

MARIA CRISTINA EBOLE DE SANTANA

**TERAPIA COM CÉLULAS
MONONUCLEARES DERIVADAS DE
MEDULA ÓSSEA NA LESÃO PULMONAR
AGUDA INDUZIDA POR PARAQUAT**

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR
EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIA CRISTINA EBOLE DE SANTANA

TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES DERIVADAS DE
MEDULA ÓSSEA NA LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA
POR PARAQUAT

**Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando a
obtenção do grau de Doutor em Ciências**

Aprovada por:

Prof^a PhD. Patricia Rieken Macedo Rocco – Orientadora
Prof^a Associada, IBCCF°, UFRJ.

Prof. PhD. Marcelo Marcos Morales – Orientador
Prof^o Associada, IBCCF°, UFRJ.

Prof^a PhD. Vera Lúcia Capelozzi
Prof^a Associada, FM, USP.

Prof^a PhD. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins
Pesquisador Titular III, IOC.

Prof^a PhD. Carmen Cabanelas Pazos de Moura
Prof^a Associada, IBCCF°, UFRJ.

Prof^a PhD. Denise Pires Carvalho – Revisora
Prof^a Associada, IBCCF°, UFRJ.

Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Junho de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Santana, Maria Cristina Ebole de

TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES DERIVADAS DE MEDULA
ÓSSEA NA LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR PARAQUAT

Rio de Janeiro, UFRJ, 2008

vi. f. 166

Tese: Doutor em Fisiologia

1. Mecânica Respiratória 2. Terapia Celular 3. Remodelamento Pulmonar
4. Lesão Pulmonar Aguda

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Investigação Pulmonar e de Fisiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX – FAPERJ).

Antes de começar um capítulo novo, é preciso terminar o antigo: diga a si mesmo que passou...

Encerrando ciclos.

Não por causa do orgulho, por incapacidade ou por soberba,

Mas porque simplesmente aquilo já não se encaixa mais na sua vida.

Aprender a construir todas as suas estradas no hoje.

Porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos.

Feche a porta, mude o disco, limpe a casa, sacuda a poeira...

Deixe de ser quem era, e se transforme em quem é.

DEDICATÓRIA

Ao meu padrinho, William de Araújo.

À minha mãe, Almindia Augusta de Santana.

A Fé é essencial para continuar...

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração deste trabalho e aos quais devo meus agradecimentos:

- Professora Patrícia R. M. Rocco, minha orientadora desde sempre...Pela amizade, dedicação, competência, dignidade e conselhos. Sempre acreditou na minha capacidade, mesmo nos momentos mais difíceis e não foram poucos... Não existem palavras para expressar meu respeito e admiração.

- Professor Marcelo Marcos Morales, meu orientador. Pelos ensinamentos da biologia celular. Pela paciência e atenção dispensadas a mim todos esses anos. Referência de competência e determinação.

- Professora Vera Capelozzi, por seu indispensável auxílio na realização da ultra-estrutura pulmonar deste trabalho. Obrigada pelas considerações, elas foram fundamentais para realização deste e de outros trabalhos.

- Letícia Lima, foi muito mais do que companheira de experimentos e de análise dos dados. Obrigada, por compreender minhas ausências e os momentos difíceis. Sucesso para você!

- Meus pais, sem vocês nada disso teria sentido! Pai, sei que estará sempre ao meu lado...te amo muito. Mãe, nem sei o que seria de mim sem você! Fizeram de tudo para Eu ser feliz.
- Meu irmão, Jarbas Júnior. Te adoro muito! Agradeço pela paciência e compreensão. Meu companheiro para as horas de alegria e tristeza. Momentos difíceis, por me acolher em sua casa a qualquer hora...
- Minha irmã Fátima, que apesar de tudo, sei que não deixou de me amar.
- Meu padrinho, William de Araújo. Dedicou horas da sua vida por mim, meu avô do coração, amor incondicional e imensurável. Sinto sua falta todos os dias.
- Minhas tias Déia e Léa, amigos são a família que a gente escolhe. Essa escolha foi feita há anos. Sempre me incentivaram a estudar e cuidaram para que eu me tornasse assim hoje.
- Emmanuel Salgueiro, guardo no coração um lugar só pra você. Admiração, carinho e amizade. Sempre disposto a me ajudar, senhas, jantares, lugares, momentos difíceis, internações. Muitíssimo obrigado por ser meu amigo.
- Flavia Carpenter, Elizeth Rossi, Rafaela Corrêa, Gláucia Madruga e Verônica Hoelz. Pra vocês muito obrigada seria pouco! Vou ser

eternamente grata pela amizade, carinho, preocupação e diversão. Sinto falta de tê-las mais perto de mim...

- Renata Contador, minha amiga para sempre!

- Todos da CSSJ, especialmente Marisete, por confiarem no meu trabalho e na minha pessoa. Aos meus amigos da UCOR, pelo incentivo de sempre, não esquecerei do apoio de vocês todos esses anos.

- Meus amigos de Fernando de Noronha pelo carinho, por entenderem minhas idas e vindas...Saudades de vocês.

- Alunos de iniciação científica e de pós-graduação do Laboratório de Fisiologia da Respiração, pela amizade, compreensão e consideração. Foram minha família por muitos anos. Débora Xisto, Vera Tostes, Ricardo Lima, Mariana Genuíno, Cristiane Nascimento, Rafael Cadete, Henrique, Halina, Caroline Pássaro, Flávia Brandão, Roberta Lassance, Felipe Prota, Alba, Débora e Felipe Ornellas, Tatiana Maron, Carolzinha, Raquel, Viviane Cagido, Pedro Leme e todos (tantos) os outros que ao seu modo contribuíram para realização deste projeto. Que todos realizem seus objetivos com muito sucesso.

- Meus amigos, Rodrigo Carvalho, Fabio Rivas Fisher, Patrícia Bruxelas, Nilson Jr., George e Ludovina Siqueira, Didi, Maria de Fátima.

- Super Camila! Nos conhecemos há tantos anos...minha família também.

- Lúcia Méres, que me ajudou num dos momentos mais difíceis da minha vida e fez com que Eu tivesse vontade de viver de novo. Obrigada mesmo!

- André, Rosa, Sérgio, Jackeline, Alaine, pelo carinho, cuidados e atenção dispensados a todos no laboratório. Agradeço muito, de coração.

- Toda minha família, mesmo que distante, entenderam minha ausência em vários momentos, incentivo incansável. Meus tios e primos. Agora, poderei estar mais próxima de todos vocês.

- Amigos da secretaria de graduação e pós-graduação do IBCCF: Ricardo, Hélio, Edna, Sandra e Diogo.

- Todos aqueles que estiveram ao meu lado e que se fazem importante mesmo não citados aqui.

RESUMO

TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR PARAQUAT.

Maria Cristina Ebole de Santana. Orientadores: Patricia Rieken Macedo Rocco e Marcelo Marcos Morales. Resumo de Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Introdução: O objetivo do presente trabalho é avaliar o impacto da terapia com células mononucleares da medula óssea em modelo experimental de lesão pulmonar aguda. **Métodos:** Trinta camundongos C57BL6 foram utilizados para desenvolver o modelo experimental de lesão pulmonar aguda (LPA). Para tal, os animais foram aleatoriamente subdivididos em 5 grupos (n=6/grupo). No grupo controle (C), injetou-se salina estéril (0,1 mL) intraperitonealmente (i.p.). Os animais com LPA receberam paraquat (10 mg/kg i.p.). A mecânica (elastâncias estática (Est) e dinâmica (Edyn), variação da elastância (ΔE), pressões resistiva ($\Delta P1$) e viscoelástica ($\Delta P2$) e histologia pulmonares (morfometria pulmonar, quantificação de fibras colágenas, microscopia eletrônica) foram avaliadas 24 h, 1, 2 e 4 semanas após administração de salina ou paraquat. **Resultados:** Constatou-se que Est, $\Delta P1$ e $\Delta P2$ aumentaram nos animais LPA 24h, 1, 2 e 4 semanas em relação à C. As alterações morfo-funcionais mais intensas ocorreram em 24 h e 1 semana após a indução da lesão. Logo, optamos em avaliar a resposta terapêutica das células mononucleares derivadas da medula óssea após 1 semana. Uma hora após administração de salina ou paraquat i.p. foram injetadas células mononucleares derivadas de medula óssea (2×10^6) (CEL) ou salina (SAL) intra-venosamente (i.v.). Est, $\Delta P1$ e $\Delta P2$ foram maiores nos animais LPA-SAL em comparação ao C-SAL. A terapia com células mononucleares reduziu Est e $\Delta P1$, porém $\Delta P2$ se manteve elevado nos animais LPA-CEL em comparação ao grupo C-CEL. A fração de alvéolos colapsados foi maior no grupo LPA-SAL em comparação ao C-SAL e reduziu em LPA-CEL, mas não atingiu valores controle. O conteúdo de fibras colágenas foi maior em LPA-SAL do que em C-SAL, sendo que a terapia com células mononucleares impediu a fibrogênese. No grupo LPA-SAL observou-se lesão de pneumócitos tipos I e II, endotélio, aumento de fibras colágenas, entretanto, no grupo LPA-CEL constatou-se reparo do epitélio alveolar e redução de fibras colágenas **Conclusão:** A terapia com células mononucleares derivadas da medula óssea acarretou reparo da membrana alvéolo-capilar com conseqüente melhora dos parâmetros morfo-funcionais, impedindo a fibrogênese no presente modelo de lesão pulmonar aguda.

Palavras chaves: células tronco, lesão pulmonar aguda, colágeno

Rio de Janeiro
Junho 2008

ABSTRACT

BONE MARROW MONONUCLEAR CELL THERAPY LEADS TO LUNG REPAIR IN PARAQUAT-INDUCED ACUTE LUNG INJURY (ALI)

Maria Cristina Ebole de Santana. Advisors: Patricia Rieken Macedo Rocco and Marcelo Marcos Morales. Abstract of doctoral in science thesis submitted to Biological Science Post-graduation Program, Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho and Federal University of Rio de Janeiro – UFRJ.

Introduction: This study was undertaken to evaluate the time course of lung mechanics, morphometry and collagen fiber content of bone marrow mononuclear cell (BMMC) therapy in a model of paraquat-induced ALI. **Methods:** Thirty C57BL6 mice were randomly divided into 5 groups. In the C group, saline (0.1 mL) was intraperitoneally (ip) injected. In ALI group, paraquat was injected (10 mg/bw ip). Lung histology, the amount of collagen fiber in the alveolar septa, and mechanical parameters [lung resistive ($\Delta P1$) and viscoelastic ($\Delta P2$) pressures, and static elastance (Est)] were analyzed 24h (ALI24), 1 (ALI1), 2 (ALI2) and 4 (ALI4) weeks after the induction of ALI. **Results:** Est, $\Delta P1$ and $\Delta P2$ increased from C to ALI24 and remained elevated until 4-wks (ALI4) which were correlated with the volume fraction of collapsed alveoli. The most important functional changes were observed in ALI24 and ALI1, so we decided to analyze the BMMC therapy after 1-wk. C57BL/6 mice were randomly divided into 2 main groups. 1-h after saline or paraquat injection, BMMC (2×10^6) from male donor mice were intravenously injected (C-CEL and ALI-CEL, respectively). 7 days after saline or paraquat injections, lung mechanics, histology (light and electron microscopy), and the amount of collagen fiber in alveolar septa were analyzed. **Results:** $\Delta P1$, $\Delta P2$ and Est were higher in ALI than C group. BMMC therapy reduced Est and $\Delta P1$, but only minimized $\Delta P2$ in LPA-CEL in relation to C-CEL. ALI group presented interstitial edema, neutrophilic infiltration and alveolar collapse. The amount of collagen fibers in the alveolar septa in ALI was higher than C animals. BMMC therapy avoided $\Delta P1$ and static elastance changes induced by paraquat as well as the increase in collagen fiber content, but only minimized the changes in $\Delta P2$ and the amount of alveolar collapse. Electron microscopy showed pneumocyte types I and II and endothelial cell lesions, and increased type III collagen fiber. ALI-CEL group presented both epithelial and endothelial repair. **Conclusion:** These findings suggest that BMMC therapy could be beneficial in paraquat-induced ALI due to its ability to control inflammation as well as contribute in the repair of lung injury.

Key words: stem cell, acute lung injury, remodelling.

Rio de Janeiro
June 2008

ÍNDICE DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

- BALF – fluido do lavado bronco-alveolar
- cDNA – ácido desoxiribonucléico complementar
- CO₂ – dióxido de carbono
- CE – célula-tronco embrionária
- C,L – complacência pulmonar
- C,rs – complacência do sistema respiratório
- C,w – complacência da parede torácica
- DAD – dano alveolar difuso
- DI – diâmetro interno
- DNA – ácido desoxiribonucléico
- DEPC - dietilpirocarbonato
- Edyn,rs – elastância dinâmica do sistema respiratório
- Edyn,L - elastância dinâmica do pulmão
- Edyn,w – elastância dinâmica da parede torácica
- Est,rs – elastância estática do sistema respiratório
- Est,L – elastância estática do pulmão
- Est,w – elastância estática da parede torácica
- FiO₂ – fração inspirada de oxigênio
- GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
- IL- interleucina
- ICAM -1 – molécula de adesão celular -1
- LPiV – lesão pulmonar induzida pelo ventilador
- LPA – lesão pulmonar aguda
- MEC: matriz extracelular

NF- κ B- fator de Transcrição Nuclear

O₂ – oxigênio

PAF - fator de Ativação Plaquetária

Pao – pressão de abertura das vias aéreas

PaO₂ – pressão parcial arterial de oxigênio

PAP – pressão da artéria pulmonar

Palv – pressão alveolar

Pb – pressão barométrica

PCPIII – pró-colágeno III

PNMI – pneumócito do tipo I

PNMII - pneumócito do tipo II

PEEP – pressão positiva ao final da expiração

Pel,L – pressão de retração elástica pulmonar

Pel,rs – pressão de retração elástica do sistema respiratório

Pel,w – pressão de retração elástica da parede torácica

Pes – pressão esofagiana

Pi – ponto de inflexão

PIP – pressão de pico inspiratória

PL – pressão transpulmonar

Pmax – pressão máxima inicial

Pmax,rs- pressão máxima do sistema respiratório

Ppl – pressão pleural

Pres,rs – pressão resistiva do sistema respiratório

Ptr – pressão traqueal

Pv – pressão venosa

P,w – pressão transtorácica

R_{aw} – resistência das vias aéreas

R_{eq} – resistência do equipamento

R,L – resistência do pulmão

RNA – ácido ribonucléico

RNA_m- ácido ribonucléico mensageiro

R,rs – resistência do sistema respiratório

RT – transcrição reversa

R_{ti} – resistência tecidual

R,w – resistência da parede torácica

SDRA- síndrome do desconforto respiratório agudo

SDRA_p – síndrome do desconforto respiratório agudo de etiologia pulmonar

SDRA_{ep} – síndrome do desconforto respiratório agudo de etiologia extra-pulmonar

TGF- β - fator de crescimento de transformação

TNF- α - fator de Necrose Tumoral α

V – volume

V' – fluxo

V-P – volume-pressão

V_T – volume corrente

TAE – tris acetato de EDTA

$\Delta E,L$ – variação de elastância dos pulmões

$\Delta E,rs$ – variação de elastância do sistema respiratório

$\Delta E,w$ – variação de elastância da parede torácica

$\Delta P_{tot,L}$ – variação de pressão total dos pulmões

$\Delta P_{1,L}$ – variação de pressão necessária para vencer o componente viscoso pulmonar

$\Delta P_{2,L}$ – variação de pressão necessária para vencer o componente viscoelástico e/ou inhomogêneo dos pulmões

$\Delta P_{tot,rs}$ – variação de pressão total do sistema respiratório

$\Delta P_{1,rs}$ – variação de pressão necessária para vencer o componente viscoso do sistema respiratório

$\Delta P_{2,rs}$ – variação de pressão necessária para vencer o componente viscoelástico e/ou inhomogêneo do sistema respiratório

$\Delta P_{tot,w}$ – variação de pressão total da parede torácica

$\Delta P_{1,w}$ – variação de pressão necessária para vencer o componente viscoso da parede torácica

$\Delta P_{2,w}$ – variação de pressão necessária para vencer o componente viscoelástico e/ou inhomogêneo da parede torácica

ΔV – volume gasoso mobilizado

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios clínicos de definição da lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).....;	6
Tabela 2 - Características temporais do dano alveolar difuso.....	12
Tabela 3 - Volume corrente e fluxo aéreo em camundongos controle e com lesão pulmonar aguda ventilados mecanicamente.....	73
Tabela 4 - Elastâncias estática e dinâmica e variação de elastâncias dos pulmões em camundongos controle e com lesão pulmonar aguda.....	74
Tabela 5 - Variações de pressões dos pulmões em camundongos controle e com lesão pulmonar aguda.....	75
Tabela 6 - Fração de área de alvéolos normais e colapsados nos grupos Controle e com Lesão Pulmonar Aguda nos diferentes tempos.....	80
Tabela 7 - Quantificação de colágeno por comprimento de septo ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) em camundongos Controle e com Lesão Pulmonar Aguda.....	84
Tabela 8 - Volume corrente e fluxo aéreo em camundongos controle e com lesão pulmonar aguda tratados com salina ou células mononucleares de medula óssea.....	86

Tabela 9- Elastâncias estática, dinâmica e variação de elastâncias em camundongos controle e com lesão pulmonar aguda tratados com salina ou células mononucleares de medula óssea.....	87
Tabela 10- Variações de pressões dos pulmões em camundongos controle e com lesão pulmonar aguda tratados com salina ou células mononucleares de medula óssea.....	88
Tabela 11- Fração de área de alvéolos normais e colapsados em camundongos controle (C) e com lesão pulmonar aguda (LPA) tratados com salina ou células mononucleares da medula óssea.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação de divisão das células-tronco. Células-tronco embrionárias (CE).....	23
Figura 2 – Representação tradicional da trajetória de renovação celular em tecidos adultos.....	24
Figura 3 – Determinação da linhagem celular durante a embriogênese e geração das células-tronco embrionárias pluripotentes.....	26
Figura 4 – Determinação da linhagem celular a partir de meios de cultura e geração das células-tronco embrionárias pluripotentes	28
Figura 5 - Plasticidade das células-tronco adultas.....	30
Figura 6 – Diferenciação de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais...	33
Figura 7 – Escala temporal dos procedimentos do experimento na indução da LPA e análise da mecânica e histologia pulmonares, quantificação de fibras colágenas.....	51
Figura 8 – Representação esquemática e análise temporal dos grupos experimentais que serão submetidos à injeção de células mononucleares de medula óssea.....	53

Figura 9 - Representação esquemática dos registros dos sinais de fluxo, volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo, obtidos a partir da oclusão ao final da inspiração.....	61
Figura 10 - Montagem experimental.....	64
Figura 11 - Retículo de 100 pontos e 50 linhas utilizado para estudo da morfometria pulmonar.....	67
Figura 12 – Elastância estática pulmonar (Est,L) dos grupos: C (animais que receberam salina intraperitonealmente) e LPA (camundongos que receberam paraquat, 10 mg/kg i.p.)	76
Figura 13 – Variação de pressão resistiva pulmonar ($\Delta P1,L$) dos grupos: C (animais que receberam salina intraperitonealmente) e LPA (camundongos que receberam paraquat, 10 mg/kg i.p.).....	77
Figura 14 – Variação de pressão viscoelástica pulmonar ($\Delta P2,L$) dos grupos: C (animais que receberam salina intraperitonealmente) e LPA (camundongos que receberam paraquat, 10 mg/kg i.p.).....	78
Figura 15 – Fração de alvéolos normais e colapsados nos grupos Controle (C) e com Lesão Pulmonar Aguda (LPA).....	81
Figura 16 – Fotomicrografias de tecido pulmonar nos grupos Controle (C) e com Lesão Pulmonar Aguda (LPA).....	82

Figura 17 - Conteúdo de fibras colágenas por comprimento de septo ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) nos grupos dos grupos: C (animais que receberam salina intraperitonealmente) e LPA (camundongos que receberam paraquat, 10 mg/kg i.p.)	83
Figura 18 –Elastância estática pulmonar (Est,L) dos grupos C e LPA tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL).....	89
Figura 19 - Variação de pressão pulmonar necessária para vencer os componentes resistivos do pulmão ($\Delta\text{P1,L}$) dos grupos C e LPA tratados com salina (SAL) ou células mononucleares derivadas de medula óssea (CEL).....	90
Figura 20 – Variação de pressão pulmonar necessária para vencer o componente viscoelásticos/inomogêneo ($\Delta\text{P2,L}$) dos grupos C e LPA tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL).....	91
Figura 21 – Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar dos grupos C e LPA tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL).....	94
Figura 22 – Fotomicrografias eletrônicas representativas do parênquima pulmonar dos grupos C e LPA tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL).....	96
Figura 23 - Quantificação de fibras colágenas dos grupos C e LPA tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL).....	98

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Fórmulas utilizadas para medida de mecânica pulmonar.....	62
---	-----------

SUMÁRIO

Capa.....	i
Folha de aprovação.....	ii
Ficha catalográfica.....	iii
Agências financiadoras.....	iv
Dedicatória.....	vi
Agradecimentos.....	vii
Resumo em português.....	xi
Resumo em inglês.....	xii
Índice de abreviaturas, símbolos e fórmulas.....	xiii
Índice de tabelas.....	xvii
Índice de figuras.....	xix
Índice de quadros.....	xxii
Sumário.....	xvii
I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Características gerais.....	2
I.1.a.Noções básicas.....	2
I.2. Síndrome do desconforto respiratório agudo.....	5
I.2.a. Patogênese da lesão pulmonar.....	8
I.2.b.Organização da matriz extracelular e remodelamento.....	13
I.2.c. Remodelamento tecidual.....	18
I.3. Células tronco.....	21
I.3.a. Conceito.....	21
I.3.b. Classificação.....	24

I.3.c. Células tronco embrionárias.....	26
I.3.d. Células tronco adultas.....	28
I.3.e. Células tronco derivadas de medula óssea.....	31
I.3.e.1. Células tronco hematopoiéticas.....	31
I.3.e.2. Células tronco mesenquimais.....	32
I.4. Células tronco e tecido pulmonar.....	34
I.5. Mecanismos e processos de quimioatração e diferenciação celulares.....	41
I.5.a. Mobilização celular por quimioatração.....	41
I.5.b. Mecanismos de plasticidade celular.....	41
I.5.c. Ação parácrina.....	43
II. JUSTIFICATIVA.....	45
III. OBJETIVOS.....	48
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
IV.1. Animais utilizados.....	50
IV.2. Desenho e caracterização dos grupos experimentais.....	50
IV.2.a. Indução da lesão pulmonar aguda.....	50
IV.2.b. Tratamento com células mononucleares derivadas de medula óssea.....	51
IV.3. Isolamento de células mononucleares derivadas de medula óssea.....	54
IV.3.a. Extração e purificação das células.....	54
IV.3.b. Contagem das células.....	55
IV.3.c. Injeção das células.....	55
IV.4. Protocolo experimental.....	56
IV.5 Método de medida da mecânica respiratória.....	59
IV.6. Estudo da histologia e morfometria pulmonares.....	66
IV.6.a. Microscopia óptica.....	66

IV.6.b. Microscopia eletrônica de transmissão.....	68	
IV.7. Análise estatística.....	70	
V. RESULTADOS.....	72	
V.1. Modelo de lesão pulmonar aguda.....	72	
V.1.a. Mecânica pulmonar.....	72	
V.1.b. Microscopia óptica.....	79	
V.1.b.1. Análise morfométrica.....	79	
V.1.c. Quantificação das fibras colágenas.....	83	
V.2. Tratamento com Células Mononucleares de Medula Óssea	85	
V.2.a. Mecânica pulmonar.....	85	
V.2.b. Microscopia óptica.....	92	
V.2.b.1. Análise morfométrica.....	92	
V.2.b.2. Microscopia eletrônica.....	95	
V.2.b.3. Quantificação de fibras colágenas.....	97	
VI. DISCUSSÃO.....	100	75
V.I.a. Modelo experimental de lesão pulmonar aguda.....	100	
V.I.b. Tratamento com células mononucleares de medula óssea.....	106	
VII. CONCLUSÕES	114	
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116	

Introdução

I. INTRODUÇÃO

I.1. Características Gerais

I.1.a. Noções Básicas

A função básica do sistema respiratório é suprir o organismo com oxigênio (O_2) e dele remover o produto gasoso do metabolismo celular, isto é, o dióxido de carbono (CO_2). Esta função é executada de forma adequada quando existe um estreito contato entre o gás alveolar e o capilar pulmonar. Nos seres humanos, a superfície encarregada das trocas gasosas é de 70 a 100 m^2 (WEST, 1995). Esta enorme superfície fica contida no interior do tórax, distribuída por aproximadamente 300 milhões de alvéolos pulmonares. Para que as trocas gasosas entre o gás alveolar e o sangue se efetuem adequadamente, a circulação pulmonar é muito rica, sendo de apenas 0,5 micrômetro a espessura entre o tecido que separa o gás alveolar do sangue. Essa estrutura extremamente adaptada é denominada membrana alvéolo-capilar (WEST e MATHIEU-COSTELLO, 1999).

A membrana alvéolo-capilar pode ser representada por duas estruturas histológicas distintas: uma camada endotelial vascular separada do epitélio alveolar por um espaço intersticial extremamente fino onde se depositam os componentes da matriz extracelular (WARE, 2000). A barreira epitelial é formada por dois tipos celulares denominados pneumócitos tipo I e II. Os pneumócitos tipo I são células achatadas, extremamente finas, que totalizam aproximadamente 90% do epitélio alveolar e estão facilmente sujeitos à lesão. Os pneumócitos tipo II, mais resistentes, são células cuboidais com microvilos na superfície apical que compõem os 10% restantes do epitélio alveolar. Essas células são especializadas na síntese e secreção do surfactante alveolar, uma

substância tenso-ativa que é armazenada nos corpos lamelares e tem a função de manter os alvéolos abertos. Outras funções têm sido atribuídas aos pneumócitos tipo II como participação no transporte de íons e proliferação e diferenciação em pneumócitos I após sofrerem lesão (GEISER, 2003). A interação entre esses dois tipos celulares constitui a principal barreira de restrição à passagem de fluidos (água e íons) para o interior do espaço alveolar. A perda da integridade da barreira epitelial alveolar é um fator determinante para o aumento da permeabilidade acarretando influxo de exudato que, em última análise, contribuirá para a redução da troca gasosa (CARDEN e COLS., 1998). As células epiteliais também produzem mediadores inflamatórios (citocinas) em resposta a diversos estímulos como lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* e/ou estiramento pulmonar (SLUTSKY, 1998).

A barreira vascular é constituída por células endoteliais achatadas que são mais permeáveis à passagem de proteínas e fluidos do que o epitélio alveolar. A passagem de fluidos e solutos (proteínas e íons) pelo endotélio vascular ocorre através das junções célula-célula (ALLPORT e COLS., 1997; BURNS e COLS., 1997). Entre os componentes estruturais das junções célula-célula podemos destacar a ocludina, presente nas junções *tight* (FURUSE e COLS., 1993) e a caderina que constitui as junções aderentes (LAMPUGNANI e COLS., 1992). MacGregor e colaboradores encontraram fragmentos solúveis de caderina no soro de indivíduos com lesão pulmonar, evidenciando a atividade proteolítica da célula endotelial e conseqüente rompimento da membrana e da junção celular (MACGREGOR e COLS., 1997). As células endoteliais vasculares apresentam ainda, moléculas de adesão em sua

superfície que possibilitam a interação com outros tipos celulares como, por exemplo, os neutrófilos. Algumas dessas moléculas de adesão encontram-se expressas constitutivamente e podem ter sua expressão aumentada, como por exemplo, a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), membro da superfamília das imunoglobulinas que medeia a interação dos neutrófilos com a célula endotelial. A ICAM-1 ainda facilita o rolamento, adesão e migração dos leucócitos através do endotélio e contribui para alterar a função de barreira alvéolo-capilar. Entretanto, outras moléculas de adesão passam a ser expressas (selectina-P e a selectina-E) ou aumentam sua expressão (ICAM-1) na superfície da célula endotelial a partir de um estímulo, que pode ser desde a liberação de citocinas (IL-1 e TNF- α) até a exposição à LPS de *Escherichia coli* (WORTHEN e COLS., 1992; MEDURI e COLS., 1995; MOSS e COLS., 1996; ARMSTRONG e COLS., 2000). Sabe-se que a interação endotélio-neutrófilo depende de ICAM-1 e promove a degranulação neutrofílica contribuindo para o rompimento tanto da barreira endotelial como da epitelial subjacente (SHANLEY e COLS., 1995; AGOURIDAKIS e COLS., 2002; MARTIN, 2002).

O espaço intercelular compreendido entre as barreiras endotelial vascular e epitelial alveolar é preenchido pela matriz extracelular (MEC). A MEC pode ser definida como uma rede de macromoléculas sintetizadas e secretadas localmente por células do tecido conjuntivo. Sua principal função consiste em fornecer suporte e manutenção estrutural ao tecido (RAGHOW, 1994). Ademais, a MEC é capaz de influenciar processos biológicos como morfogênese, migração e diferenciação celulares. Sua composição está relacionada ao tipo celular que a sintetiza, ao estado metabólico e de diferenciação. As macromoléculas que compreendem a matriz extracelular

podem ser agrupadas em três classes funcionais: (1) proteínas fibrosas como o colágeno e a elastina, (2) proteínas estruturais como a fibronectina e a laminina e (3) proteoglicanos. Essas macromoléculas encontram-se distribuídas num gel polissacarídico hidratado contendo diversos glicosaminoglicanos, inclusive o ácido hialurônico (PARK e COLS., 2001 SOUZA e COLS., 2006, PELOSI e COLS., 2007, PELOSI e ROCCO, 2008). Cada componente da matriz está perfeitamente organizado para as necessidades individuais das células num determinado órgão, permitindo a manutenção da homeostase, a diferenciação de cada estágio do desenvolvimento e adaptações frente a novos estímulos.

I.2. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

A primeira descrição da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) foi publicada em 1967 por Ashbaugh e colaboradores, ao identificarem pacientes ventilados mecanicamente que evoluíam com dispnéia grave, taquipnéia, cianose refratária a oxigenioterapia, diminuição da complacência pulmonar e evidência de infiltrados difusos na radiografia de tórax. Desde então, a SDRA tem recebido especial atenção na medicina intensiva e na comunidade científica. Em 1994, a SDRA foi definida como um processo inflamatório de instalação aguda, que pode persistir por semanas, associado a determinados fatores de risco e lesão da membrana alvéolo-capilar com conseqüente alteração de sua permeabilidade (BERNARD e COLS., 1994). Em conseqüência, ocorre a formação de edema pulmonar que independe da elevação da pressão hidrostática (pressão capilar pulmonar < 18 mmHg ou ausência clínica de hipertensão atrial esquerda). Essas alterações resultam na diminuição da complacência estática do sistema respiratório e aumento do

shunt pulmonar, caracterizado pela existência de regiões pulmonares perfundidas, mas não ventiladas, o que explica a persistência da hipoxemia mesmo após a instituição da oxigenioterapia.

Os achados fisiopatológicos mais relevantes encontrados na SDRA são: dano alveolar difuso (DAD), redução da complacência estática do sistema respiratório, aumento da resistência das vias aéreas e do trabalho respiratório e hipoxemia refratária a oxigenioterapia evidenciada por uma relação entre pressão parcial arterial de oxigênio (PaO_2)/fração inspirada de oxigênio (FiO_2) \leq 200 caracterizando a SDRA ou $PaO_2/FiO_2 \leq 300$ caracterizando a lesão pulmonar aguda (LPA). Logo, a principal diferença entre SDRA e LPA está relacionada ao grau de comprometimento da troca gasosa (Tabela 1). Assim, a SDRA se caracteriza por uma lesão mais intensa, com maior repercussão funcional. As alterações da estrutura e função se instalam progressivamente e são responsáveis pela alta mortalidade do quadro, chegando a 50% em alguns centros de terapia intensiva (SUCHYTA e COLS., 1992; 1997; DOYLE e COLS. 1995; ZILBERBERG e COLS. 1998; KALLET, 2004; CRIMI e SLUTSKY, 2004; RUBENFELD e COLS., 2005; MATTHAY e COLS., 2008).

	Início	Oxigenação	Radiografia de tórax	Pressão capilar pulmonar
<i>LPA</i>	Agudo	$PaO_2/FiO_2 < 300$	Infiltrado bilateral	< 18 mmHg
SDRA	Agudo	$PaO_2/FiO_2 < 200$	Infiltrado bilateral	< 18 mmHg

Tabela 1. Critérios clínicos de definição da lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). Adaptada de BERNARD e COLS., 1994.

A etiologia da SDRA é multifatorial e está relacionada com agentes que causam injúria direta ao epitélio pulmonar (origem pulmonar – SDRAp) ou indireta (origem extrapulmonar – SDRExp) quando o endotélio vascular é o sítio inicial da lesão (ROCCO e PELOSI, 2008). Os fatores de risco associados à lesão direta são: pneumonia, aspiração de conteúdo gástrico, embolia gordurosa, afogamento, inalação de gases tóxicos e edema pulmonar por reperfusão após transplante pulmonar. Dentre as causas de origem indireta, pode-se citar: sepse, trauma grave com choque, *bypass* cardiopulmonar, intoxicação por drogas, pancreatite aguda e transfusão de produtos do sangue (BERNARD e COLS., 1994; WARE e MATTHAY, 2000).

Vários modelos experimentais têm examinado a resposta inflamatória na SDRA iniciada por infecção, trauma, queimadura e hemorragia (BONE e COLS., 1997). Estes estudos têm demonstrado a complexidade e multiplicidade das vias envolvidas neste processo fisiopatológico, indicando que diferenças na lesão inicial associada a outras condições subjacentes podem resultar na ativação de diferentes mecanismos inflamatórios. Apesar das várias causas da SDRA resultarem em alterações patológicas uniformes tardiamente (BLAISDELL, 1974; NASH e FOLEY, 1974; LAMY e COLS., 1976; BACHOFEN e WEIBEL, 1977), as evidências têm indicado que a fisiopatologia na fase precoce da SDRA pode diferir de acordo com o tipo de insulto primário (LAMY e COLS., 1976; TERESHIMA e COLS., 1996; GATTINONI e COLS., 1998; ROCCO e ZIN, 2005; ROCCO e PELOSI, 2008).

I.2.a. Patogênese da Lesão Pulmonar

A SDRA pulmonar é caracterizada por lesão direta ao epitélio alveolar. A intensidade da lesão epitelial interfere na gravidade e prognóstico da SDRA (WIERNER-KRONISH e COLS., 1991; PITTET e COLS., 1997; MATTHAY e WIERNER-KRONISH, 1990). A perda da integridade epitelial na SDRA acarreta edema alveolar em função dos seguintes fatores: (1) a barreira epitelial é menos permeável que a endotelial (WIERNER-KRONISH e COLS., 1991); logo, a lesão epitelial contribui significativamente na formação de edema alveolar; (2) lesão dos pneumócitos tipo II interrompe o transporte normal de fluidos, dificultando a remoção de exudato do espaço alveolar (SZNAJDER, 1999), bem como reduz a produção e o *turnover* de surfactante, contribuindo para perpetuação do edema (GREENE e COLS., 1999). Desta forma, na SDRA pulmonar há um predomínio de consolidação alveolar, com preenchimento do espaço alveolar por células inflamatórias, restos celulares, fibrina, colágeno e edema. Em contrapartida, na SDRA extrapulmonar, o sítio inicial de lesão é o endotélio vascular que sofre ação dos mediadores inflamatórios liberados por vários tipos celulares incluindo neutrófilos, macrófagos, monócitos e plaquetas na circulação sistêmica. A liberação destes mediadores promove a resposta inflamatória e dá início à disfunção da célula endotelial pulmonar, com aumento de permeabilidade. O aumento da permeabilidade desta barreira acarreta a formação de edema intersticial, com aumento do “peso” pulmonar e conseqüente colapso do espaço alveolar. Entretanto, vale ressaltar que podem coexistir as características morfológicas dos dois tipos de SDRA (ROCCO e ZIN, 2005; ROCCO e PELOSI 2008).

A característica morfológica pulmonar mais relevante encontrada na lesão pulmonar aguda (LPA) é o dano alveolar difuso, que se desenvolve temporal e progressivamente após a lesão inicial. As características morfológicas do DAD presente na LPA são didaticamente divididas em três fases que se encontram correlacionadas e sobrepostas de acordo com a evolução clínica da doença: fase inicial exudativa (aguda), seguida da fase proliferativa e, finalmente, a fase tardia denominada fase fibrótica (INGBAR, 2000; TOMASHEFSKI, 2000) (Tabela 2).

