

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Indianara Maria Araújo do Nascimento

**TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES  
DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE LESÃO PULMONAR AGUDA  
DE ETIOLOGIA PULMONAR E EXTRAPULMONAR**

Rio de Janeiro

2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Indianara Maria Araújo do Nascimento

**TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES  
DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE LESÃO PULMONAR AGUDA DE  
ETIOLOGIA PULMONAR E EXTRAPULMONAR**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Orientadores: Patricia R. M. Rocco.  
Marcelo M. Morales.

Rio de Janeiro

2010

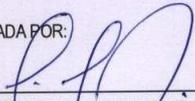
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

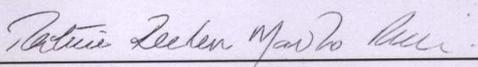
Indianara Maria Araújo do Nascimento

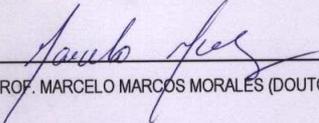
**TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES DERIVADAS DA  
MEDULA ÓSSEA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO  
PULMONAR AGUDA DE ETIOLOGIA PULMONAR E  
EXTRAPULMONAR**

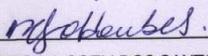
Rio de Janeiro, 29 de janeiro de 2010.

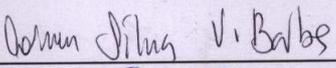
APROVADA POR:

  
\_\_\_\_\_  
PROF. CELSO CARUSO NEVES (DOUTOR – U.F.R.J.)  
COORDENADOR DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FISIOLOGIA)

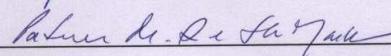
  
\_\_\_\_\_  
PROFª. PATRÍCIA RIEKEN MACEDO ROCCO (DOUTOR – U.F.R.J.) – ORIENTADORA

  
\_\_\_\_\_  
PROF. MARCELO MARCOS MORALES (DOUTOR – U.F.R.J.) – ORIENTADOR

  
\_\_\_\_\_  
PROFª. REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG (DOUTOR – U.F.R.J.) – REVISORA

  
\_\_\_\_\_  
PROFª. CARMEN SILVA VALENTE BARBAS (DOUTOR – U. S.P)

  
\_\_\_\_\_  
PROF. JACKSON DE SOUZA MENEZES (DOUTOR – U.F.R.J.)

  
\_\_\_\_\_  
PROFª. PATRÍCIA MACHADO RODRIGUES SILVA MARTINS (DOUTOR – FIOCRUZ)

## **AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

O presente estudo foi realizado nos Laboratórios de Investigação Pulmonar e Fisiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX).

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, grandes incentivadores e exemplos de que o estudo é o único caminho para o crescimento intelectual e pessoal.

## **AGRADECIMENTOS**

- A minha orientadora Patricia R. M. Rocco pelo incentivo incansável, exemplo de sabedoria, amor, paciência e dedicação, fundamentos básicos no ensino a pesquisa e a docência, e obrigada principalmente, por acreditar que este momento seria possível.

- Aos meus orientadores Marcelo Morales e Carlos Peres Da Costa, pelo suporte científico e ajuda admiráveis.

- Aos meus amigos do Laboratório de Investigação Pulmonar, cujo companheirismo, ajuda e dedicação foram essenciais na elaboração deste trabalho e no decorrer de toda essa trajetória.

- A Patrícia Vieira, grande amiga, cujo apoio foi imprescindível na realização deste sonho.

## RESUMO

### TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE LESÃO PULMONAR AGUDA DE ETIOLOGIA PULMONAR E EXTRAPULMONAR

Indianara Maria Araújo do Nascimento

Orientadora: Patricia R. M. Rocco

Resumo de tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Doutor em Ciências.

A fisiopatologia da lesão pulmonar aguda (LPA) difere de acordo com a etiologia da lesão. Portanto, a hipótese do estudo é que os efeitos da terapia com células mononucleares derivadas da medula óssea (CMMO) podem agir diferentemente no pulmão e órgãos a distância em modelos experimentais de LPA pulmonar e extrapulmonar com similar comprometimento da mecânica pulmonar. Em animais controle, salina estéril foi instilada via intratraqueal ou intraperitoneal, enquanto animais no grupo LPA receberam lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, via intratraqueal (40 µg, LPA<sub>p</sub>) ou intraperitoneal (400 µg, LPA<sub>exp</sub>). Seis horas após administração de LPS, os animais dos grupos controle e LPA, pulmonar e extrapulmonar, foram novamente randomizados em subgrupos que receberam salina (0,05 mL) ou CMMO ( $2 \times 10^6$ ) via intravenosa. No dia 7 após administração de CMMO, os seguintes achados foram observados: 1) redução na taxa de mortalidade, elastância estática, colapso alveolar e celularidade no lavado broncoalveolar (BALF) em ambos os grupos LPA, principalmente na LPA<sub>exp</sub>, 2) diminuição no conteúdo de fibras colágenas no septo alveolar, número de células apoptóticas no pulmão, rim e fígado, e níveis de interleucinas (IL)-6, KC (homólogo do IL-8 em camundongos) e IL-10 no BALF, assim como, reparo na membrana basal, epitélio e endotélio, independentes da etiologia da LPA, 3) aumento na expressão de RNAm para o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e diminuição para o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), e fator de crescimento transformador beta (TGF)- $\beta$  em ambos os grupos LPA, e 5) aumento no número de células *green fluorescent protein* (GFP)+ no pulmão, rim e fígado na LPA<sub>exp</sub>. Em conclusão, a terapia com CMMO foi efetiva na modulação do processo inflamatório e fibrogênico em ambos os modelos de LPA, embora tenha reduzido de forma mais significativa a mortalidade e melhorado a mecânica pulmonar e histologia na LPA<sub>exp</sub>. Estes benefícios podem ser atribuídos a fixação e/ou efeito parácrino das CMMO.

Palavras Chaves: lesão pulmonar aguda, síndrome do desconforto respiratório agudo, células-tronco, mecânica pulmonar, remodelamento pulmonar .

## ABSTRACT

### BONE MARROW-DERIVED MONONUCLEAR CELL THERAPY IN EXPERIMENTAL PULMONARY AND EXTRAPULMONARY ACUTE LUNG INJURY

Indianara Maria Araújo do Nascimento

Orientadora: Patricia R. M. Rocco

Resumo de tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Doutor em Ciências.

The pathophysiology of acute lung injury (ALI) differs according to the type of primary insult. We hypothesized that bone marrow-derived mononuclear cell (BMDMC) therapy might act differently on lung and distal organs in models of pulmonary (p) or extrapulmonary (exp) ALI with similar mechanical compromise. In control animals, sterile saline solution was intratracheally or intraperitoneally injected, whereas ALI animals received *Escherichia coli* lipopolysaccharide intratracheally (40 µg, ALIp) or intraperitoneally (400 µg, ALIexp). Six hours after lipopolysaccharide administration, ALIp and ALIexp animals were further randomized into subgroups receiving saline (0.05 mL) or BMDMC ( $2 \times 10^6$ ) intravenously. At day 7, BMDMC led to: 1) significant reduction in mortality rate, static lung elastance, fraction area of alveolar collapse, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cellularity (higher in ALIexp than ALIp), 2) decrease in collagen fiber content, number of apoptotic cells in lung, kidney, and liver, and interleukin (IL)-6, KC (murine IL-8 homolog), and IL-10 levels in BALF, as well as repair of basement membrane, epithelium and endothelium independent of ALI etiology, 3) increased mRNA expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and decrease in insulin-like growth factor (IGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and transforming growth factor (TGF)- $\beta$  in both ALI groups, and 5) increased number of green fluorescent protein (GFP)+ cells in lung, kidney, and liver in ALIexp. In conclusion, the BMDMC therapy was effective in modulating the inflammatory and fibrogenic process in both ALI models, although it reduced mortality and improved lung mechanics and histology more in ALIexp. These beneficial results may be attributed to BMDMC engraftment and/or paracrine effects.

Key Words: acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, stem cell, lung mechanics, lung remodeling.

## SUMÁRIO

Folha de rosto .....	I
Folha de Aprovação .....	II
Agências Financiadoras .....	III
Dedicatória .....	IV
Agradecimentos .....	V
Resumo .....	VI
Abstract .....	VII
Índice de abreviaturas .....	12
Índice de Figuras .....	15
Índice de Tabelas .....	17
1 Introdução .....	18
1.1 Conceito da Lesão Pulmonar Aguda .....	19
1.2 Fisiopatologia da Lesão Pulmonar Aguda .....	20
1.3 Reparo da lesão pulmonar .....	23
1.4 Células-tronco .....	26
1.5 Terapia Celular na Lesão Pulmonar Aguda .....	30
2 Justificativa .....	35
3 Objetivos .....	38
3.1 Objetivo Geral .....	38
3.2 Objetivo Específico .....	38
4 Materiais e Métodos .....	39

	10
4.1 Metodologia do estudo .....	30
4.2 Amostra do estudo .....	39
4.3 Instilação dos Animais.....	44
4.4 Preparação e transplante das células mononucleares derivadas da medula óssea.....	44
4.4.1 Contagem das células .....	45
4.4.2 Injeção das células da medula óssea.....	46
4.5 Protocolo experimental .....	46
4.5.1 Preparo dos animais.....	46
4.6 Estudo da mecânica pulmonar .....	48
4.7 Histologia e Morfometria.....	53
4.7.1 Fixação e preparo das lâminas .....	53
4.7.2 Análise histológica e morfométrica .....	55
4.8 Microscopia eletrônica de transmissão.....	56
4.9 Microscopia Confocal .....	58
4.10 Quantificação dos fatores de crescimento e caspase 3 no tecido pulmonar .	59
4.10.1 Extração de RNA total do tecido pulmonar.....	59
4.10.2 <i>Real Time-Polimerase Chain Reaction (RT-PCR)</i> .....	59
4.11 Quantificação da celularidade total, diferencial e citocinas no BALF .....	61
4.11.1 Lavado broncoalveolar .....	61
4.12 Apoptose celular em órgãos.....	62
5 Análise Estatística .....	63
6 Resultados .....	64
6.1 Taxa de mortalidade.....	64

	11
6.2 Mecânica pulmonar .....	65
6.3 Histologia e morfometria.....	68
6.4 Celularidade total, diferencial e citocinas no BALF .....	77
6.5 Expressão de fatores de crescimento e caspase 3 no tecido pulmonar.....	80
6.6 Apoptose celular em órgãos.....	82
7 Discussão.....	88
8 Conclusão .....	97
9 Referências Bibliográficas .....	98
ANEXO .....	111

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BALF - fluido do lavado broncalveolar

BSS - *balanced saline solution*

CMMO - células mononucleares derivadas da medula óssea

Cexp - controle extrapulmonar

Cexp-CEL - controle extrapulmonar tratado com CMMO

Cexp-SAL - controle extrapulmonar tratado com salina

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

Cp - controle pulmonar

Cp-CEL - controle pulmonar tratado com CMMO

Cp-SAL - controle pulmonar tratado com salina

CXC - quimiocinas

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

DDSA - anidrido de ácido doxecenil succínico

DEPC - dietilpirocarbonato

DMEM - *Dulbecco's modified eagle Mmedium*

ELISA - enzyme linked immuno sorbent assay

*E. coli* - *Escherichia coli*

Est - elastância estática do pulmão

FGF - fator de crescimento de fibroblastos

FiO<sub>2</sub> - frações Inspiradas de Oxigênio

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GFP - *green fluorescen protein*

GMCSF - fator estimulante de colônias de granulócitos – monócitos

HE - hematoxilina e eosina

HSCs – células-tronco hematopoiéticas

IFN - interferon

IGF - fator de crescimento semelhante à insulina

IL- interleucina

KC - homólogo do IL-8 em camudongos

KGF - fator de crescimento keracinócito

LPA - Lesão Pulmonar Aguda

LPAexp - LPA extrapulmonar

LPAexp-SAL - LPA extrapulmonar tratado com salina

LPAexp-CEL - LPA extrapulmonar tratado com CMMO

LPAp - LPA pulmonar

LPAp-CEL - LPA pulmonar tratado com CMMO

LPAp-SAL - LPA pulmonar tratado com salina

LPS - lipopolissacarídeo

MSCs – células-tronco mesenquimais

PaO<sub>2</sub> - pressão parcial de oxigênio arterial

PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas

PEEP - Pressão Positiva Expiratória Final

Pel - pressão de retração elástica

PL - pressão transpulmonar

Pi - ponto de inflexão

Pmáx - pressão máxima

PMN – células polimorfonucleares

Ptr - pressão traqueal

PI - pneumócito tipo I

PII - pneumócito tipo II

Req - resistência total do equipamento

RT-PCR – *real time polimerase chain reaction*

SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

TGF - fator de crescimento transformador

Ti - tempo inspiratório

TNF – fator de necrose tumoral

TUNEL - *terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling*

V' - fluxo aéreo

VEGF - fator de crescimento vascular endotelial

V<sub>T</sub> - volume

$\Delta P$  - variações de pressão

$\Delta P_{tot}$  - variação total de pressão

$\Delta P_1$  - gradiente de pressão necessário para vencer os componentes resistivos

$\Delta P_2$  - gradiente de pressão necessário para vencer os componentes viscoelásticos e/ou inomogêneos

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma e linha do tempo do estudo experimental.....	43
Figura 2. Representação esquemática dos traçados de fluxo, volume e pressão transpulmonar em função do tempo.....	49
Figura 3. Representação esquemática dos traçados dos equipamentos utilizados na mecânica pulmonar .....	53
Figura 4. Representação esquemática do retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos .....	56
Figura 5. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier .....	64
Figura 6. Elastância estática (Est) dos pulmões nos dias 1 e 7 .....	66
Figura 7. Variação de pressão nos dias 1 e 7 .....	67
Figura 8. Fotomicrografia de parênquima pulmonar nos dias 1 e 7 .....	70
Figura 9. Quantidade de fibras colágenas no septo alveolar nos dias 1 e 7 .....	72
Figura 10. Micrografia eletrônica do parênquima pulmonar nos dias 1 e 7 .....	75
Figura 11. Microscopia confocal do parênquima pulmonar de animais GFP+ no dia 7 .....	76
Figura 12. Níveis de interleucinas (IL) no BALF.....	79
Figura 13. Expressão de RNAm para fatores de crescimento e caspase 3 no tecido pulmonar .....	81
Figura 14. Fotomicrografia representativa do pulmão, fígado e rim corado com hematoxilina-eosina (HE) e técnica de TUNEL no dia 1 .....	84
Figura 15. Fotomicrografia representativa do pulmão, corado com hematoxilina-eosina (HE) e técnica de TUNEL no dia 7.....	85

Figura 16. Fotomicrografia representativa do rim corado com hematoxilina-eosina (HE) e técnica de TUNEL no dia 7 .....	86
Figura 17. Fotomicrografia representativa do fígado, corado com hematoxilina-eosina (HE) e técnica de TUNEL no dia 7.....	87

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1. Parâmetros morfométricos .....	69
Tabela 2. Análise semi-quantitativa da microscopia eletrônica .....	74
Tabela 3. Celularidade total e diferencial do lavado broncoalveolar .....	78
Tabela 4. Apoptose de células epiteliais .....	83

## 1 INTRODUÇÃO

A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) são caracterizadas por uma reação inflamatória difusa do parênquima pulmonar a uma variedade de agressões pulmonares ou sistêmicas, com aumento da permeabilidade alvéolo-capilar associada a uma série de anormalidades clínicas, radiológicas e fisiológicas (BERNARD e cols., 1994; BERNARD, 2005).

Durante os 45 anos, desde a descrição inicial da SDRA, uma variedade de informações acerca dos fatores de risco, co-morbidades e mortalidade hospitalar vêm sendo estudada. A incidência da LPA/SDRA varia significativamente entre os estudos, podendo refletir as diferentes definições usadas na literatura desde 1971 (ARTIGAS e cols., 1998; CHEUNG e cols., 2006, VILLAR e cols., 2007). Recentemente, estudo epidemiológico prospectivo mostrou incidência de aproximadamente 200.000 casos por ano nos Estados Unidos com aproximadamente 75.000 mortes por LPA/SDRA (RUBENFELD e cols., 2005).

A gravidade dessa doença faz com que métodos avançados de suporte de vida como a utilização de ventilação mecânica e o uso de potentes terapias medicamentosas sejam adotados (AMATO e cols., 1998; CEPKOVA & MATTHAY, 2006, DEAL e cols., 2008; SHYAMSUNDAR e cols., 2009). Entretanto, apesar dos avanços terapêuticos, a taxa de mortalidade nestes pacientes continua elevada, sendo de aproximadamente 35-40% (ARTIGAS e cols., 1998; BRUN-BUISSON e cols., 2004; VILLAR e cols., 2007, PHUA e cols., 2009). Nesse contexto acredita-se que uma terapia eficaz para o tratamento da LPA/SDRA deva promover

simultaneamente atenuação da resposta inflamatória e adequado reparo da lesão pulmonar. Assim, a terapia celular surge como uma possível ferramenta para a reversão dos eventos patológicos da LPA/SDRA, ou pelos menos, atenuação dos sintomas da mesma (KOTTON e cols., 2001; GUPTA e cols., 2004; YAMADA e cols., 2004; MEI e cols., 2007; LEE e cols., 2009).

