61.
42. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005; 7(5):393-5.
43. Huh JW, Kim SY, Lee JH, Lee JS, Van Ta Q, Kim M, et al. Bone marrow cells repair cigarette smoke-induced emphysema in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011; 301:L255-66.
44. Inoue K, Koike E, Takano H. Comprehensive of elastase-induced pulmonary emphysema in mice: Effects of ambiente existing particulate matters. *International Immunopharmacology*. 2010; 1380-9.
45. Ishikawa S, Fattal GA, Popiewicz J, Wyatt JP. Functional morphometry of myocardial fibers in cor pulmonale. *Am Ver Respir Dis*. 1972; 105:358-67.
46. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Numasaki M, Ueda S, et al. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. *FEBS Lett*. 2004; 556:249-52.
47. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Suzuki T, Mizuno S, et al. Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 324(1): p. 27680.
48. Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. *Biol Pharm Bull*, 2008; 31: 1434-8.

49. Ken-ichiro I, Eiko K, Yanagisawa R, Takano H. Extensive Analysis of Elastase-Induced Pulmonary Emphysema in Rats: ALP in the Lung, a New Biomarker for Disease Progression? *J Clin Biochem Nutr.* 2010; 46(2): 168–176.
50. Knudsen L, Allen L, Stumbaugh A, Levin S, Nyengaard JR, Hawgood S. GM-CSF mediates alveolar epithelial type II cell changes, but not emphysema-like pathology, in SP-D-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 287: L1333-41.
51. Kolf CM, Cho C, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy.* 2007; v.9, 204-13.
52. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development.* 2001; 128(24):5181-8.
53. Kotton DN, Summer R, Fine A. Lung stem cells: new paradigms. *Exp Hematol.* 2004; 32(4):340-3.
54. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* 2003; 1;101(9):3722-9.
55. Krause DS, Amam JSV, Herzog E, Grove J, Bruscia E, Ziegler E, et al. Engraftment of bone marrow-derived epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1044:117-24.
56. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 2001; 105(3):369-77.
57. Krause DS. Bone Marrow–derived Cells and Stem Cells in Lung Repair. *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 5(3): 323-7.
58. Kuhl CP, Garcez TNA, Magrisso AB, Laurino CCFC, Cirne-Lima EO, Rocco PRM, Macedo-Neto AV. Desenvolvimento de Diferentes Graus de Enfisema Plmonar Induzido por Elastase em Camundongos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós Graduação em Medicina: Cinências Cirúrgicas. Porto Alegre, 2013; 82f. pg 38-59.
59. Lee KH, Sum-Kim H, Choi JS. Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovers following acute spinal cord injury in rats. *Acta Neurobiol Exp.* 2007; 67: 13-22.

60. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Applic.* 1995; 4: 357-62.
61. Lonescu L, Byrne RN, Haaften TV, Vadivel A, Alphononse RS, Parra GJR, et al. Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: in vivo evidence for stem cell paracrine action. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Dec 1, 2012; 303(11): L967-77.
62. Lüthje L, Raupach T, Michels H, Unsöld B, Hasenfuss G, Kögler H, Andreas S. Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. *Respir Res.* 2009; 10:7-17.
63. Macintyre NR. Chronic obstructive pulmonary disease: emerging medical therapies. *Respir Care.* 2004; 49(1):64-74.
64. Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science.* 2006; 119: 2204-13.
65. Monteiro BS, Argôlo-Neto NM, Del Carlo RJ. Terapia celular em reparação óssea – aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. *Ciência Veterinária nos Trópicos.* 2008; v.11, s2, p. 95-100.
66. Monteiro BS, Argôlo-Neto NM, Del Carlo RJ. Terapia celular em reparação óssea – aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. *Ciênc Vet Tróp.* 2008; v. 11, supl. 2, p. 95-100.
67. Monteiro R, Jatene FB, Pazetti R, Correia AT, Manoel LA, Bernado WM, et al. Avaliação das alterações morfológicas cardíacas secundárias ao enfisema pulmonar: estudo experimental em ratos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2004; vol.19, n.4, pp. 341-7.
68. Murakami S, Nagaya N, Itoh T, Iwase T, Fujisato T, Nishioka K, et al. Drenomedullin regenerates alveoli and vasculature in elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(5):581-9.
69. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 1997; 349(9061):1269-76.
70. Nerem RM, Ensley AE. The tissue engineering of blood vessels and the heart. *Am J Transplant.* 4 Suppl. 2004; 6:36-42.

71. Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42(1):88-97.
72. Pawels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. GOLD Scientific Committee. *Am J Respir Care Med.* 2001; v. 163, p. 1256-76.
73. Peinado VI, Ramez J, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Barbera JA. Identification of Vascular Progenitor Cells in Pulmonary Arteries of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; 34(3):257-63.
74. Pinto Filho STL, Treichel TLE, Aramburú Junior JS, Rosa MB, Dalmolin F, Brun MV, et al. Células-Tronco mesenquimais adultas: Características e aplicações experimentais em animais. *Vet. e Zootec.* 2013; 20 (Edição Comemorativa): 49-59.
75. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284, 143-7.
76. Ribeiro GF. Abordagem ambulatorial do paciente com DPOC e comorbidades. *Gaz. méd. Bahia* 2008; 78 (Suplemento 2):52-8.
77. Ribeiro-Paes JT, Bilaque A, Oswaldo T, Milton A, Luis RB, Stessuk T, et al. Terapia celular em doenças pulmonares: existem perspectivas? Cell therapy in pulmonary diseases: are there perspectives? *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009; 31(Supl.1):140-8.
78. Ribeiro-Paes JT, Stessuk T, Kozma RH. Cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease: state of the art and perspectives. In: Ong CK, editor. *Chronic obstructive pulmonary disease: current concepts and practice.* Croácia: InTech. 2012; cap 23. Pg 455-74.
79. Rufino R, Costa CH. Patogenia da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Rev HUPE.* 2013; 12(2):19-30.
80. Sawada M, Ohno Y, La Bl, Funaguchi N, Asai T, Yuhgetsu H, et al. The Fas/Fasligand pathway does not mediate the apoptosis in elastase-induced emphysema in mice. *Exp Lung Res.* 2007; 33: 277-88.

81. Shi GP, Munger JS, Meara JP, Rich DH, Chapman HA. Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J Biol Chem.* 1992; 267: 7258-62.
82. Shigemura N, Okumura M, Mizuno S, Imanishi Y, Nakamura T, Sawa Y. Autologous transplantation of adipose tissue-derived stromal cells ameliorates pulmonary emphysema. *Am J Transplant.* 2006; 6:2592-600.
83. Shintani S, Murohara T, Ikeda H. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001; 103: 2776-9.
84. Soares MBP, Lima RS, Rocha LL, Takyia CM, Pontes-de-Carvalho L, Carvalho AC, Ribeiro-dos-Santos R. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am. J. Pathol.* 2004; 164(2), 441-7.
85. Souza CF, Napoli P, Han SW, Lima VC, Carvalho ACC. Células-tronco mesenquimais: Células ideais para a regeneração cardíaca? *Rev Bras Cardiol Invasiva.* 2010; 18(3):344-53.
86. Sulkowska M, Musiatowicz B, Sulkowski S, Zimnoch L, Ejsmont-Pietrow G, Sulik M et al. Cor pulmonale in experimental lung emphysema. I-The morphometric evaluation of pulmonary and myocardium changes. *Rocz Akad Med Bialymst.* 1995; 40:335-43.
87. Takahashi S, Nakamura H, Seki M, Shiraishi Y, Yamamoto M, Furuuchi M, et al. Reversal of elastase-induced pulmonary emphysema and promotion of alveolar epithelial cell proliferation by simvastatin in mice. *AmJ Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 294(5): L882-90.
88. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: A pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet.* 2002; 360: 427-35.
89. Van DP, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume FO, Nahmias Y. Mesenchymal Stem Cell-Derived Molecules Directly Modulate Hepatocellular Death and Regeneration In Vitro and In Vivo. *Hepatology.* Vol. 2008; 47, No. 5.
90. Vidal DTA, Fortunato GA, Klein W, Ribeiro-dos-Santos R, Soares M, Macambira S, et al. Alterations in pulmonary structure by elastase administration in a model of emphysema in mice is associated with functional disturbances. *Rev Port Pneumol.* 2012; 18(3):128-36.

91. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology*. 2014; 1009-16.
92. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002; 420:520-62.
93. Wong AP, Dulty AE, Sacher A, Lee H, Hwang DM, Liu M, et al. Targeted cell replacement with bone marrow cells for airway epithelial regeneration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293: L740-52.
94. World Health Organization. Global alliance against chronic respiratory diseases (GARD). General Meeting [Internet]. In: Third General Meeting; Istanbul 2008; Available from: http://www.who.int/gard/news_events/GARD_general_meeting_istanbul/en.
95. Zago MA. Terapia com células tronco: fundamentos, oportunidades e obstáculos. *Revista da sociedade brasileira de hipertensão*. 2005; v.8, n.4, p.145-50.
96. Zhao S, Wehner R, Bornhäuser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells and Their Therapeutic Consequences for Immune-Mediated Disorders. *Stem Cells and Development*. 2010; 19: 607-14.
97. Zhen G, Xue Z, Zhao J, Gu N, Tang Z, Xu Y, Zhang Z. Mesenchymal stem cell transplantation increases expression of vascular endothelial growth factor in papain-induced emphysematous lungs and inhibits apoptosis of lung cells. *Cytotherapy*. 2010; 12:605-14.

XI. ANEXO

ANEXO I

Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 016/2012

PROJETO: "Avaliação do potencial terapêutico das células tronco mesenquimais de medula óssea, meio condicionado e/ou do G-CSF em modelo experimental de enfisema pulmonar: Estudo funcional e estrutural da terapia celular"

COORDENADORA: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongos C57Bl/6 fêmeas	200
Camundongos C57Bl/6 machos EGFP (disponíveis no biotério do CBTC/HSR)	30

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 14/03/2013, e tem validade até 14/03/2015.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 03/14/2013, being valid until 03/14/2015.

Salvador, 15 de março de 2013.

PATRICIA SAMPAIO T. VERAS
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