A fase aguda ou exudativa se caracteriza por uma resposta inflamatória aguda com lesão das células epiteliais alveolares e endoteliais, promovendo aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar com conseqüente extravasamento de água, proteínas, hemácias e células inflamatórias para o interstício e luz alveolar, necrose dos pneumócitos tipos I e II e desnaturação do surfactante alveolar com conseqüente formação de edema alveolar (WARE e MATTHAY, 2000). Essas alterações são induzidas por uma interação complexa de mediadores através da ativação de macrófagos e neutrófilos que liberam mediadores pró- e anti-inflamatórios na circulação causando lesão direta à microcirculação pulmonar (WALLACE e DONNELLY, 2002). As primeiras alterações microscópicas observadas são congestão capilar, edemas intersticial e alveolar, bem como hemorragia alveolar (TOMASHEFSKI, 2000). Outra característica proeminente deste período é a formação de uma membrana hialina eosinofílica a partir de proteínas plasmáticas condensadas. A membrana hialina está localizada muito próxima ao ducto alveolar e após a lesão da membrana alvéolo-capilar, migra para o espaço alveolar, juntando-se aos restos (*debris*) celulares. A membrana hialina também é composta por

imunoglobulinas, fibrinogênio, surfactante e proteínas do complemento. A fibronectina pode ser encontrada recobrando minimamente a superfície da membrana basal. Com a destruição e necrose extensa dos pneumócitos tipo I, a membrana alvéolo-capilar torna-se “desnuda” e predisposta à adesão em sua superfície de membrana hialina, fibrina e *debris* celulares (NASH e COLS., 1974; BACHOFEN e WEIBEL, 1977; ALBERTINI, 1985; TOMASHEFSKI, 2000).

A fase proliferativa é o período de organização do exudato alveolar e intersticial (FUKUDA e COLS., 1987; FEIN e CALALANG-COLUCCI, 2000; ROCCO e COLS., 2004; SANTOS e COLS., 2006). Há a proliferação dos pneumócitos II através do septo alveolar para cobrir a região “desnuda” da membrana basal. Os pneumócitos tipo II também podem se diferenciar em pneumócitos tipo I para reconstruir a membrana alvéolo-capilar e dar continuidade ao processo de regeneração da barreira alvéolo-capilar (ADAMSON e BOWDEN, 1974). Os fibroblastos e os miofibroblastos proliferam e migram através dos hiatos existentes na membrana alvéolo-capilar para o interior dos alvéolos e convertem o exsudato intra-alveolar em tecido de granulação através da deposição de colágeno. A deposição de colágeno tem seu aspecto primordial para o início do remodelamento fibroso e de outros elementos da matriz extracelular. A partir de então, um tecido fibroso e denso é formado e conseqüentemente o septo alveolar se torna espessado (WALLACE e DONNELLY, 2002). Com a evolução da lesão pulmonar é observado um aumento gradual do tecido intersticial (FUKUDA e COLS., 1987). Portanto, ocorre o espessamento gradual do septo alveolar com a evolução temporal da LPA (WALLACE E DONNELLY, 2002; MENDEZ E HUBMAYR, 2005). Em

alguns pacientes, esse processo pode progredir para a irreversível fase fibrótica (FEIN E CALANG-COLUCCI, 2000; SOUZA e COLS., 2003). Nesse momento, os alvéolos encontram-se obliterados e apresentam fibrose em seu interior. A irregularidade na espessura da parede alveolar está associada à dilatação e ao estreitamento dos espaços aéreos, além do recém formado epitélio cuboidal escamoso estratificado. A organização do exudato intra-alveolar ocorre espontaneamente através da deposição de fibrinogênio nas áreas de membrana hialina, de fibronectina na região de fibrose intra-alveolar e de queratina no epitélio alveolar, nas glândulas brônquicas e no mesotélio (ZAPOL e COLS., 1979; FUKUDA e COLS., 1987). A organização do exudato e do colapso alveolar são os principais mecanismos responsáveis pelo remodelamento da arquitetura alveolar e pelo desenvolvimento de fibrose após a lesão pulmonar aguda (MEDURI e COLS., 1991). O processo fibrótico resulta de uma interação complexa entre fibroblastos e macrófagos. Os fibroblastos migram para regiões lesionadas e são estimulados a produzir e secretar colágeno e outras proteínas da matriz extracelular. Estas células secretam ainda inúmeras proteases, que são capazes de degradar e remodelar as próprias proteínas da matriz extracelular. O estímulo que torna os fibroblastos propícios a remodelar os pulmões pode incluir desde constituintes do sangue como a fibrina, produtos de degradação da matriz extracelular até mediadores como o TGF- β (fator transformador de crescimento- β), que são liberados por macrófagos e outras células do parênquima pulmonar (WARD e HUNNINGHAKE, 1998). A fibrose intra-alveolar é mais importante que a fibrose intersticial na estrutura do remodelamento pulmonar, porque ela resulta em

obliteração alveolar, coalescência da parede alveolar e perda funcional das unidades alvéolo-capilares (FUKUDA e COLS., 1987).

É importante ressaltar que, a qualquer momento, as características destas três fases podem se sobrepor, sendo a evolução da doença individual. Logo, nem todos os pacientes evoluem com fibrose e a progressão da SDRA pode ocorrer de uma maneira heterogênea no tempo e no espaço (diferentes regiões do pulmão) (INGBAR, 2000). Ademais, recentemente, alguns autores descreveram a fase proliferativa como uma resposta precoce à lesão pulmonar. Portanto, pode-se dizer que o processo inflamatório e os mecanismos de remodelamento se iniciam em paralelo, não em série como previamente descrito (CHESNUTT e COLS., 1997; ARMSTRONG e COLS., 1999; MARSHALL e COLS., 2000; TOMASHEFSKI, 2000; ROCCO e COLS., 2001, 2003 e 2004; SANTOS e COLS., 2006).

Tabela 2. Características temporais do dano alveolar difuso. Adaptada de Tomashefski, 2000.

Aguda (Exudativa)	Proliferativa	Fibrótica
1- 7 dias	7-21 dias	> 21 dias
Edemas alveolar e intersticial	Miofibroblastos intersticiais	Fibrose com deposição de colágeno
Hemorragia	Organização de fibrose intra-alveolar	Obliteração alveolar
Necrose do pneumócito tipo I	Inflamação crônica	Hipertrofia do septo alveolar
Necrose de células endoteliais	Necrose do parênquima	Tortuosidade arterial
Membrana hialina	Hiperplasia dos pneumócitos tipo II	Fibrose intersticial e intra-alveolar

I.2.b. Organização da Matriz Extracelular (MEC) e Remodelamento Pulmonar

No pulmão normal, os fibroblastos são as principais células responsáveis pela secreção de proteínas da matriz extracelular (LAURENT e COLS., 2008). Esse mecanismo ocorre localmente já que estas células encontram-se organizadas em rede através dos espaços intersticiais. A morfologia de cada célula diferenciada é um reflexo da interação célula-matriz extracelular, sendo que uma série de informações podem ser transmitidas para o citoesqueleto através de interações específicas com receptores de superfície celular (ALBERTS e COLS., 1994, PELOSI e ROCCO, 2008). Os efeitos deletérios das células inflamatórias na matriz extracelular parecem ser o principal fator responsável por estas lesões, liberando além de enzimas proteolíticas, agentes oxidativos para o espaço intersticial. As proteases, elastases, collagenases e ativadores de plasminogênio participam ativamente do processo de degradação da matriz extracelular (GOLDSTEIN, 1991; ALBERTS e COLS, 1994; COTRAN e COLS., 1999; PARK e COLS, 2001; CHEN e COLS, 2001; TAsAKA e COLS., 2002).

Três grupos de macromoléculas estão intimamente associados para formar a matriz extracelular: (1) proteínas estruturais como fibras colágenas e elásticas, (2) glicoproteínas, incluindo a fibronectina e a laminina e (3) proteoglicanos, estando dispostas em duas porções no tecido: matriz intersticial e membrana basal (PARK e COLS., 2001; PELOSI E COLS., 2007).

As fibras colágenas são os principais componentes da matriz extracelular. Apesar de particularidades funcionais e estruturais, os diversos tipos de colágeno têm estrutura química e organizacional semelhantes. A

molécula de colágeno resulta da associação de três cadeias alfa polipeptídicas em tripla hélice formando homo ou heterotrímeros. As diferentes cadeias são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso do fibroblasto, principal célula produtora de colágeno nos pulmões, sob a forma de um polipeptídeo conhecido como pró-colágeno. Estas moléculas se associam de modo complexo, constituindo fibrilas e fibras. As diferenças nos tipos de colágeno residem na composição primária de suas moléculas, no tipo de agregação extracelular e na capacidade de formarem ou não estruturas fibrilares. Dependendo dos tipos de cadeias alfa que os compõem, os colágenos são designados como I, II e III que são fibrilares e os tipos IV, V e VI que são amorfas. O colágeno tipo III forma fibrilas que corresponde às fibras reticulares e, quase sempre, aparece co-distribuído com o colágeno tipo I, presente em tecidos que necessitam de um arcabouço estrutural maleável, como os pulmões (PELOSI e COLS., 2007). No pulmão sadio o *turnover* de colágeno e elastina são fundamentais para a manutenção da arquitetura do tecido, ocorrendo lentamente ao longo da vida do indivíduo (ARMSTRONG e COLS., 1999). Entretanto, após um insulto inicial do tecido pulmonar, se inicia um intenso processo de reparo e remodelamento da matriz extracelular. O colágeno tipo I é a proteína estrutural mais encontrada no interstício pulmonar, produzida em grandes quantidades durante o desenvolvimento e nas reações fibróticas. A fibrogênese ocorre bem precoce na evolução da lesão pulmonar aguda e níveis elevados de pró-colágenos I e III (moléculas precursoras) são encontrados no plasma e no fluido do lavado bronco-alveolar (BAL) no primeiro dia de lesão, indicando que a síntese do colágeno é um evento precoce na resposta à lesão (BAUGHMAN e COLS., 1996; PARK e COLS., 2001; CHEN e COLS., 2001; TASAKA e COLS., 2002).

Armstrong e colaboradores demonstraram aumento significativo nos níveis de pró-colágeno I e uma redução dos marcadores de degradação do colágeno no lavado bronco-alveolar de pacientes sob ventilação mecânica por 48 h, sugerindo que ocorre um desequilíbrio entre a síntese do colágeno e sua degradação em pacientes com LPA a favor da deposição de colágeno nos estágios iniciais da LPA (ARMSTRONG e COLS., 1999). A presença de pró-colágeno III (molécula precursora do colágeno III) no fluido do lavado bronco-alveolar de indivíduos com LPA pode ser marcador de extrema utilidade para avaliar a síntese e o *turnover* do colágeno. Clark e colaboradores identificaram pró-colágeno III no BAL de 80% dos pacientes na fase aguda da LPA, correlacionando-o a um pior prognóstico, talvez porque o pró-colágeno III reflita a fibrose pulmonar que se segue no curso da lesão pulmonar aguda (CLARK e COLS., 1995). Chesnutt e colaboradores também encontraram níveis maiores de pró-colágeno III 24 h após a intubação endotraqueal nos pacientes com LPA do que nos pacientes com edema hidrostático. Ademais, este estudo confirma a maior mortalidade nos indivíduos com LPA que apresentavam níveis elevados de colágeno no BAL (CHESNUTT e COLS., 1997). A substituição do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I, que é mais rígido, pode ser responsável por problemas na troca gasosa e por alterações fisiológicas que ocorrem nos estágios tardios da fibrose (ENTZIAN e COLS., 1990).

A quantidade de deposição de colágeno irá depender de diversos fatores como: a extensão da lesão celular submetida ao tecido, a intensidade de proliferação dos fibroblastos e os mediadores presentes na inflamação (STRIETER., 2008). Outros fatores parecem estar também relacionados com a deposição do colágeno incluindo a hipoperfusão vascular e as alterações na

PaO₂ que ocorrem durante a lesão pulmonar. O fator de crescimento transformador-β (TGF-β) e outros peptídeos relacionados à insulina podem induzir o aumento da secreção de colágeno pelos fibroblastos e pelas células musculares lisas, além de indiretamente inibir a produção e a atividade das collagenases (MEDURI, 1999). À medida que ocorre progressão do reparo do tecido, os fibroblastos sintetizam e depositam grandes quantidades de componentes da matriz extracelular. A síntese do colágeno pode ser intensificada por diversos fatores incluindo: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), famílias dos fatores de crescimento (FGF), TGF-β e citocinas (interleucinas 1 e 4) que são secretadas pelos fibroblastos e por neutrófilos. Entretanto, a deposição do colágeno não depende apenas de sua síntese, mas também de todo processo de degradação do mesmo (COTRAN e COLS., 1999). Rocco e colaboradores avaliaram o remodelamento do parênquima pulmonar em diferentes graus de LPA induzida por paraquat. O paraquat (*1,1-dimethyl-4,4 bipyridinium dichloride*) é um herbicida catiônico, não seletivo, muito utilizado nos últimos 40 anos em agricultura. Altamente tóxico quando inalado, moderadamente tóxico quando ingerido por via oral e pouco tóxico quando em contato com a pele; sua administração em doses elevadas causa dano oxidativo aos pulmões, fibrose e falência respiratória (SCHENKER e COLS., 2004). Rocco e colaboradores observaram aumento progressivo das fibras colágenas de acordo com o grau da lesão pulmonar aguda (ROCCO e COLS., 2001).

O sistema elástico é composto por fibras elásticas, elauínicas e oxitalânicas (STARCHER, 2000). As fibras elásticas maduras aparecem como um dos principais constituintes de tecidos conjuntivos que possuem

propriedades elastoméricas (extensibilidade), tais como o pulmão e grandes vasos arteriais. Durante o desenvolvimento de uma fibra elástica, primeiramente surge um simples feixe de microfibrilas seguida da deposição gradual de material amorfo (elastina) entre as microfibrilas, até que as fibras elásticas atinjam a maturação completa. Diversos indícios apontam para o fato de que os três diferentes tipos de fibras do sistema elástico pertencem a uma série contínua, sendo a ordem cronológica caracterizada por: fibras oxitalânicas (apresentam somente as microfibrilas), fibras elaunínicas (com microfibrilas intermediadas por grumos de material amorfo, elastina) e fibras elásticas maduras (constituídas principalmente por elastina) (MECHAM, 1997).

A degradação das fibras da matriz extracelular ocorre devido às necessidades do tecido em ajustar padrões qualitativos e quantitativos para manter uma relação de equilíbrio entre estroma/parênquima (MURPHY e DOCHERTY, 1992). Em determinadas situações o desequilíbrio entre a síntese e a degradação resulta na deposição ou retirada excessivas das macromoléculas que compõem a matrix extracelular. Os fenômenos que envolvem o remodelamento extracelular necessitam de enzimas específicas para iniciar a degradação como as metaloproteases (degradam pelo menos um dos componentes da MEC), sendo que as elastases degradam fibras elásticas e as colagenases degradam o colágeno. A atividade enzimática da matriz extracelular é regulada pelo balanço entre as proteases e seus inibidores específicos, como as α -2 macroglobulinas (que inibem as metaloproteases) e os inibidores das metaloproteases teciduais (TIMP) (SHAPIRO e SENIOR, 1999). A perda do equilíbrio entre a expressão das proteases e seus inibidores irá acarretar degradação tecidual (ex.:doenças inflamatórias). O

restabelecimento funcional de um tecido conjuntivo funcional torna-se o principal objetivo no processo de reparo que irá ocorrer através da deposição de macromoléculas fibrosas e não fibrosas da matriz extracelular bem como seu remodelamento pelas metaloproteases (PARKS, 2003).

I.2.c. Remodelamento Tecidual

A resposta proliferativa começa imediatamente após o início da lesão, na tentativa de reparar o dano causado à membrana alvéolo-capilar (ROCCO e COLS., 2001; BELLINGAN, 2002; STRIETER, 2008). Por proliferativa, entende-se a resposta estereotipada de ação restauradora do tecido lesionado, caracterizada pela substituição das células epiteliais que sofreram necrose por miofibroblastos e seus produtos de matriz extracelular nos espaços aéreos, interstício, bronquíolos respiratórios e parede vascular da microcirculação intracinar (GALEN e TOEWS, 1999). O recrutamento de células inflamatórias e o extravasamento de plasma para os espaços alveolares alteram o microambiente alveolar, dando início ao processo de remodelamento, que pode progredir até a fibrose ou restaurar arquitetura alveolar (GALEN e TOEWS, 1999). O processo de reparo tem início com a reversão do edema e a remoção de proteínas solúveis e insolúveis que estão presentes nos espaços alveolares e intersticiais. A seguir, se observa a re-epitelização precoce da membrana alvéolo-capilar a partir da proliferação dos pneumócitos tipo II e da neovascularização capilar pulmonar (angiogênese). Ao mesmo tempo, ocorre proliferação de fibroblastos associada à deposição excessiva dos componentes da matriz extracelular que contribuem para a redução da complacência e para a perda da arquitetura alveolar normal (ARTIGAS e COLS., 1998).

O exudato alveolar, contendo fragmentos de fibrina, fibronectina e outros componentes da matriz extracelular forma uma cicatriz tridimensional que mantém a arquitetura alveolar e previne a adesão imediata da membrana basal exposta (desnuda). Esta matriz extracelular tridimensional provisória também permite que possa ocorrer a migração de células inflamatórias, epiteliais, mesenquimais e endoteliais (MATTHAY, 2002). Um importante fator que contribui no remodelamento tecidual é a existência de uma membrana alvéolo-capilar íntegra, porque o reparo do pulmão lesionado envolve interações complexas entre células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, macrófagos alveolares, fatores de coagulação, citocinas e fatores de crescimento (STRIETER, 2008). Além disso, é necessário que o pneumócito tipo II esteja íntegro para que o surfactante seja sintetizado e para que os mecanismos envolvidos na remoção do exudato alveolar continuem em funcionamento. Quando houver integridade do epitélio alveolar e preservação da função epitelial, a remoção do exudato pode ser estimulada mesmo na presença de edema intersticial (BERTHIAUME e COLS., 2001; MATTHAY, 2002). O tipo de célula epitelial que recobre a superfície alveolar irá depender, em parte, da extensão da lesão. Os pneumócitos tipo II podem proliferar e se diferenciar em pneumócitos tipo I nas áreas pulmonares com menor lesão (ADAMSON, 1974; FOLKESSON e COLS., 1998). As células epiteliais influenciam no balanço fibrinolítico dentro dos espaços alveolares através da síntese de uroquinase e da inibição do ativador de plasminogênio. Assim, a persistência de fibrina na fase fibrótica da lesão pulmonar aguda, pode ser, pelo menos em parte, devido a perda de células epiteliais ou alterações nas suas funções fibrinolíticas. O influxo de fatores de coagulação nos alvéolos também contribui para o acúmulo

de fibrina intra-alveolar. A remoção da fibrina intra-alveolar é um passo importante da resolução da lesão pulmonar. Se a fibrina extra-vascular é removida, torna-se possível reconstruir o espaço alveolar normal. Caso isto não ocorra, os fibroblastos migram para a matriz de fibrina e secretam colágeno intersticial formando cicatrizes de fibrose, espessamento da parede dos alvéolos e obliteração alveolar que depende do local e da extensão do exudato residual (Galen e Toews, 1999).

Apesar do melhor entendimento da fisiopatologia da lesão pulmonar aguda (LPA) e da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) nos últimos anos, a maioria das abordagens terapêuticas empregadas nos pacientes com LPA e/ou SDRA tem como objetivo: 1) manter a troca gasosa adequada através de estratégias ventilatórias que diminuam a lesão no parênquima pulmonar provocado pelo estresse elevado (AMATO e COLS., 1998; ARDS NETWORK, 2000), 2) estabelecer o suporte cardiovascular através do controle do volume intravascular e hemodinâmico (SCHULLER e COLS., 1991; TUCHSCHMIDIT e COLS., 1992; YU e COLS., 1993) e 3) assegurar uma nutrição adequada (KROETZ, 1994). Adicionalmente, novas estratégias terapêuticas foram empregadas: corticosteróide (MEDURI e COLS., 1997; STEINBERG E COLS., 2006), anti-proteases (WEISS, 1989), “soro” de citocinas pró-inflamatórias (LANORE e COLS., 1993; FISHER e COLS., 1994; ABRAHAM e COLS., 1995), inibidor de ciclo-oxigenase (BONE e COLS., 1989; AUPT e COLS., 1991; FARMER e COLS., 1991; YU e COLS., 1993) anti-oxidantes (BERNARD e COLS., 1994; SUTTER e COLS., 1994; BERNARD e COLS., 1997), e reposição de surfactante alveolar (MACINTYRE e COLS.,

1994; ANZUETO e COLS., 1996) não mostrando resultados benéficos no que tange a melhora funcional ou a taxa de mortalidade na SDRA.

Entretanto, poucas estratégias de tratamento encontram-se direcionadas para corrigir as alterações determinadas pela fisiopatologia da doença, cujo objetivo seria diminuir a gravidade da lesão inicial através da promoção do reparo das barreiras endotelial e epitelial. Neste sentido, com resultados promissores através da utilização de células-tronco em outros campos da medicina, como a cardiologia (ORLIC e COLS., 2001; JACKSON e COLS., 2001) e neurologia (KOPEN e COLS., 1999; LIU e COLS., 2000; FREED e COLS., 2001), algumas hipóteses começaram a ser analisadas no intuito de avaliar a possibilidade do uso da terapia com células-tronco em animais com lesão pulmonar (aguda ou crônica) (KRAUSE e COLS., 2001; KOTTON e COLS., 2001; GROVE e COLS., 2002; ORTIZ e COLS., 2003; WANG e COLS., 2005). Logo, é fundamental a descoberta de novas alternativas terapêuticas na tentativa de minimizar o processo inflamatório e de fibrogênese relacionados à LPA/SDRA, bem como reduzir a taxa de mortalidade.

I.3. Células-tronco

I.3.a. Conceito

As células-tronco são células indiferenciadas, com capacidade de se auto-replicar (gerar cópias de si mesma) por períodos indefinidos através da vida do organismo. Sob determinadas condições ou a partir de estímulos adequados, as células-tronco (dependendo da sua potencialidade), podem se diferenciar em muitos tipos celulares diferentes que constituem o organismo, até atingir o estágio final de diferenciação (célula madura), com características

e funções especializadas, como por exemplo, células epidérmicas, hepáticas, vasculares, pancreáticas, musculares e nervosas (LOEFFLER e POTTEN, 1997; PITTENGER e COLS. 1999; KOPEN, 1999; KOTTON e COLS. 2001; ALISON e COLS. 2001; JANES e COLS. 2002; MATHUR, 2004). Podem se dividir assimetricamente (modelo aleatório), sendo uma célula-filha semelhante à célula-mãe e outra dando origem a uma linhagem progenitora comprometida (Figuras 1 e 2).

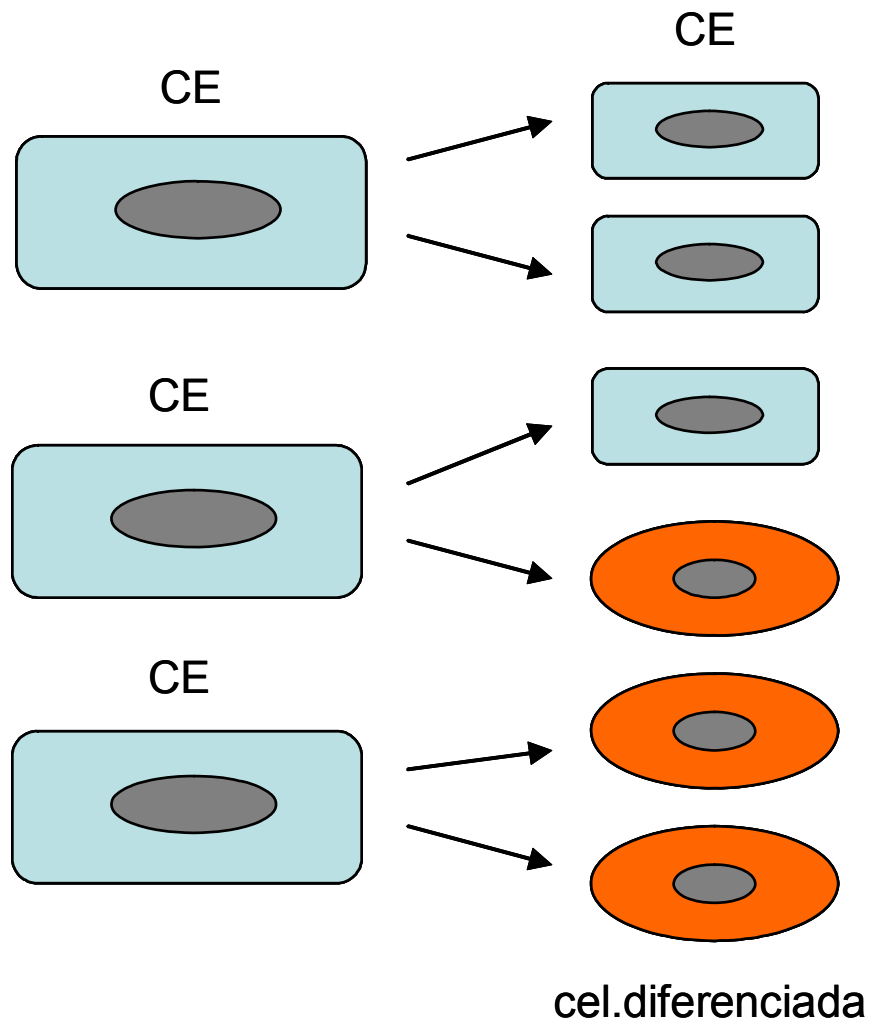
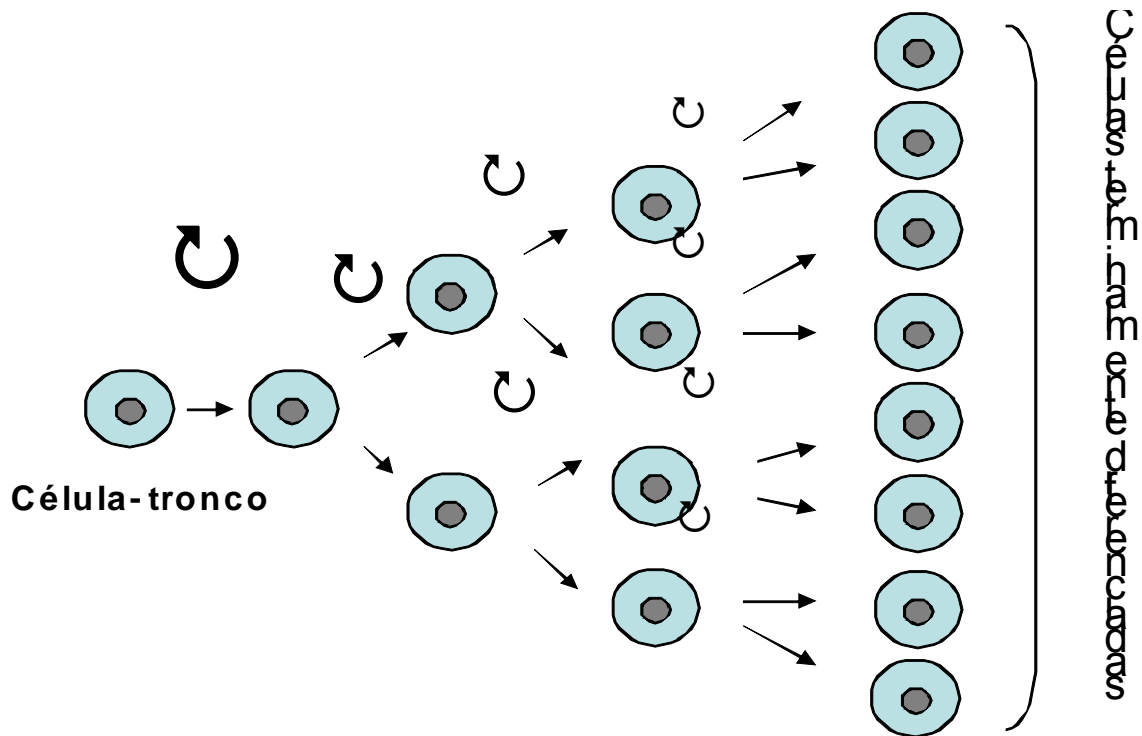


Figura 1. Representação de divisão das células-tronco. Células-tronco embrionárias (CE). Cel. = célula.



Compartimento de amplificação transiente

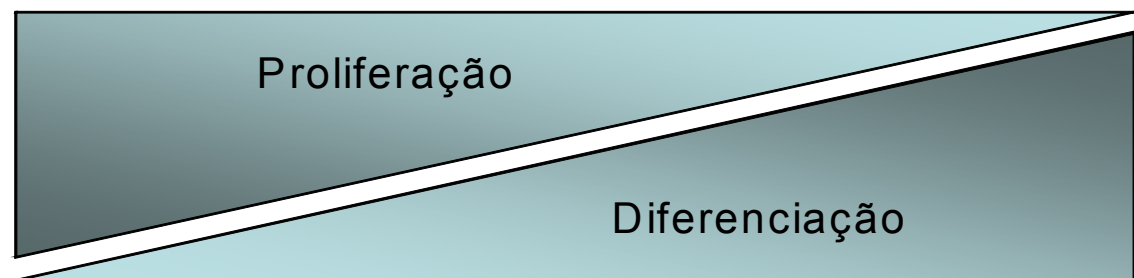


Figura 2. Representação tradicional da trajetória de renovação celular em tecidos adultos. Adaptado de NEURINGER e SCOTT, Respiratory Research, 2004.

I.3.b. Classificação

As células-tronco podem ser classificadas de diferentes formas: anatomicamente, funcionalmente ou através de marcadores de superfície celular, fatores de transcrição e pelas proteínas que elas expressam. Quanto à sua natureza, elas podem ser distinguidas em: células-tronco embrionárias (ESC) e células encontradas no tecido somático adulto, conhecidas como

células-tronco adultas (AS). Para a compreensão mais didática da família de células-tronco, foi criada uma classificação hierárquica quanto ao potencial de diferenciação celular de cada uma, sendo divididas em: 1) células-tronco totipotentes, 2) pluripotentes, 3) multipotentes e 4) unipotenciais.

As células-tronco totipotentes são capazes de formar todos os 216 tipos de células diferenciadas e tecidos do organismo, além de células trofoblásticas, da placenta e cordão umbilical. Possuem a habilidade de permanecerem indiferenciadas e de proliferarem indefinidamente *in vitro*. As células totipotentes são aquelas presentes nas primeiras fases da divisão, quando o embrião tem até 16 - 32 células (até três ou quatro dias de vida). As células-tronco pluripotentes são capazes de se diferenciar em quase todos os tipos celulares exceto placenta e anexos embrionários. Essas células se originam a partir das três camadas germinativas (endoderma, mesoderma e ectoderma) com aproximadamente cinco dias após a fertilização (32 - 64 células), já com embrião implantado. Elas possuem intensa capacidade de replicação. As células-tronco embrionárias formam a camada mais interna do blastocisto e são consideradas pluripotentes (Figura 3). Já as células-tronco multipotentes são capazes de produzir um número limitado de linhagens de células diferenciadas de acordo com sua localização e são encontradas principalmente no tecido adulto. Elas darão origem apenas aos tipos celulares do próprio tecido onde residem (MATHUR, 2004). Entretanto, o uso do termo “multipotencial” pode ser redundante, visto que, algumas células-tronco adultas podem ser locomover do seu local de origem e se diferenciar em células que estejam em outro microambiente. Finalmente, as células-tronco unipotentes possuem menor potencial para diferenciação, ou seja, é a célula-tronco de um

organismo adulto que é capaz de se diferenciar em apenas uma única linhagem celular.

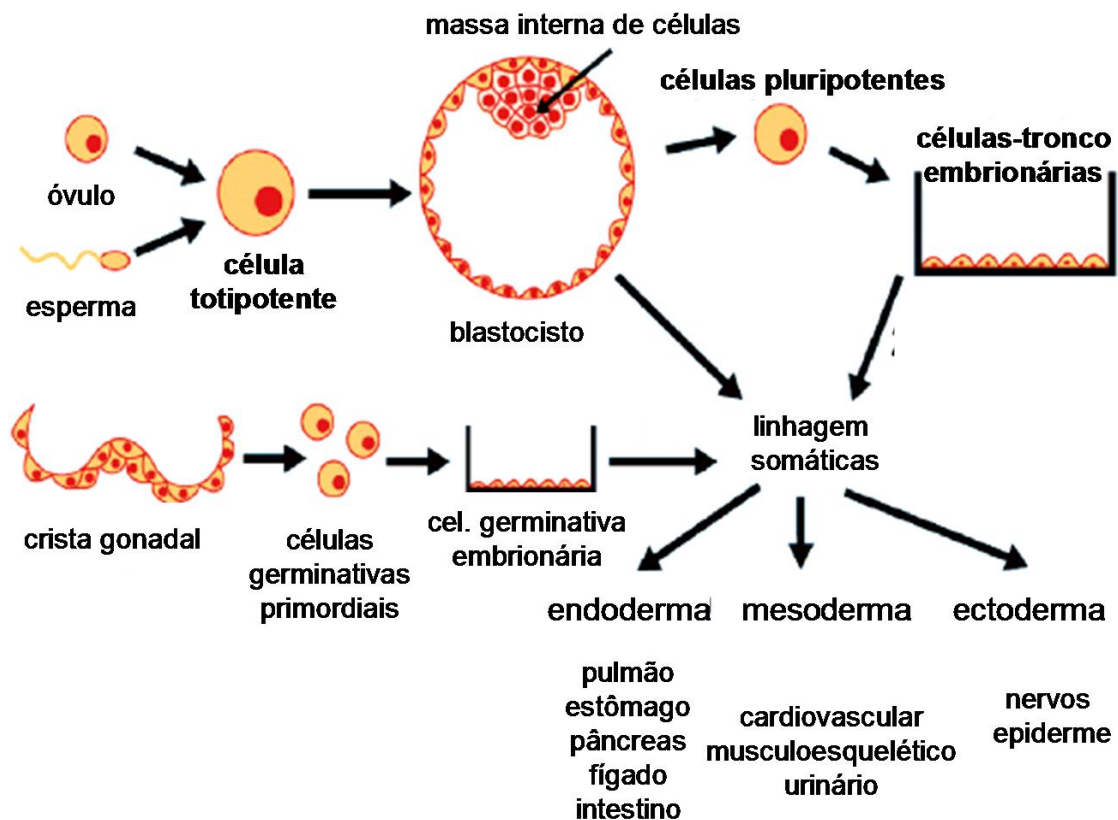


Figura 3. Determinação da linhagem celular durante a embriogênese e geração das células-tronco embrionárias pluripotentes. Adaptado de NEURINGER e RANDELL, Respiratory Research, 2004.

I.3.c. Células-tronco Embrionárias

As células-tronco embrionárias (CE) foram, inicialmente, isoladas em camundongos e, mais recentemente, em humanos (EVANS e KAUFMAN, 1981; THOMPSON e COLS. 1998; REUBINOFF e COLS. 2000). As células-tronco embrionárias são pluripotentes (ou multipotentes) e, portanto, capazes de se diferenciarem em qualquer tipo celular presente no organismo adulto

(MARSHAK COLS. 2001) (Figura 4). Elas podem ser isoladas e colocadas em cultura, onde continuam a se replicar e ainda apresentam potencial para se diferenciar.

As células-tronco embrionárias humanas em seu estágio indiferenciado podem ser identificadas através de marcadores característicos, como por exemplo; antígenos embrionários específicos (SSEA-3 e SSEA-4) e glicoproteínas (TRA-1-60, TRA-1-81). Elas também expressam fosfatase alcalina, possuem atividade de telomerase elevada, bem como apresentam fator de transcrição Oct-4. As células-tronco embrionárias humanas podem ser induzidas ao processo de diferenciação a partir da substituição específica do meio de cultura a que estão submetidas e adicionando fatores de crescimento ao meio de cultura ou alterando a composição química da superfície onde as células estão crescendo (ODORICO e COLS., 2001). As células-tronco embrionárias também podem ser induzidas à diferenciação através da introdução de genes nas células via transfecção.