Estudos experimentais sugerem que as células-tronco apresentam um importante papel no desenvolvimento, reparo e remodelamento alveolar após injúria (WEISS e cols., 2006). As células-tronco são células indiferenciadas com habilidade de auto-replicação (gerar cópias idênticas de si mesma) e diferenciação em diversas células do organismo. Sob determinadas condições, ainda são capazes de estimular a síntese de mediadores pró- e anti-inflamatórios e fatores de crescimento. Destarte, elas podem vir a ser promissoras na reversão de doenças respiratórias (PITTENGER e cols., 1999; LOI e cols., 2006; WEISS, 2007; ASLAM e cols., 2009; BALASUBRAMANIAM e cols., 2009), podendo ser uma nova proposta terapêutica na LPA/SDRA, na tentativa de minimizar o processo inflamatório e de fibrogênese, bem como reduzir a taxa de mortalidade.

## **1.1 CONCEITO DA LESÃO PULMONAR AGUDA**

A LPA e a SDRA são síndromes caracterizadas por critérios fisiológicos e radiológicos em que há uma extensa lesão as células e estruturas da membrana alvéolo-capilar que ocorre dentro de horas a dias após um fator predisponente (MATTHAY e cols., 2003).

As anormalidades fisiológicas primárias são hipoxemia arterial severa

refratária ao uso de altas frações inspiradas de oxigênio ( $\text{FiO}_2$ ), edema alveolar resultante da alteração da permeabilidade alvéolo-capilar com conseqüente diminuição na complacência pulmonar e aumento do trabalho respiratório, uma das razões pelas quais a assistência ventilatória mecânica é necessária. Os exames histológicos evidenciam microatelectasias, congestão vascular, hemorragia e edema intra-alveolar rico em proteína, formação de membrana hialina revestindo a superfície alveolar, edema intersticial e fibrose (SCHUSTER, 1995; GUNTHER e cols., 2001; SOUZA e cols., 2003).

Em 1994, o consenso entre as Sociedades Americana e Européia de Pneumologia e Terapia Intensiva estabeleceram os seguintes critérios para definição da SDRA: (1) início agudo, (2) infiltrado bilateral difuso à radiografia de tórax, (3) pressão capilar pulmonar  $\leq 18$  mmHg ou ausência de evidências clínicas de falência cardíaca esquerda, e (4) índice de oxigenação (relação entre pressão parcial de oxigênio arterial e fração inspirada de oxigênio [ $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ])  $\leq 300$ , qualquer que fosse o nível de pressão positiva expiratória final (PEEP) utilizado. Os quadros mais leves, caracterizados por  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  entre 200 e 300, seriam denominados de LPA (BERNARD e cols., 1994). Essa definição vem permitindo melhor comparação, compreensão e padronização nos estudos clínicos da LPA e SDRA (ARTIGAS e cols., 1998).

## **1.2 FISIOPATOLOGIA DA LESÃO PULMONAR AGUDA**

Os fatores predisponentes ou desencadeantes da LPA/SDRA incluem uma

variedade de processos que afetam direta ou indiretamente os pulmões. São consideradas lesões diretas, aquelas que ocorrem primariamente no epitélio alveolar, como é o caso das pneumonias ou aspiração de ácidos gástricos, e lesões indiretas, as que ocorrem através do endotélio vascular da membrana alvéolo-capilar, como é o caso da sepse, trauma grave não torácico e circulação extra-corpórea (BERNARD e cols., 1994).

Recentes investigações mostraram diferenças no curso clínico e resolução da doença dependendo do fator predisponente, podendo ser resultado da ativação de diferentes mecanismos inflamatórios (ROCCO & PELOSI, 2008). A lesão pulmonar causada por um insulto direto ao epitélio alveolar induz a perda da integridade epitelial acarretando alteração na permeabilidade, modificação no transporte de fluidos e na remoção do edema do espaço alveolar, assim como, redução na produção e *turnover* do surfactante (WARE & MATTHAY, 2000). Assim, na lesão direta há um predomínio de consolidação alveolar com presença de edema, deposição de fibrina e colágeno, agregado plaquetário e hemácias. Quando o insulto é indireto, há menor dano ao epitélio alveolar, com prevalência de colapso do espaço alveolar conseqüente a congestão microvascular e edema intersticial devido à disfunção da célula endotelial pulmonar induzida pela ação dos mediadores inflamatórios liberados por vários tipos celulares incluindo neutrófilos, macrófagos, monócitos e plaquetas na circulação sistêmica (MATTHAY & WIRNER-KRONISH, 1990; GEISER, 2003; SHIMABUKURO e cols., 2003; ESTEBAN e cols., 2004; MENEZES e cols., 2005; SANTOS e cols., 2006; LEITE-JUNIOR e cols., 2008).

A análise da radiografia de tórax, associada ao conceito fisiopatológico de

alteração difusa da membrana alvéolo-capilar, conduziu a uma interpretação errônea de que a LPA/SDRA seria uma doença com acometimento difuso do parênquima pulmonar. A tomografia computadorizada de tórax permitiu demonstrar que há uma heterogeneidade no acometimento alveolar. As áreas pulmonares, dependentes da gravidade, apresentam graus variáveis de condensações e atelectasias, e as demais regiões apresentam áreas normalmente aeradas ou até mesmo hiperinsufladas (GATTINONI e cols., 1998; PUYBASSET e cols., 1998).

A evolução clínica dos pacientes com LPA/SDRA é variável, sendo influenciada por diferentes fatores, incluindo a etiologia da lesão (GEISER, 2003). Até recentemente, a história natural da LPA/SDRA era descrita acerca de duas fases distintas: uma aguda, inflamatória ou exudativa, e outra tardia, iniciada aproximadamente 72 horas após o insulto inicial, denominada fibroproliferativa. No entanto, recentemente, tem se demonstrado que o processo fibrótico inicia-se precocemente no curso da LPA/SDRA, onde respostas transcricionais em genes envolvidos na inflamação e reparo na LPA são expressos simultaneamente na fase inicial da lesão (MARSHALL e cols., 2000; ROCCO e cols., 2001; DOS SANTOS, 2008; ROCCO e cols., 2009). Desta forma, alguns pacientes recuperam-se da LPA/SDRA durante a primeira semana da doença, outros morrem nesse período, e alguns progridem para uma fase fibrótica, sendo o estágio de organização do exsudato intra-alveolar e intersticial adquirido na fase aguda (SOUZA e cols., 2003; ROCCO e cols., 2001; 2004).

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, sendo a fibrose intra-alveolar 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 (MEDURI e cols., 1991). Extensa fibrose pulmonar está presente em 55% das autópsias de pacientes com SDRA, sugerindo que um reparo inadequado pode contribuir para morbidade e mortalidade nesses pacientes (DOS SANTOS, 2008).

### **1.3 REPARO DA LESÃO PULMONAR**

Um dos mais importantes mecanismos que determinam à gravidade da lesão pulmonar é a intensidade da lesão na barreira alvéolo-capilar sendo a possibilidade de reparar a lesão epitelial na fase inicial, o principal determinante da recuperação (WARE & MATTHAY, 2000).

O grande desafio do processo do reparo funcional da barreira alvéolo-capilar deve começar com a reversão do edema e proteínas e reepitelização da barreira alvéolo-capilar. A resolução do edema alveolar deve ser feita através do transporte ativo de sódio do espaço alveolar para o interstício seguido do transporte passivo de água, enquanto as proteínas, tanto solúveis quanto insolúveis, devem ser removidas por endocitose, transcitose e fagocitose (SHIMAKUBURO e cols., 2003). A remoção das proteínas insolúveis é particularmente importante, já que a membrana hialina fornece estrutura para o crescimento de tecido fibroso (GEISER, 2003).

O epitélio alveolar usualmente exhibe extensa necrose de células alveolares tipo I, levando a desnudação da membrana basal com formação de membrana hialina (GEISER, 2003). As células tipo I são altamente vulneráveis a lesão, entretanto as células tipo II são mais resistentes e podem funcionar como células progenitoras para regeneração do epitélio alveolar após a lesão. A hiperplasia de células tipo II é típica na fase proliferativa da LPA (YEN e cols., 2006). As células migram e iniciam a proliferação ao longo do septo alveolar na tentativa de recobrir a membrana basal desnuda e restabelecer a continuidade do epitélio alveolar (GEISER, 2003). Esta proliferação é controlada por fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento de hepatócito e fator de crescimento de fibroblasto (WARE & MATTHAY, 2000; QUESNEL e cols., 2008).

O mecanismo pelo qual há resolução da proliferação e migração de pneumócitos tipo II para o reparo do dano alveolar permanece incerto. Acredita-se que, o fim da proliferação pode estar associado à diminuição dos fatores de crescimento, perda do contato inibitório da contigüidade das células tipo I, alteração na estrutura da matriz extracelular ou aumento dos níveis de citocinas inibitórias (WANG e cols., 2002). Wang e colaboradores (2002) e Hagimoto e colaboradores (2002) também demonstraram que a apoptose das células tipo II mediada pela via Fas/FasL parece ser o principal mecanismo envolvido com o processo de reparo e remodelamento na LPA, podendo envolver angiotensina II e fator de crescimento transformador (TGF)- $\beta$ .

O remodelamento e reparo dependem da causa primária da lesão. Nesse contexto, estudos experimentais demonstraram que a LPA causada por uma

agressão primária ao endotélio acarretava fibrose precoce que se reparava com o progredir da lesão, diferentemente de quando a lesão inicial era direta ao epitélio alveolar, onde havia fibrose que se perpetuava com o decorrer da lesão, sugerindo a importância do epitélio na manutenção da fibrogênese (SANTOS e cols., 2006). Menezes e colaboradores (2005) também constataram, através de microscopia eletrônica, que 24 horas após indução de lesão pulmonar direta ou indireta por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (*E. coli*) havia proliferação de fibroblastos no septo alveolar e presença de fibras colágenas tipo III, sugerindo que a síntese de colágeno reagia rapidamente à agressão pulmonar.

Dentro da parede alveolar, os fibroblastos se proliferam e migram através da membrana basal para dentro do exudato intra-alveolar (GEISER, 2003). Se o exudato fibrinoso puder ser resolvido, a restauração da arquitetura pulmonar normal poderá ser alcançada. No entanto, se as células alveolares tipo II migrarem sobre a superfície do tecido de granulação, a fibrose intersticial pode se desenvolver (SANTOS e cols., 2006). Desordem no *turnover* da fibrina também pode levar a deposição de fibrina no espaço alveolar, acelerando o processo fibrótico. Isto pode levar a piora na troca gasosa e redução na complacência pulmonar (BREEN, 2000; IDELL, 2003).

Os macrófagos alveolares também têm importante papel na progressão da LPA para uma fase fibroproliferativa, uma vez que secretam vários mediadores pró-inflamatórios como interleucinas (IL)-1 $\beta$ , IL-8 e IL-13 e fatores de crescimento como TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) que influenciam a migração de células mesenquimais, proliferação e

deposição de componentes da matriz extracelular (DOS SANTOS, 2008).

Portanto, o processo de reparo epitelial inclui interações célula-célula e interação entre células alveolares tipo II e matriz extracelular que são coordenados por uma variedade de mediadores liberados no espaço alveolar na LPA e que pode ocorrer de maneira heterogênea no tempo e no espaço (INGBAR, 2000; GEISER, 2003; SANTOS e cols., 2006). Porém, não se sabe quais os fatores que determinam se o indivíduo vai evoluir com fibrose pulmonar ou restaurar a arquitetura pulmonar. A eficiência no reparo do epitélio alveolar pode reduzir o desenvolvimento de fibrose em pacientes, já que a presença de epitélio alveolar intacto suprime a proliferação fibroblástica e a deposição na matriz (ADAMSON e cols., 1988).

Outro importante mecanismo envolvido na reconstituição da membrana alveolar é a regeneração celular. Acredita-se que em condições fisiológicas, exista um suficiente número de células progenitoras residentes capazes de reparar o epitélio dando origem a células epiteliais relativamente mais proliferativas e resistentes a apoptose induzida por lesão. Entretanto, após lesão significativa a capacidade das células locais em reconstituir o epitélio desnudado é insuficiente e células progenitoras circulantes precisam ser recrutadas ou células-tronco exógenas utilizadas contribuindo, assim, com o reparo (WARBURTON e cols., 2008).

#### **1.4 CÉLULAS-TRONCO**

As células-tronco são células indiferenciadas, conhecidas pela sua

capacidade de auto-renovação, proliferação e plasticidade. Elas possuem um potencial de diferenciação variado, ou seja, algumas células são completamente indiferenciadas e outras são diferenciadas nos tecidos em que residem, podendo ser assim classificadas em (1) totipotentes que são as mais indiferenciadas, capazes de gerar todos os tipos de células completamente diferenciadas do organismo, (2) pluripotentes que são células capazes de dar origem a todos os tipos de células exceto anexos placentários, e se diferenciam em células provenientes dos três folhetos embrionários, (3) multipotentes que são responsáveis por uma pequena taxa de diferenciação, e dão origem apenas aos tipos celulares do próprio tecido em que residem e, (4) unipotentes que são células capazes de gerar apenas um tipo celular, como é o caso dos pneumócitos tipo II que podem dar origem aos pneumócitos tipo I (GRIFFITHS e cols., 2005, ABREU e cols., 2008; WEISS e cols., 2008).

As células-tronco podem ainda ser divididas em dois tipos: endógenas e exógenas. As células endógenas contribuem localmente para o restabelecimento celular, isto é, apresentam células-tronco tecido-específicas, assim chamadas células-tronco somáticas adultas (ALIOTTA e cols, 2005). O epitélio alveolar, por exemplo, é classificado como um tecido de renovação contínua. As células epiteliais tipo II parecem ser as células-tronco do parênquima pulmonar. No início de 1970, muitos investigadores observaram grande aumento no número de pneumócitos II que se diferenciava em células tipo I na superfície alveolar durante o reparo dos pulmões que sofreram lesão por hiperóxia ou pneumonia (YEN e cols, 2006). As células-tronco adultas são raras e sua capacidade de proliferação muito baixa em condições basais (MATTHAY e cols., 2003; NEURINGER &

RANDELL, 2004), assim, as células exógenas derivadas da medula óssea podem contribuir para o reparo tecidual em lesões mais graves, fazendo-se necessário a busca de uma fonte alternativa de células, como é o caso dos transplantes de células-tronco (YEN e cols., 2006).

O termo células-tronco derivadas da medula óssea é utilizado para indicar uma população, ou populações de células derivadas da medula óssea que podem participar no remodelamento e reparo da lesão (WEISS e cols., 2006). A medula óssea é fonte de duas distintas populações de células-tronco: células-tronco hematopoiéticas (HSCs), que são responsáveis pelo desenvolvimento de linhagens inteiras de células sanguíneas, incluindo leucócitos, hemácias e plaquetas, e células-tronco mesenquimais (MSCs) que dão origem a uma variedade de tecidos conectivos localizados em diferentes camadas germinativas (WEISS e cols., 2006; YEN e cols., 2006). Vários estudos usando transplante de HSC ou MSC em modelo experimental de lesão pulmonar e em estudos clínicos também têm demonstrado que as células-tronco derivadas da medula óssea podem ser convertidas em pneumócitos tipo II (ORTIZ e cols., 2003; SURATT e cols., 2003; MATTSSON e cols., 2004).

O mecanismo pelo quais as células assumem fenótipos pulmonares permanece incerto (ALIOTTA e cols., 2006; DOONER e cols., 2008). Dentre eles, a transdiferenciação pode ser definida como um processo onde uma célula já diferenciada se transforma em outro tipo celular completamente diferenciado (ex: células-tronco hematopoiéticas se diferenciando em tecido pulmonar) (YEN e cols., 2006). Nesse processo, ocorre uma mudança na morfologia e na programação genética da célula que ocorre através da alteração da expressão de

um gene regulador mestre que define as características de uma célula específica. Estudos recentes indicam também que as células-tronco da medula podem alterar de forma contínua e reversível seu fenótipo em determinadas fases do ciclo celular na dependência de citocinas ou que seja possível em certas fases do ciclo celular, que as células-tronco da medula expressem receptores específicos que podem receber sinais externos que permitam eventual diferenciação em células pulmonares (DOONER e cols., 2008). Alguns autores demonstraram, no entanto, que pode ocorrer fusão de células, na qual duas células se fundem formando um heterocácion (dois núcleos) (HERZOG & KRAUSE, 2006; KRAUSE, 2008). Nesse contexto, a fusão das células-tronco adultas derivadas da medula óssea com células epiteliais pulmonares pode ocorrer sob várias circunstâncias *in vitro*, embora esse fenômeno pareça não ocorrer com tanta frequência em pulmões *in vivo* (NEURINGER & RANDELL, 2004; WEISS e cols., 2006). É importante ressaltar, no entanto, que nem sempre ocorre reprogramação gênica como resultado dessa fusão, não caracterizando dessa forma a formação de um novo tipo celular como na plasticidade (TERADA e cols., 2002, NEURINGER & RANDELL, 2004; HERZOG & KRAUSE, 2006; WEISS e cols., 2006).

O recrutamento das células-tronco derivadas da medula óssea provavelmente se deve a sinais quimiotáticos liberados na lesão ou remodelamento, assim como expressão de moléculas de adesão específicas ou outras proteínas servindo como fator de atração para essas células. Quando são expostos a fatores de crescimento e citocinas, as células estromais adultas podem desenvolver fenótipos com características de fibroblastos, osteoblastos,

condrócitos ou adipócitos. Isto sugere que, a liberação de mediadores solúveis pelas células epiteliais e/ou contato direto célula a célula entre epitélio e células mesenquimais possam influenciar a conversão fenotípica de células-tronco estromais em células pulmonares epiteliais (BURNHAM & MOSS, 2006; WEISS e cols., 2006). Nesse contexto, Hashimoto e colaboradores (2004) 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 $\alpha$  se elevou no pulmão lesado em relação ao controle, sendo especulado seu envolvimento nesse mecanismo molecular (HASHIMOTO e cols., 2004).

Outro mecanismo que vem sendo estudado é o da liberação de citocinas e fatores de crescimento oriundos das células derivadas da medula óssea, o chamado efeito parácrino (KINNAIRD e cols., 2004; LEE e cols., 2009). Estudos experimentais têm mostrado que células mononucleares derivadas da medula óssea (CMMO) são capazes de produzir várias citocinas, *in vitro* e *in vivo*, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), FGF e angiopoietina-1 (HAMANO e cols., 2000; KOBAYASHI e cols., 2000; NISHIDA e cols., 2003; KINNAIRD e cols., 2004; TAKAHASHI e cols., 2006).

## **1.5 TERAPIA CELULAR NA LESÃO PULMONAR AGUDA**

A terapia com células-tronco derivadas da medula óssea vem sendo realizada em modelos experimentais de LPA (ABREU e cols., 2008). Nesse

contexto, Yamada e colaboradores (2004) demonstraram que o estímulo inflamatório, por si só, acarreta recrutamento de células progenitoras da medula óssea para a circulação sistêmica, com posterior diferenciação em células epiteliais e endoteliais. Além disso, observaram-se alterações sugestivas de enfisema pulmonar nos animais que tiveram a medula óssea irradiada, antes da administração de LPS. Logo, as células progenitoras da medula óssea demonstraram ter grande importância no processo de reparo da lesão pulmonar.

Recentemente, também foi observada relação direta entre o número de células progenitoras endoteliais e a sobrevida na LPA/SDRA. Tais células são subtipo das células-tronco hematopoiéticas, isoladas do sangue periférico de humanos, com capacidade de reparar e reconstituir o endotélio pulmonar lesado na LPA/SDRA. Adicionalmente essas células estimulam e promovem: 1) a secreção de fatores de crescimento parácrinos, regulando a resposta angiogênica e 2) a interação celular, facilitando a proliferação e crescimento celulares (BURNHAM e cols., 2005). Assim, o estímulo das células progenitoras na circulação pode representar uma nova intervenção terapêutica para a LPA (STRIPP, 2008; WARBURTON e cols., 2008).

O recrutamento de células-tronco da medula óssea também tem sido induzido pela administração de diversas citocinas, quimiocinas e agentes quimioterapêuticos, sendo o mais utilizado o fator estimulante de colônias de granulócitos – monócitos (GMCSF). Tal fator promove melhora da troca gasosa em pacientes com sepse grave e disfunção respiratória (PRESNEILL e cols., 2002). Entretanto, a administração de GMCSF em indivíduos saudáveis, com o intuito de recrutar células-tronco para posterior doação, está associada a uma

série de efeitos adversos como dor óssea, cefaléia, além de fadiga generalizada em aproximadamente 30% dos casos. As complicações pulmonares não estão descartadas, sendo as mais freqüentes SDRA e a pneumonia intersticial. No caso das células progenitoras endoteliais, já foi observado que o GMCSF e o VEGF parecem não estar correlacionados com o recrutamento e conseqüente aumento do número de tais células. Logo, mais estudos são necessários para avaliarmos os verdadeiros efeitos das células progenitoras endoteliais no reparo do dano endotelial na SDRA (PRESNEILL e cols., 2002).

Rojas e colaboradores (2005a) demonstraram efeito benéfico da administração de células mesenquimais derivadas da medula óssea na lesão pulmonar induzida por bleomicina em camundongos. Os autores constataram que o grau de lesão pulmonar foi minimizado nos camundongos que eram mielo-suprimidos, enquanto que nos animais que apresentavam a medula íntegra, a lesão foi quase toda resolvida; sugerindo que tanto as células-tronco exógenas quanto as endógenas desempenham importante papel no reparo da lesão pulmonar, provavelmente por reduzir os níveis de diversas citocinas, tais como interferon (IFN)- $\gamma$ , IL-2, IL-1 $\beta$  e IL-4, e promover a liberação de GMCSF, que acabam por recrutar as células-tronco para o local da lesão. As células-tronco mesenquimais também se diferenciaram em diversos tipos celulares do tecido pulmonar como: células epiteliais tipo I e II, fibroblastos e células endoteliais, porém ainda não se sabe se tais células se originam da fusão com células residentes do próprio tecido ou realmente de sua diferenciação.

Certamente, mais estudos são necessários para determinar a verdadeira fonte celular de fatores quimiotáticos e os efeitos da interação entre a lesão

pulmonar e o conseqüente recrutamento de células-tronco, com posterior diferenciação das mesmas. Xu e colaboradores (2007) demonstraram que a administração de células mesenquimais derivadas da medula óssea na LPA induzida por LPS preveniu a lesão pulmonar e reduziu a resposta inflamatória sistêmica, por suprimirem a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimularem a liberação de citocinas antiinflamatórias, não sendo necessária interação entre as células-tronco e as células pulmonares; porém, se ocorresse essa interação, a resposta antiinflamatória seria potencializada.

A administração de células-tronco mesenquimais em associação com um potente fator vasoprotetor, a angiopoetina-1, na circulação pulmonar foi avaliado por Mei e colaboradores (2007) em modelo de LPA induzida por LPS, sendo observado que as células-tronco mesenquimais quando administradas isoladamente minimizaram parcialmente a inflamação pulmonar. No entanto, a administração das células-tronco mesenquimais transfectadas com angiopoetina-1 resultou em melhora do processo inflamatório, reduzindo os níveis de diversas citocinas e quimiocinas no fluido do lavado broncoalveolar (BALF), acarretando diminuição da permeabilidade e conseqüente extravasamento de plasma. Além disso, acredita-se que essa produção aumentada de angiopoetina-1 pelas células mesenquimais geneticamente modificadas reduzem a produção de moléculas de adesão, minimizando o influxo de células inflamatórias para o espaço alveolar e diminuindo, por conseguinte, a lesão tecidual.

Recentemente, Lee e colaboradores. (2009), demonstraram que o transplante alogênico de células-tronco mesenquimais humanas em um modelo *ex vivo* de pulmão humano submetido à LPA por instilação de *E.coli* resultou em

redução do edema alveolar e melhora da integridade da barreira endotelial com restauração do transporte de fluido através do epitélio alveolar e que estes resultados são em parte mediados pela secreção de fator de crescimento keratinócito (KGF).

Em resumo, apesar da escassa literatura na LPA, evidenciou-se que as células-tronco endógenas ou exógenas promoveram melhora na lesão pulmonar e seu conseqüente processo fibrótico, não somente por produzir um reparo tecidual mais adequado através da sua diferenciação em diversos tipos celulares do tecido pulmonar, como também em função de seus efeitos na redução da inflamação pulmonar e sistêmica e na liberação de fatores de crescimento, que estimulam a proliferação celular. Portanto, a terapia celular é vista como uma possível proposta terapêutica para o tratamento da LPA/SDRA. Entretanto, mais estudos são necessários para um melhor entendimento dos efeitos das células-tronco no tecido pulmonar na LPA/SDRA.

## 2 JUSTIFICATIVA

O reconhecimento das diferentes fisiopatologias da LPA/SDRA pode levar a resultados clínicos distintos e diferentes respostas aos tratamentos (PELOSI e cols, 2003; ROCCO & ZIN, 2005; ROCCO & PELOSI, 2008). Atualmente, o principal direcionamento da LPA/SDRA inclui o tratamento da doença de base, adequado suporte hemodinâmico e ventilação com estratégia protetora. Acelerar o processo de reparo ou atenuar a resposta inflamatória parece ser os principais alvos no manejo da LPA/SDRA.

Nesse contexto, a terapia celular realizada em alguns modelos de lesão pulmonar tem demonstrado que células da medula óssea são capazes de se diferenciar em epitélio brônquico e alveolar, mais especificamente com morfologia e fenótipo de células tipo II (KRAUSE e cols, 2001) e são capazes de induzir redução significativa na inflamação, deposição de colágeno, e ativação de metaloproteinases (MMP) no tecido pulmonar provavelmente por produzir antagonistas do fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  (ORTIZ e cols., 2003) ou outras citocinas que interrompem as vias de sinalização que levam a fibrose (ROJAS e cols, 2005a). Contrariamente ao observado nos estudos anteriores, Hashimoto e colaboradores (2004) constataram que a terapia celular na lesão pulmonar induzida por bleomicina induziu migração pulmonar de fibroblastos derivados da medula óssea, com 27% dessas células expressando colágeno tipo I determinando agravamento do quadro de fibrose pulmonar. Já Kotton e colaboradores (2005) observaram que quando autofluorescência, células mortas e

contaminação de células sanguíneas são excluídas da análise tecidual, o transplante de células-tronco em lesão pulmonar por bleomicina não determinou reconstituição de células do epitélio alveolar. Apesar dos resultados contraditórios, faz-se necessário entender os mecanismos responsáveis pela liberação, proliferação e diferenciação das células-tronco envolvidas no mecanismo de reparo e remodelamento do parênquima pulmonar.

Nos últimos anos, tem sido demonstrado que as células-tronco derivadas da medula óssea possuem capacidade proliferativa e de diferenciação muito maior do que se imaginava. Essa elevada capacidade de diferenciação das células-tronco está relacionada a alguns fenômenos no parênquima pulmonar tais como: 1) diferenciação: processo através do qual uma célula indiferenciada torna-se mais complexa e especializada no que tange sua estrutura e função (ex: célula epitelial tipo II se diferenciando em tipo I); 2) dediferenciação: processo pelo qual uma célula já comprometida com uma determinada linhagem é reprogramada, tornando-se uma célula mais imatura e com maior potencial proliferativo e de diferenciação (ex: célula epitelial tipo I originando célula epitelial tipo II); 3) transdiferenciação: nesse evento, uma célula já diferenciada se transforma em outro tipo celular completamente diferenciado (ex: células tronco hematopoiéticas se diferenciando em tecido pulmonar); 4) transdiferenciação direta: processo através do qual uma célula diferenciada multipotente se transforma de forma direta em outro tipo celular com estrutura e função mais complexas e especializadas (ex: células tronco hematopoiéticas se diferenciando em célula epitelial tipo I); 5) transdiferenciação oblíqua: tal processo é caracterizado pela transformação de forma indireta de células diferenciadas multipotentes em outros tipos celulares em

estados mais imaturos e com maior capacidade proliferativa (ex: células-tronco hematopoiéticas se diferenciando em célula epitelial tipo II) (YEN e cols., 2006).

Atualmente, vários modelos experimentais têm demonstrado a plasticidade das células-tronco adultas. Porém, os mecanismos moleculares que levam a diferenciação de tais células necessitam ser elucidados. Certamente, o entendimento desses mecanismos auxiliará no uso dessas células nas diferentes etiologias da LPA/SDRA. Acredita-se também que as células-tronco adultas sejam recrutadas para o local de lesão através da liberação de sinais quimiotáticos e/ou aumento da expressão de moléculas de adesão específicas. Outro fator que permanece sem resposta é o mecanismo pelo qual as células conseguem atravessar a membrana basal do tecido lesado e alcançar as áreas lesadas. Considera-se que tal fenômeno ocorra pelos mesmos mecanismos através dos quais as células de defesa conseguem atingir seu alvo, ou seja, acredita-se que as permeabilidades de tais membranas sejam reguladas pela produção de proteínas sintetizadas pelo próprio tecido, controlando o influxo das células-tronco para a área lesada.

Nesse contexto, a hipótese do nosso trabalho é que uma vez que o transplante das células-tronco é realizado por via sistêmica, o reparo e a resolução do processo inflamatório podem depender da etiologia da lesão, podendo ser potencializados na LPA extrapulmonar, já que o endotélio é primariamente lesado e isso facilitaria a entrada de células no interstício, contrariamente ao que ocorreria na LPA pulmonar, onde o endotélio usualmente está preservado na fase inicial da lesão.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos da terapia com células mononucleares derivadas da medula óssea (CMMO) no reparo e remodelamento do parênquima pulmonar em modelos experimentais de LPA de etiologia pulmonar e extrapulmonar.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver modelo de LPA de etiologia pulmonar e extrapulmonar em camundongos C57BL/6 com grau similar de alteração funcional.
- Analisar o efeito da terapia celular na taxa de mortalidade na LPA de diferentes etiologias.
- Avaliar a resposta morfofuncional e inflamatória através da mecânica pulmonar e microscopias óptica, eletrônica e confocal do tecido pulmonar após a terapia com CMMO.
- Entender os mecanismos envolvidos no remodelamento e reparo da membrana alvéolo-capilar após a terapia com CMMO.
- Identificar as células dos doadores injetadas nos receptores através da expressão da *green fluorescen protein* (GFP).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Metodologia do estudo

Estudo experimental laboratorial utilizando camundongos C57BL/6, pesando entre 20 e 25 gramas.

### 4.2 Amostra do estudo

Foram estudados um total de 192 camundongos C57BL/6: 42 machos (doadores) de 1 mês de idade, 6 machos entre 1 mês de idade (doadores) geneticamente modificados para expressar *green fluorescen protein* (GFP) e 144 fêmeas (receptores) entre 1 mês e meio e 2 meses de idade provenientes do biotério do Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). É importante ressaltar que os animais doadores foram da mesma ninhada dos animais receptores.

Todos os animais receberam os cuidados humanos de acordo com os “Princípios de Cuidados para Animais de Laboratório” formulado pela Sociedade Nacional para Pesquisas Médicas aprovada pelo Conselho da Sociedade Americana de Fisiologia, e os protocolos (CEUA 019) submetidos ao Comitê de Bioética do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ. Todas as fêmeas foram aleatoriamente divididas em quatro principais grupos experimentais

**Grupo controle pulmonar (Cp) (n=28)**

Animais receberam solução salina (NaCl 0,9%, 50 µL) por via intratraqueal.

**Grupo controle extrapulmonar (Cexp) (n=28)**

Animais receberam solução salina (NaCl 0,9%, 500 µL) por via intraperitoneal.

**Grupo LPA pulmonar (LPAp) (n=28)**

Animais receberam LPS de *Escherichia coli* (*E. coli*, O55:B5, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) na concentração de 40 µg em 50 µL de solução salina (NaCl 0,9%) por via intratraqueal.

**Grupo LPA extrapulmonar (LPAexp) (n=28)**

Animais receberam LPS de *E. coli* (*E. coli*, O55:B5, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) na concentração de 400 µg em 50 µL de solução salina (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal.

Após seis horas, parte dos animais de ambos os grupos controle e LPA foram novamente subdivididos nos seguintes grupos (Figura 1):

**Grupo controle pulmonar tratado com salina (Cp-SAL) (n=7)**

Animais receberam solução salina (NaCl 0,9%, 50  $\mu$ L) por via intratraqueal e tratados com injeção de solução salina (NaCl 0,9%, 50  $\mu$ L) na veia jugular esquerda.

**Grupo controle pulmonar tratado com células mononucleares derivadas da medula óssea (CMMO) (Cp-CEL) (n=7)**

Animais receberam solução salina (NaCl 0,9%, 50  $\mu$ L) por via intraperitoneal e foram tratados com injeção de CMMO ( $2 \times 10^6$  células/50  $\mu$ L de solução salina (NaCl 0,9%) na veia jugular esquerda.

**Grupo LPA pulmonar tratado com salina (LPAp-SAL) (n=7)**

Animais receberam LPS de *E. coli* na concentração de 40  $\mu$ g/50  $\mu$ L por via intratraqueal e foram tratados com injeção de solução salina (NaCl 0,9%, 50  $\mu$ L) na veia jugular esquerda.

**Grupo LPA pulmonar tratado com células mononucleares derivadas da medula óssea (CMMO) (LPAp-CEL) (n=7)**

Animais receberam LPS de *E. coli* na concentração de 40  $\mu$ g/50  $\mu$ L por via

intratraqueal e tratados com injeção de CMMO ( $2 \times 10^6$  células/50  $\mu$ l de solução salina (NaCl 0,9%) na veia jugular esquerda.

**Grupo controle extrapulmonar tratado com salina (Cexp-SAL) (n=7)**

Animais receberam solução salina (NaCl 0,9%, 500  $\mu$ L) por via intraperitoneal e foram tratados com injeção de solução salina (NaCl 0,9%, 50  $\mu$ L) na veia jugular esquerda.