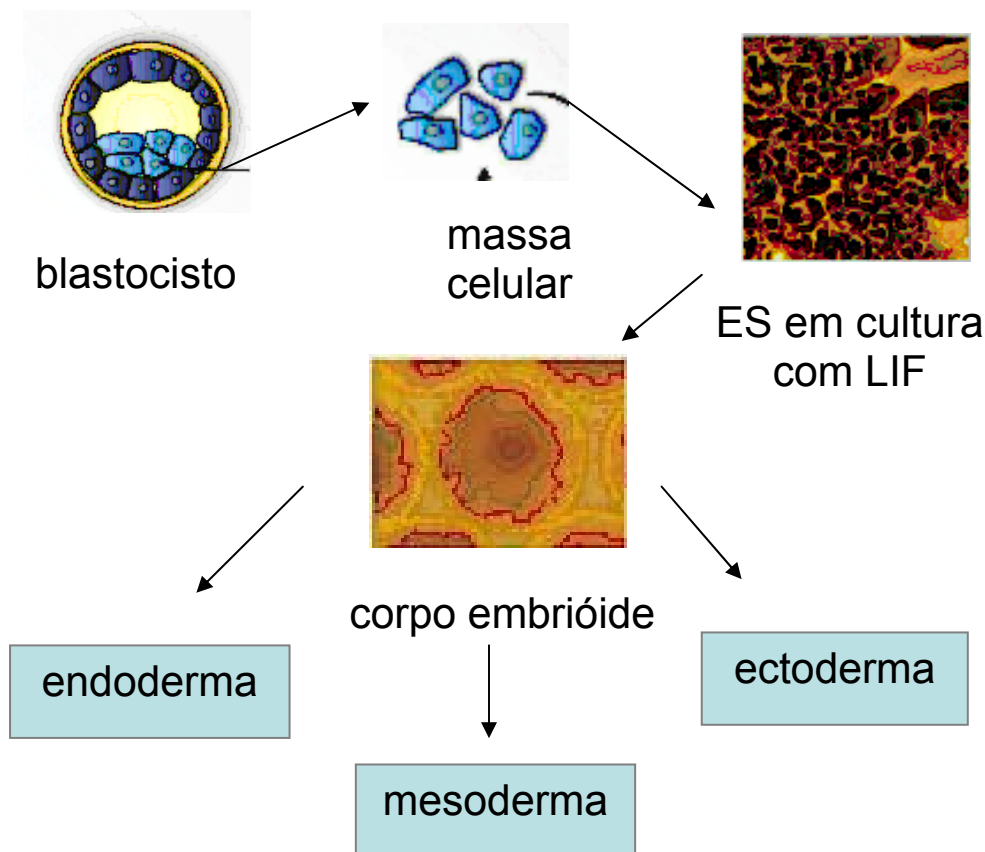


Figura 4. Determinação da linhagem celular a partir de meios de cultura e geração das células-tronco embrionárias pluripotentes. ES – célula-tronco embrionária. LIF – fator de crescimento fibroblástico.

I.3.d. Células-tronco Adultas

As células-tronco adultas, como todas as células-tronco, possuem pelo menos duas características fundamentais. A primeira consiste na capacidade de formar cópias de si próprias (auto-replicar) por períodos prolongados. A segunda característica primordial reside na capacidade de se diferenciar em células maduras que possuem fenótipos morfológicos distintos e funções especializadas. Elas são encontradas em vários tecidos e órgãos onde a necessidade de reposição celular seja própria da homeostasia fisiológica do organismo, como medula óssea, epitélio e paredes intestinais. É relativamente

recente a constatação de que outros tecidos e órgãos humanos como fígado, pâncreas, músculos esqueléticos, tecido adiposo e sistema nervoso, têm um “estoque” de células-tronco residentes e uma capacidade limitada de regeneração após lesões (GRIFFITHS e COLS., 2005). Mais recente ainda, é a idéia de que essas células-tronco adultas não são apenas multipotentes (capazes de gerar os tipos celulares que compõem o tecido ou órgão específico onde estão situadas), mas também pluripotentes (podem gerar células de outros órgãos e tecidos). Os pesquisadores demonstraram que as células-tronco adultas podem exibir plasticidade (POULSON e COLS., 2002).

O termo plasticidade significa a propriedade que a célula-tronco adulta tem em produzir células especializadas que estejam fora de sua linhagem habitual de diferenciação. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que as células-tronco de medula óssea podem se “diferenciar” em células nervosas, do sistema digestivo, fígado, pâncreas, cardíacas e pulmonares (MAKINO e COLS., 1999; PITTENGER e COLS., 1999; ALISON e COLS., 2000; MEZEY e COLS., 2000; KRAUSE e COLS., 2001; POULSON e COLS., 2001; DEB e COLS., 2003; IANUS e COLS., 2003), como demonstrado na Figura 5. A lista de tecidos maduros contendo células-tronco adultas têm crescido progressivamente e inclui medula óssea, cérebro, medula espinhal, polpa dental, vasos sanguíneos, músculo esquelético, epitélio da pele e do sistema digestivo, córnea, retina, fígado, pâncreas e pulmões. Células-tronco hematopoéticas são raras, se encontram dispersas no tecido adulto e apresentam comportamento diferenciado de acordo com o microambiente exposto. Estima-se que 1 em 10.000 células na medula óssea seja uma célula-tronco adulta (WEISSMAN, 2000).

As evidências para a presença de células progenitoras residentes nos pulmões necessárias para manutenção do tecido são recentes (NEURINGER e COLS., 2004). Enquadram-se neste grupo: células de Clara consideradas progenitoras das células epiteliais de vias aéreas e, juntamente com os pneumócitos tipo II, são capazes de reconstituir o epitélio pulmonar (GIANGRECCO e COLS., 2002; OTTO e COLS., 2002; HERZOG e COLS., 2003). Essas células residentes são capazes de realizar reparos em pequenas lesões, substituindo as células responsáveis pela função do órgão em questão; no entanto, elas não são capazes de restabelecerem a função ou realizarem reparos em lesões extensas. Logo, é necessário buscar fontes alternativas dessas células para a finalidade terapêutica (MAJKA e COLS., 2005).

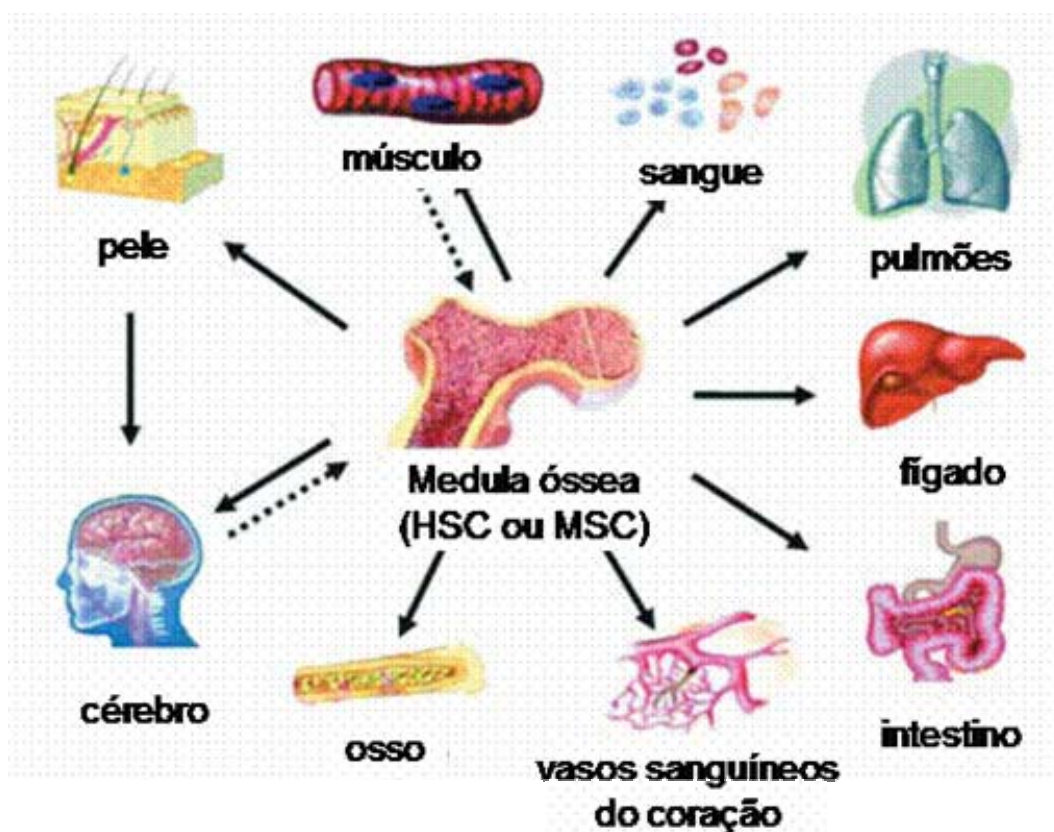


Figura 5. Plasticidade das células-tronco adultas. Adaptado de YEN e COLS., 2006.

A medula óssea de adultos é tradicionalmente um órgão composto de dois sistemas: hematopoético e mesenquimal (BIANCO e GEHRON, 2001).

I.3.e. Células-tronco derivadas de medula óssea

I.3.e.1. Células-tronco Hematopoéticas

As células-tronco hematopoéticas (HSC) são multipotentes, com alta capacidade de proliferação. Elas são definidas funcionalmente como células responsáveis pela manutenção e reconstituição de toda a linhagem sangüínea de células incluindo as células do sistema imune. As HSC podem ser identificadas a partir do sangue periférico, do sangue do cordão umbilical, da medula óssea e possuem propriedades como: auto-renovação e diferenciação, mesmo que diminuta, em outros tipos celulares especializados (HERZOG e KRAUSE, 2006). Por razões práticas, estas células são distinguidas, com freqüência, em relação aos marcadores de superfície que apresentam ou pela habilidade de efluir o corante Hoechst. Logo, células que apresentam determinadas combinações de receptores de superfície podem ser consideradas como HSC. Até o momento, células que expressam somente CD45⁺ ou que possuem as seguintes combinações: Thy-1.1^{lo}Sca-1^{hit}Lineage^{-/lo}, Lineage^{-/lo}Sca-1⁺cKit⁺, Lineage^{-/lo}Sca-1⁺cKit⁺CD34⁻ e Lineage^{-/lo}Sca-1⁺c-kit⁺CD38⁺ têm sido utilizadas com sucesso nos experimentos de repopulação (SPANDGRUDE e COLS., 1988; OSAWA e COLS., 1996 e RANDALL e COLS., 1996). Utilizando-se anticorpos monoclonais específicos e a técnica de *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) ou *magnetic-assisted cell sorting* (MACS) os receptores de superfície e, conseqüentemente, as HSC podem ser

identificadas (isoladas) e utilizadas em pesquisa ou transplante de células (THOMAS E COLS, 1999).

I.3.e.2. Células-tronco Mesenquimais

As células-tronco mesenquimais ou células-tronco estromais são uma subpopulação de células-tronco, presente na medula óssea, distinta das HSC. As células-tronco mesenquimais podem ser encontradas na própria medula óssea onde influenciam a modulação da quiescência, a auto-renovação, proliferação, maturação e apoptose HSC (DENNIS e COLS., 2002). Acredita-se que as células-tronco mesenquimais possuam potencial para se diferenciar em células hematopoéticas estromais, células musculares, fibroblastos, osteoblastos, condroblastos (tendão e ligamento) e adipócitos (CAPLAN, 1991; PROCKOP, 1997; PITTENGER e COLS., 1999; PITTENGER e MARSHAK, 2001) como demonstrado na Figura 6. Apesar de ainda controverso, alguns autores demonstram que as células-tronco mesenquimais podem se diferenciar também em tecidos não estromais, incluindo as células epiteliais pulmonares (PEREIRA E COLS., 1995; LIECHTY e COLS., 2000; JIANG e COLS., 2002; KOTTON e COLS., 2001; SPEES e COLS., 2003; ORTIZ e COLS., 2003; ROJAS e COLS., 2005; WANG e COLS., 2005; POPOV e COLS. 2007). Estes trabalhos fornecem grande evidência para explorar o potencial uso das MSCs no tratamento de doenças pulmonares.

Essas células foram inicialmente isoladas *in vitro* (FRIEDENSTEIN e COLS., 1974), tendo grande capacidade de aderência à superfície de cultivo do tecido e grande potencial de diferenciação. As células-tronco mesenquimais podem ser facilmente obtidas a partir de intensa “lavagem” do aspirado de células, que estão aderidas à placa de cultura da medula óssea de humanos,

ratos ou camundongos (KREBSBACH e COLS., 1997; COLTER e COLS., 2000; BARBASH e COLS., 2003). Apesar da reduzida capacidade em se diferenciar em outras linhagens celulares, alguns autores demonstraram a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos, condroblastos, adipócitos (PROCKOP e COLS., 1997; PITTENGER e COLS., 1999), músculo esquelético, células de músculo cardíaco, células endoteliais, hepatócitos, neurônios, oligodendrócitos, astrócitos e células epiteliais (JIANG e COLS., 2002; YAMADA e COLS., 2004; ROJAS e COLS. 2005; POPOV e COLS. 2007). As células-tronco mesenquimais chegam a expandir até 1 bilhão de vezes, quando em cultura por 8 semanas (COLTER e COLS., 2000). Por não apresentarem potencial carcinogênico, essas células vem apresentando grande interesse no que concerne seu uso terapêutico (KRAUSE e COLS., 2001; ORTIZ e COLS, 2003; ROJAS e COLS. 2005).

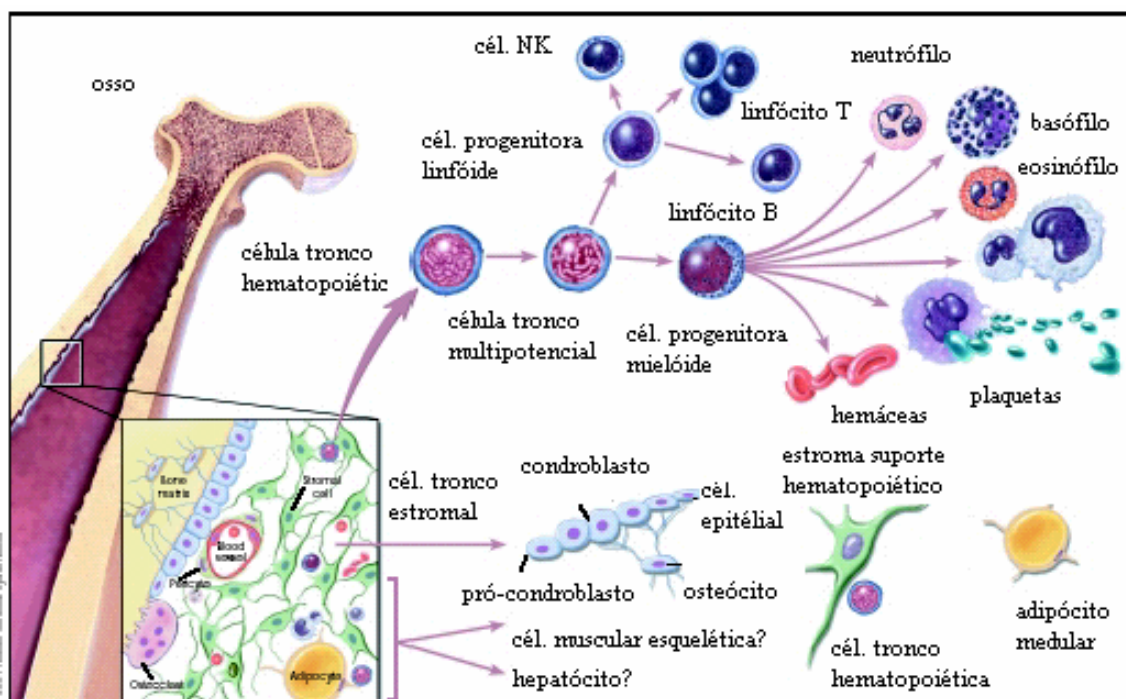


Figura 6. Diferenciação de células-tronco hematopoéticas e mesenquimais. NK = célula *natural killer*. Cél. = célula. Adaptada de Stem Cells: Scientific progress and future research directions, 2001.

I.4. Células-tronco e Tecido Pulmonar

Os pulmões são uma estrutura tri-dimensional complexa formada por diversos tipos celulares epiteliais morfologicamente distintos, que estão dispostos através de vias aéreas que se bifurcam até os alvéolos. A grande complexidade intrínseca, somada aos diversos aspectos únicos da estrutura pulmonar e de sua biologia, faz com que haja dificuldade em se identificar células-tronco pulmonares.

Diferentemente das outras superfícies epiteliais (ex.: pele e trato gastrointestinal), os epitélios das vias aéreas e alvéolos apresentam um *turnover* celular lento e pequena capacidade regenerativa. Esta quiescência tecidual impede a identificação de células-tronco residente pulmonares. Outro aspecto relevante seria a dificuldade técnica a qual está relacionada à análise histológica de um órgão que possui uma interface gás-tecido. Apesar dessas limitações, diversos tipos de células pulmonares progenitoras já foram identificadas nas regiões proximal e distal pulmonares. Nas vias aéreas proximais, células basais, células de Clara e células que residem nas glândulas submucosas demonstraram possuir funções progenitoras (BREUER e COLS., 1990; BOERS e COLS., 1998; BORTHWICK e COLS., 2001 e HONG E COLS., 2004). As células de Clara residentes no interior dos corpos neuroepiteliais (REYNOLDS e COLS., 2000) ou das junções do ducto broncoalveolar (GIANGRECCO e COLS., 2002) também demonstraram contribuir para o reparo epitelial das vias aéreas depois de ocorrida lesão por naftaleno. Na região mais distal pulmonar, onde ocorre troca gasosa, os pneumócitos tipo II são as células associadas à função progenitora do epitélio alveolar, já que possui a capacidade de auto-regeneração e diferenciação em pneumócitos tipo

I (MASON e WILLIAMS, 1977). Estudos *in vitro* demonstram o potencial onde células em cultura com fenótipo de pneumócitos tipo II se diferenciaram em pneumócitos tipo I (BRODY e WILLIAMS, 1992). Além disso, um estudo realizado *in vivo*, a partir da incorporação de timidina ao núcleo da célula, demonstrou diferenciação dos pneumócitos tipo II em tipo I após lesão pulmonar (EVANS e COLS., 1973, 1975; ADAMSON e BOWDEN, 1974, 1979).

Estudos realizados em camundongos sugerem que as células-tronco de medula óssea podem ser utilizadas como progenitoras de células diferenciadas de órgãos sólidos. Estes achados modificaram o pensamento de que as células-tronco de medula óssea adulta tinham uma natureza fixa, e passaram a considerar a hipótese de existirem células-tronco de medula óssea que estejam circulando pela corrente sangüínea. Os resultados que dão suporte a este novo paradigma provêm de experimentos realizados em camundongos irradiados que foram submetidos ao transplante de células-tronco de medula óssea cujas células doadoras foram marcadas com proteína verde fluorescente (GFP), β -galactosidade, lac-Z ou cromossomo-Y (LAGASSE e COLS., 2000; KRAUSE e COLS., 2001; JIANG e COLS., 2002). Nestes estudos, as células epiteliais derivadas da medula foram identificadas subseqüentemente através de co-localização histológica do marcador utilizado, juntamente com os marcadores específicos de diferenciação. A partir desta abordagem experimental prévia, as células-tronco de medula óssea passaram a serem consideradas como progenitoras para uma variedade de tipos celulares epiteliais em vários órgãos inclusive os pulmões (ALISON e COLS., 2000; KLEENBERGER e COLS., 2003 e SURAT e COLS., 2003). Os estudos realizados com transplante de células em camundongos, em sua maioria, foram realizados utilizando 3 populações de

células de medula óssea: aspirado de células mononucleares, células mesenquimais (MSC) ou preparações enriquecidas para células-tronco hematopoéticas (HSC).

Um dos primeiros estudos a demonstrar que células-tronco de medula óssea eram capazes de migrar para o tecido pulmonar foi realizado por Pereira e colaboradores (1995), onde células-tronco mesenquimais marcadas com mini-gene humano para colágeno tipo I foram transplantadas em camundongos irradiados e analisadas através de PCR *in situ*. Após 30 dias, o mini-gene humano colágeno tipo I estava expresso nas células pulmonares dos animais receptores. Ademais, estas células encontravam-se difusamente distribuídas entre brônquios e alvéolos indicando que poderiam se tornar células progenitoras para o tecido pulmonar. Entretanto, o estudo, não foi capaz de identificar diferenciação celular (PEREIRA e COLS., 1995).

Krause e colaboradores constataram implantação significativa de células-tronco hematopoéticas transplantadas em camundongos, que se diferenciaram em pneumócitos tipo II e em células epiteliais das vias aéreas. Nesse estudo, as células doadoras utilizadas eram de camundongo-macho e após serem selecionadas (separação por tamanho, depleção da linhagem e na capacidade rápida de migração) foram utilizadas para realização do transplante na camundongo-fêmea cuja medula óssea sofrera ablação. As células implantadas foram identificadas pelo princípio de co-localização do cromossomo-Y e através de marcadores específicos de células epiteliais pulmonares. Os níveis de implantação dos pneumócitos II alcançaram 20% após 11 meses do transplante das células-tronco hematopoéticas (KRAUSE e COLS., 2001).

Kotton e colaboradores injetaram intravenosamente cerca de $1 - 2 \times 10^6$ de células-tronco mesenquimais (lacZ⁺) em camundongos que não receberam ablação prévia da medula óssea. Nesse estudo, as células medulares foram purificadas através da adesão ao plástico (placa de cultura) e colocadas em cultura por 1 semana. Após 5 a 30 dias da injeção intravenosa de células-tronco nos animais sem lesão e com lesão pulmonar induzida por bleomicina, um pequeno número de células se implantou no tecido pulmonar com características morfológicas de pneumócitos I. Além do aspecto morfológico de pneumócitos I, estas células exibiam características moleculares de pneumócitos I como expressão de marcadores de superfície, T1- α , aquaporina-5 e ligação da lecitina *Lycopersicon esculentum*. O percentual de implantação foi mais intenso nos animais com lesão pulmonar induzida pela bleomicina. Apesar de terem realizado uma análise cuidadosa, não foram encontrados sinais de implantação e diferenciação de pneumócitos II. Este é um dos estudos precursores, que demonstraram que os pneumócitos tipo I não apresentam apenas uma linhagem precursora proveniente das células residentes pneumócitos tipo II. Ademais, esse estudo sugere o uso de células-tronco de medula óssea para terapia regenerativa quando houver lesão ao epitélio alveolar (KOTTON e COLS., 2001).

Ortis e colaboradores encontraram resultados semelhantes aos de Kotton e colaboradores após implantação de células-tronco mesenquimais no pulmão com lesão por bleomicina. Essas células foram localizadas em regiões pulmonares lesionadas e apresentaram características morfológicas de células epiteliais alveolares tipo II. Eles observaram que a administração de células-tronco mesenquimais imediatamente após exposição a bleomicina reduziu

significativamente o grau de lesão ocasionado pela mesma ao parênquima pulmonar através da redução da inflamação e da deposição de colágeno no tecido. Resumidamente, os autores (ORTIS e COLS., 2003) demonstraram, através de um modelo murino, que as células-tronco mesenquimais migram para o pulmão em resposta ao estímulo lesivo (bleomicina), adotam um fenótipo epitelial (pneumócitos II) e alteram o curso da evolução da doença por reduzirem a inflamação e a deposição de colágeno no tecido pulmonar.

Rojas e colaboradores observaram que as células-tronco derivadas de medula óssea são importantes no reparo do parênquima pulmonar. Eles observaram que os animais lesionados com bleomicina apresentaram um aumento significativo na expressão gênica de algumas citocinas pró-fibróticas e inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-4 e IFN- γ), retornando a valores basais, quando estes animais eram tratados com as células-tronco (ROJAS e COLS., 2005). Vale ressaltar que esse trabalho utilizou células mesenquimais derivadas de medula óssea na tentativa de tratar a fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Gupta e colaboradores administraram células mesenquimais derivadas de medula óssea diretamente aos espaços alveolares 4h após induzir lesão pulmonar por endotoxina de *Escherichia coli* (5 mg/kg). Os autores observaram que os animais submetidos à terapia celular apresentaram redução da mortalidade, do edema pulmonar e de proteínas no lavado bronco-alveolar (BAL). Ademais, houve redução das citocinas inflamatórias como TNF- α , MIP-2 e aumento das citocinas anti-inflamatórias, como IL-10. Concluíram então, que a terapia com células derivadas de medula óssea reduz a gravidade da lesão pulmonar causada por LPS (GUPTA e COLS., 2007).

Aprofundando os estudos sobre a contribuição das células derivadas de medula óssea para a regeneração pulmonar, Yamada e colaboradores constataram que o estímulo inflamatório induzido pelo lipopolissacarídeo instilado intratraquealmente acarretou não só uma rápida liberação de células inflamatórias, mas também de células derivadas de medula óssea para o pulmão. Nesse trabalho os autores utilizaram camundongos transplantados com células provenientes de camundongos GFP após a ablação da medula óssea por irradiação. Com esse modelo eles evidenciaram que as células derivadas de medula óssea se diferenciaram em epitélio alveolar ou em células endoteliais dos capilares pulmonares, 1 semana após a injeção das células. Assim, tal estudo comprovou que nesse modelo de lesão, ocorria recrutamento de células-tronco derivadas de medula na tentativa de recuperar o tecido previamente lesado (YAMADA e COLS., 2004)

Somando-se a isso, Matute-Bello e colaboradores, mostraram como a re-população de células pulmonares ocorria temporalmente após indução de lesão por irradiação corpórea juntamente com o transplante de células derivadas da medula óssea. Utilizando-se animais quimeras com células GFPs como doador, eles observaram que 30 dias após o transplante cerca de 47% das células residentes pulmonares expressavam GFP, aumentando para 75% aos 60 dias e 80% aos 90 dias. Isso mostra o aumento progressivo do número de células do doador no pulmão ao longo do tempo (MATUTE-BELLO e COLS., 2004).

Contrariamente ao observado nos estudos anteriores, Hashimoto e colaboradores constataram que a terapia celular (transplante de 4×10^6 células mononucleares derivadas da medula óssea) piorava o quadro de fibrose

pulmonar induzida por bleomicina. Utilizando animais quimera (que possuíam células GFP positivas apenas na medula óssea) observaram que um número substancial de células derivadas da medula possuíam semelhança morfológica a dos fibroblastos (principais células responsáveis pela deposição de colágeno no organismo) que migravam para o pulmão, sendo que mais de 27% dessas células GFP positivas expressavam colágeno tipo I agravando o quadro de fibrose pulmonar (HASHIMOTO e COLS., 2004).

Apesar da diversidade de estudos na literatura evidenciando a migração e a plasticidade das células-tronco derivadas de medula óssea em tecidos pulmonares, alguns autores não corroboraram tal característica (WAGERS e COLS., 2002; CHANG e COLS., 2005; KOTTON e COLS., 2005). Wagers e colaboradores transplantaram células-tronco hematopoética expressando GFP (positiva) e KTLS (c-kit positiva, thy-1, Sca-1 e lin⁻) em animais irradiados e comprovaram que havia reconstituição completa da medula óssea, mas não havia sinais de “transdiferenciação” em tecidos não-hematopoéticos como pulmões, rins e trato gastro-intestinal. Ademais, poucas células GFP+ foram encontradas no cérebro e fígado (WAGERS e COLS., 2002), concluindo que a “transdiferenciação” seria um evento muito raro. No intuito de esclarecer a controvérsia existente na re-população do epitélio alveolar por células-tronco derivadas de medula óssea, dois outros autores (CHANG e COLS., 2005 e KOTTON e COLS., 2005) realizaram estudos em que células mononucleares derivadas de medula óssea foram incorporadas com GFP e SP-C (proteína C do surfactante) e a seguir transplantadas em camundongos irradiados. Apesar das diferentes técnicas utilizadas para visualização das células-doadoras, ambos autores não conseguiram demonstrar que havia reconstituição do

epitélio pulmonar pelas células mononucleares ou pelas células-tronco hematopoéticas purificadas uma vez que quando foram excluídos fenômenos de auto-fluorescência, células mortas ou células sanguíneas que contaminaram a amostra, não havia reconstituição epitelial detectável.

I.5. Mecanismos e Processos de Quimioatração e Diferenciação

Celulares

I.5.a. Mobilização Celular por Quimioatração

A natureza dos sinais envolvidos no recrutamento das células-tronco no pulmão bem como em outros órgãos, sua extensa implantação e seu efeito nas doenças ainda não estão bem estabelecidos (ORTIZ e COLS., 2003).

Muitos fatores liberados por epitélios lesados auxiliam na migração de células-tronco hematopoéticas (HSCs) da medula, e um deles é o SDF-1 α (fator derivado de células de estroma), descrito também como quimioatraente de HSCs para áreas necróticas do fígado (HATCH E COLS., 2002). Nesse contexto, Hashimoto e colaboradores observaram que as quimiocinas (CXC) liberadas pelas células inflamatórias no pulmão lesado poderiam ser importantes para o influxo de células derivadas de medula óssea para o pulmão. A expressão de RNAm para SDF-1 α se elevou no pulmão lesado em relação ao controle, sendo especulado seu envolvimento nesse mecanismo molecular (HASHIMOTO e COLS., 2004).

I.5.b. Mecanismos de Plasticidade Celular

Vários mecanismos são especulados em relação à plasticidade das células derivadas de medula óssea. Dentre esses, a “transdiferenciação”

pode ser definida como um processo de diferenciação de um tipo celular para outro diferente do anterior (DANTO e COLS., 1995; GRIFFINS e COLS., 2005). Quando uma célula-tronco hematopoética, por exemplo, se diferencia diretamente em outro tipo celular diferente ao que estava comprometido, temos uma “transdiferenciação” direta. Nesse processo ocorre uma mudança na morfologia e na programação genética da célula. Essa “transdiferenciação” ao nível molecular ocorre através da alteração da expressão de um gene regulador mestre que define as características de uma célula específica (HERZOG e COLS., 2003; WAGERS e COLS., 2004; HERZOG e COLS., 2007).

Outro mecanismo discutido seria a fusão celular, na qual duas células se fundem formando um heterocácion (dois ou mais núcleos). O interessante é que nem sempre ocorre a reprogramação gênica como resultado dessa fusão, não caracterizando, dessa forma, a formação de um novo tipo celular como na plasticidade. Para investigar se o processo de diferenciação celular em resposta à lesão tecidual ocorria através de fusão celular, Spees e colaboradores utilizaram um modelo *in vitro* de células-tronco mesenquimais em co-cultura com células epiteliais de pequenas vias aéreas de humanos. Os autores encontraram que algumas células mesenquimais se diferenciaram em células epiteliais e expressavam genes característicos das mesmas, enquanto que, outras células mesenquimais se fundiram diretamente com as células epiteliais (fusão nuclear) (SPESS e COLS., 2003). No ano seguinte, Harris e colaboradores desenharam um estudo para comprovar a fusão celular através da utilização de um sistema de recombinase Cre/lox juntamente com a β -galactosidase e amplificaram

a expressão da proteína verde fluorescente (GFP) em camundongos transgênicos para identificar células epiteliais nos pulmões, fígado e pele. Os autores verificaram que as células epiteliais alveolares podem se desenvolver a partir das células-tronco derivadas da medula óssea sem que ocorresse fusão celular (HARRIS e COLS., 2004). Entretanto, esse mecanismo persiste controverso (SPEES e COLS., 2002; HERZOG e COLS., 2003; 2006 e 2007; HARRIS e COLS., 2004).

Herzog e colaboradores realizaram um estudo experimental em que utilizaram modelo murino de inflamação pulmonar e transplantaram células derivadas de medula óssea de doadores machos em fêmeas para verificar se havia formação de heterocácion de células medulares com pneumócitos tipo II com lesão. Os autores concluíram que havia reprogramação específica de pneumócitos II pós-transplante de células e que isso se devia principalmente a formação de heterocácion (HERZOG e COLS. 2007). Assim, mais estudos precisam ser realizados para estabelecer qual a verdadeira contribuição tanto para a regeneração tecidual quanto para a possível atuação na diminuição da inflamação em modelos de lesão pulmonar.

I.5.c. Ação Parácrina

Outro mecanismo que vem ganhando espaço na comunidade científica é o da possível liberação de fatores celulares parácrinos oriundos das células derivadas de medula óssea nos tecidos-alvo com lesão (DE PALMA e COLS., 2005; GRUNEWALD e COLS., 2006). Um estudo analisando os constituintes moleculares de meio condicionado de células

mesenquimais derivadas de medula óssea mostrou que essas células são capazes de liberar citocinas como: interleucinas (IL-6 e IL-1), fatores de crescimento de fibroblastos (FGF-2 e FGF-7), fator de crescimento placentário, fator transformador de crescimento (TGF- α), fator de necrose tumoral (TNF- α) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF-A), quando submetidas à condição de hipóxia. A utilização desse meio em lesão muscular isquêmica constatou atenuação da resposta inflamatória e migração de células endoteliais para reconstituir o tecido vascular lesado em questão (KINNAIRD e COLS., 2004).

Utilizando-se meio condicionado com fatores liberados por células derivadas de medula óssea (citocinas incluindo VEGF, IL-1, PDGF, e IGF-1) em modelo de isquemia do miocárdio em camundongos, Takahashi e COLS constataram diminuição da área de fibrose cardíaca (TAKAHASHI e COLS., 2006). Os possíveis mecanismos da ação imuno-modulatória de células derivadas de medula óssea têm sido analisados em modelo *ex-vivo* (AGGARWAL e PITTENGER, 2005). Os experimentos com co-cultura de sub-populações de leucócitos e células-tronco mesenquimais demonstraram que as células-tronco mesenquimais podem secretar fatores que modulam os fenótipos TH1 e TH2. Ademais, as células-tronco mesenquimais diminuem a secreção de citocinas inflamatórias na co-cultura de leucócitos (ex.: TNF- α) e promovem a secreção de IL-4 e IL-10 pelas células T (AGGARWAL e PITTENGER, 2005). No entanto, um estudo *in vitro* com co-cultura de células-tronco mesenquimais e células epiteliais pulmonares tipo A-549 sinalizou que ocorra ação parácrina de células epiteliais através da ativação da via da β -catenina influenciando a

diferenciação das células mesenquimais, já que estas passaram a expressar marcadores epiteliais pulmonares como a citoqueratina-5 e 8, pró-proteína C surfactante e zônula de oclusão-1. Para excluir a possibilidade de fusão celular, estas células foram separadas por uma membrana impermeável à passagem de células (POPOV e COLS., 2007). Mas pouco se sabe a respeito da ocorrência desse mecanismo *in vivo* no pulmão. No intuito de analisar a ação parácrina causada pelas células derivadas de medula óssea, Rojas e colaboradores induziram lesão pulmonar por bleomicina em camundongos com medula óssea íntegra e, observaram aumento de fatores de crescimento como G-CSF e GM-CSF. Concluíram então, que os fatores liberados pelas células medulares influenciaram o reparo, mas também preveniram a lesão do parênquima pulmonar (ROJAS e COLS., 2005). Xu e colaboradores desenvolveram modelo de lesão pulmonar induzida pela injeção intra-peritoneal de LPS seguida da injeção de células derivadas de medula óssea. Os autores observaram que a infusão de células medulares prevenia a inflamação, a lesão pulmonar e o edema (XU e COLS., 2007).

II. Justificativa

A lesão pulmonar aguda (LPA) é um termo utilizado para descrever a resposta pulmonar a uma série de agressões que acometem direta ou indiretamente o tecido pulmonar. A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) representa uma condição mais grave da lesão pulmonar, onde coexistem alterações inflamatórias por todo o pulmão seguido por fibrose (TOMASHEFSKI, 1990; BERNARD E COLS., 1994; INGBAR, 2000).

As células-tronco mesenquimais são uma população de células-tronco da medula óssea distintas das células-tronco hematopoéticas. As células-tronco mesenquimais podem se diferenciar em osteoblastos, condroblastos, adipócitos e células do estroma hematopoético (PROCKOP, 1997; PITTENGER e COLS.,1999). Estudos recentes sugerem que as células-tronco mesenquimais também podem se diferenciar, apesar da reduzida frequência, em tecidos não estromais, incluindo até as células epiteliais pulmonares (PEREIRA e COLS, 1995; LIENCHTY e COLS, 2000; JIANG e COLS, 2002; KOTTON e COLS, 2001; ORTIZ e COLS. 2003; ROJAS e COLS., 2005; POPOV e COLS., 2007). Ademais, a possibilidade de terapias que utilizam células-tronco para uma intervenção efetiva nas doenças pulmonares vem se tornando bastante promissora. Entretanto, a natureza dos sinais envolvidos no recrutamento de células-tronco, na extensão do seu implante nos tecidos e se sua administração é capaz de alterar a evolução natural da doença ainda não estão esclarecidos.

Até o presente, os trabalhos científicos demonstram evidências sustentáveis para a possibilidade do uso de células-tronco no tratamento de doenças pulmonares (aguda ou crônica) que cursem com lesão da superfície de troca gasosa, bem como de doenças em que o curso do remodelamento do tecido pulmonar esteja comprometido (ISHIZAWA e COLS., 2003; YAMADA e COLS., 2004; WANG E COLS., 2005; ROJAS e COLS., 2005). Entretanto, os mecanismos de reparo induzidos pelas células-tronco ainda são controversos na literatura e precisam ser mais bem elucidados (KOTTON e COLS.,2005; CHANG e COLS., 2005).

Portanto, nosso estudo analisou através de um modelo experimental de lesão pulmonar aguda em camundongos, os efeitos da terapia com células mononucleares derivadas de medula óssea no remodelamento do parênquima pulmonar na lesão pulmonar aguda. Para tal foram estudadas a mecânica e histologia pulmonares e o conteúdo de fibras colágenas no parênquima pulmonar. Este entendimento faz-se necessário visto que poderá nortear novas condutas clínicas no sentido de oferecer outras abordagens terapêuticas à melhora da função pulmonar em indivíduos com LPA/SDRA.

III. Objetivos

O presente estudo visa a analisar o impacto da administração de células mononucleares derivadas de medula óssea sobre a mecânica e histologia pulmonares em modelos murinos de lesão pulmonar aguda induzida por paraquat.

Para tal, serão analisados as propriedades elásticas, resistivas e viscoelásticas e/ou inomogêneas do pulmão, a morfometria do parênquima pulmonar, a quantificação de fibras colágenas e o grau de reparo do epitélio e endotélio pulmonares.

Materiais e Métodos

IV. Materiais e Métodos

IV.1. Animais utilizados

Foram utilizados setenta camundongos C57BL6 fêmeas e machos, oriundos do biotério do laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os animais receberam cuidados conforme o guia preparado pelo Comitê de cuidados e Uso dos animais de laboratório do Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos da América (*U.S. Department of Health and Human Care Services, 1985*) e aprovado pela comissão interna do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

IV.2. Desenho e Caracterização dos Grupos Experimentais

IV.2.a. Indução da Lesão Pulmonar Aguda

Para se estabelecer e caracterizar o modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) em camundongos C57BL6 fêmeas, foram utilizados 30 animais divididos aleatoriamente em 2 grupos:

A – *Grupo Controle (C)*: Seis camundongos, pesando aproximadamente 25 a 30 g, receberam injeção de 0,1 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) a 37°C, na cavidade peritoneal.

B – *Grupo Paraquat (LPA)*: Vinte e quatro camundongos, pesando aproximadamente 25 a 30 g, receberam injeção de paraquat na dose de 10 mg/kg intra-peritonealmente (i.p.) com intuito de induzir a lesão pulmonar aguda (LPA).

Ambos os grupos de animais foram submetidos à análise temporal da mecânica e histologia pulmonares e dos componentes da matriz extracelular. As análises foram realizadas nos seguintes tempos: 1 (LPA 1); 7 (LPA 2); 14 (LPA 3) e 30 (LPA 4) dias, respectivamente (n=6/tempo). Uma vez que não houve diferença morfo-funcional nos grupos Controle nos diferentes tempos, optamos por utilizar somente um grupo Controle (C). No esquema a seguir (Figura 7) observa-se a escala temporal com a identificação dos procedimentos experimentais.

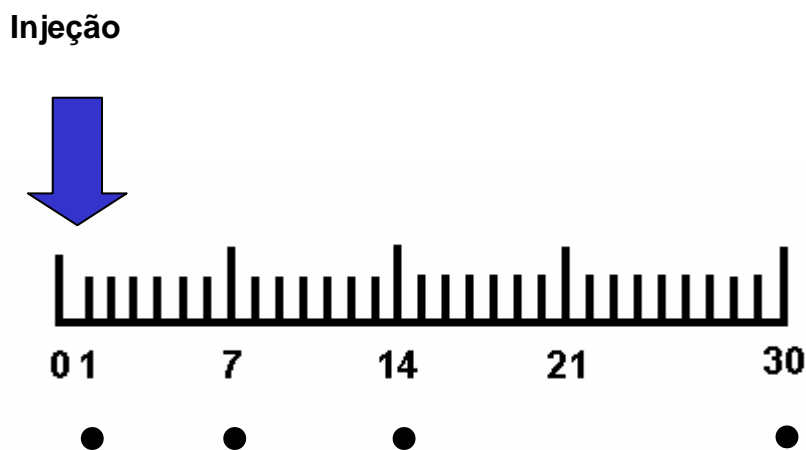


Figura 7. Escala temporal dos procedimentos do experimento na indução da LPA e análise da mecânica e histologia pulmonares, quantificação de fibras colágenas. • Representa os dias da análise experimental.

IV.2.b. Tratamento com células monucleares derivadas de medula óssea

Foram utilizados quarenta camundongos C57BL/6 selvagens, obtidos do biotério do laboratório de biologia celular e molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Como doadores, foram usados dezesseis machos C57BL/6 de um mês de idade, enquanto os animais tratados, identificados como receptores, foram

fêmeas de 1 mês e meio a 2 meses de idade, que pesavam entre 25 e 30 gramas.

Após ter estabelecido o modelo experimental de lesão pulmonar aguda (LPA), foram utilizados 24 camundongos C57BL6, fêmeas, divididos em dois grupos: controle (C) e LPA nos quais foram injetadas células mononucleares de medula óssea. Nos animais controle (C) (n=12) foi injetado intraperitonealmente 0,1 mL de solução salina estéril (NaCl) e no grupo com lesão pulmonar aguda (n=12) foi injetado 10 mg/kg de paraquat na cavidade peritoneal. Cada grupo experimental (C e LPA) foi dividido em dois subgrupos de acordo com a injeção intravenosa de solução salina estéril ou de células mononucleares de medula óssea. Em todos os grupos, mecânica e histologia pulmonares (microscopia óptica e eletrônica) e os componentes da matriz extracelular (fibras colágenas) foram analisados.

1. *Controle Salina (C-Sal)* (n=6): animais com peso entre 25 e 30 g, em que salina foi injetada na veia jugular externa 1 hora após a injeção de salina intra-peritoneal (0,1 mL).
2. *Controle Célula (C-Cel)* (n=6): animais com peso entre 25 e 30 g, tratados com células mononucleares derivadas de medula óssea (2×10^6 células/200 μ l de solução salina) que foram injetadas pela veia jugular externa direita 1h após a injeção de salina intra-peritoneal (0,1 mL).
3. *Paraquat Salina (LPA-Sal)* (n=6): animais com peso entre 25 e 30 g, em que salina (0,1 mL) foi injetada na veia jugular externa direita 1 hora após a injeção de paraquat (10 mg/Kg)..

4. *Paraquat Célula (LPA-Cel)* (n=6): animais com peso entre 25 e 30 g, tratados com células mononucleares derivadas de medula óssea (2×10^6 células/200 μ l de solução salina) que foram injetadas pela veia jugular externa direita 1h após a injeção de paraquat intra-peritoneal (10mg/Kg)..

Esquemática dos grupos experimentais e a análise temporal pode ser observada na Figura 8.

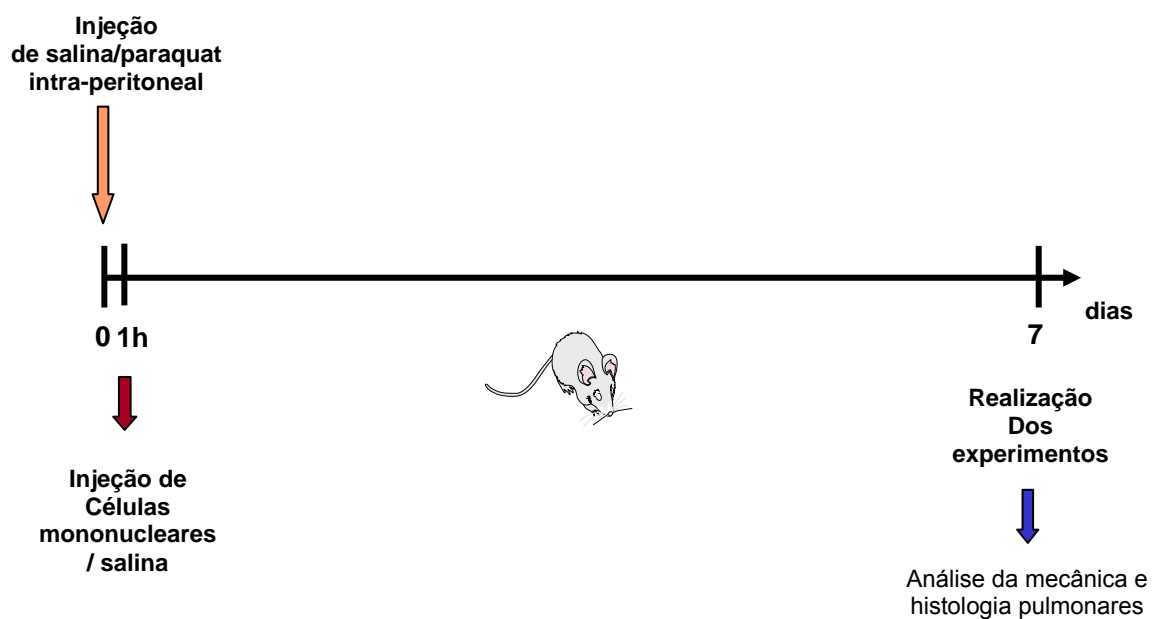


Figura 8. Representação esquemática e análise temporal dos grupos experimentais que foram submetidos à injeção de células mononucleares de medula óssea.

A medida da mecânica pulmonar e análise da histologia por microscopia óptica foram realizadas no Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto

de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ). A análise da histologia por microscopia eletrônica e a quantificação das fibras colágenas e elásticas foram realizadas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). O preparo e isolamento das células monucleares derivadas de medula óssea foram realizados no Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ).

IV.3. Isolamento de células monucleares derivadas de medula óssea

IV.3.a. Extração e purificação das células.

Dezesseis camundongos machos (doadores) 6 a 10 semanas, normais, foram anestesiados com éter etílico PA (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e sacrificados com deslocamento cervical rápido.

Com o auxílio de pinça e tesoura estéreis retirou-se a pele e os músculos adjacentes ao fêmur e à tíbia, evitando o rompimento da artéria femoral. As epífises ósseas foram cortadas, e a cavidade medular foi lavada com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Life Technologies[®], Grand Island, NY, EUA) utilizando uma seringa com agulha de 18 G colocada sobre um tubo estéril de poliestireno cônico de 15 mL (Falcon[®]). As células foram homogeneizadas com auxílio de pipeta Pasteur, e em seguida, centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento de células foi ressuspenso em DMEM sem soro e, posteriormente, foi adicionado cuidadosamente sobre o Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077 – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) (CONGET e MINGUELL, 1999). A seguir, as células foram centrifugadas a 1200 rpm

durante 30 minutos a temperatura ambiente. O anel de células, formado após a centrifugação, na interface Ficoll-meio de cultura foi coletado e colocado em um tubo de poliestireno cônico de 15 ml (Falcon®). Este anel de células contém células mononucleares (linfócitos e monócitos) e células-tronco de medula óssea. As células foram ressuspensas em solução salina balanceada (BSS) e centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi, então, desprezado, e esse processo repetido mais duas vezes para retirar o Ficoll que possa ter sido coletado junto com o anel de células. As células foram ressuspensas em 1 ml de BSS e submetidas à contagem para serem utilizadas.

IV.3.b. Contagem das células.

Uma alíquota de 1 μL de células foi diluída em 200 μL de ácido acético 2% (Reagen®) (líquido de Turk) a fim de lisar as hemácias e evitar a contagem das mesmas. Desta diluição, retirou-se 10 μL da suspensão de células e adicionou-se na câmara de Neubauer (Hausser Scientific). O número de células redondas e brilhantes foi contado nos quatro quadrantes. Após a contagem, um total de 2×10^6 células em 200 μL de solução salina estéril balanceada foram injetadas na veia jugular externa dos camundongos-fêmeas que receberam solução salina (0,1 mL) ou paraquat (10 mg/kg i.p.).

IV.3.c. Injeção das células.

A via de escolha para a injeção das células foi a veia jugular, por ser uma via mais direta de chegada aos pulmões. Dessa forma, os animais foram sedados com diazepam (1 mg) e em seguida anestesiados com sevoflurano, sendo a veia jugular direita dissecada. Uma seringa de 1,0 mL foi utilizada para a injeção das células (2×10^6 células) no sentido

céfalo-caudal e um *clamp* metálico foi provisoriamente colocado para evitar ocasionais perdas de sangue ou mesmo das células injetadas.

IV.4. Protocolo Experimental

Os animais foram pesados (balança Filizola, modelo BR, Indústrias Filizola SA, SP, Brasil) e, então, foi injetado intra-peritonealmente (i.p.) solução salina (0,1 mL) ou paraquat na dose 10 mg/kg para induzir lesão pulmonar aguda.

De acordo com a caracterização dos grupos experimentais, os animais foram sedados com diazepam (1 mg i.p.), novamente pesados (balança Filizola, modelo BR, Indústrias Filizola SA, SP, Brasil) e, então, anestesiados com tiopental (20 mg/kg i.p.).

Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados por esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos horizontalmente abduzidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada uma incisão longitudinal, medial, de aproximadamente 1 cm de extensão na face ventral do pescoço dos animais seguida de divulsão dos tecidos até a exposição completa do terço inicial da traquéia. A seguir, foram realizados a traqueostomia e a introdução de jelco 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, sendo a cânula fixada à porção proximal da traquéia por meio de fios de algodão.

O tubo traqueal do animal foi conectado a um pneumotacógrafo para pequenos animais, como descrito por Mortola e Noworaj (1983), para medida

de fluxo aéreo (V'). O pneumotacógrafo utilizado consiste de uma cânula metálica com duas saídas laterais com as seguintes características: diâmetro interno = 1,5 mm, comprimento = 4,2 cm e distância entre as saídas laterais = 2,1 cm. O gradiente de pressão através do pneumotacógrafo foi determinado utilizando-se um transdutor diferencial de pressão Scireq [SCIREQ[®] *Scientific Respiratory Equipment Inc.* (SC-24), Montreal, Canadá]. Essa forma de medir fluxo aéreo, além de bem simples, é adequada, visto que, em animais de pequeno porte, os fluxos baixos e as dimensões traqueais reduzidas são responsáveis pela existência de fluxo laminar e, portanto, o fluxo aéreo pode ser medido de acordo com a lei de Poiseuille, onde a diferença de pressão entre as saídas laterais do pneumotacógrafo é proporcional ao V' . Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a um transdutor diferencial de pressão Validyne MP45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA) para medida da pressão traqueal (P_{tr}). A inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traquéia até a extremidade da tubulação) evitará erros de medida de resistência ao fluxo (LORING e COLS., 1979; CHANG e MORTOLA, 1981). O volume (V) mobilizado foi obtido por integração digital do sinal de fluxo. A calibração dos transdutores de pressão foi realizada com o auxílio de um tubo em "U" contendo água destilada. A aferição foi realizada antes de cada experimento para assegurar a confiabilidade do registro.

Os animais foram, então, paralisados com brometo de pancurônio [0,005 mg/kg intravenosamente (i.v.) Pavulon[®], Organon International Incorporation, Nova Jersey, EUA], administrado na veia da cauda (i.v.), e o ventilador mecânico para pequenos animais (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguai) foi acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. O

ventilador utilizado é composto por um conjunto de duas válvulas solenóides, permitindo, assim, o controle dos tempos inspiratório (entre 0 e 0,6 segundos) e expiratório (entre 0,11 e 1,18 segundos). Os camundongos foram, então, acoplados à prótese ventilatória e ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo 1,0 mL/s. A frequência respiratória foi regulada pelo equilíbrio entre os tempos inspiratório e expiratório e a pausa inspiratória.

Após a adaptação ao ventilador mecânico, os animais foram submetidos a incisão cirúrgica por tesoura na linha média do abdômen justo abaixo do apêndice xifóide. A incisão foi estendida, superficialmente, ao longo da parede torácica sobre o esterno, sendo, então, a pele do animal retirada por tração lateral. A seguir, a incisão abdominal foi estendida lateralmente, para esquerda e para direita, seguindo o bordo inferior das costelas até atingir a linha axilar anterior, bilateralmente. Com a cavidade abdominal aberta, foi possível visualizar o diafragma, que foi perfurado e seccionado segundo a mesma orientação da abertura da parede abdominal. Imediatamente antes da perfuração do diafragma foi instalada pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O (SALDIVA e COLS., 1992). A utilização da PEEP evitou o colapso alveolar e o desenvolvimento de atelectasias resultantes da retirada da parede torácica.

Após a retirada do diafragma, a parede torácica foi removida por cortes longitudinais bilaterais no nível das linhas axilares anteriores, em toda sua extensão, e corte superior, abaixo da clavícula.

O ventilador foi ajustado previamente para gerar, quando desejado, uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração. Foram tomados cuidados especiais na manutenção do volume ($V_T = 0,2$ mL) e fluxo ($V' = 1$ mL/s)

constantes em todos os animais, a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e duração da inspiração nas variáveis medidas (KOCHI e COLS., 1988 a, 1988 b; SIMILOWSKI e COLS., 1989). Uma vez que não existiram modificações abruptas no diâmetro do nosso circuito, erros de medida da resistência ao fluxo (CHANG e MORTOLA., 1981; LORING e COLS., 1979) foram evitados. Durante os experimentos evitou-se ao máximo a manipulação da cânula traqueal com aspirações e insuflações, para eliminar possíveis interferências sobre os parâmetros medidos. Nesta fase, os animais foram mantidos em decúbito dorsal e a mecânica respiratória foi mensurada.

IV. 5. Método de Medida da Mecânica Respiratória

A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração após insuflação com fluxo constante (BATES e COLS. 1985; 1988; KOCHI e COLS. 1988a e 1988b), que permite analisar separadamente os componentes elástico, viscoso e viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão.

Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da pressão traqueal [(Ptr), no animal com o tórax aberto, a Ptr é, na realidade, a pressão transpulmonar (PL)] até um ponto (ponto de inflexão, $P_{i,L}$) a partir do qual o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica dos pulmões ($P_{el,L}$), como demonstrado na Figura 9. A diferença de pressão ($\Delta P_{1,L}$) que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ($P_{max,L}$) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta ($P_{i,L}$), corresponde ao componente viscoso pulmonar. A segunda variação de

pressão ($\Delta P_{2,L}$), representada pela queda lenta, do $P_{i,L}$ ao platô ($P_{el,L}$), reflete a pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico (“*stress relaxation*”) e/ou inhomogêneo (“*pendelluft*”) do pulmão (BATES e COLS., 1988; D’ANGELO e COLS., 1989 e KOCHI e COLS., 1988a e 1988b). A soma de $\Delta P_{1,L}$ e $\Delta P_{2,L}$ fornece a variação total de pressão no pulmão ($\Delta P_{tot,L}$).

As elastâncias estática ($E_{st,L}$) e dinâmica ($E_{dyn,L}$) do pulmão podem, então, ser obtidas dividindo-se $P_{el,L}$ e $P_{i,L}$, respectivamente, pelo volume corrente (V_T). ΔE_{L} corresponde à diferença entre $E_{dyn,L}$ e $E_{st,L}$, estando relacionada às propriedades viscoelásticas dos pulmões (EISSA e COLS., 1992) (Quadro 1).

Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o volume nunca cai a zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno fluxo. Este fluxo foi responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, de $P_{i,L}$ e $P_{el,L}$. Por isso, foi realizada a correção de acordo com Kochi e colaboradores (KOCHI e COLS., 1988a).

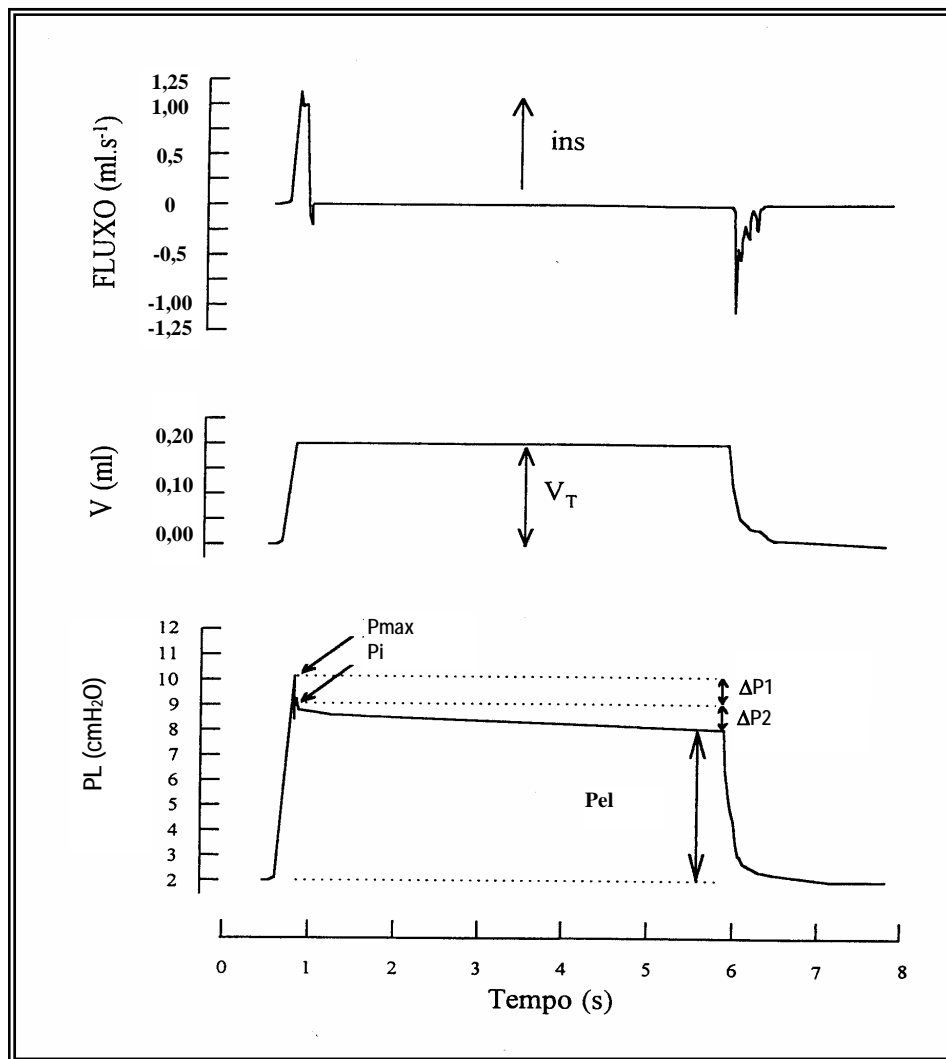


Figura 9. Representação esquemática dos registros dos sinais de fluxo, volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo, obtidos a partir da oclusão ao final da inspiração. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo aéreo de 1 mL/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na PL ($\Delta P1,L$) que corresponde a $P_{max,L} - P_{i,L}$, pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta ($\Delta P2,L$), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representado pela pressão de retração elástica pulmonar ($P_{el,L}$). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O.

As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

$$\Delta P_{1,L} = P_{max,L} - P_{i,L}$$

$$\Delta P_{2,L} = P_{i,L} - P_{el,L}$$

$$\Delta P_{tot,L} = \Delta P_{1,L} + \Delta P_{2,L}$$

$$E_{st,L} = P_{el,L}/V_T$$

$$E_{dyn,L} = P_{i,L}/V_T$$

$$\Delta E,L = E_{dyn,L} - E_{st,L}$$

$$T_i = V_T/V'$$

Quadro 1: Fórmulas utilizadas para medida de mecânica pulmonar.

Onde:

$\Delta P_{1,L}$ = variação de pressão relativa ao componente viscoso pulmonar

$\Delta P_{2,L}$ = variação de pressão relativa ao componente viscoelástico e/ou inhomogêneo pulmonar

$\Delta P_{tot,L}$ = variação total de pressão pulmonar

$P_{max,L}$ = pressão pulmonar máxima atingida

$P_{i,L}$ = pressão pulmonar no ponto de inflexão

$P_{el,L}$ = pressão de retração elástica pulmonar

$E_{st,L}$ = elastância estática do pulmão

E_{dyn} = elastância dinâmica do pulmão

$\Delta E, L$ = variação de elastância

V_T = volume corrente

TI = tempo inspiratório

V' = fluxo inspiratório

Assim, com os camundongos paralisados e ventilados artificialmente, as vias aéreas foram ocluídas ao final da inspiração, permitindo analisar separadamente os componentes elásticos, resistivos e viscoelásticos e/ou inomogêneos pulmonares. Os parâmetros da mecânica respiratória foram obtidos através da captação de 15 ciclos respiratórios, pelo método da oclusão ao final da inspiração (BATES e COLS., 1985; 1988; KOCHI e COLS., 1988a e 1988b). Os transdutores conectados ao pneumotacógrafo e a cânula traqueal registraram os sinais de V' e PL, respectivamente. As respostas de freqüências dos sistemas de registro da PL foram estáveis até 20 Hz. Em seguida, os sinais foram condicionados, filtrados [SCIREQ[®] *Scientific Respiratory Equipment Inc.* (SC-24), Montreal, Canadá], convertidos em sinais digitais por um conversor analógico-digital de 12-bitz (DT-2801A, *Data Translation*, Malboro, MA, EUA) e amostrados a uma freqüência de 200 Hz.. Os sinais foram armazenados em microcomputador (PC-AT, IBM, Armonk, NY, EUA), utilizando-se o software LABDAT (RHT-InfoData, Montreal, Canadá). Todos os dados foram coletados pelo programa LABDAT (RHT-InfoData Inc., Montreal, Quebec, Canada) e gravados em disquetes magnéticos para posterior análise (*off line*), que foi realizada pelo programa ANADAT (RHT-InfoData, Montreal, Canadá). A

montagem experimental pode ser demonstrada esquematicamente na Figura 10.

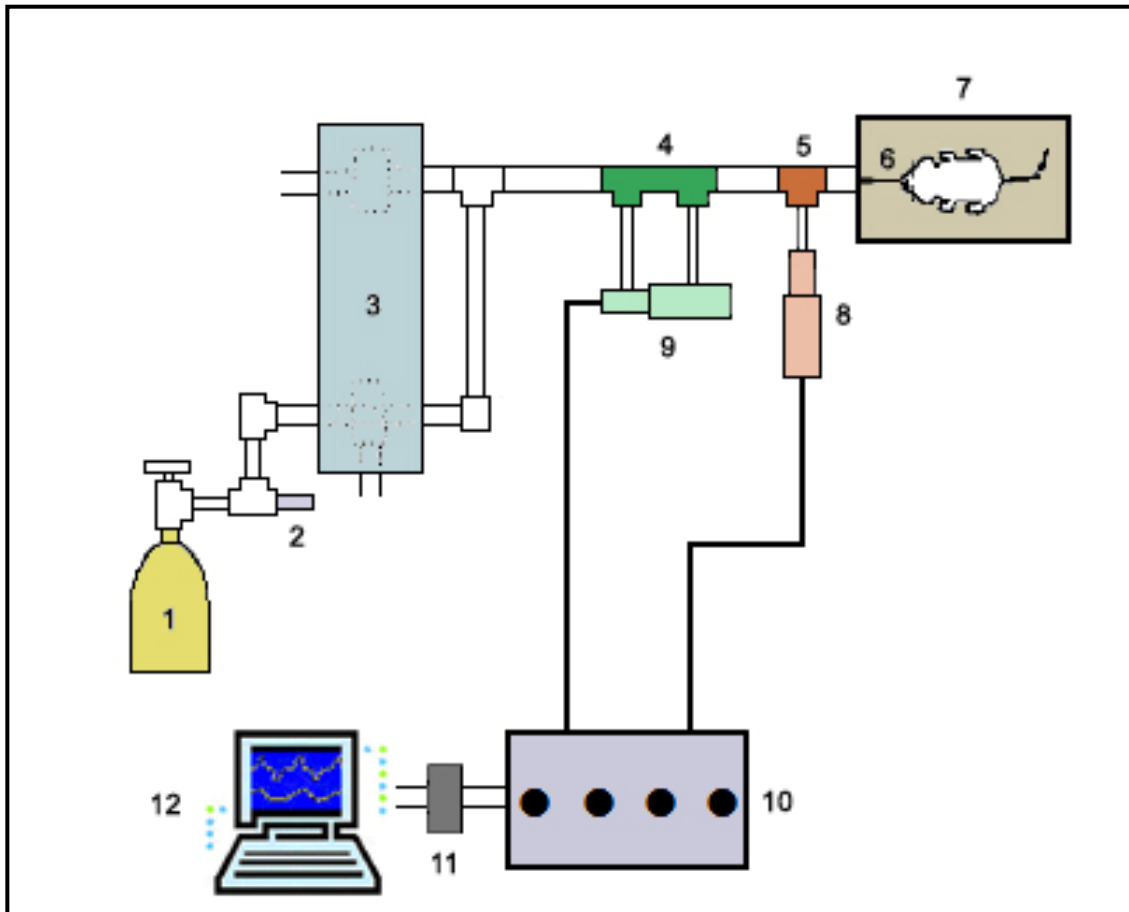


Figura 10. Montagem experimental consistindo em: (1) cilindro de ar comprimido, (2) rotâmetro de agulha, (3) ventilador de fluxo inspiratório constante composto por duas válvulas solenóides, (4) pneumotacógrafo, (5) peça em T, (6) cânula traqueal, (7) mesa cirúrgica, (8) transdutor de pressão traqueal, (9) transdutor diferencial de pressão para medida de fluxo, (10) polígrafo de oito canais, (11) dois filtros, (12) microcomputador.

A resistência total do equipamento (R_{eq}), incluindo a cânula traqueal, foi previamente aferida através da aplicação de diferentes fluxos de ar ao sistema (até fluxos de 26 mL/s; bem acima da faixa de fluxo a ser utilizada nos experimentos), com concomitante registro das variações de pressão (ΔP). Uma vez que $R_{eq} = \Delta P/V'$, a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva $\Delta P \times V'$. A R_{eq} mensurada foi de 0,12 cmH₂O/mL.s. A pressão resistiva determinada pelo equipamento ($= R_{eq} \cdot V'$) foi subtraída das pressões resistivas do pulmão, de tal forma que os resultados representam as propriedades mecânicas intrínsecas.

Após a mensuração da mecânica respiratória foi injetado na veia cava inferior 1 mL de heparina e, após 1 minuto, o animal foi imediatamente sacrificado por seção da aorta abdominal e veia cava inferior, e a traquéia ocluída ao final da expiração com um fio de algodão. A porção abdominal do esôfago foi identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática e as estruturas do pescoço foram dissecadas permitindo a liberação das vias aéreas. A pinça que prendia o esôfago foi suavemente tracionada para cima, permitindo separar o bloco coração-pulmões das demais estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traquéia foi seccionada acima do local ligado pelo fio de algodão e o esôfago e o coração foram separados do conjunto por leve tração, restando apenas os pulmões e as vias aéreas. O conjunto (pulmões-vias aéreas) foi separado para posterior estudo histológico. Dois fragmentos do pulmão direito (lobo inferior) foram retirados e colocados em solução de glutaraldeído por vinte e quatro horas e em seguida colocados em sacarose 5% para microscopia eletrônica.

IV.6. Estudo da Histologia e Morfometria Pulmonares

IV.6.a. Microscopia Óptica

- Fixação e Preparo das Lâminas

Com os pulmões isolados, o brônquio fonte esquerdo e direito foram ocluídos por nó com linha de algodão e separados um do outro manualmente com lâmina de bisturi. Os pulmões esquerdos (ocluídos ao término da expiração), que são inteiros, foram congelados através de imersão, por aproximadamente 3 minutos, em nitrogênio líquido, retirados e mantidos em solução fixadora de paraformaldeído a temperatura ambiente por 48 horas. Após este período o material foi desidratado progressivamente através de imersões crescentes em soluções com concentrações crescentes de etanol até atingir a concentração de 100% do mesmo.

Depois da desidratação, o material foi embebido em xylol fazendo com que as peças fiquem translúcidas. Em seguida, o material foi mergulhado em parafina fundida, a 60°C, no interior de uma estufa por aproximadamente 1 hora. Colocou-se a peça e um pouco de parafina fundida num recipiente de forma retangular de metal e foi deixado solidificar a temperatura ambiente, formando um bloco de parafina (inclusão). Os blocos de parafina foram seccionados pela navalha de aço do micrótomo e cortes de 4 µm de espessura foram realizados. Esses cortes foram estirados em água quente e depois colocados nas lâminas sendo posteriormente procedida coloração pela hematoxilina e eosina (HE).

- Análise Histológica e Morfométrica

As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia óptica (Olympus corp; BX51; Tóquio, Japão), segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos. Para a análise descritiva, a superfície total da lâmina foi observada com todas as estruturas pulmonares representadas em aumento de 100x.

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (*"point-counting"*) (WEIBEL, 1990), utilizando-se uma ocular acoplada ao microscópio, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo (Figura 11). Foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina, em um aumento de 200x. Foi quantificada a fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados. Pontos que caírem sobre área de tecido e não nos espaços alveolares foram computados e divididos pelo número total de pontos.

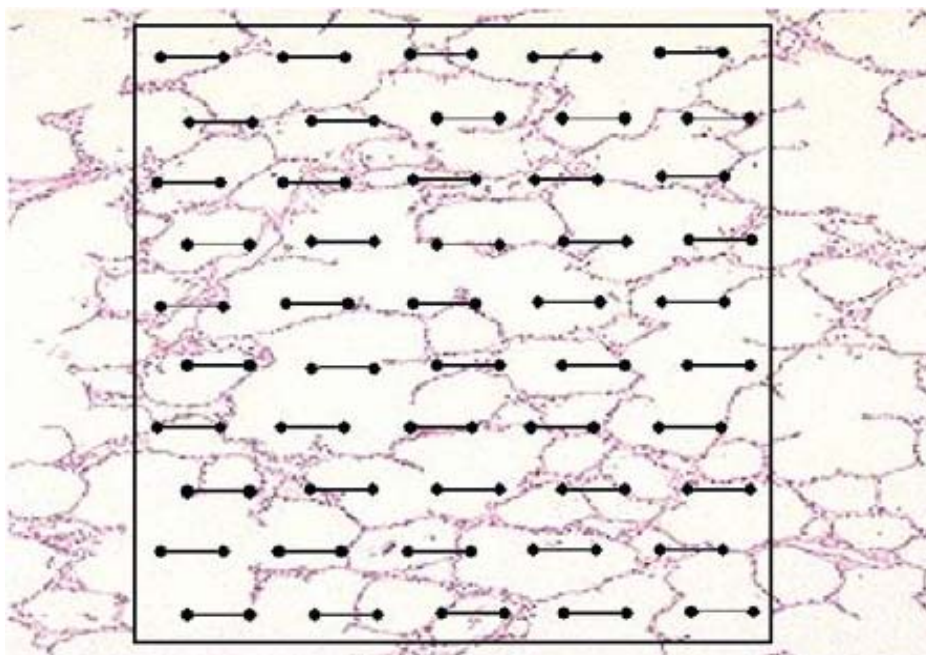


Figura 11. Retículo de 100 pontos e 50 linhas, utilizado para estudo da morfometria pulmonar.

As lâminas também foram coradas com métodos específicos para quantificação de fibras colágenas no tecido pulmonar.

- Fibras Colágenas

Os tecidos foram corados em solução de *Sirius Red* dissolvido em solução saturada de ácido pícrico e observados sob microscopia de luz polarizada, uma vez que a acentuação da birrefringência do colágeno promovida pelo método de polarização de picrosirius é específica para estruturas colágenas (MONTES, 1996).

A quantificação de fibras colágenas no parênquima pulmonar foi feita utilizando-se o *software* Image-Pro[®] Plus 4.1 para Windows[®] (Media Cybernetics – Silver Spring, MD, EUA), um computador conectado a uma câmera digital (Sony Trinitron CCD, Sony, Tokyo, Japão) que está acoplada a um microscópio óptico (Olympus corp; BX51; Tóquio, Japão). A área ocupada pelas fibras colágenas foi determinada por densitometria digital. Brônquios e vasos sanguíneos foram excluídos das medidas. Para evitar qualquer erro devido a áreas de colapso alveolar, as áreas ocupadas pelas fibras colágenas foram divididas pelo comprimento do septo estudado. Os resultados foram expressos como quantidade de fibras colágenas por unidade de comprimento septal ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$).

IV.6.b. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a análise por microscopia eletrônica foram retirados dois fragmentos de parênquima pulmonar do pulmão direito (lobulado) com as seguintes dimensões 0,2x0,2x0,2 cm. Os fragmentos foram colocados em glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4, por 2 h, sendo

posteriormente lavados em solução de sacarose, constituída de 4,5 g de NaCl e 8,9 g de sacarose diluídos em 500 mL de água destilada, até a pós-fixação. A seguir, os fragmentos foram imersos em solução de tetróxido de ósmio (1% em água, contendo 133 mg de sacarose por mL) por 2 h. Após a lavagem em água bidestilada as preparações foram colocadas na geladeira em acetato de uranila 0,5% contendo 133 mg de sacarose, por um tempo que variou de 2 a 24 h. O processo foi continuado, efetuando-se a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, progredindo gradativamente até álcool absoluto, sendo, então, o tecido passado em óxido de propileno por 15 minutos (2 vezes). Iniciando a fase de embebição, as amostras foram colocadas em misturas de partes iguais de óxido de propileno e resina (araldite). Os frascos contendo os fragmentos foram colocados para girar (1 rotação a cada 4 minutos, por 1 hora). Posteriormente, as peças foram colocadas por 16 h em resina, com a seguinte composição: 10 mL de araldite (Cy-205), 8 mL de endurecedor DDSA (anidrido de ácido doxecenil succínico), 0,5 mL de acelerador (N-benzildimetilamina) e 0,1 mL de plastificante (dibutilftaltato). Ao término de 16 h, as amostras foram colocadas em moldes de silicone com nova resina, para polimerização em estufa a 60°C, por 5 dias. Concluída a polimerização, os espécimes foram aparados e cortes semifinos obtidos com o ultramicrótomo Porter Blum MT2 (Reichert ultracult S). Tais cortes, com 0,5 μm de espessura foram montados em lâminas de vidro e corados com uma mistura de azul de metileno a 1% e azur II, em partes iguais e a quente. Nestes cortes, selecionamos áreas representativas das lesões. De cada espécime, 2 blocos, contendo aproximadamente 10 fragmentos cada um, foram submetidos à análise para seleção dos cortes ultrafinos.

Para o estudo ultraestrutural, os cortes ultrafinos com espessura em torno de 90 nanômetros foram contrastados pelo acetato de uranila a 2% durante 30 minutos e, finalmente, por citrato de chumbo por 10 minutos. A observação dos cortes e as eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico JEOL (JEOL, JSM-6100F; Tóquio, Japão).