**Grupo controle extrapulmonar tratado com células mononucleares derivadas da medula óssea (CMMO) (Cexp-CEL) (n=7)**

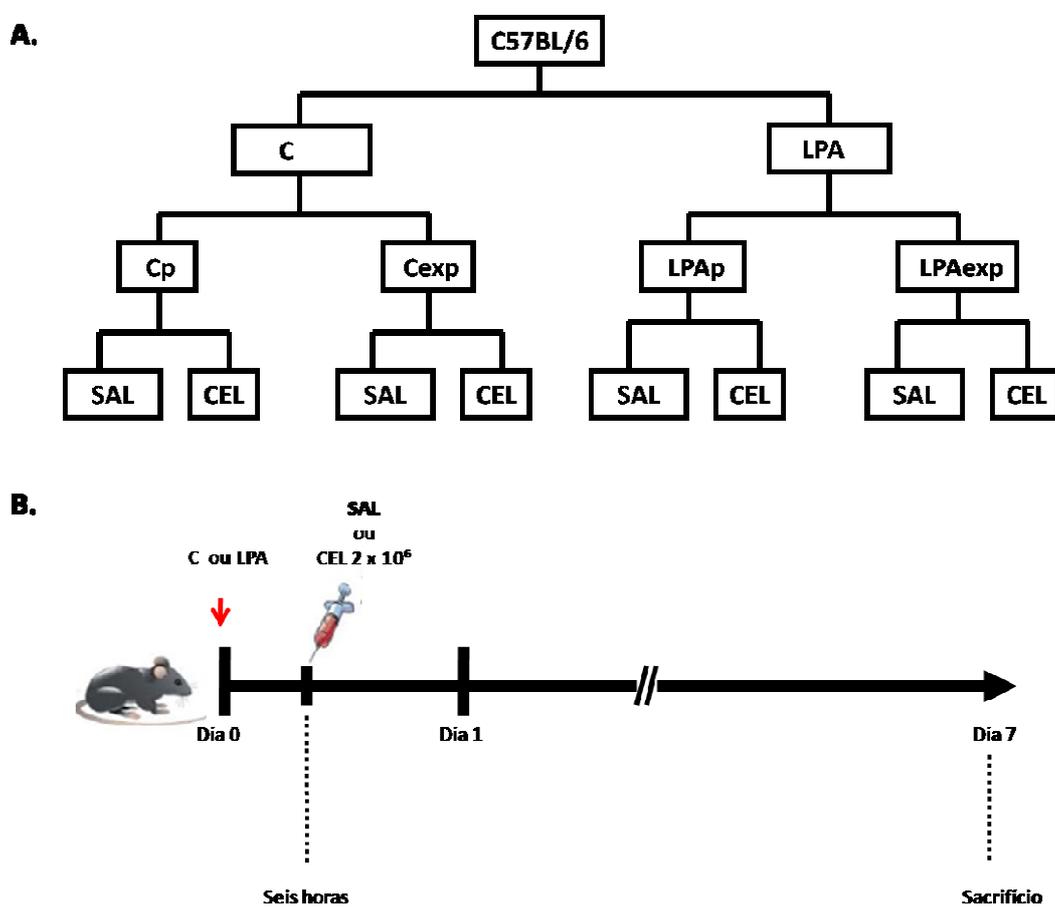
Animais receberam solução salina (NaCl 0,9%, 500  $\mu$ L) por via intraperitoneal e submetidos à injeção de CMMO ( $2 \times 10^6$  células/50  $\mu$ L de solução salina (NaCl 0,9%) na veia jugular esquerda.

**Grupo LPA extrapulmonar tratado com salina (LPAexp-SAL) (n=7)**

Animais receberam LPS de *E. coli* na concentração de 400  $\mu$ g/50  $\mu$ L por via intraperitoneal e tratados com injeção de solução salina (NaCl 0,9%, 50  $\mu$ L) na veia jugular esquerda.

**Grupo LPA extrapulmonar tratado com células mononucleares derivadas da medula óssea (CMMO) (LPAexp-CEL) (n=7)**

Animais receberam LPS de *E. coli* na concentração de 400 µg/50 µL por via intraperitoneal e submetidos à injeção de CMMO ( $2 \times 10^6$  células/50 µL de solução salina NaCl 0,9%) na veia jugular esquerda.



**Figura 1.** Fluxograma (A) e linha do tempo (B) do estudo experimental. C: controle; LPA: lesão pulmonar aguda; SAL: salina NaCl 0,9%; CMMO: células mononucleares derivadas da medula óssea; p: pulmonar; exp: extrapulmonar. Todos os dados foram analisados 1 e 7 dias após os animais serem divididos nos grupos C ou LPA.

### **4.3 Instilação dos Animais**

Para a instilação intratraqueal, os animais foram anestesiados com Sevofluorano (ABBOTT laboratórios do Brasil, Ltda, São Paulo) e, a partir de um corte vertical na traquéia, a musculatura foi divulsionada com exposição da traquéia. Após injeção da solução, os animais foram colocados em posição ortostática para que pudesse facilitar uma distribuição homogênea da solução em ambos os pulmões, sem retenção na traquéia. A seguir, o corte foi fechado com fio de sutura. Todo o procedimento demorou em torno de 2 minutos. Para a injeção intraperitoneal de salina ou LPS os animais não foram anestesiados e a mesma foi realizada sempre a 1 cm do membro inferior esquerdo do animal.

### **4.4 Preparação e transplante das células mononucleares derivadas da medula óssea (CMMO).**

Os doadores foram anestesiados com éter etílico PA (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e submetidos a deslocamento cervical. Com o auxílio de uma pinça e uma tesoura estéreis a pele e os músculos adjacentes ao fêmur e à tíbia foram retirados, sempre evitando o rompimento da artéria femoral. As epífises ósseas foram cortadas, e a cavidade medular lavada com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies<sup>®</sup>, Grand Island, NY, EUA) utilizando uma seringa com agulha de 18 gauge colocada sobre um tubo estéril de poliestireno cônico de 15 mL (Falcon<sup>®</sup>). As células foram homogeneizadas com auxílio de pipeta Pasteur, e em seguida, centrifugadas a

1200 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. O precipitado de células foi ressuspenso em DMEM sem soro, e em seguida adicionado cuidadosamente sobre o Ficoll-Paque (Amersham – GE Healthcare). A seguir, as células foram centrifugadas a 1500 rpm durante 30 minutos à 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<sup>®</sup>). Este anel de células contém células mononucleares (linfócitos e monócitos) e células-tronco de medula óssea. As células foram ressuspenso em solução salina balanceada (balanced saline solution-BSS) e centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, e este processo repetido mais duas vezes para retirar o Ficoll que possa ter sido coletado junto com o anel de células, já que este é tóxico as mesmas. As células não foram colocadas em cultura, sendo injetadas nos animais receptores no mesmo dia da coleta.

#### **4.4.1 Contagem de Células**

Uma alíquota de 10  $\mu$ L de células foi retirada e diluída com 10  $\mu$ L de Azul de Trypan. Desta diluição, 10  $\mu$ L de suspensão de células foi retirado e adicionado na câmara de Neubauer (Hausser Scientific) para a contagem de células. O número de células viáveis foi contado nos quatro quadrantes.

#### **4.4.2 Injeção das Células da Medula Óssea**

Uma hora após a instilação/injeção, as fêmeas foram anestesiadas com Sevoflurano e receberam, através da veia jugular esquerda (i.v.), a injeção das CMMO, em uma concentração de  $2 \times 10^6$  células em 50  $\mu$ L de solução salina NaCl 0,9%.

### **4.5 Protocolo Experimental**

#### **4.5.1 Preparo dos animais**

Os camundongos foram sedados com diazepam via intraperitoneal (1 mg i.p.) (Cristália Prod. Químico e Farmacêutico Ltda, São Paulo, Brasil) e anestesiados com tiopental sódico (20 mg/kg i.p.) (Cristália Prod. Químico e Farmacêutico Ltda, São Paulo, Brasil). Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico, em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados com esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos estendidos a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores abduzidos em diagonal. Após posicionamento cirúrgico, foi realizada uma pequena incisão longitudinal medial de aproximadamente 2 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, pela traqueostomia, um jelco de 20G com 15 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno foi introduzido na traquéia, sendo este fixado na porção proximal por meio de fios de algodão.

A cânula traqueal do animal foi conectada 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 (SC-24, Montreal, PQ, 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 Scireq (SC-24, Montreal, PQ, Canadá) para medida da pressão traqueal ( $P_{tr}$ ). A inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traquéia até a extremidade da tubulação) evita erros de medida de resistência ao fluxo (LORING e cols., 1979; CHANG & MORTOLA, 1981). O volume ( $V_T$ ) mobilizado é 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.

O espaço morto da montagem foi de 0,2 mL. Para computá-lo, pesa-se o conjunto de equipamentos utilizados entre a via aérea do animal e o ventilador (cânula traqueal, tubo em "T", pneumotacógrafo e conexões de borracha) vazio e

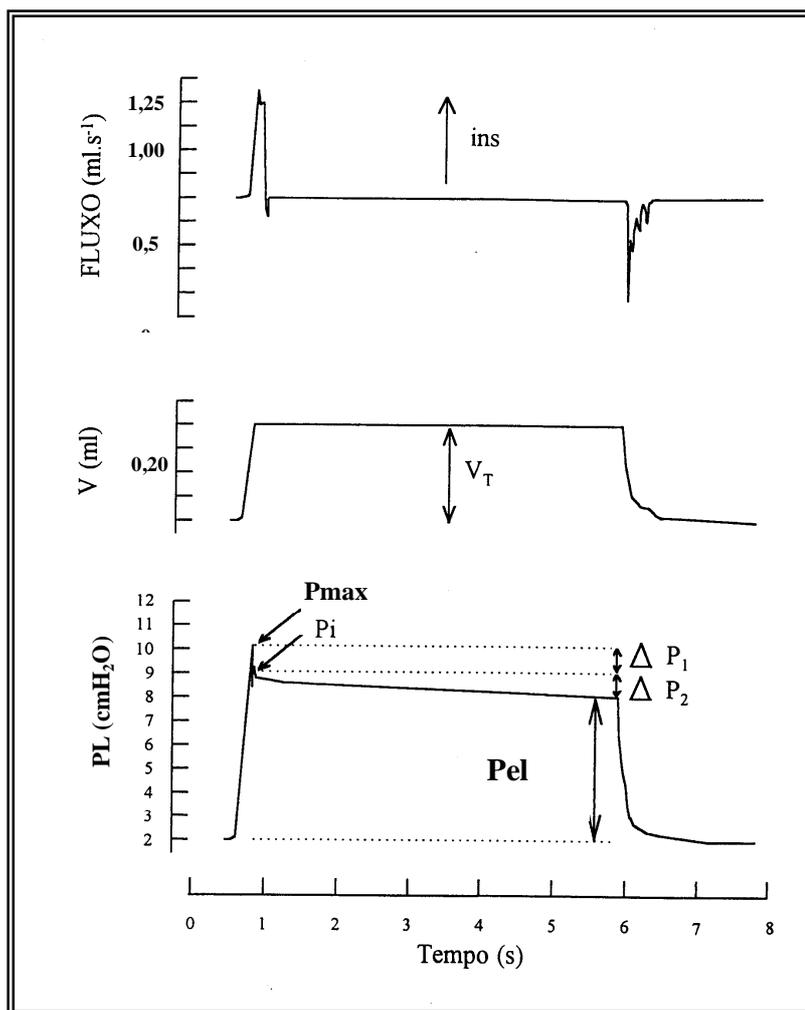
cheio de água. A diferença de peso permite saber o volume de água e, portanto, o volume do espaço morto do sistema. Para fechar as saídas do conjunto e enchê-lo de água foi usado massa de modelar, que foi também pesada, junto com os demais equipamentos.

#### **4.6. Estudo da Mecânica Pulmonar**

Para este estudo, os animais tiveram sua musculatura paralisada após a administração de brometo de pancurônio (2 mg/kg i.v.) e a ventilação artificial instituída por um ventilador mecânico para pequenos animais (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideú, Uruguai) acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. Os animais foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL, fluxo aéreo de 1 mL/s, frequência respiratória de 100 irpm e PEEP de 2 cmH<sub>2</sub>O.

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos à incisão cirúrgica 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 no sentido transversal, seguindo o bordo inferior das costelas até atingir a linha axilar, bilateralmente. Com a cavidade abdominal aberta, é possível visualizar o diafragma que foi perfurado e seccionado para posterior remoção da parede torácica. Nesse momento, uma PEEP de 2 cmH<sub>2</sub>O foi adicionada para manter a capacidade residual funcional.

A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração após insuflação com fluxo constante (BATES e cols., 1985, 1988, 1989), que permite analisar separadamente os componentes elástico, viscoso e viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão (Figura 2).



**Figura 2.** Representação esquemática dos traçados de fluxo, volume e pressão transpulmonar em função do tempo, obtidos a partir da oclusão da via aérea ao final da inspiração. P<sub>max</sub> = pressão máxima alcançada; P<sub>i</sub> = ponto de inflexão; P<sub>el</sub> = pressão de retração elástica, V<sub>T</sub> = volume corrente, ΔP<sub>1</sub> = gradiente de pressão necessário para vencer os componentes resistivos, ΔP<sub>2</sub> = gradiente de pressão necessário para vencer os componentes viscoelásticos e/ou inhomogêneos.

No animal com o tórax aberto, a pressão traqueal ( $P_{tr}$ ) é, na realidade, a pressão transpulmonar (PL). Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, ocorre uma queda súbita da PL até um determinado ponto (ponto de inflexão,  $P_i$ ) 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 do pulmão ( $P_{el}$ ). A diferença de pressão ( $\Delta P_1$ ) que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ( $P_{m\acute{a}x}$ ) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta ( $P_i$ ), corresponde ao componente viscoso do pulmão, ou seja, reflete a pressão necessária para vencer a resistências dos pulmões em animais normais (BATES e cols., 1988, 1989). A segunda variação de pressão ( $\Delta P_2$ ), representada pela queda lenta, do  $P_i$  ao platô ( $P_{el}$ ), reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico (“stress relaxation”) e/ou inhomogêneo (“pendelluft”) do tecido pulmonar (BATES e cols., 1988; KOCHI e cols., 1988a, 1988b; D’ANGELO e cols., 1989). A soma de  $\Delta P_1$  e  $\Delta P_2$  fornece a variação total de pressão ( $\Delta P_{tot}$ ). A elastância estática do pulmão ( $E_{st}$ ) foi calculada dividindo-se  $P_{el}$  pelo volume corrente ( $V_T$ ) (EISSA e cols., 1992).

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 à zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno fluxo. Este fluxo será responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, de  $P_i$  e  $P_{el}$ . Por isso, foi feita correção de acordo com Kochi e colaboradores (KOCKI e cols., 1988a).

As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica respiratória:

$$\Delta P1 = P_{\text{máx}} - P_i$$

$$\Delta P2 = P_i - P_{el}$$

$$\Delta P_{\text{tot}} = \Delta P1 + \Delta P2$$

$$Est = P_{el}/V_T$$

Onde:

$\Delta P1$  = variação de pressão relativa ao componente viscoso

$\Delta P2$  = variação de pressão relativa ao componente viscoelástico e/ou inhomogêneo

$\Delta P_{\text{tot}}$  = variação de pressão total;  $P_{\text{máx}}$  = pressão máxima atingida.

$P_i$  = pressão no ponto de inflexão;  $P_{el}$  = pressão de retração elástica.

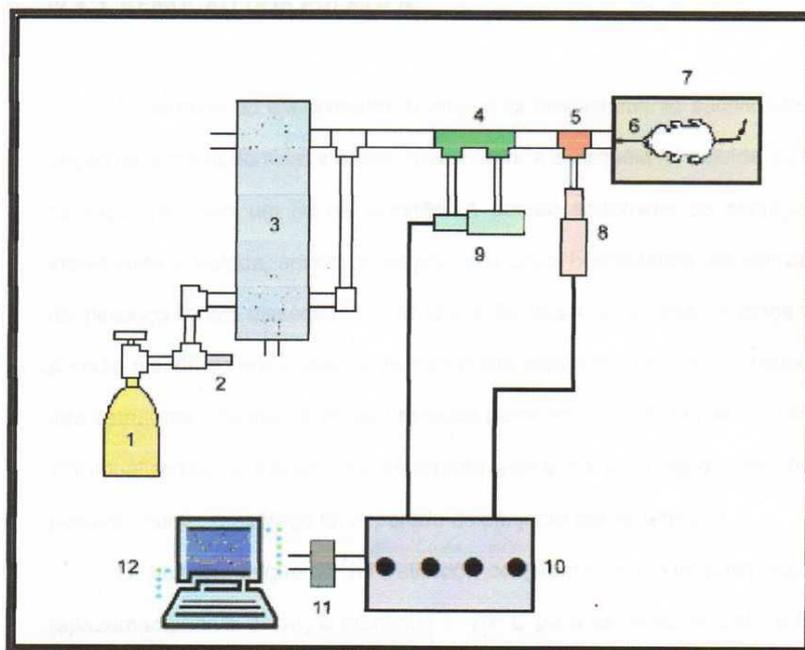
$Est$  = elastância estática;  $V_T$  = volume corrente;

Foram registrados 12 ciclos pelo método de oclusão ao final da inspiração (BATES e cols., 1985, 1988, 1989; KOCHI e cols., 1988a, 1988b), em cada animal. Os transdutores conectados ao pneumotacógrafo e ao tubo 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 [SC-24 (Scireq, Montreal, PQ, Canada)] e convertidos em sinais digitais por um conversor analógico-digital de 12-bitz (DT-2801-A, Data Translation, Malboro, MA, EUA) e amostrados a uma freqüência de 200 Hz em um polígrafo de quatro canais. Os sinais foram armazenados em microcomputador, utilizando-se o software LABDAT (RHT-InfoData, Montreal,

Canadá) e gravados em disquetes magnéticos para posterior análise (*off line*), que foi realizada pelo programa ANADAT (RHT-InfoData, Montreal, Canadá).

A resistência total do equipamento ( $R_{eq}$ ), incluindo a cânula traqueal, foi aferida previamente através da aplicação de diferentes fluxos de ar ao sistema (até fluxos de 26 mL/s; bem acima da faixa de fluxo utilizada no presente experimento), com concomitante registro das variações de pressão ( $\Delta P$ ). Uma vez que  $R_{eq} = \Delta P/V'$ , a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva  $\Delta P \times V'$ . A pressão resistiva do equipamento é subtraída das pressões resistivas do sistema respiratório e pulmões de tal forma que os resultados representam as propriedades mecânicas intrínsecas. A  $R_{eq}$  encontrada nos experimentos, constante na faixa de fluxos usados, foi de  $0,12 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{s}$ . A inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traquéia até a extremidade do pneumotacógrafo) evita erros de medida de resistência ao fluxo (CHANG & MORTOLA, 1981).

A montagem experimental está demonstrada esquematicamente na figura 3.