IV.7. Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada no programa SigmaStat® para Windows® (V.3.0). Diferenças temporais no modelo de lesão pulmonar aguda foram comparadas através da análise de variâncias (one-way ANOVA). Diferenças entre os grupos tratados com células mononucleares de medula óssea foram comparadas através da análise de variância (two way ANOVA) seguido do teste de Tukey. Os parâmetros apresentados em forma percentual foram submetidos à transformação arco-seno, a fim de tornar sua distribuição próxima ao normal, permitindo assim os testes de variância paramétricos. O grau de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

V. Resultados

V.1. Modelo de Lesão Pulmonar Aguda

V.1. a. Mecânica Pulmonar

Na tabela 3 observam-se os valores de volume corrente e fluxo aéreo. Esses parâmetros não diferiram significativamente entre os grupos estudados.

A análise da mecânica pulmonar permitiu avaliar o comportamento funcional dos animais Controle [(C), injeção de salina intra-peritoneal (i.p.)] e dos animais submetidos à lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por Paraquat (10 mg/Kg i.p.). Os parâmetros da mecânica pulmonar foram significativamente diferentes em relação ao grupo Controle (Tabelas 4 e 5; Figuras 12, 13 e 14).

As elastâncias estática, dinâmica e variação de elastância dos pulmões (Est,L, Edyn,L e $\Delta E,L$, respectivamente) foram maiores nos grupos com LPA do que no C independentemente do tempo de análise (24h, 1, 2 ou 4 semanas). Nos animais analisados após quatro semanas da injeção de paraquat (LPA-4), houve redução significativa das elastâncias estática (Est, L) e dinâmica (Edyn,L) quando comparado aos demais grupos com LPA (24h, 1 e 2 semanas). Entretanto, tais valores continuaram maiores do que no grupo C (Tabela 4 e Figura 12).

ΔP_{tot} , ΔP_1 e ΔP_2 dos pulmões dos grupos com LPA são apresentados na Tabela 5 e nas Figuras 13 e 14. No que tange à ΔP_{tot} , ΔP_1 e ΔP_2 , houve aumento em todos os grupos com LPA em relação ao C, independentemente da análise temporal. Ademais, o aumento observado em ΔP_{tot} foi devido ao incremento tanto de ΔP_1 como de ΔP_2 . ΔP_2 se elevou mais em 1 semana em relação aos demais tempos.

Tabela 3. Volume corrente e fluxo aéreo em camundongos controle e com lesão pulmonar aguda ventilados mecanicamente.

	Volume (mL)	Fluxo (mL/s)
Grupos		
C	0,20 ± 0,01	1,00 ± 0,01
LPA 24	0,19 ± 0,00	1,01 ± 0,00
LPA 1	0,20 ± 0,00	1,00 ± 0,00
LPA 2	0,21 ± 0,00	1,01 ± 0,00
LPA 4	0,21 ± 0,01	0,98 ± 0,02

Os valores representam média ± erro padrão da média (EPM) de 6 camundongos. Volume: volume corrente (mL); Fluxo: fluxo inspiratório (mL/s). C, grupo controle que recebeu salina intra-peritoneal (i.p); LPA, animais que receberam paraquat (10 mg/kg i.p.). LPA 24 = 24 horas após injeção de paraquat; LPA 1 = uma semana após injeção do paraquat; LPA 2 = duas semanas após injeção do paraquat e LPA 4 = quatro semanas após injeção do paraquat.

Tabela 4. Elastâncias estática e dinâmica e variação de elastâncias dos pulmões em camundongos controle e com lesão pulmonar aguda.

	Est,L (cmH ₂ O/mL)	Edyn,L(cmH ₂ O/mL)	ΔE (cmH ₂ O/mL)
Grupos			
C	23,62 ± 1,11	26,50 ± 1,16	2,89 ± 0,11
LPA 24	33,18 ± 1,28*	36,74 ± 1,39*	3,56 ± 0,16*
LPA 1	33,47 ± 1,05*	37,77 ± 1,09*	4,30 ± 0,26*#
LPA 2	31,60 ± 1,78*	35,27 ± 1,95*	3,67 ± 0,22*
LPA 4	26,17 ± 1,04*#	29,80 ± 1,11*#	3,62 ± 0,10*

Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) de 6 camundongos/grupo com 12 determinações por animal. Elastância estática pulmonar (Est,L) dos grupos: C (animais que receberam salina intraperitonealmente) e LPA (camundongos que receberam paraquat, 10 mg/kg i.p.). LPA 24 = 24 horas após indução de LPA, LPA 1 = uma semana após indução de LPA, LPA 2 = duas semanas após indução de LPA e LPA 4 = quatro semanas após indução de LPA. *Significativamente diferente de C (p<0,05). #Significativamente diferente de LPA 24 (p<0,05).

Tabela 5. Variações de pressões dos pulmões em camundongos controle e com lesão pulmonar aguda.

	$\Delta P1,L$ (cmH ₂ O)	$\Delta P2,L$ (cmH ₂ O)	$\Delta P_{tot,L}$ (cmH ₂ O)
Grupos			
C	0,40 ± 0,03	0,59 ± 0,02	0,98 ± 0,03
LPA 24	0,60 ± 0,03*	0,69 ± 0,03*	1,29 ± 0,06*
LPA 1	0,48 ± 0,03*	0,88 ± 0,06*#	1,36 ± 0,06*
LPA 2	0,58 ± 0,01*	0,77 ± 0,05*	1,35 ± 0,06*
LPA 4	0,55 ± 0,05*	0,75 ± 0,01*	1,30 ± 0,04*

Os valores representam média ± erro padrão da média (EPM) de 6 camundongos/grupo. Foram realizadas 12 determinações por animal. ΔP_{tot} , $\Delta P1$ e $\Delta P2$ = variações de pressão total, dissipada para vencer os componentes viscosos e viscoelásticos, respectivamente. C (animais que receberam salina intraperitonealmente) e LPA (camundongos que receberam paraquat, 10 mg/kg i.p.). LPA 24 = 24 horas após indução de LPA, LPA 1 = uma semana após indução de LPA, LPA 2 = duas semanas após indução de LPA e LPA 4 = quatro semanas após indução de LPA. *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$). #Significativamente diferente de LPA 24 ($p < 0,05$).

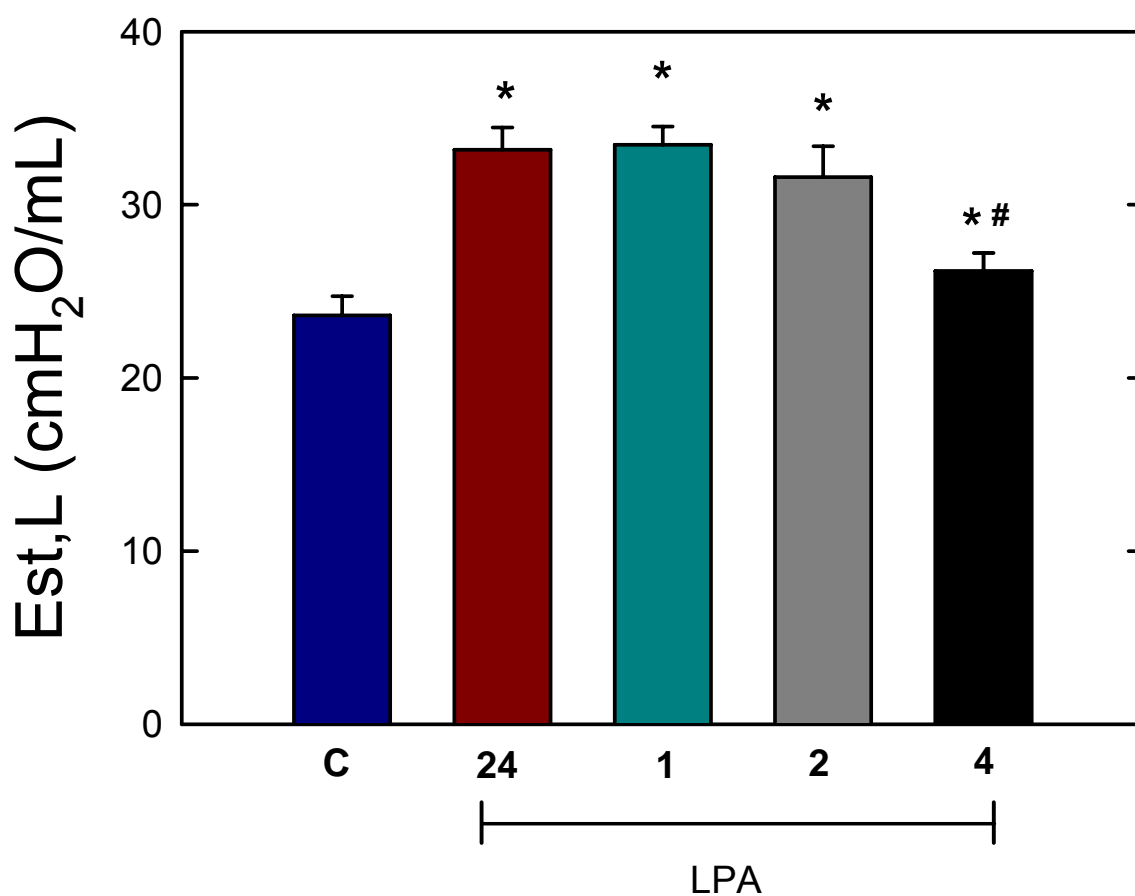


Figura 12 – Elastância estática pulmonar (Est,L) dos grupos: C (animais que receberam salina intraperitonealmente) e LPA (camundongos que receberam paraquat, 10 mg/kg i.p.). LPA 24 = 24 horas após indução de LPA, LPA 1 = uma semana após indução de LPA, LPA 2 = duas semanas após indução de LPA e LPA 4 = quatro semanas após indução de LPA. As barras correspondem a média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 camundongos/grupo com 12 determinações por animal. *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$). #Significativamente diferente de LPA 24 ($p < 0,05$).

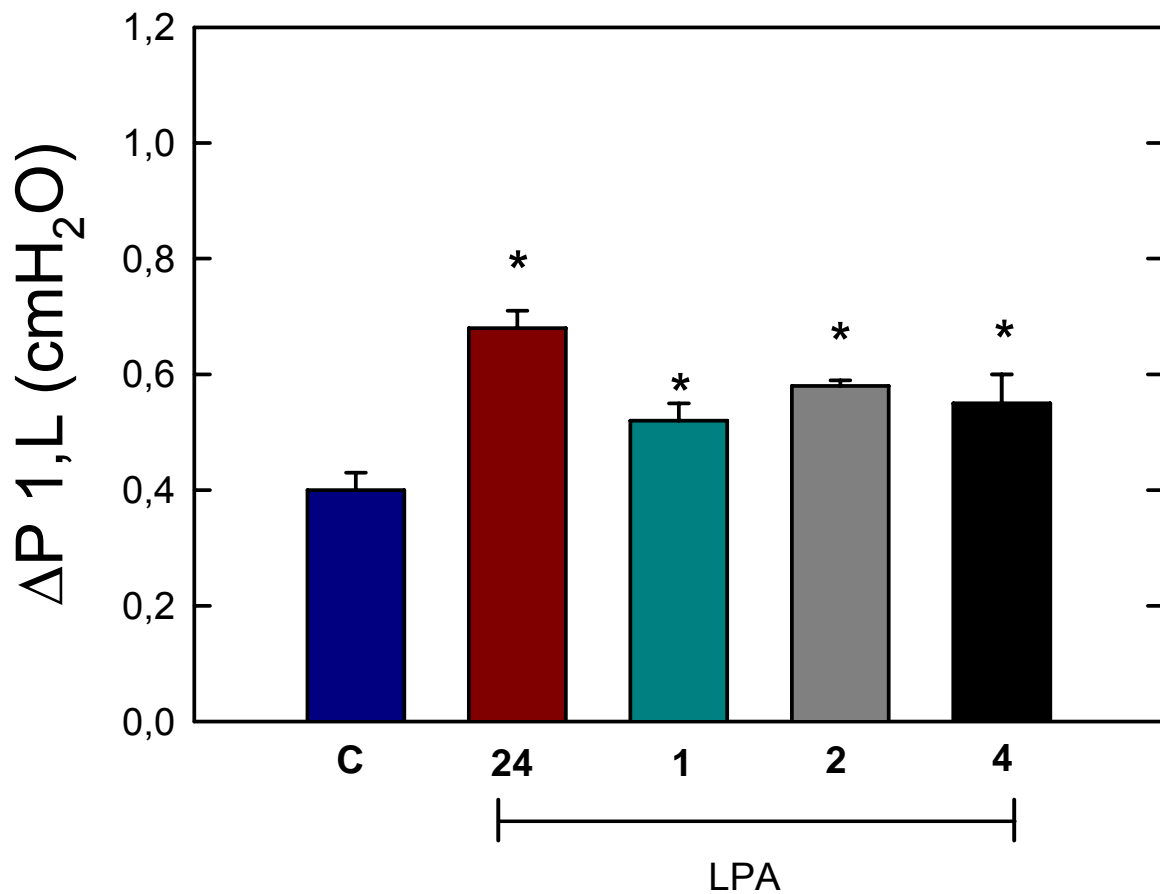


Figura 13 – Variação de pressão resistiva pulmonar ($\Delta P_{1,L}$) dos grupos: C (animais que receberam salina intraperitonealmente) e LPA (camundongos que receberam paraquat, 10 mg/kg i.p.). LPA 24 = 24 horas após indução de LPA, LPA 1 = uma semana após indução de LPA, LPA 2 = duas semanas após indução de LPA e LPA 4 = quatro semanas após indução de LPA. As barras correspondem a média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 camundongos/grupo com 12 determinações por animal. *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$).

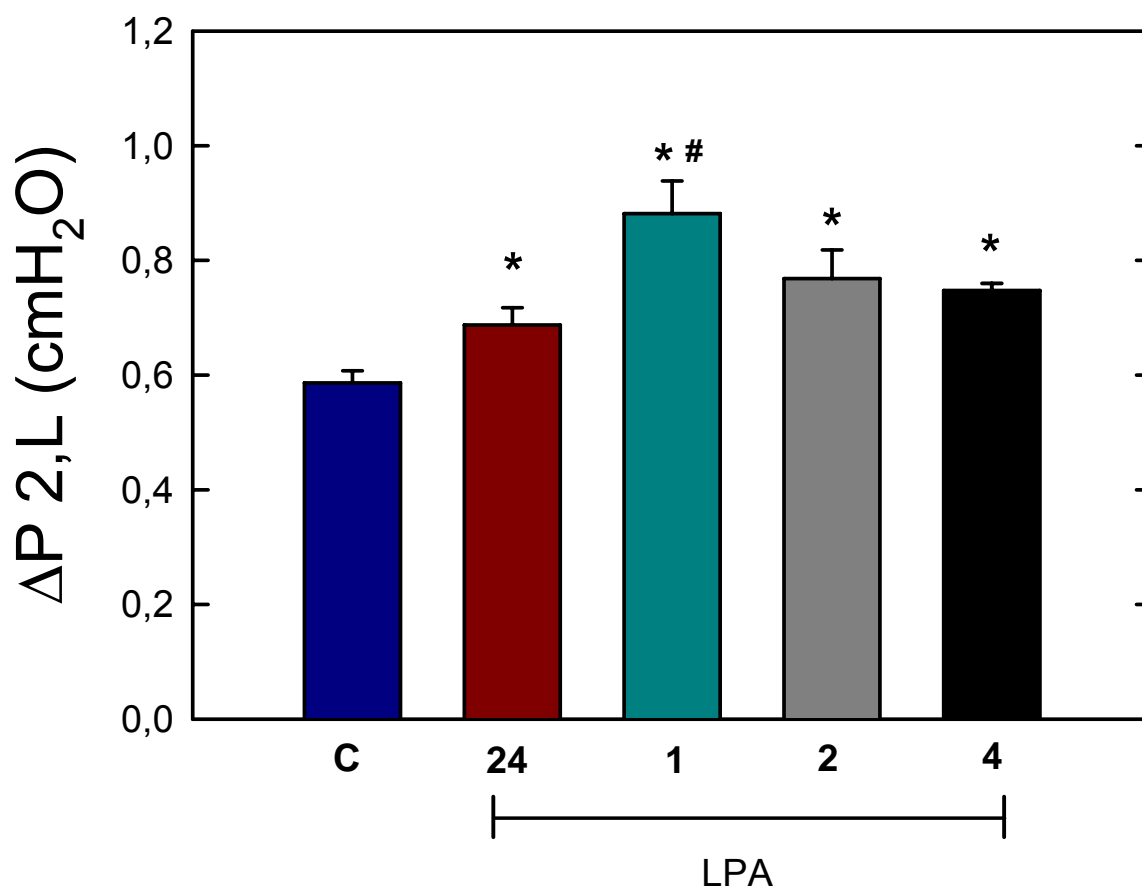


Figura 14 – Variação de pressão viscoelástica pulmonar ($\Delta P_{2,L}$) dos grupos: C (animais que receberam salina intraperitonealmente) e LPA (camundongos que receberam paraquat, 10 mg/kg i.p.). LPA 24 = 24 horas após indução de LPA, LPA 1 = uma semana após indução de LPA, LPA 2 = duas semanas após indução de LPA e LPA 4 = quatro semanas após indução de LPA. As barras correspondem a média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 camundongos/grupo com 12 determinações por animal. *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$). #Significativamente diferente de LPA 24 ($p < 0,05$).

V.1.b. Microscopia Óptica

V.1.b.1. Análise Morfométrica

A fração de área de colapso alveolar aumentou significativamente no grupo que recebeu paraquat intra-peritonealmente (LPA) em relação ao grupo controle (C), (Tabela 6 e Figura 15).

Na fotomicrografia do parênquima pulmonar constataram-se atelectasias, espessamento do septo alveolar e edema intersticial nos grupos LPA sem modificação significativa entre os diferentes tempos (Figura 16).

Tabela 6 – Fração de área de alvéolos normais e colapsados nos grupos Controle (C) e com Lesão Pulmonar Aguda nos diferentes tempos (LPA).

Grupos	% Alvéolos Normais	% Alvéolos Colapsados
	C	83,24 ± 2,03
LPA 24	47,96 ± 4,05*	36,33 ± 6,95*
LPA 1	52,75 ± 2,08*	40,51 ± 3,31*
LPA 2	62,14 ± 1,79*	37,37 ± 1,60*
LPA 4	70,16 ± 0,78*	29,79 ± 0,75*

Fração de alvéolos normais e colapsados nos grupos Controle (C) e com Lesão Pulmonar Aguda (LPA). C, grupo controle de animais que receberam salina intraperitoneal (i.p.); LPA, animais que receberam paraquat (10 mg/Kg i.p.) submetidos à análise temporal. LPA 24 = camundongos com análise 24h após injeção; LPA 1 = uma semana após injeção; LPA 2 = duas semanas após injeção e LPA 4 = quatro semanas após injeção de paraquat. Os valores representam média ± erro padrão da média dos grupos com 6 camundongos/grupo com 10 campos analisados por animal. * Valores significativos ($p < 0,05$) em relação ao grupo C.

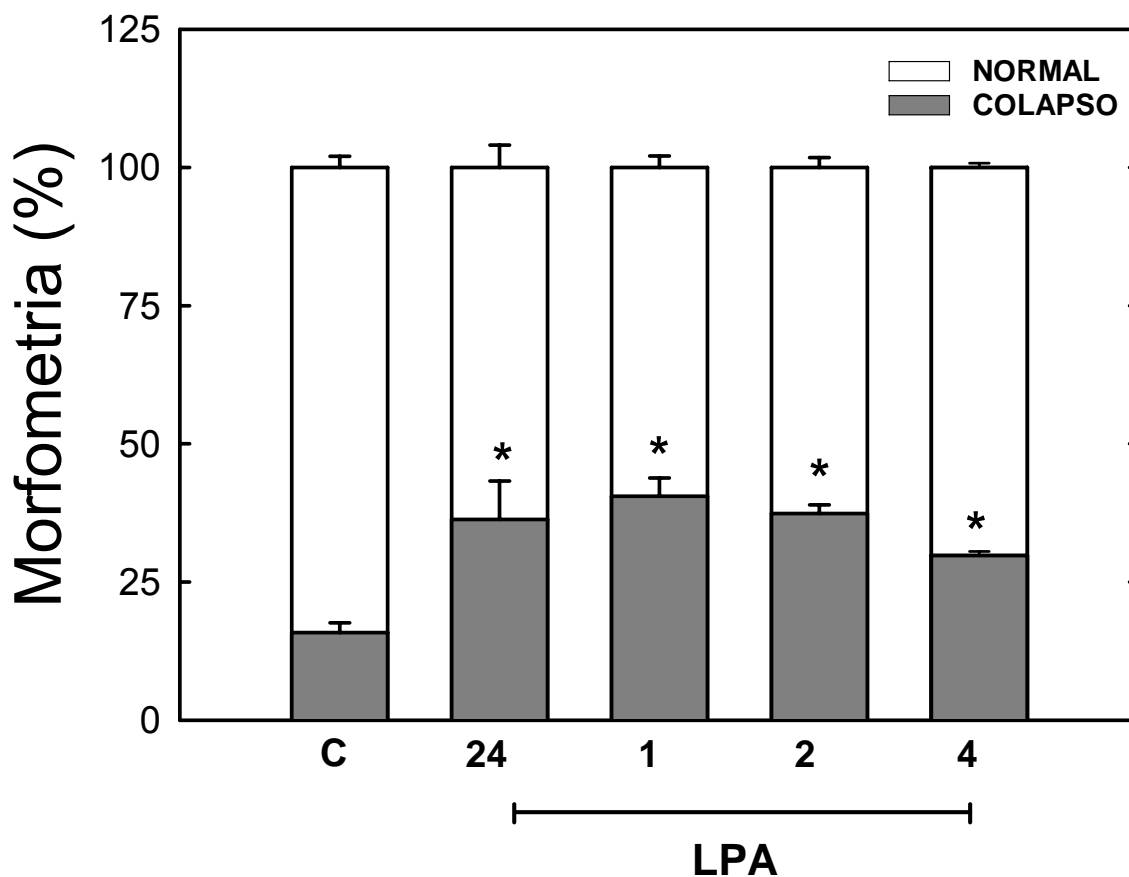


Figura 15 – Fração de alvéolos normais e colapsados nos grupos Controle (C) e com Lesão Pulmonar Aguda (LPA). C, grupo controle de animais que receberam salina intraperitoneal (i.p.); LPA, animais que receberam paraquat (10 mg/Kg i.p.). LPA 24 = 24h após injeção; LPA 1 = uma semana após injeção; LPA 2 = duas semanas após injeção e LPA 4 = quatro semanas após injeção de paraquat. Os valores representam média \pm erro padrão da média dos grupos com 6 camundongos/grupo com 10 campos por animal 1 lâmina.

* Valores significativos ($p < 0,05$) em relação ao grupo C.

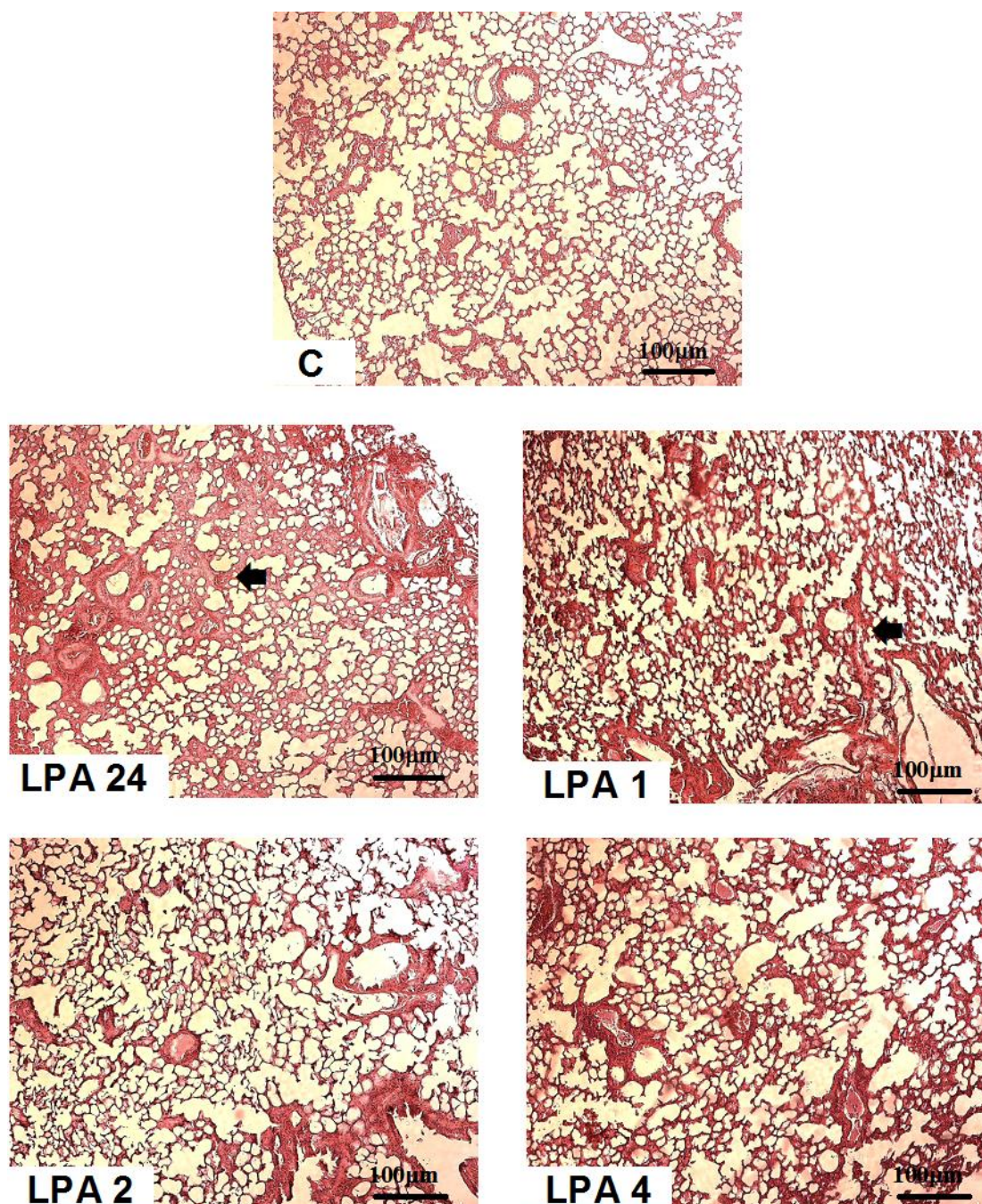


Figura 16 – Fotomicrografias de tecido pulmonar nos grupos Controle (C) e com Lesão Pulmonar Aguda (LPA). C, grupo controle; LPA, animais que receberam paraquat. LPA 24 = 24h, LPA 1 = 1 semana, LPA 2 = 2 semanas e LPA 4 = 4 semanas após injeção de paraquat. Aumento de 200X. Barra de aumento 100 µm. Coloração hematoxilina e eosina (HE). As setas em negrito indicam o colapso alveolar.

V.1.c. Quantificação de Fibras Colágenas

A lesão pulmonar aguda induzida por paraquat acarretou aumento do conteúdo de fibras colágenas por área de septo nos grupos 24 h e 1 semana, em comparação aos demais grupos (Figura 17 e Tabela 7).

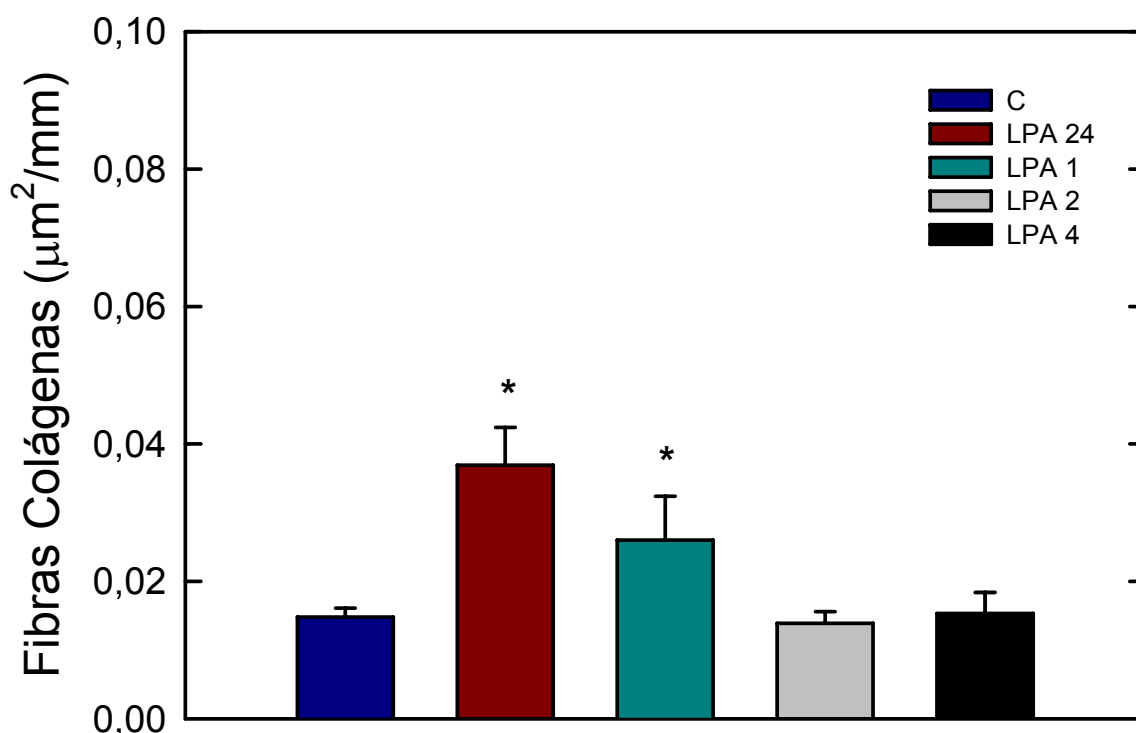


Figura 17. Conteúdo de fibras colágenas por comprimento de septo ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) nos grupos dos grupos: C (animais que receberam salina intraperitonealmente) e LPA (camundongos que receberam paraquat, 10 mg/kg i.p.). LPA 24 = 24 horas após indução de LPA, LPA 1 = uma semana após indução de LPA, LPA 2 = duas semanas após indução de LPA e LPA 4 = quatro semanas após indução de LPA. As barras correspondem a média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 camundongos/grupo (10 campos/animal). *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$).

Tabela 7. Quantificação de colágeno por comprimento de septo ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) em camundongos Controle (C) e com Lesão Pulmonar Aguda (LPA).

Fibras Colágenas ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)	
Grupos	
C	0,02 \pm 0,00
LPA 24	0,04 \pm 0,01*
LPA 1	0,03 \pm 0,01*
LPA 2	0,01 \pm 0,01
LPA 4	0,02 \pm 0,01

Quantificação do colágeno por comprimento de septo nos grupos Controle (C) e Lesão Pulmonar Aguda (LPA) nos diferentes tempos. LPA 24 = 24h; LPA 1 = 1 semana; LPA 2 = 2 semanas e LPA 4 = 4 semanas após injeção intraperitoneal de paraquat. Os valores correspondem a média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 camundongos/grupo (10 campos/animal). *Significativamente diferente de C ($p < 0,05$).

V. Resultados

V.2. Tratamento com Células Mononucleares de Medula Óssea

V.2. a. Mecânica Pulmonar

Na tabela 8 observam-se os valores de volume corrente e fluxo aéreo. Esses parâmetros não diferiram significativamente entre os grupos estudados.

A análise da mecânica pulmonar permitiu avaliar o comportamento funcional dos animais Controle (C) e daqueles submetidos à lesão pulmonar aguda por paraquat [(10 mg/kg i.p., LPA)] tratados com salina (SAL) ou células mononucleares derivadas da medula óssea (2×10^6) (CEL) (Figuras 18, 19 e 20, Tabelas 9 e 10).

As elastâncias estática (Est,L) e dinâmica (Edyn,L), a variação de elastância (ΔE) e as pressões necessárias para vencer os componentes resistivos ($\Delta P1,L$) e viscoelástico/inomogêneo ($\Delta P2,L$) foram maiores no grupo com lesão pulmonar aguda (LPA– SAL) do que no controle tratado com salina (C - SAL). O tratamento com a injeção de 2×10^6 células mononucleares de medula óssea (LPA – CEL) impediu as modificações de Est,L, Edyn,L, e $\Delta P1,L$, porém evitou as alterações em $\Delta P2,L$ e $\Delta E,L$ (Tabelas 9 e 10 / Figuras 18 a 20).

Tabela 8. Volume corrente e fluxo aéreo em camundongos controle e com lesão pulmonar aguda tratados com salina ou células mononucleares de medula óssea.

	Volume (mL)	Fluxo (mL/s)
Grupos		
C – SAL	0,20 ± 0,00	1,00 ± 0,01
C – CEL	0,20 ± 0,01	1,00 ± 0,00
LPA – SAL	0,21 ± 0,00	1,00 ± 0,00
LPA – CEL	0,20 ± 0,00	1,00 ± 0,00

Os valores representam média ± erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. Volume: volume corrente; Fluxo: fluxo inspiratório. C – animais que receberam salina intraperitoneal (i.p.). LPA – animais que receberam paraquat (10 mg/kg) i.p. Os animais dos grupos C e LPA foram tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL) 1 hora após injeção de salina ou paraquat e estudados após uma semana.

Tabela 9. Elastâncias estática, dinâmica e variação de elastâncias em camundongos controle e com lesão pulmonar aguda tratados com salina ou células mononucleares de medula óssea.

	Est,L (cmH ₂ O/mL)	Edyn,L(cmH ₂ O/mL)	ΔE (cmH ₂ O/mL)
Grupos			
C – SAL	23,62 ± 1,11	26,50 ± 1,16	2,88 ± 0,11
C – CEL	23,16 ± 2,72	25,89 ± 2,98	2,73 ± 0,28
LPA – SAL	32,68 ± 1,90*	37,30 ± 1,90*	4,62 ± 0,17*
LPA - CEL	22,44 ± 2,04	25,76 ± 2,19	3,32 ± 0,27

Os valores representam média ± erro padrão da média (EPM) de 6 camundongos/grupo. Foram realizadas 12 determinações por animal. Est, elastância estática; Edyn, elastância dinâmica; ΔE, variação de elastâncias. C – animais que receberam salina intraperitoneal (i.p.). – animais que receberam paraquat (10 mg/kg) i.p. Os animais dos grupos C e LPA foram tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL) 1 hora após injeção de salina ou paraquat e estudados após uma semana..
*Significativamente diferente dos demais grupos (p<0,05).

Tabela 10. Variações de pressões dos pulmões em camundongos controle e com lesão pulmonar aguda tratados com salina ou células mononucleares de medula óssea.

	$\Delta P1,L$ (cmH ₂ O)	$\Delta P2,L$ (cmH ₂ O)	$\Delta P_{tot},L$ (cmH ₂ O)
Grupos			
C – SAL	0,40 ± 0,03	0,59 ± 0,02	0,98 ± 0,03
C – CEL	0,43 ± 0,03	0,54 ± 0,04	0,97 ± 0,07
LPA – SAL	0,46 ± 0,02*	0,93 ± 0,04*	1,39 ± 0,04*
LPA - CEL	0,43 ± 0,01	0,67 ± 0,05*#	1,10 ± 0,08

Os valores representam média ± erro padrão da média (EPM) de 6 camundongos/grupo. Foram realizadas 12 determinações por animal. ΔP_{tot} , $\Delta P1$ e $\Delta P2$ = variações de pressão total, dissipada para vencer os componentes viscosos e viscoelásticos, respectivamente. C – animais que receberam salina intraperitoneal (i.p.). LPA – animais que receberam paraquat (10 mg/kg) i.p. Os animais dos grupos C e foram tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL) 1 hora após injeção de salina ou paraquat e estudados após uma semana. *Significativamente diferente de C-SAL e C-CEL (p<0,05). # Significativamente diferente de LPA–SAL (p<0,05).

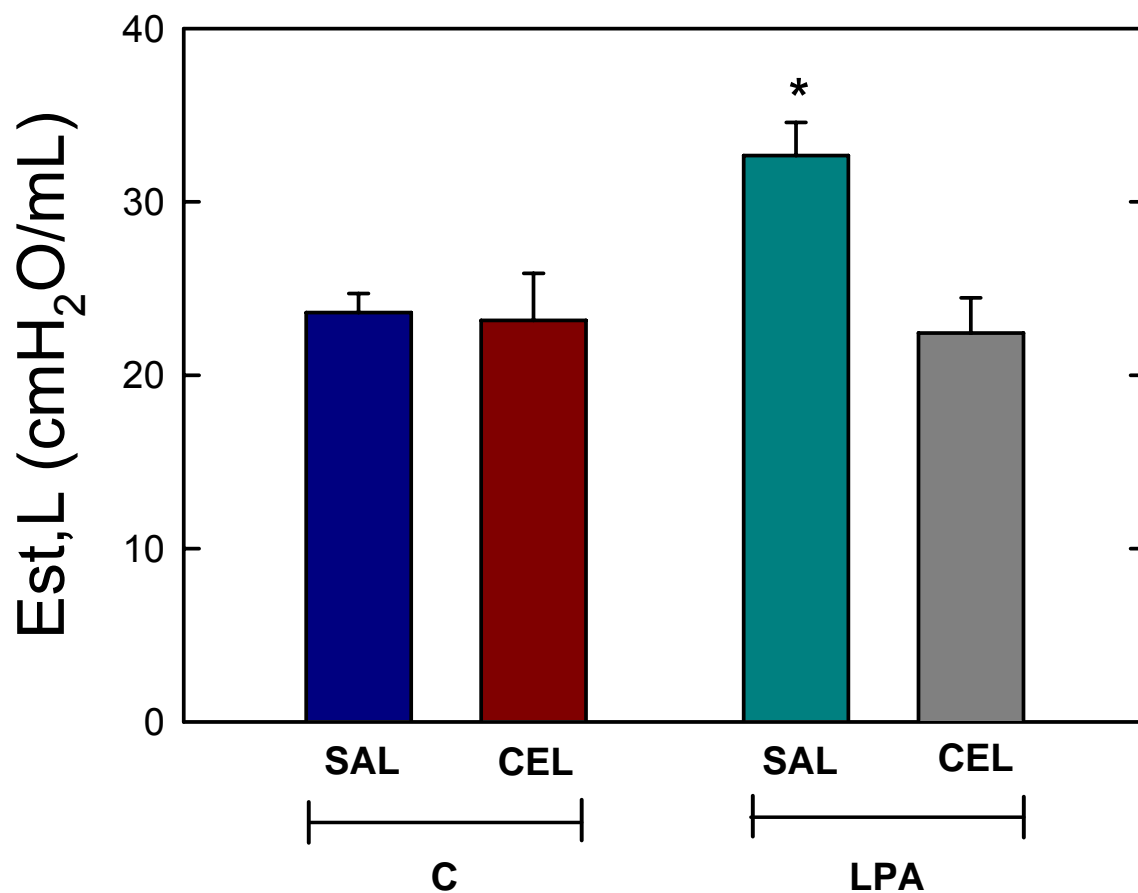


Figura 18 – Elastâncias estática pulmonar (Est,L) dos grupos. C – animais que receberam salina intraperitoneal (i.p.). LPA – animais que receberam paraquat (10 mg/kg) i.p. Os animais dos grupos C e LPA foram tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL) 1 hora após injeção de salina ou paraquat e estudados após uma semana. As barras correspondem a média + erro padrão da média (EPM) de 6 camundongos/grupo. *Significativamente diferente de C-SAL, C-CEL e LPA-CEL ($p < 0,05$).

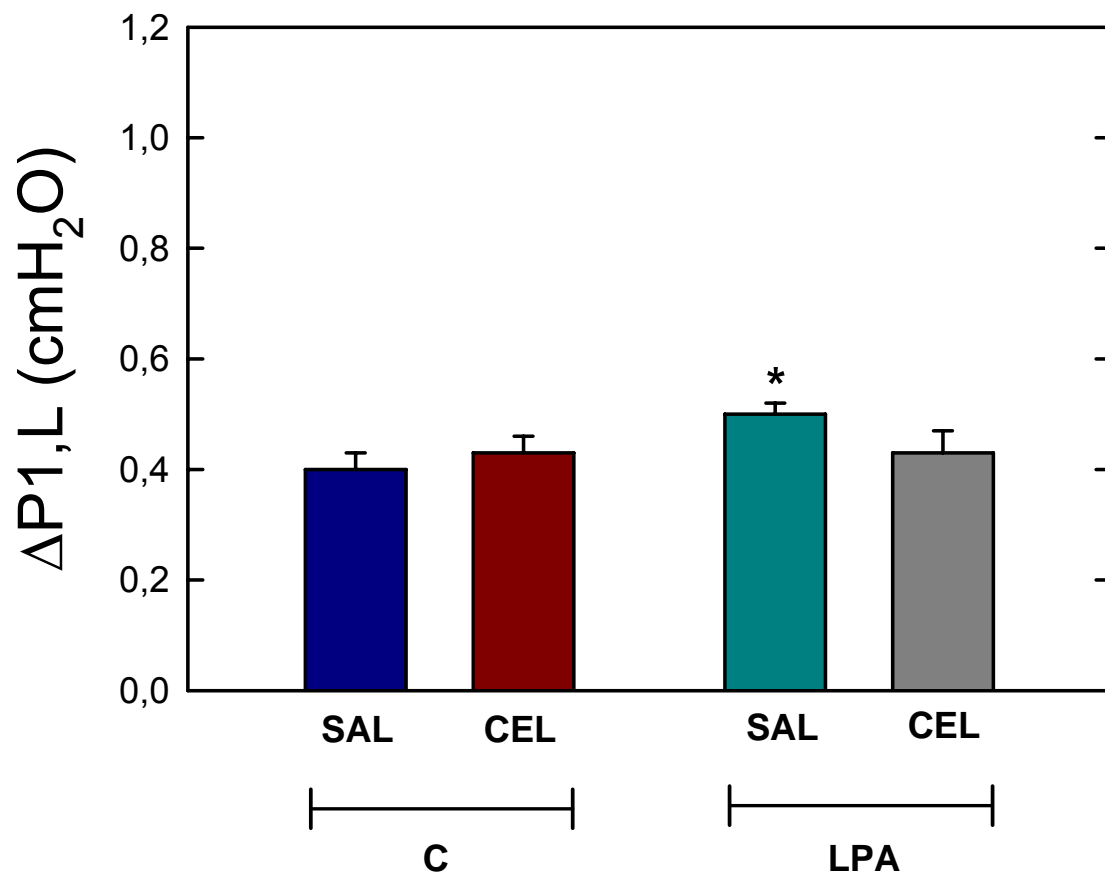


Figura 19 – Variação de pressão pulmonar necessária para vencer os componentes resistivos do pulmão ($\Delta P_{1,L}$). C – animais que receberam salina intraperitoneal (i.p.). LPA – animais que receberam paraquat (10 mg/kg) i.p. Os animais dos grupos C e LPA foram tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL) 1 hora após injeção de salina ou paraquat e estudados após uma semana. As barras correspondem a média + erro padrão da média (EPM) de 6 animais/grupo. *Significativamente diferente do grupo C-SAL, C-CEL e LPA-CEL ($p < 0,05$).

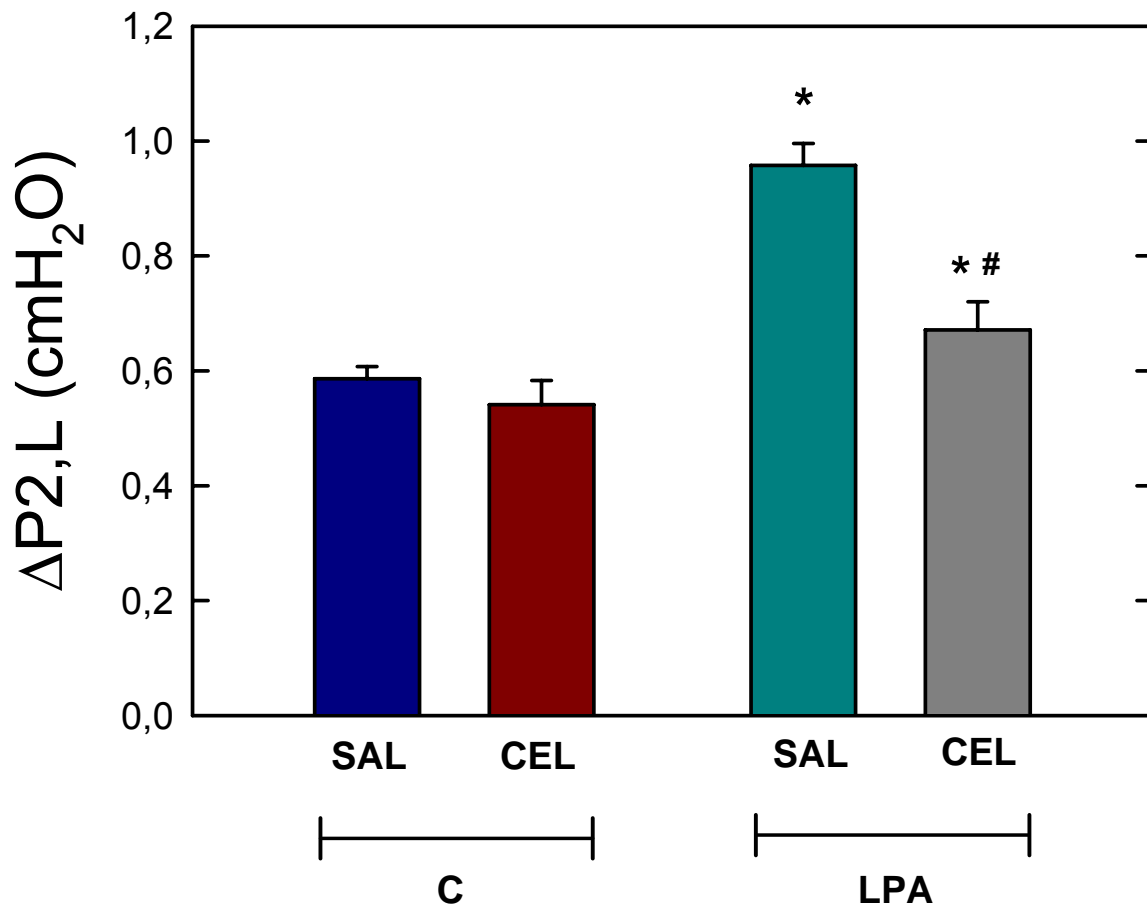


Figura 20 – Variação de pressão pulmonar necessária para vencer os componentes viscoelásticos/inomogêneos do pulmão ($\Delta P_{2,L}$). C – animais que receberam salina intraperitoneal (i.p.). LPA – animais que receberam paraquat (10 mg/kg) i.p. Os animais dos grupos C e LPA foram tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL) 1 hora após injeção de salina ou paraquat e estudados após uma semana. As barras correspondem a média + erro padrão da média (EPM) de 6 animais/grupo. *Significativamente diferente do grupo C-SAL, C-CEL ($p < 0,05$). #Significativamente diferente do grupo LPA-SAL ($p < 0,05$).

V.2.b. Microscopia Óptica

V.2.b.1. Análise Morfométrica

A fração de área de colapso alveolar aumentou significativamente no grupo que recebeu paraquat intra-peritonealmente e tratamento com salina intravenosamente (LPA - SAL) em relação ao grupo controle tratado com salina (C-SAL). Ademais, observou-se diferença significativa do grupo controle tratado com células mononucleares de medula óssea (C - CEL) em relação ao grupo controle injetado salina intravenosamente (i.v.) (C – SAL) (Tabela 11 e Figura 21). O tratamento com células mononucleares de medula óssea minimizou o aumento da fração de alvéolos colapsados nos animais submetidos à lesão pulmonar aguda (LPA –CEL) em relação àqueles tratados com salina (LPA - SAL).

A análise histológica do parênquima pulmonar evidenciou atelectasias, espessamento do septo alveolar e edema intersticial no grupo lesão pulmonar aguda tratado com salina i.v. (LPA – SAL). Tais modificações foram menos relevantes nos animais tratados com células mononucleares de medula óssea (LPA – CEL) (Figura 21).

Tabela 11. Fração de área de alvéolos normais e colapsados em camundongos controle (C) e com lesão pulmonar aguda (LPA) tratados com salina ou células mononucleares da medula óssea

Grupos	% Alvéolos Normais	% Alvéolos Colapsados
	C – SAL	87,73 ± 1,05
C – CEL	79,28 ± 1,08*	20,72 ± 1,08*
LPA – SAL	53,33 ± 1,02**	46,67 ± 1,02**
LPA – CEL	71,45 ± 1,62*#	28,55 ± 1,62* #•

Fração de área de alvéolos normais e colapsados. C – animais que receberam salina intraperitoneal (i.p.). LPA – animais que receberam paraquat (10 mg/kg) i.p. Os camundongos dos grupos C e LPA foram tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL) 1 hora após injeção de salina ou paraquat. Os animais foram submetidos à análise da histologia pulmonar uma semana após injeção intraperitoneal de salina ou paraquat e estudados após uma semana. Os valores representam média ± erro padrão da média de 6 camundongos/grupo (10 campos por animal). *Significativamente diferente do grupo C-SAL (p<0,05). # Significativamente diferente do grupo LPA-SAL (p<0,05). • Significativamente diferente do grupo C-CEL (p<0,05).

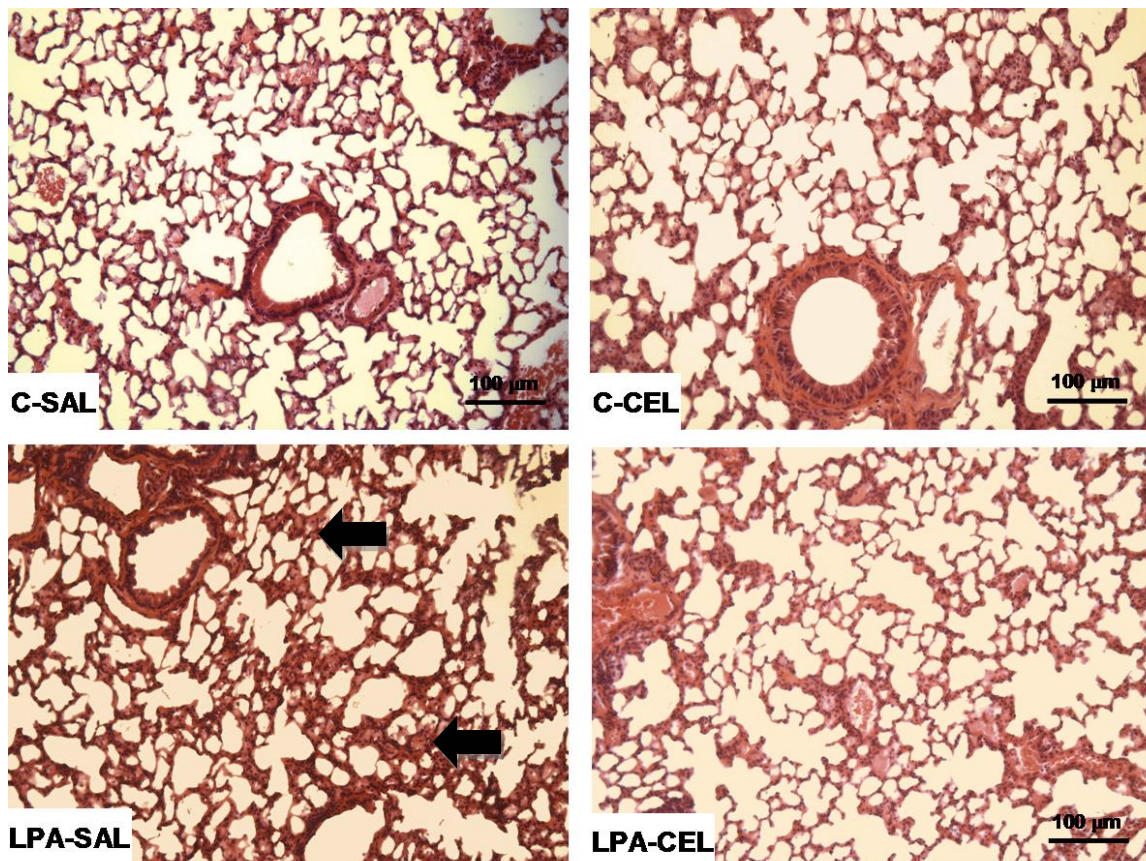


Figura 21 – Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar dos grupos C (animais que receberam salina intraperitonealmente) e LPA (animais que receberam paraquat (10 mg/kg, i.p). Os animais dos grupos C e LPA foram tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL) 1 hora após injeção de salina ou paraquat e estudados após uma semana. Aumento de 200X. Barra de aumento 100 µm. Coloração hematoxilina e eosina (HE). As setas em negrito representam regiões de colapso alveolar.

V.1.b.2. Microscopia Eletrônica

A análise ultra-estrutural evidenciou degeneração citoplasmática de pneumócitos tipo II caracterizada por vacúolos, redução do número de corpos lamelares, destruição de barreira alvéolo-capilar e perda de integridade da membrana basal e colapso alveolar no grupo com lesão pulmonar aguda induzida por paraquat. A terapia com células mononucleares derivadas da medula óssea acarretou reparo da membrana alvéolo-capilar com redução significativa de fibras colágenas no interstício pulmonar (Fig. 22).

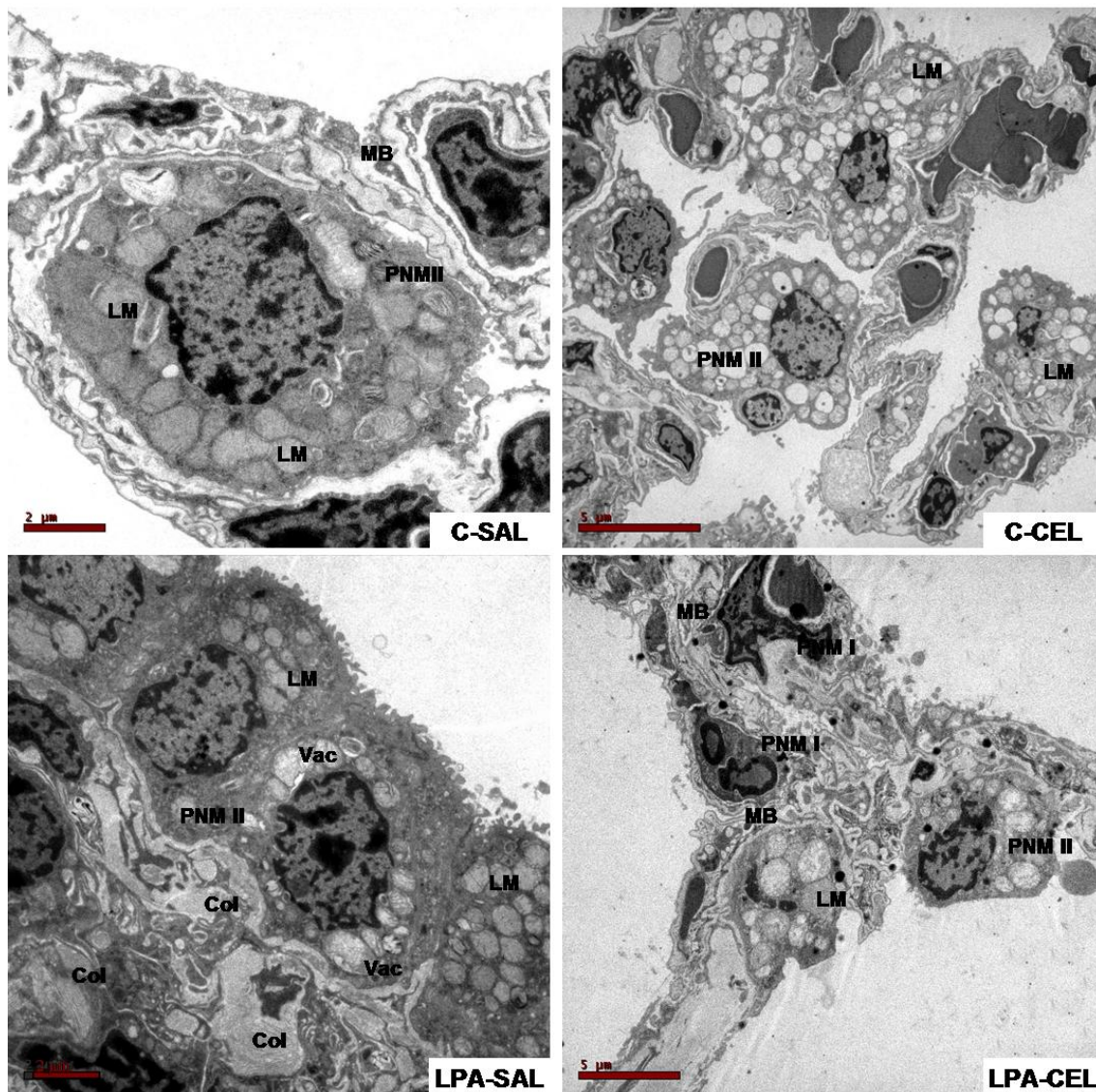


Figura 22 – Fotomicrografias eletrônicas de parênquima pulmonar dos grupos C (animais que receberam salina intraperitonealmente) e LPA (animais que receberam paraquat (10 mg/kg, i.p)). Os animais dos grupos C e LPA foram tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL) 1 hora após injeção de salina ou paraquat e estudados após uma semana. PNM I – pneumócito tipo I; PNMII – pneumócito tipo II; LM – corpos lamelares; MB – membrana basal; Col – colágeno; Vac – vacúolos.

V.1.c. Quantificação de Fibras Colágenas

Constatou-se aumento de fibras colágenas no septo alveolar no grupo LPA – SAL ($0,036 \pm 0,004 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) em comparação ao grupo controle salina (C – SAL; $0,014 \pm 0,003 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) (Figura 23). Os animais com lesão pulmonar aguda tratados com células mononucleares derivadas da medula óssea (LPA – CEL; $0,015 \pm 0,001 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) apresentaram redução no conteúdo de fibras colágenas em comparação ao grupo LPA – SAL. A injeção de células mononucleares derivadas da medula óssea não acarretou aumento na síntese de fibras colágenas nos animais controle (C-CEL; $0,015 \pm 0,004 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$).

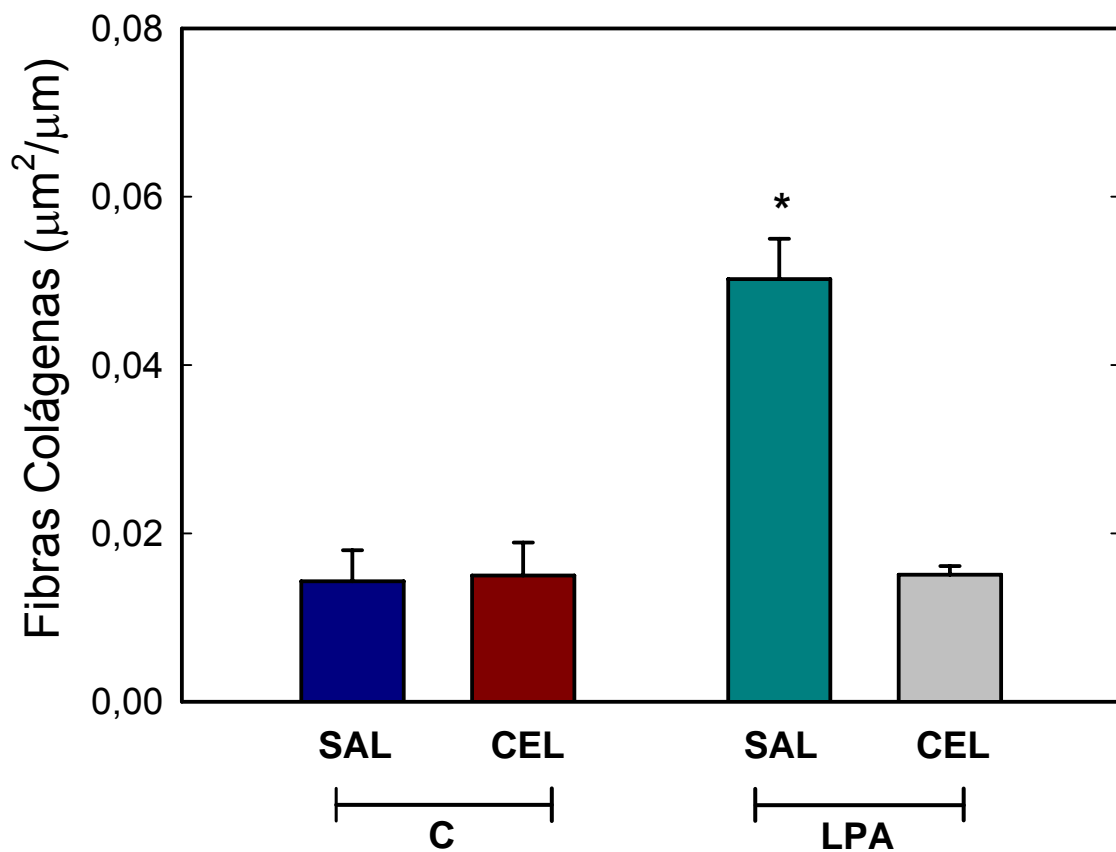


Figura 23. Quantificação de fibras colágenas por comprimento de septo dos grupos C (animais que receberam salina intraperitonealmente) e LPA (animais que receberam paraquat (10 mg/kg, i.p)). Os animais dos grupos C e LPA foram tratados com salina (SAL) ou células mononucleares de medula óssea (CEL) 1 hora após injeção de salina ou paraquat e estudados após uma semana. Os valores representam média \pm erro padrão da média de 6 camundongos/grupo (10 campos por animal). *Significativamente diferente do grupo C-SAL, C-CEL e LPA-CEL ($p < 0,05$).

Discussão

VI. Discussão

O presente estudo mostrou que a utilização de células mononucleares derivadas de medula óssea em modelo de lesão pulmonar aguda induzida por paraquat acarretou melhora morfo-funcional impedindo as modificações elastásticas e viscoelásticas pulmonares, bem como minimizando as alterações histológicas e reduzindo a deposição de colágeno no parênquima pulmonar.

VI.a. Modelo Experimental de Lesão Pulmonar Aguda

O uso de modelos animais possibilitou enormemente o entendimento da patogênese da lesão pulmonar aguda e permitiu avanços importantes no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Existe uma grande variedade de espécies animais disponíveis para a pesquisa biológica, e uma parte importante da interpretação dos resultados é a cuidadosa seleção da espécie. Escolhemos camundongos C57BL6, espécie utilizada em maior frequência nos trabalhos com terapia celular (GUASCH e FUCHS).

O Paraquat (*1,1-dimetil, 4,4-bipyridium dicloreto*) é um herbicida não seletivo altamente tóxico que pode levar à morte quando ingerido em doses elevadas em 1 a 4 dias por falência múltiplas dos órgãos (LOCK e WILKS, 2001). Quando a intoxicação ocorre em pequenas doses, o paraquat se acumula predominantemente nos pulmões onde sofre modificações e dá origem a espécies reativas de oxigênio que atingem especialmente os pneumócitos tipo II causando lesão epitelial (BUS e COLS., 1976; BONNEH-BARKAY e COLS., 2005). Portanto, o paraquat é capaz de reproduzir algumas das características morfo-funcionais da LPA humana (ISHIDA e COLS., 2006; TOMITA e COLS., 2007). Este é um modelo experimental de lesão pulmonar

aguda de baixo custo, efeito rápido e de fácil administração que vêm sendo utilizado desde a década de 70 (SMITH e COLS., 1974; DELAVAL e GILLESPIE, 1985; ROCCO e COLS., 2001; 2003; 2004).

O paraquat induz fibrose pulmonar em humanos, macacos, cachorros e ratos (MURRAY e GIBSON, 1972; AKAHORI e OEHME; 1983; HAMPSON e POND, 1988). A toxicidade induzida por paraquat se caracteriza inicialmente pela formação de edema e hemorragia alveolares, infiltração inflamatória e leucocitária, proliferação de fibroblastos e aumento da deposição de colágeno (NEIRLICH e COLS., 1984). Os sobreviventes dessa fase inicial destrutiva desenvolvem um processo de fibrose que pode se estender por semanas (TONER e COLS., 1970; BISMUTH, 1990). Nesta fase, os pulmões se encontram infiltrados de miofibroblastos que coexistem com fibroblastos cuja produção de colágeno acarreta fibrose e conseqüentemente a obliteração das estruturas alveolares. Há uma diversidade de tratamentos experimentais sugeridos na literatura para evitar a instalação e progressão da fibrose pulmonar causada pelo paraquat, mas até o presente, ainda sem a eficácia desejada nos estudos clínicos multicêntricos (LICKER e COLS., 1988; SUNTRES, 2002; YEH e COLS., 2006; LIN e COLS., 2006).

Vários modelos têm sido utilizados para possibilitar o melhor entendimento da patogênese da LPA/SDRA. Dentre eles, podemos citar: aqueles induzidos por ácido oléico (SLUTSKY e COLS., 1980; SCHUSTER, 1998), endotoxinas (RYLANDER e COLS., 1985; KLINE e COLS., 1999; HASDAY e COLS., 1999; NYS e COLS., 2000; SANTOS e COLS., 2006), ligadura-perfuração de ceco (BAKER e COLS., 1983) e paraquat

(MANTKTELOW, 1967; ROCCO e COLS., 2001; 2003 e 2004; SATOMI e COLS., 2006 e 2007).

Rocco e colaboradores avaliaram o remodelamento do parênquima pulmonar nos diferentes graus de LPA. Para tal, analisaram os efeitos de diferentes doses de paraquat (10, 15, 25 e 30 mg/kg i.p.) em ratos Wistar. O remodelamento tecidual foi quantificado através da mensuração das fibras colágenas e elásticas no septo alveolar. Os autores encontraram aumento progressivo, após 24 h, das fibras colágenas de acordo com o grau de LPA (ROCCO e COLS., 2001). Ao analisar o remodelamento do parênquima pulmonar, Rocco e colaboradores utilizaram modelo experimental de LPA induzida por paraquat com injeção única na dose de 10 mg/kg e 25 mg/kg. Os autores demonstraram que a dose de 10 mg/kg de paraquat acarretava aumento precoce da elastância, e pressões resistivas e viscoelásticas em 24 h, similarmente ao observado no presente estudo em camundongos (ROCCO E COLS., 2003).

Satomi e colaboradores (2006) consideraram o perfil da expressão gênica causado pela lesão induzida por paraquat, em ratos, no tecido pulmonar. Para tal, foi realizada injeção diária de paraquat intra-peritoneal (7 mg/kg) durante 8 dias. A fibrogênese tecidual foi analisada através da quantificação do conteúdo de hidroxiprolina e de TGF- β no nono dia e após três meses da indução da lesão. Foram observadas alterações no balanço de eletrólitos, edema pulmonar e remodelamento alveolar a partir do nono dia, que se perpetuaram até o terceiro mês. Esses resultados foram confirmados pelas mudanças na expressão gênica de CSF-1, TGF- β , na bomba de sódio-potássio

ATPase, canal de potássio e alterações de proteínas do citoesqueleto (SHPS-1). O estudo demonstrou que a fibrose acarretada pela lesão do paraquat não termina após 3 meses, mas se perpetua com alterações teciduais que ocorrem dinâmica e progressivamente assim como a reorganização do citoesqueleto e da matriz extra-celular.

No presente estudo a LPA foi induzida por paraquat em camundongos C57BL6. Os resultados evidenciaram lesões similares às aquelas observadas nos pulmões dos modelos experimentais de LPA/SDRA, como o aumento das elastâncias estática e dinâmicas já nas primeiras 24h após a indução da lesão que se perpetuaram por até 4 semanas. Observamos também, aumento das pressões resistivas e viscoelásticas a partir das 24 h após a injeção intraperitoneal de paraquat, permanecendo alteradas por 4 semanas. Os animais apresentaram ainda, maior fração de área de alvéolos colapsados em relação aos animais controle bem como incremento do conteúdo de colágeno por área de septo nos grupos analisados em 24h e 7 dias após a indução da lesão por paraquat.

Dois trabalhos na literatura utilizaram camundongos C57BL6 e paraquat para induzir a lesão pulmonar (ISHIDA e COLS., 2006; TOMITA e COLS., 2007). Ishida e colaboradores (2006) demonstraram que a injeção intraperitoneal de paraquat (20 mg/kg - duas vezes na semana) em camundongos C57BL6 acarretava inicialmente (1 semana) formação de edema e hemorragia alveolares, inflamação difusa composta tanto de mononucleares e polimorfonucleares. Após duas e três semanas havia proliferação de fibroblastos com espessamento da parede alveolar, migração e acúmulo de

macrófagos bem como de células T. A análise histológica do tecido pulmonar evidenciava a distribuição não homogênea de colágeno e conseqüente formação de fibrose. Essa alteração estrutural foi confirmada pelo aumento do conteúdo de hidroxiprolina e RNAm para colágeno tipo I, na expressão gênica de TGF- β , fator que aumenta a transcrição de genes do colágeno bem como de PDGF-A (Fator de crescimento derivado de plaquetas).

Tomita e colaboradores (2007) avaliaram a progressão patológica da lesão pulmonar em camundongos C57BL/6J onde foram inalados 20 μ L de doses diferentes de paraquat (0,01; 0,02; 0,04 mg/kg). A análise temporal foi realizada nos seguintes intervalos: 6 h, 24 h, 5 e 21 dias, após a administração do paraquat. Após 6 e 24 h da inalação do paraquat havia infiltração inflamatória, formação de edema e lesão do epitélio alveolar. A partir do quinto dia, houve aumento da expressão gênica de pro-colágeno, metaloprotease de matriz extracelular - 9 (MMP 9) e inibidor tecidual de metaloprotease de matriz extracelular - 1 (TIMP-1) e lesões fibróticas foram configuradas à microscopia óptica nos animais com maior dose inalada (0,04 mg/kg).

Nosso modelo de lesão pulmonar aguda induzida por paraquat acarretou alterações morfológicas similares aos trabalhos de TOMITA e colaboradores (2006) e ISHIDA e colaboradores (2007) no que tange à lesão do epitélio alveolar, formação de edema e deposição de colágeno bem como à progressão da fibrose, exceto pela quantificação de colágeno no tecido em 4 semanas onde observamos retorno aos valores de controle. Ademais, Rocco e colaboradores (2003) ao analisarem a mecânica respiratória e remodelamento pulmonar em ratos Wistar com lesão induzida por paraquat (10 mg/kg)

observaram aumento da elastância, das pressões resistivas ($\Delta P1$) e viscoelásticas ($\Delta P2$) pulmonares em 24h e após 30 dias. A análise morfométrica demonstrou aumento da fração de colapso alveolar em 24h e após 30 dias. Ademais, houve aumento de fibras colágenas no tecido já nas primeiras 24h após a lesão, resultado que também foi observado em nosso estudo. Entretanto, no estudo de Rocco e colaboradores, o colágeno se manteve elevado após 30 dias.

Nosso estudo mostrou-se ser um modelo controlado de lesão pulmonar aguda induzida por paraquat, reproduzível e de grande potencial para induzir a fibrogênese. As alterações histológicas por nós observadas são compatíveis àquelas descritas em estudos prévios de lesão pulmonar aguda moderada já nas primeiras 24h. O método de oclusão ao final da inspiração, método utilizado para mensuração da mecânica pulmonar, permite identificar as alterações elásticas, resistivas e viscoelásticas e/ou inomogêneas do pulmão, onde $\Delta P1$ reflete a pressão dissipada para vencer a resistência de vias aéreas centrais e $\Delta P2$ reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico do tecido pulmonar, juntamente com pequena contribuição da heterogeneidade do parênquima pulmonar (BATES e COLS., 1988; D'ANGELO e COLS., 1989; SALDIVA e COLS., 1992).

As modificações das elastâncias (Figura 12 e Tabela 4) e pressões viscoelásticas e/ou inomogêneas pulmonares (Figura 14 e Tabela 5) nos animais com lesão por paraquat são similares àquelas observadas em outros estudos (ROCCO e COLS., 2001, 2003 e 2004). Tais alterações na elastância estática estão relacionadas à presença de edema intersticial e colapso alveolar dadas por disfunção do surfactante. Estas alterações no surfactante

provavelmente decorrem do efeito do paraquat no pneumócito tipo II. Nesse contexto, a análise ultra-estrutural evidenciou degeneração citoplasmática do PII com redução do número de corpos lamelares (Figura 22). O aumento da deposição de fibras colágenas em 24h e 7 dias, também contribui para essas alterações (ROCCO e COLS., 2001; 2003; TOMITA e COLS., 2006; ISHIDA e COLS., 2007). O aumento da pressão resistiva pulmonar provavelmente reflete uma redução no calibre brônquico causado por secreção nas vias aéreas, broncoconstrição reflexa e/ou redução do volume pulmonar. O aumento da pressão viscoelástica e/ou inomogênea no grupo paraquat pode sugerir a presença de heterogeneidade que pode ser devido a fatores como colapso alveolar, edema, inflamação com infiltrados de neutrófilos, principais células presentes na reação do organismo ao paraquat, e células mononucleares, além de mudanças no conteúdo de fibras colágenas (ROCCO e COLS., 2001 e 2003). A manutenção da elastância e das pressões viscoelásticas elevadas em 4 semanas (Figuras 12 e 14) sugere presença de atelectasia e inomogeneidade alveolar.

VI.b. Tratamento com Células Mononucleares de Medula Óssea

O pulmão é um órgão relativamente quiescente que contém aproximadamente 40 tipos celulares diferentes e apresenta pequena capacidade regenerativa (WEISS e COLS., 2006). Até o momento, existem controvérsias a respeito da existência de uma população de células-tronco residentes para a manutenção do tecido pulmonar (GIANGRECO e COLS., 2002; OTTO e COLS., 2002; KIM e COLS., 2005). Entretanto, após o tecido ser lesionado, vários tipos celulares encontram-se aptos a proliferar e reconstituir o

epitélio pulmonar, como as células de Clara e o próprio pneumócito tipo II (MASON e WILLIAMS, 1977; BRODY e WILLIAMS, 1992; ZEPEDA e COLS., 1995; BORTHWICK e COLS., 2001).