**Figura 3.** Representação esquemática dos equipamentos utilizados para análise da mecânica respiratória.

1. Cilindro de ar comprimido
2. Rotâmetro de agulha
3. Ventilador de fluxo constante
4. Pneumotacógrafo
5. Conector em T
6. Cânula traqueal
7. Mesa cirúrgica
8. Transdutor diferencial de pressão (Ptr)
9. Transdutor diferencial de pressão
10. Condicionador de 4 canais (Scireq)
11. Conversor analógico-digital
12. Microcomputador

## 4.7 Histologia e Morfometria

### 4.7.1 Fixação e Preparo das Lâminas

Heparina sódica (1000 UI) (Cristália Prod. Químico e Farmacêutico Ltda, São Paulo, Brasil) foi injetada intravenosamente após determinação da mecânica

respiratória. A traquéia foi ocluída ao final da expiração com linha de algodão e o animal sacrificado através de uma hemorragia maciça através da seção da aorta abdominal e da veia cava. O pulmão direito foi, então, removido e congelado através de imersão em nitrogênio líquido, por aproximadamente 3 minutos, e mantidos em solução Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%, por volume) a  $-70^{\circ}$  C por 24 h. Após este período, o material foi desidratado progressivamente através de imersão em soluções com concentração crescente de etanol, como discriminado abaixo:

- MC-1: Etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a  $-20^{\circ}$  C durante 1 h;
- MC-2: Etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a  $-20^{\circ}$  C durante 1 h;
- MC-3: Etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a  $-20^{\circ}$  C durante 1 h;
- Etanol 100%, sendo mantidos a  $-20^{\circ}$  C por 1 h.

Posteriormente, os pulmões foram mantidos a  $-4^{\circ}$  C por 24 h. Após a fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 3  $\mu$ m de espessura.

As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

#### 4.7.2 Análise Histológica e Morfométrica

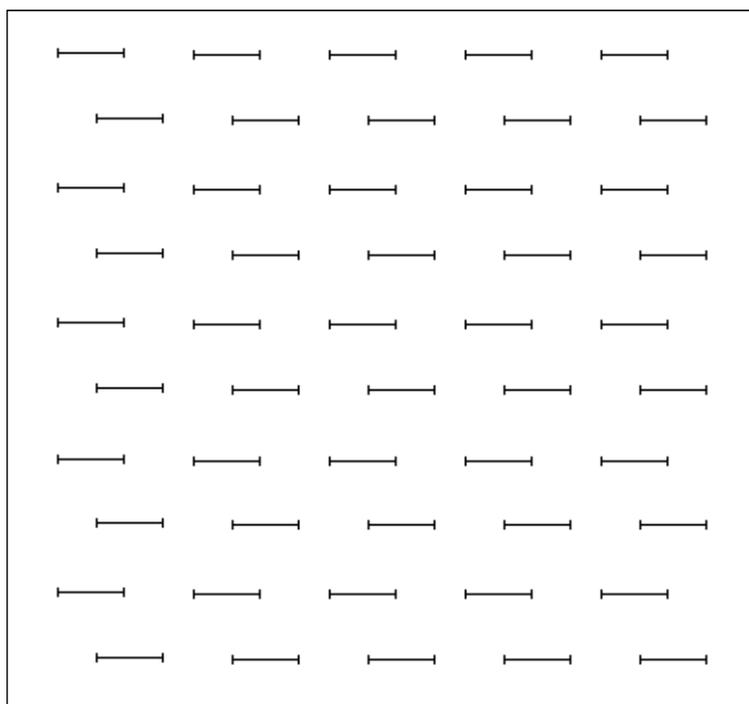
As lâminas contendo os cortes pulmonares foram analisadas por microscopia óptica (microscópio BX51, Olympus Latin American Inc., Miami, Flórida, EUA) segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos. Para a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada com todas as estruturas pulmonares representadas, em aumento de 100 e 400x.

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (“point-counting”), utilizando uma ocular acoplada ao microscópio contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas dispostos em paralelo (Figura 4). Em um aumento de 200x, foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina. Foi quantificada a fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados. O número de pontos que caem em área de alvéolo normal, colapsado ou hiperinsuflado foi dividido pelo número total de pontos em cada campo analisado.

Em um aumento de 1000x (área de  $10.000 \mu\text{m}^2$ ) foram avaliados cinco a dez campos aleatórios e não coincidentes. Os seguintes parâmetros foram quantificados: tecido pulmonar, celularidade total e diferencial (células polimorfonucleares e mononucleares) no septo alveolar e no espaço alveolar. O tecido pulmonar foi avaliado através do número de pontos do campo que coincidiam com a área de tecido e não sobre o espaço aéreo. O resultado foi apresentado como fração de área de tecido pulmonar, obtido pela razão entre a média do número de pontos computados nos cinco campos analisados pela área

total da amostra ( $10.000 \mu\text{m}^2$ ).

Fibras colágenas foram quantificadas no septo alveolar com um aumento de 200x através da técnica de polarização (*Picrosirius*). A área ocupada pelas fibras foi determinada por densitometria digital e, para evitar qualquer viés na interpretação devido ao edema alveolar e ao colapso alveolar, a área ocupada pelas fibras, mensurada em cada septo, foi dividida pelo comprimento de cada septo estudado. O resultado foi expresso como a quantidade de fibras colágenas e elásticas por unidade de comprimento de septo ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ ).



**Figura 4.** Representação esquemática do retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.

#### 4.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a análise por microscopia eletrônica foram retirados dois fragmentos de parênquima pulmonar (2x2x2 mm). 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 anidrido de ácido doxecenil succínico (DDSA), 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 ultramicrótomoto 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, foram selecionadas áreas representativas das lesões. De cada espécime, 2 blocos, contendo aproximadamente 10 fragmentos cada um, foram submetidos à análise para seleção dos cortes ultrafinos.

#### **4.9 Microscopia Confocal**

Para a análise da microscopia confocal foi retirado um pequeno fragmento do parênquima pulmonar do pulmão esquerdo (0,2 x 0,2 x 0,2 cm) e colocado em formaldeído. As amostras foram então incubadas com 20% de ácido acético em metanol por 10 minutos para bloquear fosfatases endógenas e re-hidratadas em solução de BSS. Anticorpos primários para proteína C pró-surfactante (proSP-C, 1:200; anticorpo policlonal de coelho, AB3428; Chemicon International, Temecula, CA), e células endoteliais CD31 mAb anti-humanas de camundongo (1:100; camundongo monoclonal, DAKO) foram utilizados.

Para visualização de células transplantadas que expressam o GFP, seções congeladas do tecido foram então tratadas em meio suplementado com 4',6-diamidino-2-fenilindolodihidroclorato (DAPI) (Vectashield, Vector Labs, Burlingame, CA) e examinado para expressão de GFP. Autofluorescência foi determinada através da avaliação de 10 controles negativos preparados simultaneamente que foram fixados com DAPI apenas. Todas as seções foram examinadas com o microscópio confocal Zeiss LMS-410 equipado com filtro para GFP (verde) e DAPI (azul).

## **4.10 Quantificação dos Fatores de Crescimento e Caspase 3 no Tecido Pulmonar**

### **4.10.1 Extração de RNA Total de Tecido Pulmonar**

As amostras de tecido pulmonar foram homogeneizadas em TRIzol® Reagent (Gibco BRL - Life Technologies, Rockville, MD, EUA). O TRIzol® Reagent é uma solução monofásica de fenol e de guanidina isotilcianato, correspondendo a uma variação do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi em 1987. Após a extração, realizada de acordo com as instruções do fabricante, o RNA precipitado foi solubilizado em 20 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A concentração das amostras de RNA-total foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nanômetros. A integridade das amostras foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi submerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 45 minutos.

### **4.10.2 Real Time-Polimerase Chain Reaction (RT-PCR)**

Para transcrição reversa 1000 ng de RNA total foi utilizado com 5 µg/µL de oligo-dt (Invitrogen, Carlsbad, CA) e um kit transcriptase reversa com inibidores de RNases (Superscript Reverse Transcriptase Kit and RNase OUT RNase inhibitor, Invitrogen, Carlsbad, CA). 20 µL da reação da transcrição reversa (RT) tinha 1 µg

de RNA total, 150 ng de hexameros randomizados, 2 µL de 10x RT *buffer*, 4 µL de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µL de 0,1 M DDT, 1 µL de solução contra RNAses, 1 µL de 50 U/µL de Superscript II e água DEPC. O PCR foi realizado com o SYBR *green* PCR Master Mix (Biosystem Applied). A mistura do PCR foi pré-aquecida a 50° C por 2 minutos e então a 95° por 10 minutos para ativar a AmpliTaq Gold DNA polimerase, seguido de 40 ciclos de amplificação (95°C por 15seg; 60°C por 30seg; 70°C por 40seg). Ao final a reação foi aquecida a 60°C por 10 minutos. O produto do PCR foi checado em gel de agarose à 3,5% (Cambrex Bio Science Rockland).

A quantidade de cDNA correspondente a 62,5 ng RNA foi selecionada e amplificada com os seguintes pares de primers:

- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

sense, 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT- 3'

anti-sense, 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'

- VEGF<sub>165</sub>

sense, 5'- GAC AAG AAA ATC CCT GTG GGC-3'

anti-sense, 5'- AAC GCG AGT CTG TGT TTT TGC-3'

- PDGF

sense, 5'- CAG AAG AAC CTC AAG AGT GCC-3'

anti-sense, 5'- CTT CAT CCA AGT AGA AAT CCT C-3'

- IGF

sense 5'- TAA CCT GCG AAT CCA TGA GCC T-3'

anti-sense, 5'- AAG TGT GTC AGG CAA GAG CA-3'

- TGF- $\beta$

sense, 5'- ATA CGC CTG AGT GGC TGT C-3'

anti-sense, 5'- GCC CTG TAT TCC GTC CTC CT-3'

- Caspase 3

sense, 5'- TAC CGG TGG AGG CTG ACT-3'

anti-sense, 5'- GCT GCA AAG GGA CTG GGA T -3'

A quantificação relativa foi normalizada para o nível de expressão gênica do GAPDH.

O ABI PRISM<sup>®</sup> 7500 Sistema de Detecção de Sequência foi utilizado para detecção em tempo real do PCR, assim como, para análise de dados.

#### **4.11 Quantificação da Celularidade Total, Diferencial e citocinas no BALF**

##### **4.11.1 Lavado Broncoalveolar (BALF)**

Outros animais foram submetidos ao mesmo protocolo de lesão pulmonar e instilação de células-tronco como previamente descrito para obtenção do BALF. Os animais foram então sacrificados em uma câmara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e então submetidos à traqueostomia para obtenção do BALF através da lavagem pulmonar com 0,5 mL de BBS realizadas 4 vezes consecutivas, via cânula traqueal. O lavado foi então centrifugado a 1500rpm durante 7 minutos. A contagem total de células foi realizada em uma câmara de Neubauer através de um microscópio óptico após diluição da amostra em solução de Türk (2% ácido

acético). A contagem diferencial foi realizada pelo método May-Grünwald-Giemsa utilizando o *citospin*. Após centrifugação do BALF o sobrenadante foi coletado e estocado a -70°C e os níveis de citocinas pró (IL-6 e KC - homólogo de IL-8 em camundongos) e antiinflamatórias (IL-10) realizado pelo método *ELISA* (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) de acordo com instruções do fabricante (Duo Set, R&D Systems, Minneapolis, MN).

#### **4.12 Apoptose celular em órgãos**

Para a análise da apoptose de órgãos foram retirados dois fragmentos (0,2 x 0,2 x 0,2 cm) do pulmão, rim e fígado. Os fragmentos foram colocados em solução de formaldeído.

Para a confirmação da ocorrência de apoptose, foi realizada a técnica de TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Label*). As células apoptóticas foram detectadas usando um Kit de detecção de morte celular *in situ* (Fluorescin-Boehringer, Mannheim, Germany). O núcleo da célula sem fragmentação de DNA foi corada em azul como resultado de interação com a hematoxilina. Dez campos por seção de regiões com células apoptóticas foram examinadas a um aumento de 400x. Uma análise semi-quantitativa foi utilizada para avaliar o grau de severidade da apoptose: 0= tecido normal; 1= 1-25% de células apoptóticas; 2=26-50% de células apoptóticas; 3= 51-75% de células apoptóticas e 4= 76-100% de células apoptóticas no tecido examinado.

## 5 Análise Estatística

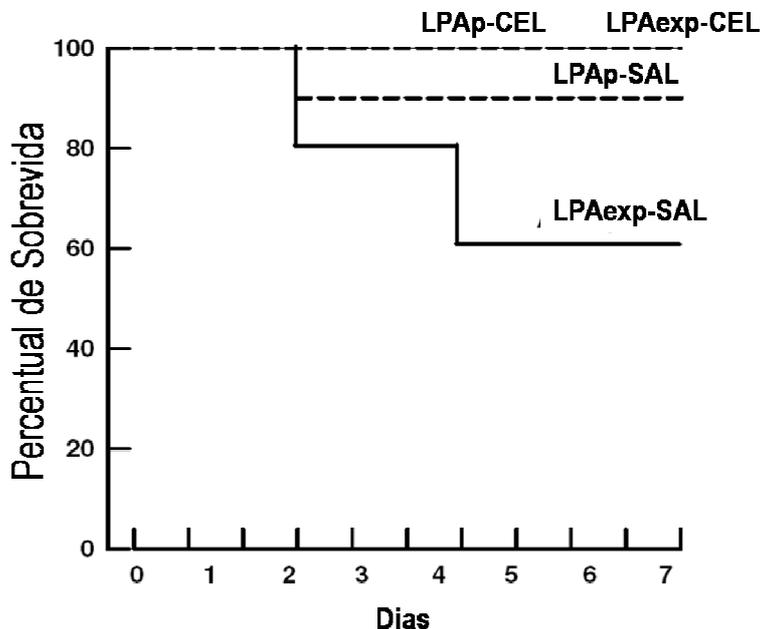
A normalidade e homogeneidade da amostra foram testadas através do teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors e teste de mediana de Levene, respectivamente. Caso as duas condições estivessem presentes, diferenças entre os grupos no dia 1 foram avaliadas usando Two-way ANOVA seguido de Tukey. No dia 7, os efeitos da terapia celular com CMMO foram analisados utilizando Three-way ANOVA seguido de Tukey *post hoc test*. Para análise de dados não paramétricos Three-way ANOVA *on ranks* foi utilizado. A curva de sobrevivência foi realizada utilizando o método de Kaplan-Meier e comparada pelo *log-rank test*. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Os dados paramétricos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP), enquanto os não-paramétricos foram expressos como mediana e percentil 25-75%. SigmaStat 3.1 statistical software package (Jandel Corporation, San Raphael, CA, USA) foi utilizado.

## 6 Resultados

### 6.1. Taxa de Mortalidade

Nenhum dos animais dos grupos controle ou LPAp morreram dentro das primeiras 24 horas, enquanto a taxa de mortalidade no dia 1 foi de 20% no grupo LPAexp.

No dia 7, a taxa de mortalidade continuou maior no grupo LPAexp-SAL (40%) comparado ao grupo LPAp-SAL (10%) ( $p < 0,001$ ). Entretanto, em ambos os grupos LPA tratados com CMMO, LPAp-CEL e LPAexp-CEL, a taxa de sobrevivida foi de 100%, significativamente maior que os grupos LPA tratados com salina ( $p < 0,01$ ) (Figura 5).

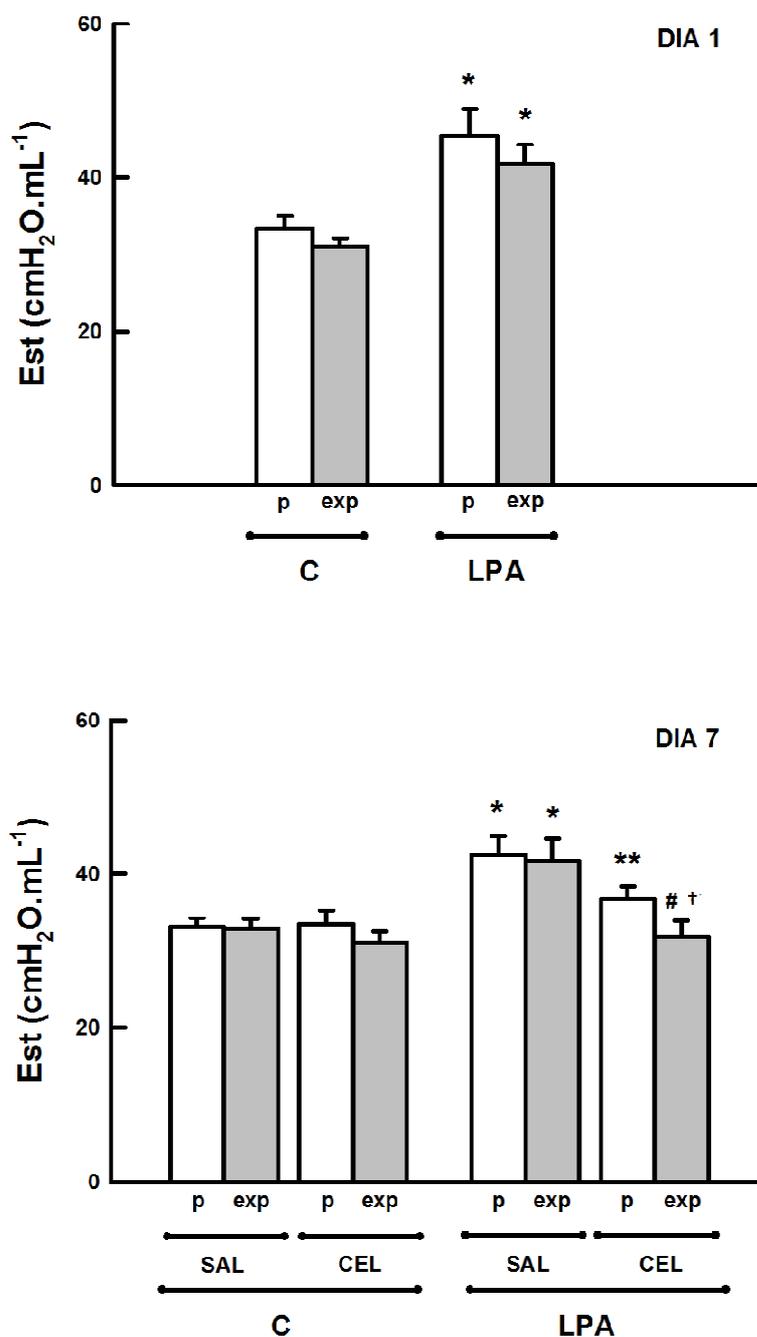


**Figura 5.** Curva de sobrevivida Kaplan-Meier. Nos grupos LPA, LPS de *E. coli* foi instilado intratraquealmente (LPAp) ou injetado intraperitonealmente (LPAexp). Após seis horas, os grupos C e LPA foram subdivididos em subgrupos que foram submetidos à infusão intravenosa de salina (SAL) ou CMMO ( $2 \times 10^6$  células, CEL).

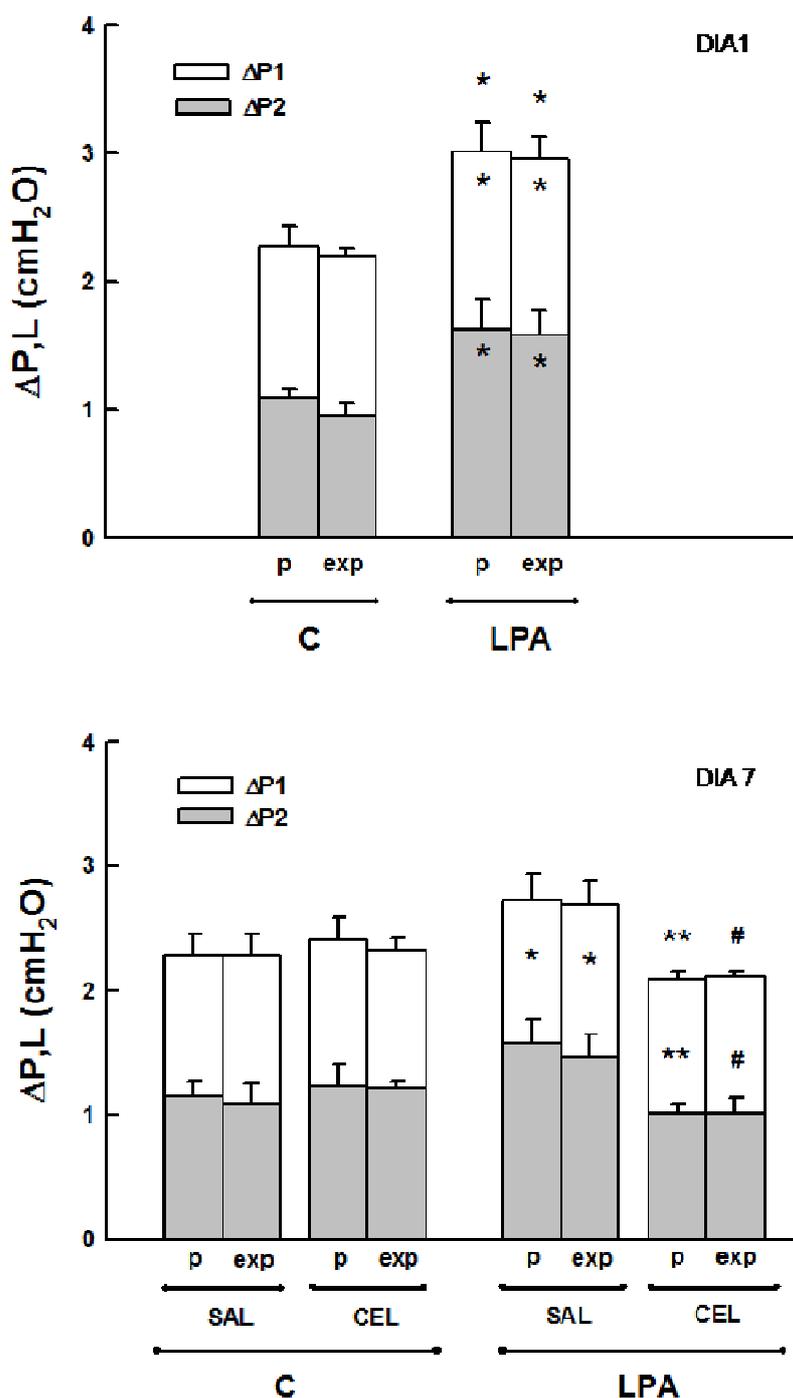
## 6.2 Mecânica Pulmonar

A elastância estática (Est) (Figura 6),  $\Delta P1$ ,  $\Delta P2$  e  $\Delta P_{tot}$  (Figura 7) aumentou de forma similar entre os dois grupos LPA, pulmonar e extrapulmonar, comparados aos seus respectivos controles no dia 1. No dia 7 similar resultados foram observados exceto para o  $\Delta P1$ , que permaneceu sem alteração significativa.

A terapia com CMMO diminuiu todos os parâmetros funcionais, independente da etiologia da LPA, contudo, a redução na Est foi maior no grupo extrapulmonar (LPAexp-CEL) comparado ao pulmonar (LPAp-CEL).



**Figura 6.** Elastância estática (Est) nos dias 1 (painel superior) e 7 (painel inferior). Nos grupos controle (C), salina foi instilada intratraquealmente (Cp) ou injetada intraperitonealmente (Cexp). Nos grupos LPA, LPS de *E. coli* foi instilado intratraquealmente (LPAp) ou injetado intraperitonealmente (LPAexp). Após seis horas, os grupos C e LPA foram subdivididos em subgrupos que foram submetidos à infusão intravenosa de salina (SAL) ou CMMO ( $2 \times 10^6$  células, CEL). Os valores são média  $\pm$  DP de sete animais por grupo. \*Significativamente diferente do grupo C ( $p < 0,05$ ). \*\*LPAp-CEL vs LPAp-SAL ( $p < 0,05$ ). #LPAexp-CEL vs LPAp-SAL ( $p < 0,05$ ). †LPAexp-CEL vs LPAp-CEL ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7.**  $\Delta P_1$ ,  $\Delta P_2$  e  $\Delta P_{tot}$  nos dias 1 (painel superior) e 7 (painel inferior). Nos grupos controle (C), salina foi instilada intratraquealmente (Cp) ou injetada intraperitonealmente (Cexp). Nos grupos LPA, LPS de *E. coli* foi instilado intratraquealmente (LPAp) ou injetado intraperitonealmente (LPAexp). Após seis horas, os grupos C e LPA foram subdivididos em subgrupos que foram submetidos à infusão intravenosa de salina (SAL) ou CMMO ( $2 \times 10^6$  células, CEL). Os valores são média  $\pm$  DP de sete animais por grupo. \*Significativamente diferente do grupo C ( $p < 0,05$ ). \*\*LPAp-CEL vs LPAp-SAL ( $p < 0,05$ ). #LPAexp-CEL vs LPAp-SAL ( $p < 0,05$ ).

### **6.3 Histologia e Morfometria**

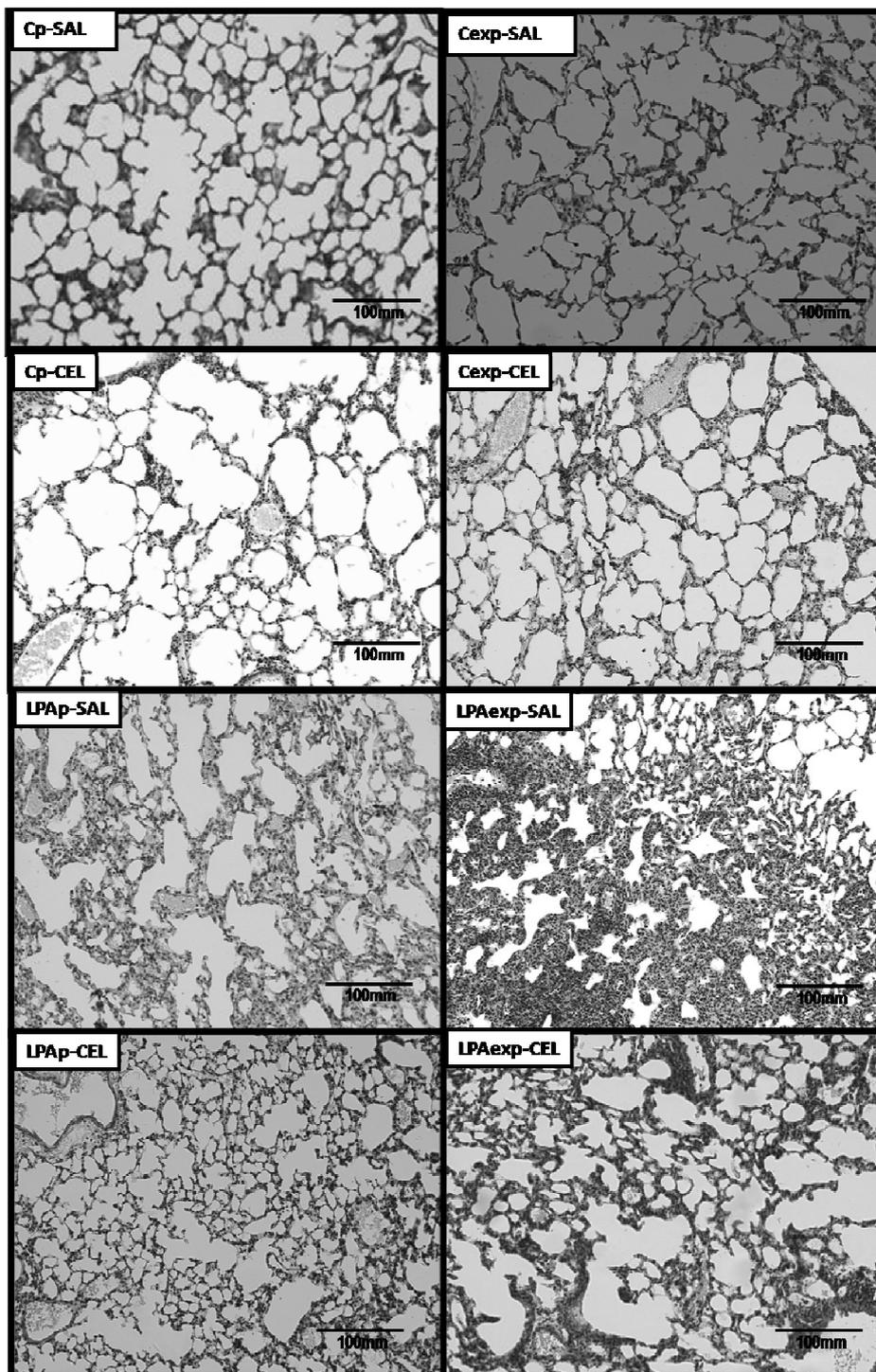
A fração de área de colapso alveolar e o número total de células e de células polimorfonucleares (PMN) foram maior nos grupos LPA comparados aos grupos controle independente da etiologia da lesão nos dias 1 e 7 (Tabela 1).

O tratamento com CMMO reduziu a fração de área colapsada principalmente no grupo LPAexp-CEL (52%) comparado ao LPAp-CEL (32%), assim como reduziu o número de PMN no grupo LPAexp-CEL (74%) comparado ao grupo LPAp-CEL (67%) (Tabela 1 e Figura 8).

**Tabela 1.** Parâmetros morfométricos.

	Área Normal (%)	Colapso Alveolar (%)	PMN (%)	MN (%)	Total (%)
DIA 1					
Cp	92,0 ± 4,3	8,0 ± 4,3	0,6 ± 0,7	37,2 ± 4,6	37,8 ± 6,0
Cexp	92,5 ± 2,7	7,5 ± 2,7	0,5 ± 0,9	36,0 ± 5,7	36,6 ± 5,0
LPAp	66,2 ± 8,5*	33,5 ± 7,9*	11,8 ± 2,8*	30,4 ± 4,5	42,2 ± 1,0*
LPAexp	66,1 ± 7,9*	33,9 ± 7,9*	11,7 ± 2,7*	31,6 ± 6,6	43,3 ± 4,9*
DIA 7					
Cp-SAL	92.4 ± 9.6	7.6 ± 9.6	0.7 ± 0.2	35.0 ± 3.1	35.7 ± 3.2
Cexp-SAL	92.1 ± 1.3	7.9 ± 1.3	0.6 ± 0.2	34.8 ± 2.3	35.4 ± 2.3
Cp-CEL	91.8 ± 3.1	8.2 ± 3.1	2.2 ± 1.3*	35.2 ± 3.7	37.4 ± 3.6
Cexp-CEL	92.7 ± 3.9	7.3 ± 3.9	2.1 ± 1.3*	34.0 ± 3.4	36.1 ± 3.4
LPAp-SAL	72.2 ± 5.2*	28.0 ± 5.3*	10.7 ± 2.0*	38.4 ± 5.3	49.1 ± 5.1*
LPAexp-SAL	72.2 ± 8.7*	27.8 ± 8.7*	6.6 ± 1.9* †	39.2 ± 3.7*	45.8 ± 3.9*
LPAp-CEL	80.9 ± 6.4* **	19.1 ± 5.4* **	3.5 ± 1.4* **	35.8 ± 3.0	39.3 ± 2.2**
LPAexp-CEL	86.6 ± 6.0* #	13.4 ± 6.0* # †	1.7 ± 1.2# †	33.2 ± 3.8*	35.0 ± 3.3#

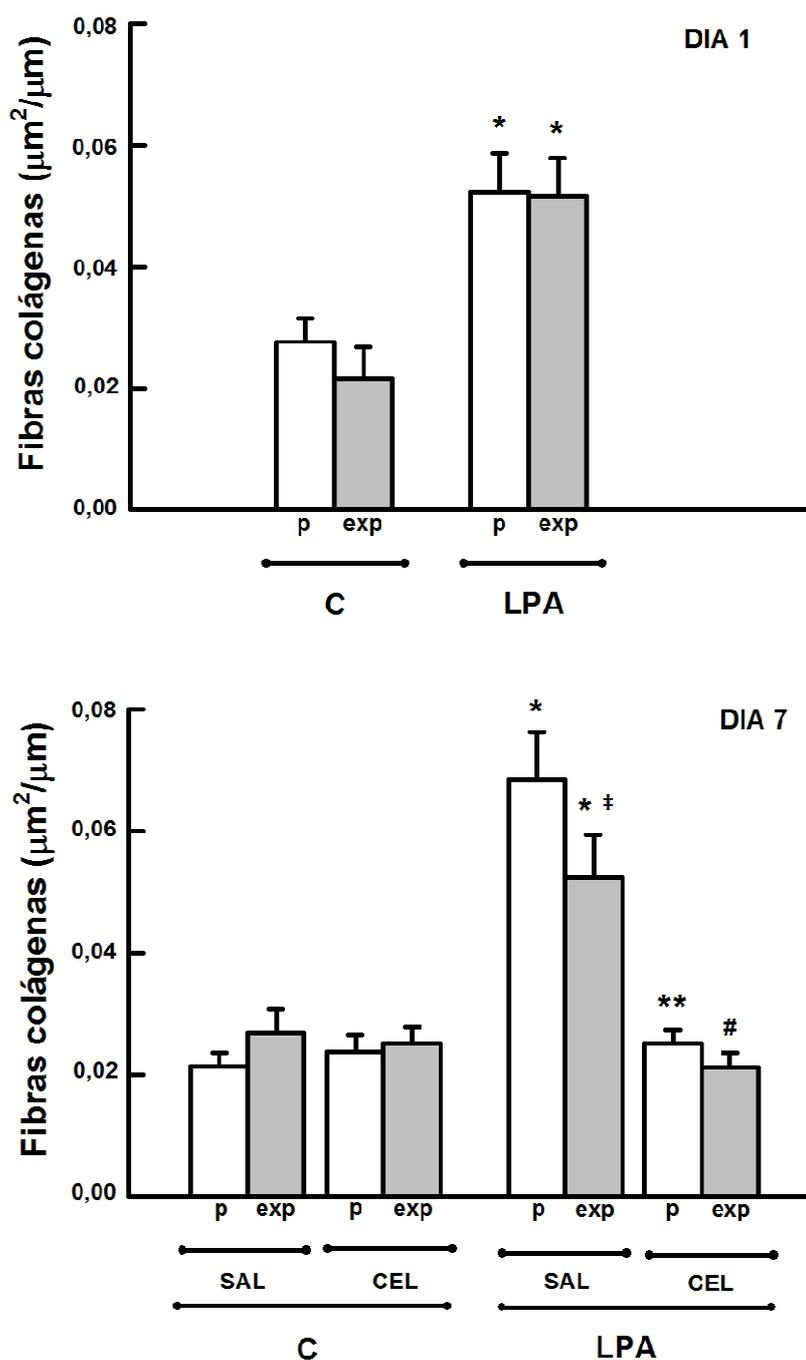
Fração de área normal, colapso alveolar, PMN: células polimorfonucleares, MN: células mononucleares, e total: celularidade total. Os valores foram analisados em 10 não-coincidentes campos por animal. Nos grupos controle (C), salina foi instilada intratraquealmente (Cp) ou injetada intraperitonealmente (Cexp). Nos grupos LPA, LPS de *E. coli* foi instilado intratraquealmente (LPAp) ou injetado intraperitonealmente (LPAexp). Após seis horas, os grupos C e LPA foram subdivididos em subgrupos que foram submetidos à infusão intravenosa de salina (SAL) ou CMMO ( $2 \times 10^6$  células, CEL). Os valores são média ± DP de sete animais por grupo. \*Significativamente diferente do grupo C ( $p < 0,05$ ). \*\*LPAp-CEL vs LPAp-SAL ( $p < 0,05$ ). #LPAexp-CEL vs LPAp-SAL ( $p < 0,05$ ). †LPAexp-CEL vs LPAp-CEL ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8.** Fotomicrografia de parênquima pulmonar (100x) corado em HE. Nos grupos controle (C), salina foi instilada intratraquealmente (Cp) ou injetada intraperitonealmente (Cexp). Nos grupos LPA, LPS de *E. coli* foi instilado intratraquealmente (LPAp) ou injetado intraperitonealmente (LPAexp). Após seis horas, os grupos C e LPA foram subdivididos em subgrupos que foram submetidos à infusão intravenosa de salina (SAL) ou CMMO ( $2 \times 10^6$  células, CEL).