Há diversos trabalhos na literatura que enfatizam o papel de células residentes do epitélio pulmonar atuarem com função progenitora após o tecido sofrer uma lesão (ZEPEDA e cols, 1995; ENGELHARDT e COLS., 1991 e 1995; BOERS e COLS., 1998; HONG e COLS., 2003). As células de Clara, as glândulas submucosas e as células basais, tipicamente encontradas nas vias aéreas proximais, proliferam e se diferenciam contribuindo para o reparo tecidual em diversos modelos de lesão (ZEPEDA e COLS., 1995; REYNOLDS e COLS., 2000; HONG e COLS., 2001 e 2003; GIANGRECCO e COLS., 2002). Giangrecco e colaboradores (2002) propuseram que o tipo de lesão da via aérea seria determinante na ativação da célula progenitora. Os autores utilizaram um modelo de lesão extensa das vias aéreas com naftaleno, que é metabolizado apenas pelas células de Clara que apresentam citocromo P4502F2, e verificaram que apenas algumas variações de células de Clara localizadas em determinados nichos anatômicos (corpos neuroepiteliais ou BADJs) tornavam-se ativas e iniciavam a proliferação e reconstituição do epitélio danificado. Park e colaboradores demonstraram que células epiteliais ciliadas são capazes de contribuir para a reconstituição do epitélio das vias aéreas após sofrer lesão (PARK e COLS., 2006).

Na região mais distal pulmonar onde ocorrem trocas gasosas, o pneumócito tipo II exerce a função de célula progenitora do epitélio alveolar. Possui capacidade auto-regenerativa e pode se diferenciar em pneumócito tipo I quando necessário (MASON e WILLIAMS, 1977; BRODY e WILLIAMS, 1992).

Dois autores publicaram trabalhos *in vivo* com incorporação de timidina ao núcleo da célula e demonstraram a progressão de diferenciação dos pneumócitos tipo II em tipo I após sofrerem lesão (EVANS e COLS., 1973, 1975; ADAMSON e BOWDEN, 1974, 1979). Além disso, alguns estudos *in vitro* evidenciaram células com fenótipo de pneumócitos tipo I durante uma cultura primária de pneumócitos tipo II (DOBBS e COLS., 1985; BRODY e WILLIAMS, 1992; DANTO e COLS., 1992 e 1995).

Apesar de ser mostrado em diversos trabalhos (KOTTON e COLS., 2001; THEISE e COLS., 2002; ORTIZ e COLS., 2003; YAMADA e COLS., 2004; ISHIZAWA e cols, 2004; ROJAS e COLS., 2005; WANG e COLS., 2005; XU e COLS., 2007; GUPTA e COLS., 2007) o papel da terapia celular nas lesões pulmonares, pouco está descrito sobre o impacto funcional da melhora da mecânica pulmonar, o que propicia mais uma possibilidade de verificação dos mecanismos envolvidos nessa terapêutica. Dentre as técnicas desenvolvidas para a análise da mecânica respiratória, optamos por utilizar o método de oclusão das vias respiratórias ao final da inspiração visto que possibilita analisar separadamente as propriedades elásticas e resistivas e viscoelásticas no pulmão dos camundongos (KOCHI e COLS., 1988; BATES e COLS., 1988 e 1989).

Nossos resultados demonstram que a utilização terapêutica de células derivadas de medula óssea preveniu a maioria das alterações na mecânica pulmonar presente no sétimo dia de lesão. O tratamento com células mononucleares de medula óssea reduziu a elastância estática e a pressão resistiva (Figura 18 e Figura 19), porém apenas minimizou a pressão viscoelástica e/ou inomogênea (Figura 20 e Tabela 10). O aumento da pressão

resistiva pulmonar nos animais não tratados, provavelmente reflete uma redução no calibre brônquico causado por secreção nas vias aéreas, broncoconstrição reflexa e/ou redução do volume pulmonar como demonstrado por Rocco e colaboradores (ROCCO e COLS., 2001 e 2003).

Estudos realizados em camundongos sugerem que as células-tronco de medula óssea podem ser utilizadas como progenitoras de células diferenciadas de órgãos sólidos (LAGASSE e COLS., 2000; KRAUSE e COLS., 2001; JIANG e COLS., 2002; SPEES e COLS., 2003; ORTIZ e COLS., 2003; ROJAS e COLS., 2005; WANG e COLS., 2005; POPOV e COLS. 2007). Diversas sub-populações de células-tronco tem sido utilizadas em terapia celular, como por exemplo, as células-tronco mesenquimais (estromais) e células-tronco hematopoéticas (KRAUSE e COLS., 2001; KOTTON e COLS., 2001; ORTIZ e COLS., 2003; ROJAS e COLS., 2005; WANG e COLS., 2005; GUPTA e COLS., 2007; XU e COLS., 2007; POPOV e COLS., 2007). Entretanto, ainda é controverso qual sub-população de células derivadas de medula óssea seria capaz de se “enxertar” como células epiteliais, exercer ação parácrina ou de quimioatração. Portanto, optamos por realizar a terapia celular com a fração mononuclear das células derivadas de medula óssea (2×10^6 células/animal) uma vez que, haveria menor manipulação das mesmas e facilitaria uma possível utilização clínica em humanos.

Krause e colaboradores (2001) realizaram experimentos em camundongos irradiados que foram submetidos ao transplante de células-tronco derivadas de medula óssea (1×10^7 células/animal) e após 11 meses foram co-localizadas no órgão alvo através do cromossomo Y. Os autores encontraram características de pneumócitos tipo II nas células implantadas.

Kotton e colaboradores foram pioneiros em sugerir a terapia regenerativa com células-tronco mesenquimais na presença de lesão ao epitélio alveolar. Os autores analisaram o transplante de células-tronco num modelo experimental de lesão pulmonar fibrótica induzida por bleomicina. As células-tronco ($1-2 \times 10^6$ células/animal, em 0,2 mL PBS) foram injetadas na circulação sistêmica 5 dias após a indução da lesão. Com 30 dias havia diferenciação em pneumócitos tipo I (KOTTON e COLS., 2001). Os autores acreditam que a migração e o enxerto das células transplantadas podem estar relacionados aos fatores quimiotáticos liberados pela lesão epitelial celular causada pela bleomicina. O modelo de lesão pulmonar induzida por paraquat também é um modelo de LPA que evolui para fibrose, em que observamos aumento da deposição de colágeno 7 dias após induzida a lesão (LPA-SAL). O tratamento com células mononucleares de medula óssea reduziu a deposição de colágeno no septo alveolar dos animais submetidos à lesão por paraquat. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de células mononucleares de medula óssea estarem inibindo o processo inflamatório por liberarem fatores parácrinos como IL-6 e IL-1, FGF-2, FGF-7, fator de crescimento placentário, TGF- α e VEGF-A (KINNAIRD e COLS., 2004; TAKAHASHI e COLS., 2006) bem como inibirem a liberação de TBG- β , de grande potencial fibrogênico.

Ortiz e colaboradores também estudaram a possibilidade terapêutica de células-tronco em modelo de lesão induzida pela bleomicina. Os autores administraram células mesenquimais derivadas de medula óssea (5×10^5 células/animal, em 200 μ L de PBS) logo após (fase aguda) e sete dias (fase crônica) após a indução de lesão pulmonar. Após 14 dias, eles constataram melhora histológica caracterizada por diminuições do colapso e edema

alveolares bem como redução de metaloproteases. Outro resultado observado foi redução da deposição de colágeno nos animais submetidos à terapia celular. Entretanto, essa melhora ocorreu somente no grupo de animais tratados na fase aguda da doença (ORTIZ e COLS., 2003). Em nosso estudo, a terapia celular também foi realizada durante a fase aguda com injeção de células mononucleares de medula óssea (2×10^6 células/animal) 1 h após a indução da lesão com paraquat (10 mg/kg). Nossos resultados são similares aos observados por Ortiz e colaboradores, uma vez que, houve redução da fração de área de colapso alveolar bem como da deposição de colágeno no septo alveolar nos animais submetidos à terapia com células mononucleares derivadas de medula óssea. É importante ressaltar que apesar de não haver alterações funcionais evidentes na fase inicial (horas após a indução da lesão), existem modificações histológicas como colapso alveolar e infiltrado neutrofílico no parênquima pulmonar (ROCCO e COLS., 2001; 2003). A inflamação aguda está ligada diretamente a quimioatração das células injetadas para o local de lesão, podendo exercer ação protetora contra o aumento da lesão (KRAUSE e COLS. 2008). Um dos prováveis mecanismos seria um aumento da liberação de antagonistas de citocinas inflamatórias como inibidores de TNF- α e de apoptose, produzidos pelos pneumócitos tipo II (ORTIZ e cols 2003; ROJAS e COLS., 2005; CORBETT e ODEA., 2007). Assim, a intensa lesão inflamatória evidenciada na fase aguda da LPA (WARE E MATTHAY., 2000; UDOBI e COLS., 2003; SOUZA e COLS., 2003; ROCCO e COLS., 2001; 2003; 2004; MENDEZ E HUBMAYR, 2005; ROCCO e PELOSI, 2008) também nos direcionou a injetar as células numa fase mais precoce, na tentativa de minimizar danos alveolares e parenquimatosos. Yamada e colaboradores, ao

analisarem os efeitos da terapia celular na lesão pulmonar induzida por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) também injetaram células derivadas de medula óssea (1×10^6 células/animal) imediatamente após a indução da lesão por LPS (fase aguda) e a análise foi realizada após 1 semana. Os autores demonstraram que a instilação de LPS induz uma rápida mobilização das células medulares na circulação e que elas se “direcionam” para o sítio de lesão. Ademais, a terapia celular reduziu as alterações morfológicas quando comparados aos animais não tratados (YAMADA e COLS., 2004).

A análise morfométrica nos permitiu observar a prevenção do colapso alveolar nos animais tratados com células mononucleares de medula óssea. A persistência do colapso alveolar provavelmente contribuiu para a manutenção da pressão viscoelástica e/ou inomogênea (Figura 19 e Tabela 10) elevada no grupo com lesão submetido à terapia celular. De forma curiosa, observamos colapso alveolar aumentado no grupo C-CEL (Tabela 11), não evidenciado por outros autores na literatura (ORTIZ e COLS., 2003; ROJAS e COLS., 2005). Esse resultado não se correlaciona com os achados da mecânica respiratória do grupo C-CEL, já que esses valores se mostraram inalterados. Logo, podemos sugerir que as células derivadas de medula óssea poderiam induzir algum tipo de processo inflamatório em organismos normais como proposto Hashimoto e colaboradores ao encontrarem quantidade elevada de fibroblastos em pulmões tratados com células derivadas de medula óssea (HASHIMOTO e COLS., 2004), uma vez que, não encontramos aumento na deposição de fibras colágenas nos animais controle.

Considerando a fibrogênese induzida pelo paraquat, nossos resultados confirmam o aumento de fibras colágenas no septo alveolar no grupo LPA-SAL em relação ao controle (Figura 23). A terapia de células mononucleares derivadas de medula óssea acarretou redução da deposição de colágeno em relação aos animais não tratados (LPA-SAL). Rojas e colaboradores observaram que os animais tratados com bleomicina apresentaram um aumento significativo na expressão gênica de algumas citocinas pro-fibróticas e inflamatórias, retornando a valores basais, quando estes animais eram tratados com as células mesenquimais derivadas de medula óssea (5×10^6 células/animal). Os autores acreditam que a proteção adquirida pelo tratamento com células-tronco envolve a supressão da inflamação (IL-2; IL-4; IL-1 β ; IFN- γ) bem como a produção de fatores de crescimento regenerativos como G-CSF e GM-CSF (ROJAS e COLS., 2005). Xu e colaboradores analisaram o efeito protetor do transplante de células-tronco mesenquimais (5×10^5 células/animal) derivadas de medula óssea no modelo de injeção intra-peritoneal de LPS. Os autores concluíram que a terapia celular foi capaz de reduzir tanto a resposta inflamatória local quanto sistêmica induzida pela endotoxina. Os autores acreditam que este resultado não foi decorrente da implantação e/ou da diferenciação celular, mas da liberação de quimioatrativos produzidos pelas células-tronco bem como das interações físicas e humorais entre células-tronco e células pulmonares residentes (Xu e COLS., 2007).

VII. CONCLUSÕES

O modelo experimental de lesão pulmonar induzida por paraquat na dose de 10 mg/kg mostrou-se ser eficaz, reprodutível e de baixo custo, sendo que as alterações morfofuncionais pulmonares se assemelham àquelas encontradas na lesão pulmonar aguda em humanos.

O tratamento com células mononucleares de medula óssea impediu os aumentos nas elastâncias pulmonares (E_{st} e E_{dyn}) e na pressão resistiva ($\Delta P1$) ocasionados pela lesão pulmonar aguda. Entretanto, apenas minimizou as alterações dos componentes viscoelásticos ($\Delta P2$) nos pulmões dos camundongos C57BL6.

A análise morfométrica possibilitou observar redução do colapso alveolar nos animais com LPA submetidos à terapia celular e aumento do colapso alveolar nos animais normais submetidos ao tratamento com células mononucleares derivadas de medula óssea.

O tratamento com células mononucleares de medula óssea reduziu a deposição de colágeno no septo alveolar dos animais com lesão pulmonar aguda bem como preservou a ultra-estrutura do epitélio alveolar desses animais.

Dessa forma, a utilização terapêutica de células derivadas de medula óssea na fase precoce da lesão pulmonar aguda preveniu a maior parte das modificações funcionais e morfológicas que ocorrem na lesão pulmonar induzida por paraquat em camundongos.

Referências

Bibliográficas

VIII. Referências Bibliográficas

Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *N Engl J Med* 2006, 354: 2564–2575.

Adamson, I.Y.; Bowden, D.H. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration: a cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest.* 1974, 30: 35-42.

Adamson, I.Y.; Bowden, D.H. Bleomycin-induced injury and metaplasia of alveolar type 2 cells. Relationship of cellular responses to drug presence in the lung. *Am J Pathol* 1979, 96 (2): 531-544.

Aggarawal, S.; Pittenger, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005, 105: 1815-1822.

Agostoni, E.; Mead, J. Statics of the respiratory system. In: Macklem, P., Mead, J (Eds). *Handbook of Physiology*, 1986. Bethesda: American Physiologic Society. 387-409.

Agostoni, E. Mechanics of pleural space. In: Macklem, P., Mead, J. (Eds). *Handbook of physiology*, 1986. Bethesda: American Physiologic Society: 531-58.

Agouridakis, P.; Kyriakou, D.; Alexandrakis, M.G.; Prekates, A.; Perisinakis, K.; Karkavitasas, N.; Bouros, D. The predictive role of serum and bronchoalveolar lavage cytokines and adhesion molecules for acute respiratory distress syndrome development and outcome. *Respir Res* 2002, 3: 25-34.

Akahori, F.; Oehme, F.W. Inhibition of collagen synthesis as treatment for paraquat poisoning. *Vet Hum Toxicol.* 1983, 25: 321-327.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. *The cell.* 3^a ed. São Paulo: ed. Artes Médicas Sul 1994: 959-1010,.

Albertini, K.H. Ultrastructural abnormalities in increased-permeability pulmonary edema. *Clin Chest Med* 1985, 6: 345-66.

Alison, M.R.; Poulson, R.; Jeffrey, R.; Dhillon, A.P.; Quaglia, A.; Jacob, J.; Novelli, M.; Prentice, G.; Williamson, J.; Wright, N.A. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000, 406:257.

Allport, A.R.; Ding, H.; Collins, T.; Gerritsen, M.E.; Luseinskas, F.W. Endothelial dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial cadherin complex at endothelial cell to cell junctions. *J Exp Med.* 1997; 186:517-27.

Amato, M.B.P.; Barbas, C.S.V.; Medeiros, D.M.; Magaldi, R.B.; Schettino, G.P.P.; Filho-Lorenzi, G.; Kairalla, R.A.; Deheinzelin, D.; Munhoz, C.; Oliveira,

R.; Takagaki, T.Y.; Carvalho, C.C. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 1998; 338 (6): 347-54.

Amit, M.; Margulets, V.; Segev, H.; Shariki, C.; Laevsky, I.; Coleman, R.; Itskovitz-Eldor, J. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod.* 2003a; 68: 2150.

Amit, M.; Shariki, C.; Margulets, V.; Itskovitz-Eldor, J. Feeder and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod.* 2003b.

Armstrong, L.; Thickett, D.R.; Mansell, J.P.; Ionescu, M.; Hoyle, E.; Billingham, R.C. Changes in collagen turnover in early acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160: 1910-5.

Armstrong, L.; Thickett, D.R.; Christie, S.J.; Kendall, H.; Millar, AB. Increased expression of functionally active membrane-associated tumor necrosis factor in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; 22: 68-74.

Artigas, A.; Bernard, G.R.; Carlet, J.; Dreyfuss, D.; Gattinoni, L. H.; Lamy, M.; Marini, J.J.; Matthay, M.A.; Pinsky, M.R.; Spragg, R.; Suter, P.M. & Consensus Committee. The American-European Consensus Conference on ARDS, part 2 – ventilatory, pharmacology, supportive therapy, study

design strategies and issues related to recovery and remodelling. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 1332-47.

Ashbaugh, D.G.; Bingelow, D.B.; Petty, T.L.; Levine, B.E. Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* 1967; 2: 319-23.

Augusto, V.M.; Sousa, A.S.; Moll, R.J.; Duarte, J.G.C.; Zin, W.A. Respiratory mechanics and morphometry after progressive intraperitoneal effusion. *Respir Physiol.* 1995; 102: 217-24.

Auler, J.O.C.; Zin, W.A.; Caldeira, M.P.R.; Cardoso, W.V.; Saldiva, P.H.N. Pre-and postoperative inspiratory mechanics in ischemic and valvular heart disease. *Chest.* 1987; 984-90.

Auler, J.O.C.; Saldiva, P.H.N.; Martins, M.A.; Carvalho, R.R.; Negri, E.M.; Hoelz, C.; Zin, W.A. Flow and volume dependence of respiratory system mechanics during constant flow ventilation in normal subjects and in adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1990; 18: 1080-6.

Bachofen, M.; Weibel, E.R. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis.* 1977; 116: 589-615.

Baker, C.C.; Chaudry, I.H.; Gaines, H.O.; Baue, A.E. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation puncture model. *Surgery.* 1983; 94: 331-5.

Barbash, I.M.; Chouraqui, P.; Baron, J.; Feinberg, M.S.; Etzion, S.; Tessone, A.; Miller L.; Guetta E.; Zipori D.; Kedes, L.H.; Kloner, R.A.; Leor, J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003; 108: 863.

Barnas, G.M.; Yoshino, K.; Loring, S.H.; Mead, J. Impedance and relative displacement of relaxed chest wall up to 4 Hz. *J Appl Physiol*. 1987; 62: 71- 81.

Bates, J.H.T.; Rossi, A.; Milic-Emili, J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. *J Appl Physiol*. 1985; 58: 1840-8.

Bates, J.H.T.; Milic-Emili, J. The flow interruption technique for measuring respiratory resistance. *J Crit Care*. 1987; 6(4): 227-38.

Bates, J.H.T.; Ludwig, M.S.; Sly, P.D.; Brown, K.; Martin, J.G.; Fredberg, J.J. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. *J Appl Physiol*. 1988a; 65 (1): 408-14.

Bates, J.H.T.; Baconnier, P.; Milic-Emili, J. A theoretical analysis of the interrupter technique for measuring respiratory mechanics. *J Appl Physiol*. 1988b; 64: 2204-14.

Bates, J.H.T.; Brown, K.A.; Kochi, T. Respiratory mechanics in the normal dog determined by expiratory flow interruption. *J Appl Physiol.* 1989; 67: 2276-85.

Bates, J.H.T.; Abe, T.; Romero, P.V.; Soto, J. Measurement of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. *J Appl Physiol,* 1989; 67: 488-92.

Bates, J.H.T.; Shadornofsky, F.; Stewart, D.E. The low frequency dependence of respiratory system resistance and elastance in normal dogs. *Respir Physiol.* 1989; 78: 369-82.

Baughman, R.P.; Gunther, K.L.; Rashkin, M.C.; Keeton, D.A.; Pattishall, E.M. Changes in the inflammatory response of lung during acute respiratory distress syndrome: prognostic indicators. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154: 76-81.

Baydur, A.P.; Behrakis, W.; Zin, W.A.; Jaeger, M.; Milic-Emili, J.J. A simple method for assessing the validity of esophageal balloon technique. *Am Rev Respir Dis.* 1982; 126: 788-91.

Beck, S.C e cols, 1999, *Science*; 284:143-47.

Bellingan, G.J. Resolution of inflammation and repair. *Eur Respir Monogr.* 2002; 7: 70-82.

Bernard, G.R.; Artigas, A.; Brigham, K.L.; Carlet, J.; Falke, K.; Hudson, L. The American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 149: 918-24.

Berg, J.T.; Fu, Z.; Breen, E.C.; Tran, H.C.; Mathieu-Costello, O.; West, J.B. High lung inflation increases mRNA of ECM components and growth factors in lung parenchyma. *J Appl Physiol.* 1997; 83: 120-8.

Berthiaume, Y.; Folkesson, H.G.; Matthay, M.A. Lung edema clearance: 20 years of progress. Invited review: alveolar edema fluid clearance in the injured lung. *J Appl Physiol.* 2001; 2207-13.

Bianco, P.; Gehron, R.P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000; 105 (12): 1663-1668.

Bianco P.; Riminucci M.; Gronthos, S.; Robey, P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cell*, 19: 180-92, 2001.

Bianco P.; Robey, P.G. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 2001; 414: 118-121.

Bismuth, C.; Garnier, R.; Baud, F.J.; Muszynski, J.; Keyes, C. Paraquat poisoning: an overview of the current status. *Drug Saf.* 1990; 5 (4):243-251.

Blaisdell, F.W. Pathophysiology of the respiratory distress syndrome. *Arch Surg* 1974; 108 (1): 44-49.

Boers, J.E.; Ambergen, A.W.; Thunnissen, F.B. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157 (6 Pt 1): 2000-2006.

Bonneh-Barkay, D.; Reaney, S.H.; Langston, W.J.; Di Monte, D.A. Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 2005; 134 (1): 52-56.

Borthwick, D.W.; Shahbazian, M.; Krantz, Q.T.; Dorin, J.R.; Randell, S.H. Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 24: 662-70.

Bone, R.C.; Grodzin, C.J.; Balk, R.A. Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997; 112: 235-43.

Breen, E.C. Mechanical strain increases type I collagen expression in pulmonary fibroblasts in vitro. *J Appl Physiol*. 2000; 88: 203-9.

Breuer, R.; Zajicek, G.; Christensen, T.G.; Lucey, E.C.; Snider, G.L. Cell kinetics of normal adult hamster bronchial epithelium in the steady state. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990; 2: 51-8.

Brigham, K.L.; Meyrick, B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 133: 913-27.

Brody, J.S.; Williams, M.C. Pulmonary alveolar epithelial cell differentiation. *Annu Rev Physiol* 1992; 54: 351-371.

Brook, F.A; Gardner, R.L. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl. Acad Sci USA.* 1997; 94: 5709-12.

Brower, R. G.; Ware, L.B.; Berthiaume, Y.; Matthay, M.A. Treatment of ARDS. *Chest.* 2001; 120 (4): 1347-67.

Brower, R.G.; Fessler, H.E. Mechanical ventilation in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Clin in Chest Med.* 2000; 21(3): 491-510.

Brusasco, V.; Warner, D.O.; Beck, K.C.; Rodarte, J.R.; Rehder, K. Partitioning of pulmonary resistance in dogs: effect of tidal volume and frequency. *J Appl Physiol.* 1989; 66: 1190-6.

Bus, J.S.; Aust, S. D.; Gibson, J.E. Paraquat toxicity: proposed mechanism of action involving lipid peroxidation. *Environ. Health Perspect.* 1976; 16: 139-146.

Burns A.R.; Walker D.C.; Brown E.S.; Thurmon L.T.; Bowden R.A.; Keese C.R.; Simon S.I.; Entman M.L.; Smith C.W. Neutrophil transendothelial migration is

independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J Immunol.* 1997; 159: 2893-2903.

Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991; 9: 641.

Carden, D.; Xiao, F.; Moak, C. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol.* 1998; 275: 385-392.

Carden, D.L.; Alexander, J.S.; George, R.B. The pathophysiology of the acute respiratory distress syndrome. *Pathophysiol.* 1998; 5: 1-13.

Chambers, R.C.; Laurent, G.J. Collagens. In *The Lung: scientific foundations*. Second edition. Edited by RG Crystal, JB West. Lippincott –Raven Publishers, Philadelphia. 1997, chapter 49: 709-27.

Chang, H.K.; Mortola, J.P. Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurements. *J Appl Physiol.* 1981; 51:218-25.

Chang, J.C.; Summer, R.; Sun, S.; Fitzsimmons, K.; Fine, A. Evidence that bone marrow cells do not contribute to the alveolar epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 33: 335-342.

Chen, C.M.; Fang, C.L.; Chang, C.H. Surfactant and corticosteroid effects on lung function in a rat model of acute lung injury. *Crit Care Med.* 2001; 29: 2169-75.

Chesnutt, A.N.; Matthay, M.A.; Tibayan, F.A.; Clark, J.G. Early detection of type III procollagen peptide in acute lung injury. Pathogenetic and prognostic significance. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156: 840-5.

Clark, J.G.; Milberg, J.A.; Steinberg, K.P. Type III procollagen peptide in the adult respiratory distress syndrome. Association of increased peptide levels in bronchoalveolar lavage fluid with increased risk for death. *Ann Intern Med.* 1995; 122: 17-23.

Colter, D.C.; Class, R.; Digirolamo, C.M.; Prockop, D.J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* .2000; 97: 3213.

Conget, P.A.; Minguell, J.J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*, 181(1):67-73, 1999.

Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins T.; Robbins S.L. *Pathology basis of disease.* 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 1999: 89-112.

Correa, F.C.F.; Ciminelli, P.B.; Falcão, H.; Alcântara, B.J.C.; Contador, R.S.; Medeiros, A.S.; Zin, W.A.; Rocco, P.R.M. Respiratory mechanics and lung

histology in normal rats anesthetized with sevoflurane. *J Appl Physiol.* 2001; 91: 803-10.

Crimi, E.; Slutsky, A.S. Inflammation and the acute respiratory distress syndrome. *Best practice & research. Clinical Anaesthesiology*, 2004; 18: 477-492.

D'Angelo, E.; Calderine, E.; Torri, G.; Robatto, F.M.; Bono, D.; Milic-Emili, J. Respiratory mechanics in anesthetized paralysed humans: effects of flow, volume and time. *J Appl Physiol.* 1989; 67(6): 2556-64.

D'Angelo, E.; Prandi, E.; Tavola, M.; Calderini, E.; Milic-Emili, J. Chest wall interrupter resistance in anesthetized paralysed humans. *J Appl Physiol.* 1994; 77: 883-87.

Danto, S.I.; Zabski, S.M.; Crandall, E.D. Reactivity of alveolar epithelial cells in primary culture with type I cell monoclonal antibodies. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6: 296-306.

Danto, S.I.; Shannon, J.M.; Borok, Z.; Zabski, S.M.; Crandall, E.D. Reversible transdifferentiation of alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 497-502.

De Palma, M.; Venneri, M.A.; Galli, R.; Sergi Sergi, L.; Politi, L.S.; Sampaolesi, M.; Naldini, L. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic

monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005; 8:211-226.

Deb, A.; Wang, S.; Skelding, K.A., Miller, D.; Simper, D.; Caplice, N.M. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation*. 2003; 107:1247.

Delaval, P.M.; Gillespie, D.J. Pulmonary dysfunction during paraquat-induced lung injury: a model of acute alveolar injury. *Crit Care Med*. 1985; 1056-60.

Dennis, J;E.; Carbillet, J.P.; Caplan, A.I.; Charbord, P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*,170 (2-3): 73-82, 2002.

Dobbs, Q.G.; Williams, M.C.; Brandt, A.E. Changes in biochemical characteristics and pattern of lectin binding of alveolar type II cells with time in culture. *Biochim Biophys Acta* 1985; 846: 155-166.

Don, H.F.; Robson, J.G. The mechanics of the respiratory system during anesthesia. *Anesthesiology*. 1965; 26:168-78.

Dorrington, K.L. The theory of viscoelasticity in biomaterials In: *The mechanical properties of biological materials (XXXIV Symposium of the Society for Experimental Biology)*. Cambridge: Cambridge University Press. 1980; 289-314.

Doyle, R.L.; Szaflarski, N.; Modin, G.W.; Wiener-Kronish, J.P.; Matthay, M.A. Identification of patients with acute lung injury. Predictor of mortality. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 152 (6 Pt1): 1818-24.

Dreyfuss, D.; Saumon, G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 294-323.

Edwards, Y.S. Stretch stimulation: its effects on alveolar type II cell function in the lung. *Comp Biochem Physiol*. 2001; 129 (Part A): 245-60.

Eissa, N.T.; Ranieri, V.M.; Corbeil, C.; Chassé, M.; Robatto, F.M.; Baridy, J.; Milic-Emili, J. Analysis of behavior of the respiratory system in ARDS patients: effects of flows, volume and time. *J Appl Physiol*. 1991; 70: 2719-29.

Eissa, N.T.; Ranieri, V.M.; Corbeil, C.; Chassé, M.; Baridy, J.; Milic-Emili, J. Effect of PEEP on the mechanics of the respiratory system in ARDS patients. *J Appl Physiol* 1992; 73: 1728-35.

Engelhardt, J.F.; Schlossberg, H.; Yankaskas, J.R.; Dudus, L. Progenitor cell of the adult human airway involved in submucosal gland development. *Development* 1995; 121: 2031- 2046.

Engelhardt, J.F.; Allen, E.D.; Wilson, J.M. Reconstitution of tracheal grafts with a genetically modified epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11192-11196.

Entzian, P.; Hückstädt, A.; Kreipe, H.; Barth, J. Determination of serum concentrations of type III procollagen peptide in mechanically ventilated patients. *Am Rev Respir Dis.* 1990, 142: 1079-82

Evans, M.J.; Cabral, L.J.; Stephens, R.J.; Freeman, G. Renewal of alveolar epithelium in rat following exposure to NO₂. *Am J Pathol*, 1973; 70 (2): 175-98.

Evans, M.J.; Cabral, L.J.; Stephens, R.J.; Freeman, G. Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp Mol Pathol* 1975; 22 (1): 142-50.

Evans, M.J.; Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292:154.

Fein, A.M.; Calalang-Colucci, M.G. Sepsis and septic shock. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock. *Crit Care Clin.* 2000; 16: 289-317.

Fligiel, S.E.; Standiford, T.; Fligiel, H.M.; Tashkin, D.; Strieter, R.M.; Warner, R.L.; Johnson, K.J.; Varani, J. Matrix metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitor in acute lung injury. *Hum Pathol* 2006; 37 (4): 422-430.

Folkesson, H.G.; Nitenberg, G.; Oliver, B.L; Jayr, C.; Albertine K.H.; Matthay M.A. Upregulation of alveolar epithelial fluid transport after subacute lung injury in rats from bleomycin. *Am J Physiol.* 1998; 275:L478-490.

Freed, C.R.; Greene, P.E.; Breeze, R.E.; Tsai, W.Y.; DuMouchei, W.; Kao, R.; Dilon, S. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2001; 344: 710-19.

Friedenstein, A.J.; Deriglasova, U.F.; Kulagina, N.N.; Panasuk, A.F.; Rudakowa, S.F.; Luria, E.A.; Ruadkow, I.A. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol*, (2):83-92,1974.

Fukuda, Y.; Ishizaki, M.; Masuda, Y. The role of intra-alveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with DAD. *Am J Pathol* 1987; 126: 171-82.

Furuse, M.; Hirase, T.; Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, A.S.; Tsukita, S.H. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993; 123: 1777-88.

Galen, B.; Toews, M.D. Cellular alterations in fibroproliferative lung disease. *Chest.* 1999; 116: 112-6.

Gattinoni, L.; Pelosi, P.; Suter, P.M. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158: 3-11

Gattinoni, L.; Pelosi, P.; Suter, P.M. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary disease and extrapulmonary disease. Different syndromes? *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 3-11.

Gattinoni, L.; Pelosi, P.; Brazzi, L.; Valenza, F. Acute respiratory distress syndrome. In: *Comprehensive Respiratory Medicine*. Albert, R. (Ed). Mosby. 1999; sect. 15 (chap. 69): 1-15.

Gattinoni, L.; Caironi, P.; Pelosi, P.; Goodman, L.R. What has computed tomography taught us about the acute respiratory distress syndrome? *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1701-11.

Geiser, T. Idiopathic pulmonary fibrosis: a disorder of alveolar wound repair? *Swiss Med Wkly* 2003; 133 (29-30): 405-411.

Giangrecco, A.; Reynolds, S.D.; Stripp, B.R. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am J Pathol* 2002; 161: 173-182.

Goldstein, R.H. Control of type I collagen formation in the lung. *Am J Physiol*. 1991; 5: L29-40.

Greene, K.E.; Wright, J.R.; Steinberg, K.P. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160:1843-50.

Griffiths, M.J.D.; Bonnet, D.; Janes, S.M. Stem cells of alveolar epithelium. *The Lancet* 2005; 366:249-260;

Grossman, R.F.; Jones, J.G.; Murray, J.F. Effects of oleic acid-induced pulmonary edema on lung mechanics. *J Appl Physiol.* 1980; 48: 1045-51.

Grove, J.E.; Lutsko, C.; Priller, J.; Henegariu, O.; Theise, N.D.; Kohn, D.B.; Krause, D.S. Marrow-derived cells as vehicles for delivery of gene therapy to pulmonary epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 27 (6): 645-51.

Grunewald, M.; Avraham, I.; Dor, Y.; Bachar-Lusting, E.; Itin, A.; Jung, S. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006; 124: 175-189.

Guasch, G.; Fuchs, E. Mice in the world of stem cell biology. *Nature Genetics* 2005; 37(11): 1201-1206.

Gupta, N.; Su, X.; Popov, B.; Lee, J.W.; Serikov, V.; Matthay, M. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol* 2007; 179: 1855-1863.

Hampson, E.C.; Pond, S.M. Ultrastructure of canine lung during the proliferative phase of paraquat toxicity. *Br J Exp Pathol* 1988; 69 (1): 57-68.

Hantos, Z.; Daroczy, B.; Suki, B.; Galgoczy, G.; Csendes, T. Forced oscillatory impedance of the respiratory system at low frequencies. *J Appl Physiol.* 1986; 60: 123-32.

Hantos, Z.; Daroczy, B.; Suki, B.; Nagy, S. Low frequency respiratory mechanical impedance in the rat. *J Appl Physiol.* 1987; 63: 36-43.

Harris, R.G; Herzegog, E.I.; Bruscia, E.M.; Grove, J.E.; Van Armam, J.S.; Krause, D.S. Lack of fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* 2004; 305: 90-93.

Hasday, J.D.; Bascom, R.; Costa, J.J.; Fitzgerald, B.S.; Dubin, W. Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest* 1999; 115: 829-35.

Hashimoto, N.; Jin, H.; Liu, T.; Chensue, S.W.; Phan, S.H. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical investigation* 2004; 113 (2): 243-252.

Hatch, H.M; Zheng, D.; Jorgensen, M.I.; Petersen, B.E. SDF1 – alpha/CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cells* 2002; 4: 339-351.

Herzog, E.L.; Chai, L.; Krause, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102 (10): 3483-93.

Herzog, E.L.; Van Arnam, J.; Hu, B.; Krause, D.S. Threshold of lung injury required for the appearance of marrow-derived lung epithelia. *Stem Cells* 2006; 24: 1986-1992.

Herzog, E.L.; Krause, D.S. Engraftment of marrow-derived epithelial cells: the role of fusion. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 8: 691-695.

Herzog, E.L.; Van Arnman, J.; Hu, B.; Zhang, J.; Chen, Q.; Haberman, A.M.; Krause, D.S. Lung-specific nuclear reprogramming is accompanied by heterokaryon formation and Y chromosome loss following bone marrow transplantation and secondary inflammation. *FASEB* 2007; 21: 2592-2601.

Hildebrandt, J. Pressure-volume data of cat lung interpreted by a plastoelastic, linear viscoelastic model. *J Appl Physiol* 1970; 28: 365-372.

Hoelz, C.; Negri, E.M.; Lichtenfels, A.J. Morphometric differences in pulmonary lesions in primary and secondary ARDS. A preliminary study in autopsies. *Pathol Res Pract* .2001; 197 (8): 521-30.

Hong, K.U.; Reynolds, S.D.; Giangreco, A.; Hurley, C.M.; Stripp, B.R. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24: 671-681.

Hong, K.U.; Reynolds, S.D.; Watkins, S.; Fuchs, E.; Stripp, B.R. In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L643—L649.