A quantidade de fibras colágenas no septo alveolar aumentou significativamente em ambos os grupos LPA, LPAp e LPAexp, nos dias 1 e 7, enquanto não houve alteração na quantidade de fibras elásticas (Figura 9).

O tratamento com CMMO agiu nos dois grupos de LPA, LPAp-CEL e LPAexp-CEL, prevenindo o aumento na quantidade de fibras colágenas comparados aos seus respectivos controles (Figura 9).



**Figura 9.** Quantidade de fibras colágenas no septo alveolar nos dias 1 (painel superior) e 7 (painel inferior). Nos grupos controle (C), salina foi instilada intratraquealmente (Cp) ou injetada intraperitonealmente (Cexp). Nos grupos LPA, LPS de *E. coli* foi instilado intratraquealmente (LPAp) ou injetado intraperitonealmente (LPAexp). Após seis horas, os grupos C e LPA foram subdivididos em subgrupos que foram submetidos a infusão intravenosa de salina (SAL) ou CMMO ( $2 \times 10^6$  células, CEL). Os valores são média  $\pm$  DP de sete animais por grupo. \*Significativamente diferente do grupo C ( $p < 0,05$ ). \*\*LPAp-CEL vs LPAp-SAL ( $p < 0,05$ ). #LPAexp-CEL vs LPAp-SAL ( $p < 0,05$ ). †LPAexp-SAL vs LPAp-SAL ( $p < 0,05$ ).

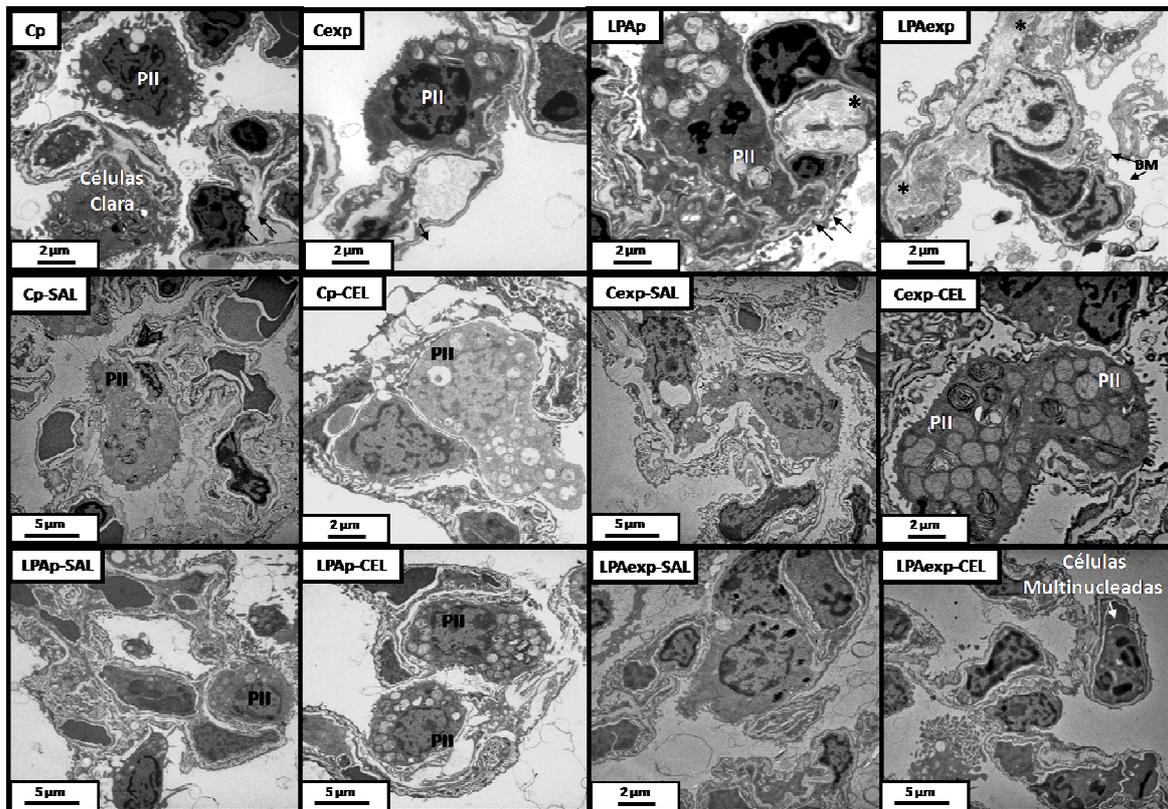
Degeneração citoplasmática de pneumócitos tipo II (PII) e lesão da membrana alvéolo-capilar estão presentes no grupo LPAp no dia 1, enquanto no grupo LPAexp, o pneumócito tipo I (PI) e o PII estão preservados com perda da integridade da membrana alvéolo-capilar (Tabela 2 e Figura 10).

No dia 7, lesão do epitélio e endotélio foi observada em ambos os grupos LPA tratados com salina (LPAp-SAL e LPAexp-SAL), que foi reparado após a infusão de CMMO (LPAp-CEL e LPAexp-CEL). Ademais, a terapia celular levou a hiperplasia de células tipo II e aparecimento de células multinucleadas sem caracterização fenotípica (Tabela 2 e Figura 10).

**Tabela 2.** Análise semi-quantitativa da microscopia eletrônica

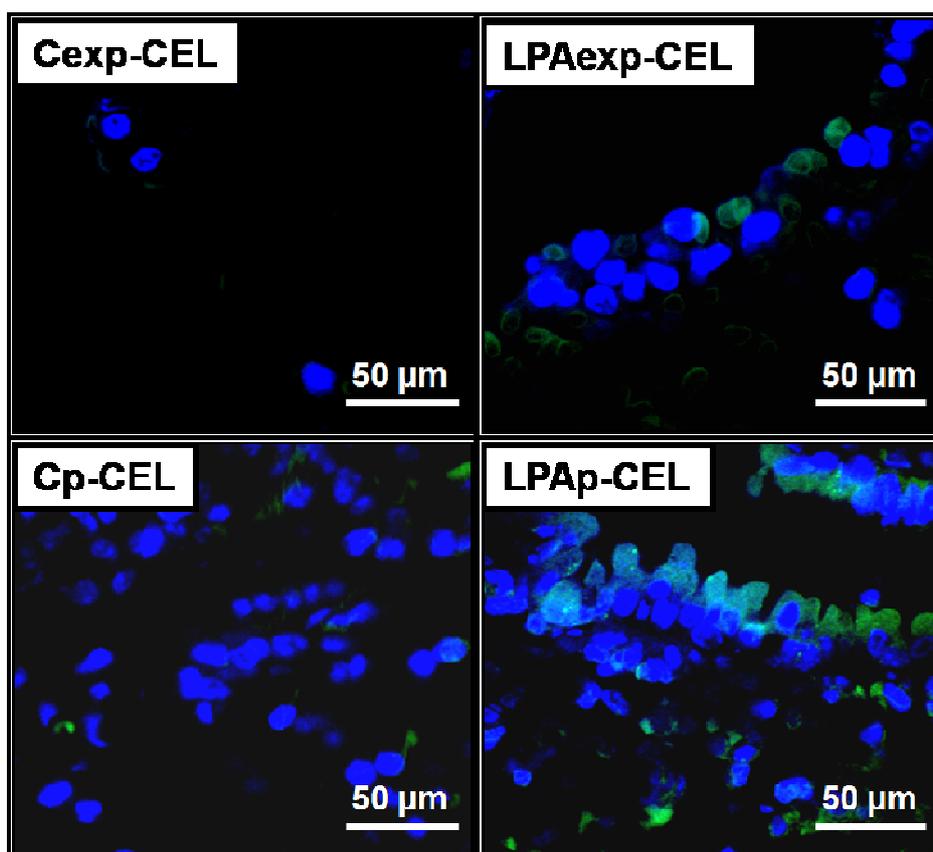
	Membrana alvéolo- capilar	Células epiteliais tipoll	Células endoteliais
DIA 1			
Cp	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Cexp	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
LPAp	3 (1,5-3,0)*	3 (2,5-3)*	0 (0-1)
LPAexp	2 (1,5-2)* <sup>§</sup>	1 (0-1) <sup>§</sup>	3 (2,5-3)* <sup>§</sup>
DIA 7			
Cp-SAL	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Cexp-SAL	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Cp-CEL	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Cexp-CEL	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
LPAp-SAL	3 (1,5-3)*	2,5 (2-3)*	3 (2,5-3)*
LPAexp-SAL	3 (2-3)*	3 (3-3)*	3 (2-3)*
LPAp-CEL	1 (1-1,5)	1 (1-1,5)	1 (0-1)
LPAexp-CEL	1 (1-1)	1 (0-1)	1 (1-1,5)

Os achados patológicos foram graduados de acordo com um escore de severidade semi-quantitativo de 5 pontos, onde 0=parênquima normal, 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% do parênquima lesado. Nos grupos controle (C), salina foi instilada intratraquealmente (Cp) ou injetada intraperitonealmente (Cexp). Nos grupos LPA, LPS de *E. coli* foi instilado intratraquealmente (LPAp) ou injetado intraperitonealmente (LPAexp). Após seis horas, os grupos C e LPA foram subdivididos em subgrupos que foram submetidos à infusão intravenosa de salina (SAL) ou CMMO ( $2 \times 10^6$  células, CEL). Os valores são mediana (percentil 25-75%) de 4-5 animais por grupo. \*Significativamente diferente do grupo C ( $p < 0,05$ ). <sup>§</sup>LPAp vs LPAexp, ( $p < 0,05$ ).



**Figura 10.** Micrografia eletrônica do parênquima pulmonar nos dias 1 (primeira linha) e 7 (segunda e terceira linhas). C: controle, LPA: lesão pulmonar aguda, p: pulmonar, exp: extrapulmonar, SAL: salina, CEL: terapia com CMMO. Pneumócitos tipo II (PII) e membrana alvéolo-capilar estão lesadas em ambos os grupos LPA. Na LPAexp há lesão da membrana basal (BM). Após o transplante de CMMO, observa-se células multinucleadas sem caracterização fenotípica. Ademais, reparo da membrana basal nos grupos LPA-CEL pode ser observado. As fotomicrografias foram obtidas de seções de pulmões de 5 animais.

Células GFP+ foram detectadas em ambos os grupos LPA, LPAp e LPAexp, embora maior fixação tenha sido observado no grupo LPAexp-CEL [5% (2-8), mediana, (mínimo-máximo)] comparado ao LPAp-CEL [2% (1-4)] (Figura 11).



**Figura 11.** Microscopia confocal do parênquima pulmonar de animais GFP+ examinados no dia 7 em animais C-SAL, pulmonar e extrapulmonar, e LPA-CEL, pulmonar e extrapulmonar. Observa-se poucas células GFP+ (verde) presentes no parênquima pulmonar em ambos os grupos LPA-CEL.

#### **6.4. Celularidade total, diferencial e citocinas no BALF**

O número de neutrófilos, e níveis de IL-6 e KC no BALF foram maiores no grupo LPAp comparado ao LPAexp, enquanto IL-10 foi similar em ambos os grupos LPA no dia 1(Tabela 3 e Figura 12).

No dia 7, o número de neutrófilos foi maior na LPAp-SAL do que no LPAexp-SAL, enquanto a quantidade de citocinas não foi diferente em ambos os grupos. O grupo tratado com CMMO apresentou redução no número de neutrófilos, IL-6, KC e IL-10. Entretanto, os níveis de IL-6 foram similares em ambos os grupos LPA-CEL, pulmonar e extrapulmonar, enquanto KC foi menor no LPAexp-CEL e IL-10 maior no LPAexp (Tabela 3 e Figura 12).

**Tabela 3.** Celularidade total e diferencial do lavado broncoalveolar.

	Neutrófilos ( $\times 10^5$ )	Mononucleares ( $\times 10^5$ )	Total ( $\times 10^5$ )
DIA 1			
Cp	0,01 $\pm$ 0,1	0,31 $\pm$ 0,2	0,33 $\pm$ 0,2
Cexp	0,01 $\pm$ 0,1	0,35 $\pm$ 0,1	0,35 $\pm$ 0,1
LPAp	3,75 $\pm$ 0,6*	1,57 $\pm$ 0,3*	5,32 $\pm$ 0,9*
LPAexp	0,04 $\pm$ 0,1* §	1,85 $\pm$ 0,2*	1,85 $\pm$ 0,3*§
DIA 7			
Cp-SAL	0,01 $\pm$ 0,1	0,57 $\pm$ 0,2	0,58 $\pm$ 0,2
Cexp-SAL	0,01 $\pm$ 0,1	0,45 $\pm$ 0,2	0,45 $\pm$ 0,2
Cp-CEL	0,01 $\pm$ 0,1	0,45 $\pm$ 0,1	0,45 $\pm$ 0,1
Cexp-CEL	0,01 $\pm$ 0,1	0,38 $\pm$ 0,1	0,38 $\pm$ 0,1
LPAp-SAL	0,67 $\pm$ 0,2*	4,94 $\pm$ 0,7*	5,40 $\pm$ 0,3*
LPAexp-SAL	0,12 $\pm$ 0,1* ‡	3,20 $\pm$ 0,13* ‡	3,40 $\pm$ 0,1* ‡
LPAp-CEL	0,02 $\pm$ 0,1**	2,98 $\pm$ 0,5**	3,00 $\pm$ 0,4* **
LPAexp-CEL	0,01 $\pm$ 0,1# †	0,56 $\pm$ 0,1# †	0,58 $\pm$ 0,1# †

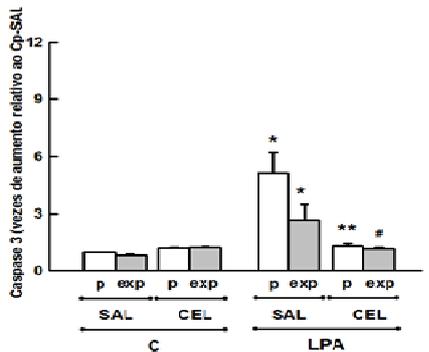
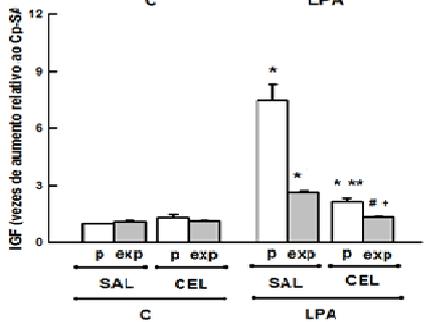
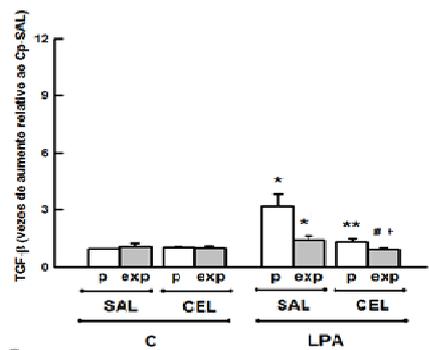
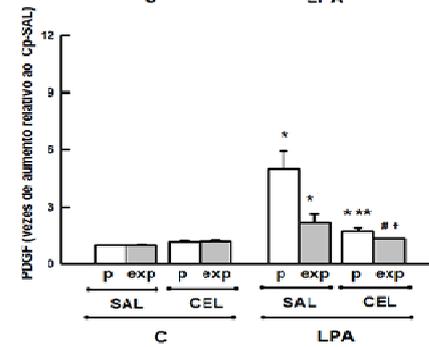
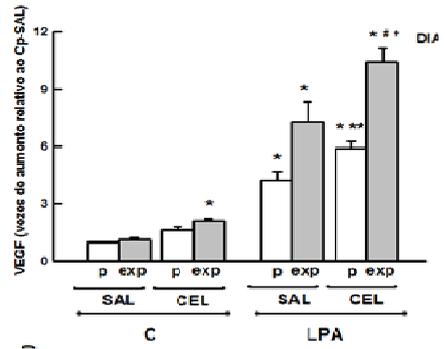
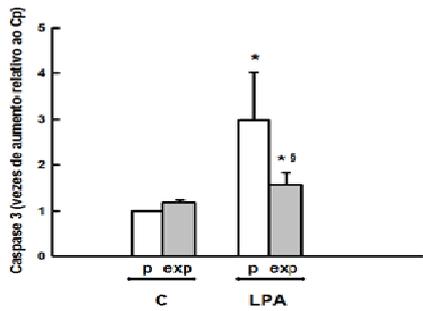
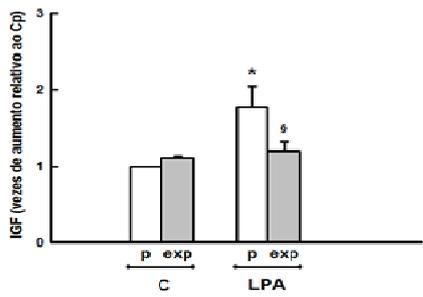
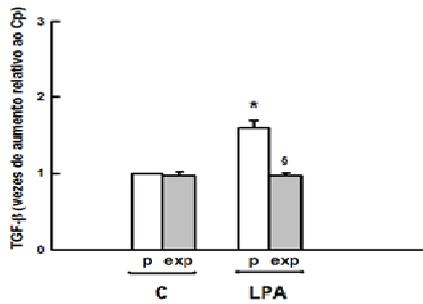
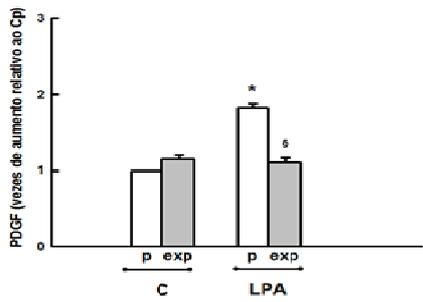
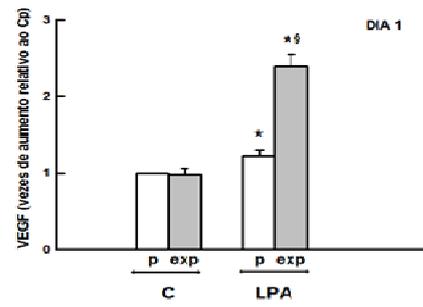
Percentual de neutrófilos e células mononucleares (MN) e celularidade total no lavado broncoalveolar. Nos grupos controle (C), salina foi instilada intratraquealmente (Cp) ou injetada intraperitonealmente (Cexp). Nos grupos LPA, LPS de *E. coli* foi instilado intratraquealmente (LPAp) ou injetado intraperitonealmente (LPAexp). Após seis horas, os grupos C e LPA foram subdivididos em subgrupos que foram submetidos à infusão intravenosa de salina (SAL) ou CMMO ( $2 \times 10^6$  células, CEL). Valores são média  $\pm$  DP de 5 animais. \*Significativamente diferente do grupo C ( $p < 0,05$ ). § LPAp vs LPAexp ( $p < 0,05$ ). \*\* LPAp-CEL vs LPAp-SAL ( $p < 0,05$ ). # LPAexp-CEL vs LPAexp-SAL ( $p < 0,05$ ). ‡ LPAexp-SAL vs LPAp-SAL ( $p < 0,05$ ). † LPAexp-CEL vs LPAp-CEL ( $p < 0,05$ ).