Hong, K.U.; Reynolds, S.D.; Watkins, S.; Fuchs, E.; Stripp, B.R. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol* 2004; 164: 577-588.

Horie, T; Hildebrant, J. Dynamic compliance, limite cicles, and static equilibria of excised cat lung. *J Appl Physiol*. 1971; 31 (3): 423-30.

Ianus A.; Holz G.G.; Theise N.D.; Hussain M.A. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Cli Invest*. 2003; 111:843.

Idell, S.; James, K.K.; Coalson, J.J. Fibrinolytic activity in bronchoalveolar lavage of baboons with diffuse alveolar damage: trends in two forms of lung injury. *Crit Care Med*. 1992; 20: 1432-40.

Ingbar, D.H. Mechanism of repair and remodeling following acute lung injury. *Clin Chest Med*. 2000; 21 (3): 589-616.

Inoue, H.; Inoue, C.; Hildebrant, J. Temperature effects on lung mechanics in air-and fluid-filled rabbit lungs. *J Appl Physiol*. 1982; 53: 567-75.

Ishida, Y.; Takayasu, T.; Kimura, A.; Hayashi, T.; Kakimoto, N.; Miyashita, T.; Kondo, T. Gene expression of cytokines and growth factors in the lungs after paraquat administration in mice. *Legal Medicine* 2006; 8: 102-109.

Ishizawa, K.; Kubo, H.; Yamada, M.; Kobayashi, S.; Numasaki, M.; Ueda, S.; Suzuki, T.; Sasaki, H. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. *FEBS Letters* 2004; 556: 249-252.

Jackson, K.A.; Majka, S.M.; Wang, H.; Pocius, J.; Hartley, C.J.; Majesky, M.W.; Entman, M.L.; Michael, L.H.; Hirlischi, K.K.; Goodell M.A. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001; 107:1-8.

Janes, S.M.; Lowell, S.; Hutter, C. Epidermal stem cells. *J Pathol.* 2002; 197 (4): 479-491.

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N.; Reinhardt, R.L. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49, 2002.

Kallet, R.H. Evidence-based management of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Respir Care.* 2004; 49: 793-809.

Kim, C.F.; Jackson E.L.; Woolfendem, A.E.; Lawrence, S.; Babar, I.; Vogel, S.; Crowley, D.; Bronson, R.T.; Jacks, T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005; 121: 823-835.

Kinnaird, T. ; Stabile, E.; Burnett, M.S.; Lee, C.W.; Barr, S.; Fuchs, S.; Epstein, S.E. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and In vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*, 94:678-685, 2004.

Kirschstein, R.; Skilboll, L.R. Stem cells: scientific progress and future research directions. Terese Wislow, 2001.

Kleeberger, W.; Vermold, A.; Rothamel, T.; Glockner, S.; Bredt, M.; Haverich, A.; Lehmann, U.; Kreipe, H. Increased chimerism of bronchial and alveolar epithelium in human lung allografts undergoing chronic injury. *Am J Pathol* 2003; 162: 1487-1494.

Kline, J.N.; Codwn, J.D.; Hunninghake, G.W.; Schutte, B.C.; Watt, J.L.; Wohlford, C.L.; Powers, L.S.; Jones, M.P.; Schwarts, D.A. Variable airway responsiveness to inhaled lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160: 297-303.

Kochi, T.; Okubo, S.; Zin, W.A.; Milic-Emili, J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. *J App Physiol*. 1988a; 64 (6): 441-50.

Kochi, T.; Okubo, S.; Zin, W.A.; Milic-Emili, J. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects of flow and volume. *J Appl Physiol.* 1988b; 64: 2636-46.

Kopen, R.L.; Prockop, D.J.; Phinney, D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 19: 10711-6.

Koretz, R.L. Feeding controversies. In G. Zaloga editor. *Nutrition in Critical Care.* Mosby, St. Louis, 1994; 283-296.

Kotton, D.N.; Ma, B.Y.; Cardoso, W.V.; Sanderson, E.A.; Summer, R.S.; Williams M.C., Fine, A. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001; 128: 5181-5188.

Krause, D.S.; Theise, N.D.; Collector, M.I.; Henegariu, O.; Hwang, S.; Gardner, R.; Neutzel, S.; Sharkis, S.J. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105:369 -377.

Krebsbach, P.H.; Kuznetsov, S.A.; Satomura, K.; Emmons, R.V.; Rowe, D.W.; Robey, PG. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation.* 1997; 63: 1059.

Kurahashi, K.; Kajikawa, O.; Sawa T. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest.* 1999; 104:743-50.

Lagasse, E.; Connors, H.; Al-Dhalimy, M.; Reitsma, M.; Dohse, M.; Osborne, L.; Wang, X.; Finegold, M.; Weissman, I.L.; Grompe, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6 (11): 1229-34.

Lampugnani, M.F.; Resnati, M.; Raiteri, M.; Piggot, R.; Pisacane, A.; Houen, G.; Ruço, L.P.; Dejana, E. A novel endothelial specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol.* 1992; 118: 1511-22.

Lamy, M.; Fallat, R.J.; Koeniger, E.; Dietrich, H.P.; Ratliff, J.L.; Eberhart, R.C.; Tucker, H.J.; Hill, J.D. Pathologic features and mechanisms of hypoxemia in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1976; 114 (2): 267-284.

Laurent, G.J.; McAnulty, R.J.; Hill, M.; Chambers, R. Escape from the Matrix: Multiple Mechanisms for Fibroblast Activation in Pulmonary Fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 311–315.

Licker, M.; Schewizer, A.; Hohn, L.; Morel, D.R.; Spiliopoulos, A. Single lung transplantation for adult respiratory distress syndrome after paraquat poisoning. *Thorax* 1988; 53 (7): 620-621.

Liechty, K.W.; MacKenzie, T.C.; Shaaban, A.F.; Radu, A.; Moseley, A.M.; Deans, R.; Marshak, D.R.; Flake, A.W. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000; 6 (11): 1282-1286.

Lin, J.L.; Lin-Tan, D.T.; Chen, K.H.; Huang, W.H. Repeated pulse of methylprednisolone and cyclophosphamide with continuous dexamethasone therapy for patients with severe paraquat poisoning. *Crit Care Med* 2006; 34 (2): 368-373.

Liu, S.; Qu, Y.; Stewart, T.J.; Howard, M.J.; Chakraborty, S.; Holekamp, T.F.; McDonald, J.W. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 97: 6126-31.

Lock, E.A.; Wilks, M.F. *Handbook of pesticide toxicology*, 2 edn. San Diego: Academic Press; 2001. Paraquat.

Loeffler, M.; Bratke, T.; Paulus, U.; Li, Y.Q.; Potten, C.S. Clonality and life cycles of intestinal crypts explained by a state dependent stochastic model of epithelial stem cell organization. *J Theor Biol* 1997; 186 (1): 41-54.

Loring, S.H.; Elliot, E.A.; Drazen, J.M. Kinetic energy loss and convective acceleration in respiratory resistance measurements. *Lung*. 1979; 156: 33-42.

Loring, S.H.; Mead, J. Action of the diaphragm on the rib cage inferred from forced-balance analysis. *J App Physiol*. 1982; 53: 756-60.

MacGregor, I.R.; Perrie, A.M.; Donnely, S.C.; Haslett, C. Modulation of human endothelial trombosmodulin by neutrophils and their release products. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155 (1): 47-52.

Majka, M.; Kucia, M.; Ratajczak, M.Z. Stem cell biology- a never ending quest for understanding. *Acta Biochim Pol* 2005; 52 (2): 353-358.

Majka, S.M.; Beutiz, M.A.; Hagen, M.; Izzo, A.A.; Voelkel, N.; Helm, K.M. Identification of novel resident pulmonary stem cells: form and function of the lung side population. *Stem Cells* 2005; 23 (8): 1073-81.

Makino, S.; Fukuda, K.; Miyoshi, S.; Konishi, F.; Kodama, H.; Pan, J.; Sano, M.; Takahashi, T.; Hori, S.; Abe, H.; Hata, J.; Umezawa, A.; Ogawa, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999; 103:697.

Manktelow, B.W. The loss of pulmonary surfactant in paraquat poisoning: a model for the study of the respiratory distress syndrome. *Br J Exp Pathol* 1967; 48 (3): 366-369..

Marshak, D.R; Gottlieb, D; Kiger, A.A. *Stem Cell Biology*, 2001. Marshak, D.R, Gardner, R.L, Gottlieb D. eds. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Marshall, R.P.; Bellingan, G.; Webb, S.; Puddicombe, A.; Goldsack, N.; McAnulty, R.J. Fibroproliferation occurs early in acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162:1783-8.

Martin, T.R. Neutrophils and lung injury: getting it right. *J Clin Invest*. 2002; 110 (11): 1603-5.

Mason, R.J.; Williams, M.C. Type II alveolar cell. Defender of the alveolus. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115: 81-91.

Matthay M.A.; Wiener-Kronish J.P. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142: 1250-57.

Matthay, M. A.; Atabai, K. The pulmonary physician in critical care, 5: acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: definitions and epidemiology. *Thorax*. 2002; 57 (5): 452-8.

Matthay, MA. Alveolar fluid clearance in patients with ARDS. Does it make difference? *Chest*. 2002; 340S-43S.

Matthay, M.A. Treatment of acute lung injure: clinical and experimental studies. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 297–299.

Mathur, A.; Martin, J.F. Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 2004; 364 (9429): 183-192.

Matute-Bello, G; Lee, JS; Frevert, C.W.; Liles, W.C.; Sutlief, S.; Ballman, K.; Wong, V.; Selk, A.; Martin, T.R. Optimal timing to repopulation of resident alveolar macrophages with donor cells following total body irradiation and bone marrow transplantation in mice. *J Immunol Methods*, Sep; 292 (1-2):25-34, 2004.

Mead, J.; Whittenberg, J.L. Evaluation of airway interruption technique as a method for measuring pulmonary air-flow resistance. *J Appl Physiol*. 1954; 6: 408-16.

Mead, J.; Collier, C. Relationship of volume history of lung to respiratory mechanics in anesthetised dogs. *J Appl Physiol*. 1959; 14: 669-78.

Mead, J. Mechanical properties of lungs. *Physiol Rev.* 1961; 41: 281-330.

Mead, J. Contribution of compliance of airways to frequency-dependent behavior of lungs. *J Appl Physiol.* 1969; 26(5): 670-73.

Mecham, R.P. Elastic Fibers. In *The Lung: scientific foundations*. Second edition. Edited by RG Crystal, JB West. Lippincott –Raven Publishers, Philadelphia. 1997, chapter 50: 729-36.

Meduri, G.U.; Belenchia, J.M.; Estes, R.J.; Wunderink, R.G.; Torkey, M.E.; Leeper, K.V. Fibroproliferative phase of ARDS- Clinical findings and effects of corticosteroids. *Chest.* 1991; 100: 943-52.

Meduri, G.U.; Headley, S.; Kohler, G.; Stents, F.; Tolley, E.; Umberger, R.; Leeper, K. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome over time. *Chest.* 1995, 107: 1062-73.

Meduri, G.U. Levels of evidence for the pharmacologic effectiveness of prolonged methylprednisolone treatment in unresolving ARDS. *Chest* .1999; 116: 116-8.

Meduri, G.U; Carratu, P.; Freire, A.X. Evidence of biological efficacy for prolonged glucocorticoid treatment in patients with unresolving ARDS. *Eur Respir J Suppl* 2003; 42: 57s-64s.

Meduri, G.U.; Golden, E.; Freire, A.X.; Taylor, E.; Zaman, M.; Carson, S.J.; Gibson, M.; Umberger, R. Methylprednisolone infusion in early severe ARDS: results of a randomized controlled trial. *Chest* 2007; 131 (4): 945-6.

Mendez, J.L; Hubmair, R.D. New insights into the pathology of acute respiratory failure. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11 (1): 29-36.

Mezey E.; Chandross K.J.; Harta G.; Maki R.A.; McKercher S.R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000; 290:1779.

Milic-Emili, J.; Mead, J.; Turner, J. M. Topography of esophageal pressure as a function of posture in man. *J Appl Physiol*. 1964a; 19: 212-16.

Milic-Emili, J.; Mead, J.; Turner, J. M.; Glauser, E. M. Improved technique for estimating pleural pressure from esophageal balloons. *J Appl Physiol*. 1964b; 19: 207-11.

Milic-Emili, J. Static distribution of lung volumes. In: *Handbook of Physiology. The Respiratory System. Mechanics of Breathing*. Bethesda. Am Physiol Soc. 1985; sect.3, vol. 3, chapt. 31: 561-74.

Mizock, B.A.; DeMichele, S.J. The acute respiratory distress syndrome: role of nutritional modulation of inflammation through dietary lipids. *Nutr Clin Pract* 2004; 19 (6): 563-574.

Moll, R.J.; Sousa, A.S.; Pontes, C.F.; Zin, W.A. Respiratory mechanics after tube thoracostomy in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1995; 28: 1113-6.

Montes, G.S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int* 1996; 20 (1): 15-27.

Mortola, J.P.; Novoraj, A. Two-sidearm tracheal canula for respiratory airflow measurements in small animals. *J Appl Physiol.* 1983; 55: 250-253.

Moss, M.; Gillespi, M.K.; Ackerson, L; Moore, F.A.; Moore, E.E.; Parson, P.E. Endothelial cell activity varies in patients at risk for the adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.*1996, 24: 1782-86.

Mount, L.E. The ventilation flow-resistance and compliance of rat lungs. *J Physiol.* 1955; 127: 157-67.

Murphy, G.; Docherty, A.J. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992; 7: 120-5.

Murray, J.F.; Matthay, M.A.; Luce, J.M.; Flick, M.R. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1988; 138: 720-3.

Murray, R.E.; Gibson, J.E. A comparative study of paraquat intoxication in rats, guinea pigs and monkeys. *Exp. Mol. Pathol.* 1972; 17:317-325.

Nash, G.; Foley, F.D. Longitudinals PL: Pulmonary interstitial edema and hyaline membranes in adult burn patients. Electron microscopic observations. *Hum Pathol.* 1974; 5: 149-60.

Neirlich, A.G.; Nerlich, M.L.; Langer, I.; Demling, R.H. Release of amino-terminal procollagen peptides in paraquat-induced acute pulmonary fibrosis. *Exp. Mol. Pathol.* 1984; 40 (3): 311-319.

Neuringer, I.P.; Randell, S.H. Stem cells and repair of lung injuries. *Respiratory Research* 2004; 5: 6-15.

Nys, M.; Ledoux, D.; Canivet, J.L.; De Mol, P.; Lamy, M.; Damas, P. Correlation between endotoxin level and bacterial count in bronchoalveolar lavage fluid of ventilated patients. *Crit Care Med.* 2000; 28: 2825-30.

Odorico, J.S.; Kaufman, D.S., Thompson, K. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* 2001;19: 193-204.

Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Jakoniuk, I.; Anderson, S.M.; Li, B.; McKay, R.; Nadal-Ginard, B.; Bodine, D.M.; Leri, A.; Anversa, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001; 410: 701-5.

Ortiz, L.A.; Gambelli, F.; McBride, C.; Gaupp, D.; Baddoo, M.; Kaminski, N.; Phinney, D.G. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in

response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. PNAS 2003; 100 (14): 8407-8411.

Osawa, M.; Hanada, K.; Hamada, H.; Nakauchi, H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. Science. 1996a; 273:242.

Osawa, M.; Nakamura, K.; Nishi, N.; Takahashi, N.; Tokuomoto, Y.; Inoue, H.; Nakauchi, H. In vivo self-renewal of c-Kit+Sca-1+Lin (low/-) hemopoietic stem cells. J Immunol. 1996b; 156: 3207.

Otis, A.B.; Fenn, W.O.; Rahn, H. Mechanics of breathing in man. J Appl Physiol. 1950; 2: 592-607.

Otis, A.B.; Mckerrow, C.B.; Bartlett, R.A.; Mead, J.; Mcilroy, M.B.; Selverstone, N.J.; Rodford, E.P. Mechanical factors in distribution of pulmonary ventilation. J Appl Physiol. 1956; 8: 427-43.

Otto, W.R. Lung epithelial stem cells. J Pathol 2002; 197: 527-535.

Park, K.S.; Wells, J.M.; Zorn, A.M.; Wert, S.E.; Laubach, V.E.; Fernandez, L.G.; Whitsett, J.A. Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 2006; 34: 151-157.

Park, W.Y.; Goodman, R.B.; Steinberg, K.P.; Ruzinski, J.T.; Radella, I.I.F.; Park, D.R. Cytokine balances in the lung injury of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164: 1896-903.

Parks, W.C. Matrix metalloproteinases in lung repair. *Eur Respir J Suppl* 2003; 44: 36s-38s.

Pelosi, P. What about primary and secondary ARDS. *Minerva Anesthesiol.* 2000; 66:779-85.

Pelosi, P.; Rocco, P.R.; Nigrini, D.; Passi, A. The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation. *An Acad Bras Cienc* 2007; 79 (2): 285-297.

Pereira, F.R.; Halford, K.W.; O'Hara, M.D.; Leeper, D.B.; Sokolov, B.P.; Pollard, M.D.; Bagasra, O.; Prockop, D.J. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; 92: 4857-4861.

Peslin, R.; Papon, J.; Duvivier, C.; Richalet, J. Frequency response of the chest: modeling and parameter estimation. *J Appl Physiol.* 1975; 39 (4): 523-34.

Pittenger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, M.A.; Aimonwri, D.W.; Craig, S.; Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284:143.

Pittenger, M.F; Marshak D.R. Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow. Marshak, D.R, Gardner, D.K and Gottlieb, D. eds. Cold Spring Harbor. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001: 349-374.

Pittet, J.F.; MacKersie R.C.; Martin T.R. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155: 1187-205.

Prockop, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276 (5309): 71-74.

Popov, B.V.; Serikov, V.B.; Petrov, N.S.; Izusova, T.V.; Gupta, N.; Matthay, M.A.. Lung epithelial cells induce endodermal differentiation in mouse mesenchymal bone marrow stem cells by paracrine mechanism. *Tissue Eng* 2007; 13 (10): 2441-50.

Poulson, R.; Forbes, S.J.; Hodivala-Dilke, K.; Ryan, E.; Wyles, S.; Navaratnarasah, S.; Jeffrey, R.; Hunt, T.; Alison, M.; Cook, T.; Pusey, C.; Wright, NA. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol.* 2001; 195:229.

Poulson, R.; Alison M.R.; Forbes S.J.; Wright N.A. Adult stem cells plasticity. *J Pathol.* 2002; 197:441.

Pugin, J.; Berghese, G.; Widmar, MC.; Matthay, M.A. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1999; 27: 304-15.

Raghow, R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J.* 1994; 8: 823-31.

Randall T.D.; Lund F.E.; Howard M.C.; Weissman I.L. Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Blood.* 1996; 87: 4057.

Rannels, D.E. Role of physical forces in compensatory growth of the lung. *Am J Physiol.* 1989; 257: L179-89.

Rattenborg, C. Basic mechanics of artificial ventilation. In: management of life-threatening poliomyelitis. Lassen, H.C.A. (Ed). London: Livingstone. 1956: 23.

Rattenborg, C.C.; Holaday, D.A. Constant flow inflation of the lungs: theoretical analysis. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1967; 23: 211-23.

Reta, G.S.; Riva, J.A.; Piriz, H.; Medeiros, A.S.; Rocco, P.R.M.; Zin, W.A. Effects of halothane on respiratory mechanics and lung histopathology in normal rats. *British J Anaesth.* 2000; 84 (3): 372-7.

Reubinoff, B.E.; Pêra, M.F.; Fong, C.Y.; Trounson, A.; Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol.* 2000; 18:399.

Reynolds, S.D.; Giangreco, A.; Power, J.H.; Stripp, B.R. Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol* 2000; 156: 269-278.

Richards, M.; Fong, C.Y.; Chan, W.K.; Wong, P.C; Bongso, A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2002, 20: 933.

Rhoades, R.A.; Tanner, G.A. Ventilation and mechanics of breathing. In: Rhodes, R.A. & Tanner, G.A. (Eds.). *Medical Physiology*. Baltimore. 1995: 341-69.

Rocco, P.R.M. Monitorização da ventilação mecânica. In *Medicina Intensiva: abordagem prática*. Nacul FE, Editora Revinter, 2003: 219-229.

Rocco, P.R.M.; Zin, W.A. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different? *Curr Opin Crit Care.* 2005, 11: 10-17.

Rocco, P.R.M.; Negri, E.M.; Kurtz, P.M.; Vasconcellos, F.P.; Silva, G.H.; Capelozzi, V.L.; Romero, P.V.; Zin, W.A. Lung tissue mechanics and

extracellular matrix remodelling in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164: 1067-71.

Rocco, P.R.M.; Souza, A.B.; Faffe, D.S.; Pássaro, C.P.; Santos, F.B.; Negri, E.M.; Lima, J.G.M.; Contador, R.S.; Capelozzi, V.L.; Zin, W.A. Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168 (6): 677-684.

Rocco, P.R.M.; Facchinetti, L.D.; Ferreira, H.C.; Negri, E.M.; Capelozzi, V.L.; Faffe, D.S.; Zin, W.A. Time course of respiratory mechanics and pulmonary structural remodeling in acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol* 2004; 143 (1):49-61.

Rocco, P.R.M.; Zin, W.A. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different? *Curr Opin Crit Care* 2005; 11 (1): 10-17.

Rocco, P.R.M.; Pelosi, P. Effects of mechanical ventilation on the extracellular matrix. *Intensive Care Med* 2008; 34(4): 631-639.

Rocco, P.R.M.; Pelosi, P. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: myth or reality? *Curr Opin Crit Care* 2008; 14(1): 50-55.

Rodarte, J.R.; Rehder, K. Dynamics of respiration. In: Macklem, P.T., Mead, J. (Eds). *Handbook of Physiology. The respiratory system. Mechanics of breathing*. The American Physiological Society, Bethesda. 1986; 3 (10): 131-44.

Rodrigues, A.C.M.; Moreira, L.F.P.; Souza, C.L.; Pettersen, P.C.D.; Saldiva, P.H.N.; Zin, W.A. Effects of thoracotomy on respiratory system, lung and chest wall mechanics. *Chest*. 1993; 104: 1882-6.

Rojas, M.; Xu, J.; Woods, C.R.; Mora, A.L.; Spears, W.; Roman, J.; Brigham, K.L. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Crit Cell Mol Biol* 2005; 33: 145-152.

Rubinfeld, G.D.; Caldwell, E.; Peabody, E.; Weaver, J.; Martin, D.P.; Neff, M.; Stern, E.J.; Hudson, L.D. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 2005; 353:1685–1693.

Rylander, R.; Hanglind, P.; Lundholm, M. Endotoxin in cotton dust and respiratory function decrement among cotton works in an experimental cardroom. *Am Rev Respir Dis*. 1985; 131: 209-13.

Saldiva, P.H.; Cardoso, M.P.; Caldeira, M.P.R.; Zin, W.A. Mechanics in rats by the end-inflation occlusion and single-breath methods. *J Appl Physiol*. 1987; 63 (5): 1711-8.

Saldiva, P.H.; Zin, W.A.; Santos, R.L.B.; Eidelman, D.H.; Milic-Emili, J. Alveolar pressure measurement in open-chest rats. *J Appl Physiol*. 1992; 72 (1): 302-6.

Santos, F.B.; Nagato, L.K.S.; Boechen, N.M.; Negri, E.M.; Guimarães A.; Capelozzi, V.L.; Faffe, D.S.; Zin, W.A.; Rocco, P.R.M. Time course of lung

parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary lung injury. *J Appl Physiol* 2006; 100: 98-106.

Santos, R.L.B.; Santos, M.A.M.; Sakae, R.S.; Saldiva, P.H.N.; Zin, W.A. Effects of longitudinal laparotomy on respiratory system, lung and chest wall mechanics. *J Appl Physiol*. 1992; 72 (5): 1985-90.

Satomi, Y.; Tsuchiya, W.; Miura, D.; Kasahara, Y.; Akahori, F. DNA microarray analysis of pulmonary fibrosis three months after exposure to paraquat in rats. *The Journal of Toxicological Sciences* 2006; 31 (4): 345-355.

Satomi, Y.; Sakaguchi, K.; Kasahara, Y.; Akahori, F. Novel and extensive aspects of paraquat-induced pulmonary fibrogenesis: comparative and time-course microarray analyses in fibrogenic and non-fibrogenic rats. *Journal of Toxicological Sciences* 2007; 32 (5): 529-553.

Schenker, M.B.; Stoecklin, M.; Lee, K.; Lupercio, R.; Zeballos, R.J.; Enright, P.; Hennessy, T.; Beckett, LA. Pulmonary function and exercise-associated changes with chronic low-level paraquat exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170: 773-779.

Schuller, D.; Mitchell, J.P.; Calandrino, F.S.; Schuster, D.P. Fluid balance during pulmonary edema. Is fluid gain a marker or a cause of poor outcome? *Chest* 1991; 100 (4): 890-892.

Schuster, D.P. Quantifying lung injury in ARDS. In: Marini, J.J., Evans, T.W. (Eds) *Acute Lung Injury*. 1998; 181-96.

Shanley, T.P.; Warner, R.L.; Ward, P.A. The role of cytokines and adhesion molecules in the development of inflammatory injury. *Mol Med Today*. 1995; 1: 40-5.

Sharp, J.T.; Johnson, F.N.; Goldberg, N.B.; Lith, P.V. Hysteresis and stress adaptation in the human respiratory system. *J Appl Physiol*. 1967; 23 (4): 487-97.

Shapiro, S.D.; Senior R.M. Matrix metalloproteinases: matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999; 20: 1100-2.

Similowski, T.; Levy, P.; Corbeil, C.; Albala, M.; Pariente, R.; Derenne, J.P.; Bates, J.H.T; Jonson, B.; Millic-Emili, J. Viscoelastic behavior of lung and chest wall in dogs determined by flow interruption. *J Appl Physiol*. 1989; 67: 2219-29.

Similowski, T.; Bates, J.H.T. Two-compartment modeling of respiratory system mechanics at low frequencies: gas redistribution or tissue rheology? *Eur Respir J*. 1991; 4: 353-8.

Slack, J.M. Stem cells in epithelial tissues. *Science*. 2000; 287: 1431-33.

Slutsky, A.S., Tremblay, L.N. Multiple system organ failure: is mechanical ventilation a contributing factor? *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 1721-1725.

Slutsky, A.S.; Scharf, S.M.; Brown, R.; Ingran, R.H. The effect of oleic acid-induced pulmonary edema on pulmonary and chest wall mechanics in dogs. *Am Rev Respir Dis.* 1980; 121: 91-6.

Smith, P.; Health, D.; Kay, J.M. The pathogenesis and structure of paraquat-induced lung fibrosis in rats. *J Pathol.* 1974; 114: 57-67.

Snapper, J.R.; Hutchinson, A.A.; Ogletree, M.L.; Brigham, K.L. Effects of cyclooxygenase inhibitors on the alterations in lung mechanics caused by endotoxemia in the unanesthetized sheep. *J Clin Invest.* 1983; 72: 63-76.

Snider, G.L.; Celli, B.R.; Goldstein, R.H.; O'Brien, J.J.; Lucey, E.C. Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin: lung volumes, volume pressure relations, carbon monoxide uptake, and arterial blood gas studies. *Am Rev Respir Dis.* 1978; 117: 289-97.

Spangrude, G.J.; Heimfeld, S.; Weissman, I.L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988; 241: 58.

Spees, J.L.; Olson, S.D.; Ylostalo, J. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2397-402.

Sousa, A.S.; Moll, R.J.; Pontes, C.F.; Saldiva, P.H.N.; Zin, W.A. Mechanical and morphometrical changes in progressive bilateral pneumotorax and pleural effusion in normal rats. *Eur Respir J*. 1995; 8: 99-104.

Souza, A.B.; Santos, B.F.; Negri, E.M.; Zin, W.A.; Rocco, P.R.M. Remodelamento do tecido pulmonar na síndrome do desconforto respiratório agudo. *J Pneumol*, 29: 1-10, 2003.

Starcher, B.C. Lung elastin and matrix. *Chest* 2000; 117 (5 Suppl 1): 229S-234S.

Strieter, R.M. What Differentiates Normal Lung Repair and Fibrosis? Inflammation, Resolution of Repair, and Fibrosis. *Proc Am Thor* 2008; *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 305–310.

Sznajder J.I. Strategies to increase alveolar epithelial fluid removal in the injured lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160:1441-2.

Suchyta, M.R.; Clemmer, T.P.; Elliott, C.G.; Orme, J.F. Jr; Weaver, L.K.. The adult respiratory distress syndrome. A report of survival and modifying factors. *Chest*. 1992; 101(4): 1074-9.

Suchyta, M.R.; Clemmer, T.P.; Elliott, C.G.; Orme, J.F. Jr; Morris, A.H.; Jacobson, J.; Menlove, R. Increased mortality of older patients with acute respiratory distress syndrome. *Chest* 1997; 111(5): 1334-9.

Suntres, Z.E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* 2002; 180 (1): 65-77.

Suratt, B.T.; Cool, C.D.; Serls, A.E.; Chen, L.; Varella-Garcia, M.; Shpall E.J.; Brown K.K.; Worthen, G.S. Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Am J respire Crit Care Med* 2003; 168: 318-322.

Takahashi, M.; Li, T.S.; Suzuki, R.; Kobayashi, T.; Ito, H.; Ikeda Y.; Matsuzak, M. ; Hamano, K. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291:886-893, 2006.

Tasaka, S.; Hasegawa, N.; Ishizaka, A. Pharmacology of acute lung injury. *Pulm Pharmacol Ther.* 2002; 15: 83-95.

Terashima, T.; Matsubara, H.; Nakamura, M.; Sakamaki, F.; Waki, Y.; Soejima, K.; Tasaka, S.; Nakamura, H.; Sayama, K.; Ishizaka, A.; Kanazawa, M. Local pseudomonas instillation induces contralateral lung injury and plasma cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153 (5): 1600-1605.

The ARDS Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2000; 342: 1301-1308.

Theise, N.D.; Henegariu, O.; Grove, J.; Jagirdar, J.; Kao, P.N.; Crawford, J.M.; Badve, S.; Saxena, R.; Krause, D.S. Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow. *Exp Hematology* 2002; 30: 1333-1338.

Thomas, T.E.; Miller, C.L; Eaves, C.J. Purification of hematopoietic stem cells for further biological study. *Methods.* 1999; 17:202.

Thomashefski, J.F. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 2000; 21 (3): 435-466.

Thompson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S.D.; Waknitz, M.A.; Swiergiel, J.J.; Marshall, V.S.; Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282:1145.

Toner, P.G.; Vettes, J.M.; Spilg, W.G.S.; Harland, W.A. Fine structure of lung lesion in a case of paraquat poisoning. *J Pathol.* 1970; 102: 182-185.

Tomita, M.; Okuyama, T.; Katsuyama, H.; Miura, Y.; Nishimura, Y.; Hidaka, K.; Otsuki, T.; Ishikawa, T. Mouse model of paraquat-poisoned lungs and its gene expression profile. *Toxicology* 2007; 231: 200-209.

Tuchschmidt J.; Fried J.; Astiz M. Evaluation of cardiac output and oxygen delivery improves outcome in septic shock. *Chest*. 1992; 102: 216-220.

Vlahakis, N.E.; Schroeder, M.A.; Limper, A.H.; Hubmayr, R.D. Stretch induces cytokine release by epithelial cells in vitro. *Am J Physiol*. 1999; 277: L167-73.

Von Neegaard, K.; Wirtz, K. Die messung der strömungswiderstände in den atemwegen des menschen, insbesondere bei asthma und emphysema. *Z. Klin Med*, 1927; 105: 51-82.

Wagers, A.J.; Sherwood, R.I.; Christensen, J.L.; Weissman, I.L. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297: 2256-2259.

Wagers, A.J.; Weissman, I.L. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116: 639-648.

Wallace, W.A.H.; Donnelly S.C. Pathogenesis of acute microvascular lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir Monogr*. 2002, 7: 22-32.

Wang, G.; Bunnell, B.A.; Painter, R.G.; Quinones, B.C.; Tom, S.; Lanson, N.A.; Spees, J.L.; Bertucci, D.; Peister, A.; Weiss D.J.; Valentine V,G.; Prockop, D.J.; Kolls, J.K. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into

airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. PNAS 2005; 102 (1): 186-191.

Ward, P.A.; Hunninghake, G.W. Lung inflammation and fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 1998; 157:S 123-9.

Ware, L.B.; Matthay, M.A. The acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med. 2000; 342 (18): 1334-49.

Webb, H.H.; Tierney, D.F. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. Am Rev Respir Dis. 1974; 556-65.

Weiss, D.J.; Berberich, Z.; Borok, D.B.; Gail, J.K.; Kolls, C.; Penland, C.; Prockop, D.J. Adult stem cells, lung biology, and lung disease. NHLBI/Cystic Fibrosis Foundation Workshop. Proc Am Thhorac Soc 2006; 3: 193-207

Weissman, I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell. 2000; 100: 157-168.

West, J.B. Respiratory physiology: the essentials. Williams & Wilkins (Eds). Baltimore. 5th ed. 1995: 1-10.

West, J.; Mathieu-Costelo, O. Structure, strength, failure and remodeling of the pulmonary blood-gas barrier. *Ann Rev Physiol* 1999; 61:543:572.

Wiebel, E.R. Morphometry: stereological theory and practical methods. In: *Models of Lung disease: microscopy and structural methods*. Gil, J. (Ed). New York: Marcel Dekker. 1990: 199-247.

Wierner-Kronish, J.P.; Albertine, K.H.; Matthay, M.A. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin. *J Clin Invest*. 1991; 88: 864-75.

Wolfson, M.R.; Greenspan, J.S.; Deoras, K.S.; Allen, J.L.; Shaffer, T.H. Effect of position on the mechanical interaction between the rib cage and abdomen in preterm infants. *J Appl Physiol*. 1992; 73 (3): 1032-8.

Worthen, G.S.; Avoli, N.; Vukajlovich, S.; Toblas, P.S. Neutrophil adherence induced by lipopolysaccharide in vitro. *J Clin Invest*. 1992; 90: 2526-35.

Wright, P.E.; Bernard, G.R. The role of airflow resistance in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1989; 139: 1169-74.

Yamada, M.; Kubo, H.; Kobayashi, S.; Ishizawa, K.; Numasaki, M.; Ueda, S.; Suzuki, T.; Sasaki, H. Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. *The Journal of Immunology* 2004; 172: 1266-1272.

Yeh, S.T.; Guo, H.R.; Su, Y.S.; Lin, H.J.; Hou, C.C.; Chen, H.M.; Chang, M.C.; Wang, Y.J. Protective effects of n-acetylcysteine treatment post-acute intoxication in rats and in human lung epithelial cells. *Toxicology* 2006; 223 (3): 181-190.

Yu, M.; Levy, M.M.; Smith, P. Effect of maximizing oxygen delivery on morbidity and mortality rates in critically ill patients: a prospective, randomized, controlled study. *Crit Care Med.* 1993; 21: 830-38.

Xu, J.; Woods, C.R.; Mora, A.L.; Joodi, R.; Brigham, K.L.; Iyer, S.; Rojas, M. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow derived mesenchymal stem cells in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L131-L141.

Zapol, W.M.; Trelstad, R.L.; Coffey, J.W. Pulmonary fibrosis in severe acute respiratory failure. *Am rev Respir Dis.* 1979; 119: 547-54.

Zepeda, M.L.; Chinoy, M.R.; Wilson, J.M. Characterization of stem cells in human airway capable of reconstituting a fully differentiated bronchial epithelium. *Somat Cell Mol Genet* 1995; 21: 61-73.

Zilberberg, M.D.; Epstein, S.K. Acute lung injury in the medical ICU: comorbid conditions, age, etiology and hospital outcome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157 (4 Pt1): 1159-64.

Zin, W.A.; Caldeira, M.P.R.; Cardoso, W.V.; Auler, J.O.C.; Saldiva, P.H.N. Expiratory mechanics before and after uncomplicated heart surgery. *Chest*. 1989; 95: 21-8.

Zin, W.A.; Martins, M.A.; Silva, P.R.M.; Sakae, R.S.; Carvalho, A.L.I.; Saldiva, P.H.N. Effects of abdominal opening on respiratory system mechanics in ventilated rats. *J Appl Physiol*. 1989; 66 (6): 2496-2501.

Zin, W.A.; Rocco, P.R.M. Mecânica respiratória normal. In: *Assistência ventilatória mecânica*. Auler Junior, J.O.C. & Amaral, G.R.V. (Eds). Rio de Janeiro. Atheneu. 1995: 3-24.

Zin, W.A.; Gomes, R.F.M. Mathematical models in respiratory mechanics. In: *Anesthesia, Pain, Intensive Care and Emergency Medicine*. Gullo, A (Ed.). Springer-Verlar, Milano. 10^a ed. 1996; 391-400.

Zin, W.A.; Rocco, P.R.M. Organização morfofuncional do sistema respiratório. In: *Fisiologia*. Aires, M.M. (Ed). Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1999: 499-502.

Zin, W.A.; Rocco, P.R.M. Mecânica respiratória. In: *Fisiologia*. Aires, M.M. (Ed). Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1999: 514-26.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)