### **6.5 Expressão de fatores de crescimento e caspase 3 no tecido pulmonar**

A expressão de RNAm para TGF- $\beta$ , PDGF, IGF, e caspase 3 foi maior na LPAp, enquanto a expressão de VEGF foi menor na LPAp comparado a LPAexp nos dias 1 e 7 (Figura 13).

A terapia com CMMO aumentou a expressão de VEGF, mas reduziu o TGF- $\beta$ , PDGF, IGF, e caspase 3 em ambos os grupos de LPA-CEL, pulmonar e extrapulmonar (Figura 13).



## 6.6 Apoptose celular em órgãos

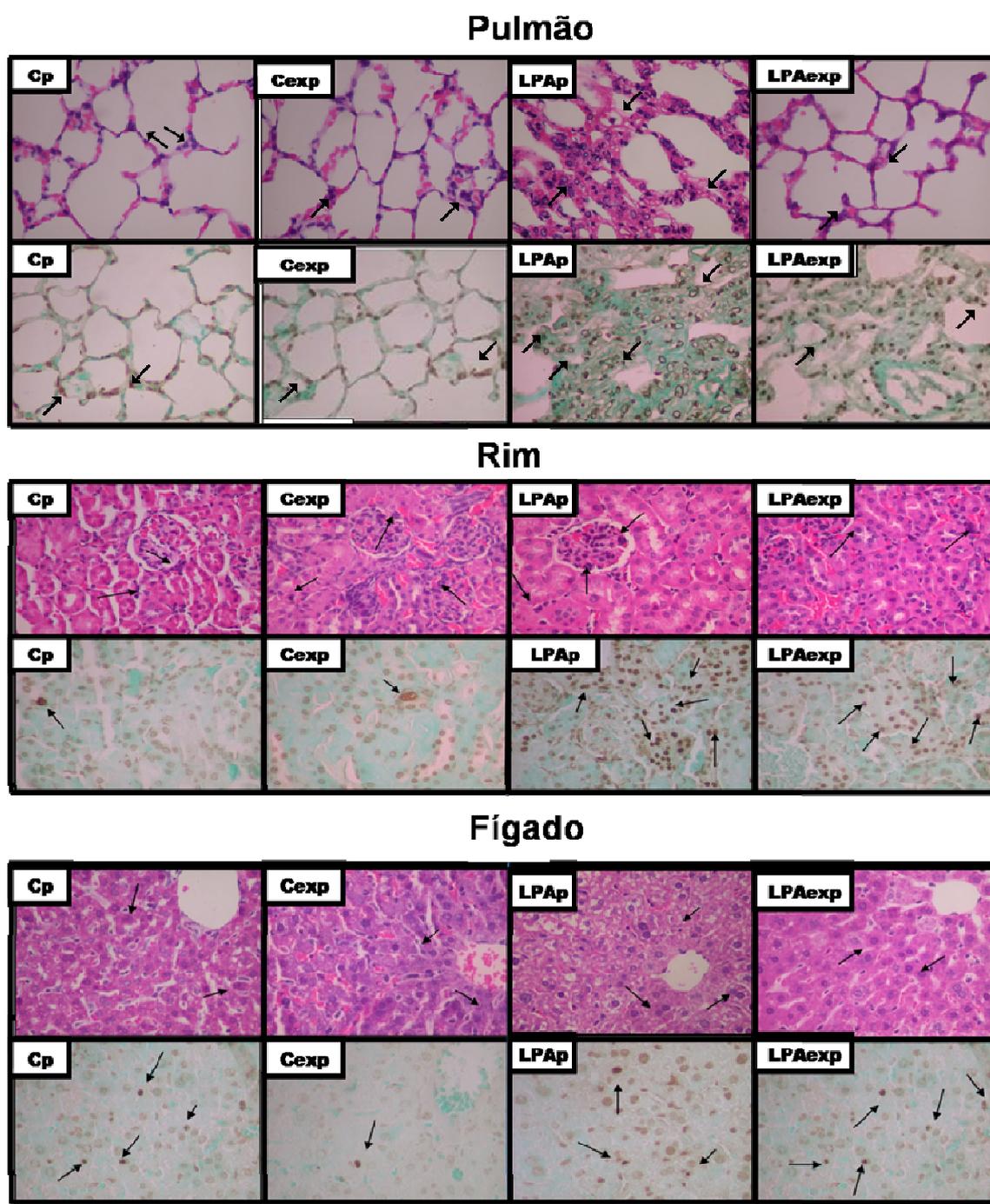
O número de células epiteliais apoptóticas no pulmão, rim e fígado foi maior nos grupos LPAp e LPAexp comparados aos seus respectivos controles no dia 1 (Figura 14). Ademais, o número de células epiteliais apoptóticas no pulmão foi maior no grupo LPAp, enquanto no rim e fígado esse número foi maior no grupo LPAexp (Tabela 4).

No dia 7, o número de células epiteliais apoptóticas no pulmão (Figura 15) e rim (Figura 16) foram similares ao dia 1, entretanto, a quantidade de células em apoptose no fígado (Figura 17) reduziu em ambos os grupos LPA tratados com salina, LPAp-SAL e LPAexp-SAL (Tabela 4).

**Tabela 4.** Apoptose de células epiteliais.

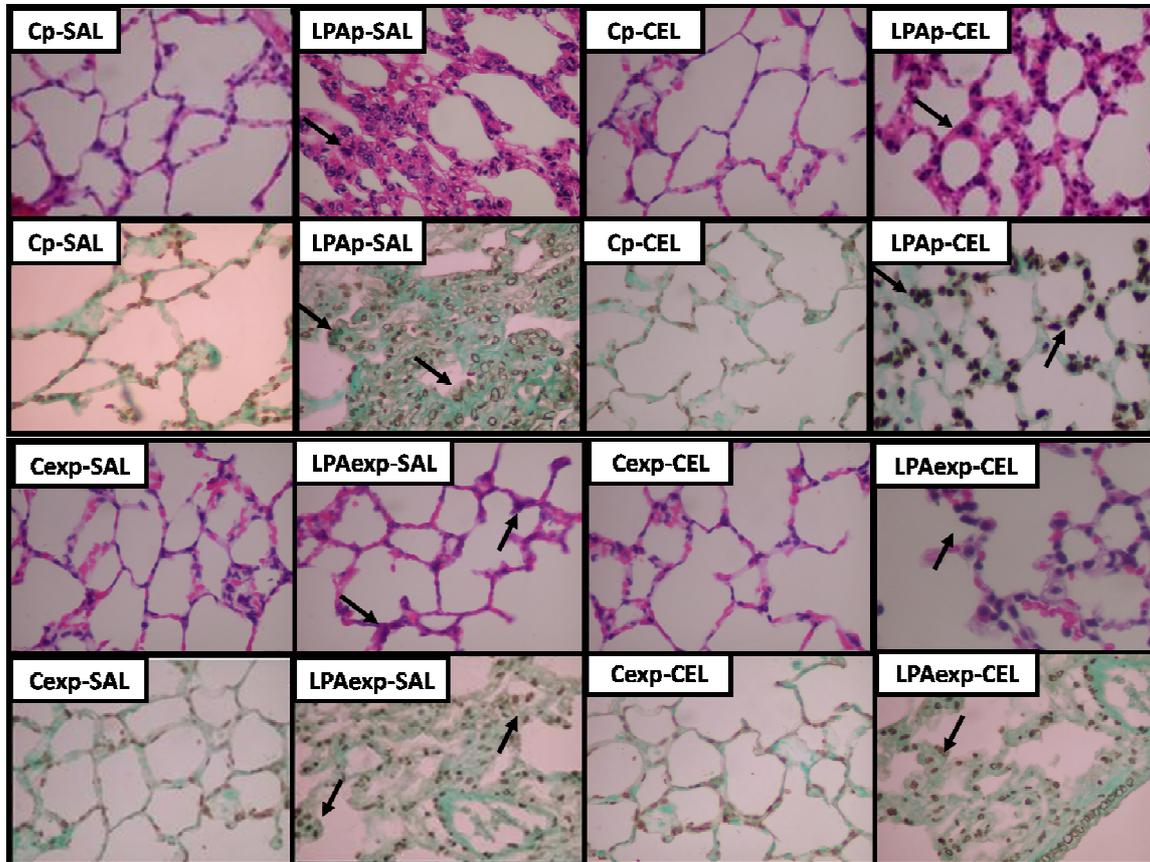
	Pulmão	Rim	Fígado
DIA 1			
Cp	1,0 (1-1)	1,0 (1-1)	1,0 (1-1)
Cexp	1,0 (1-1)	1,0 (1-2)	1,0 (1-1)
LPAp	3,0 (3-4)*	2,0 (2-3)*	2,0 (2-3)*
LPAexp	2,0 (2-2)* §	3,0 (2-3)*	3,0 (2-3)* §
DIA 7			
Cp-SAL	1,0 (1-1)	1,0 (1-1)	1,0 (1-1)
Cexp-SAL	1,0 (1-1)	1,0 (1-1)	1,0 (1-1)
Cp-CEL	1,0 (1-2)	1,0 (1-2)	1,0 (1-2)
Cexp-CEL	2,0 (1-2)	1,0 (1-2)	1,0 (1-1)
LPAp-SAL	3,0 (3-2)*	2,0 (2-2)*	1,0 (1-2)
LPAexp-SAL	2,0 (1-2)*	3,0 (3-4)* †	2,0 (2-3)* †
LPAp-CEL	1,0 (1-2)**	1,0 (1-1)**	1,0 (1-1)
LPAexp-CEL	1,0 (1-2)#	1,0 (1-1)#	1,0 (1-1)#

Análise semi-quantitativa de células apoptóticas no pulmão rim e fígado. O grau de apoptose foi graduado como negativo=0, leve=1, moderado=2, alto=3 e severo=4, em 10 campos não-coincidentes com aumento de 400x. Um escore de lesão foi então calculado para 0= parênquima normal, 1=1-25%, 2=26-50%, 3=51-75%, 4=76-100% do parênquima lesado. Nos grupos controle (C), salina foi instilada intratraquealmente (Cp) ou injetada intraperitonealmente (Cexp). Nos grupos LPA, LPS de *E. coli* foi instilado intratraquealmente (LPAp) ou injetado intraperitonealmente (LPAexp). Após seis horas, os grupos C e LPA foram subdivididos em subgrupos que foram submetidos a infusão intravenosa de salina (SAL) ou CMMO ( $2 \times 10^6$  células, CEL). Os valores são mediana (percentil 25-75%) de 4 animais por grupo. \*Significativamente diferente do grupo C ( $p < 0,05$ ). §LPAp vs LPAexp ( $p < 0,05$ ), \*\*LPAp-CEL vs LPAp-SAL ( $p < 0,05$ ). #LPAexp-CEL vs LPAp-SAL ( $p < 0,05$ ). †LPAexp-SAL vs LPAp-SAL ( $p < 0,05$ ).

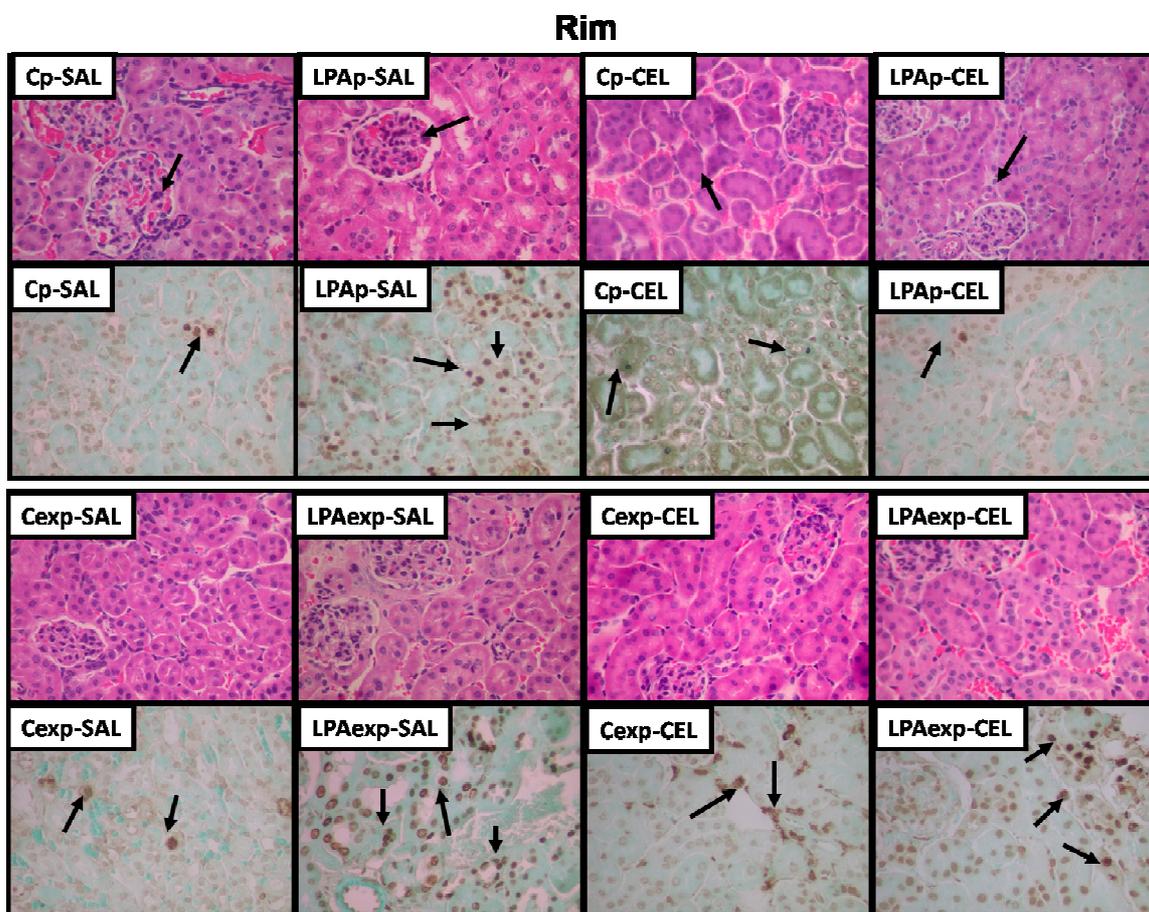


**Figura 14.** Fotomicrografia representativa do pulmão, fígado e rim corado com hematoxilina-eosina (HE) (primeira, terceira e quinta linhas) e técnica de TUNEL (segunda, quarta e sexta linhas) no dia 1. Nos grupos controle (C), salina foi instilada intratraquealmente (Cp) ou injetada intraperitonealmente (Cexp). Nos grupos LPA, LPS de *E. coli* foi instilado intratraquealmente (LPAp) ou injetado intraperitonealmente (LPAexp). Note que nos grupos LPA, o número de células epiteliais apoptóticas é maior do que nos seus respectivos grupos controle. As setas demonstram as células apoptóticas nos diferentes tecidos.

## Pulmão

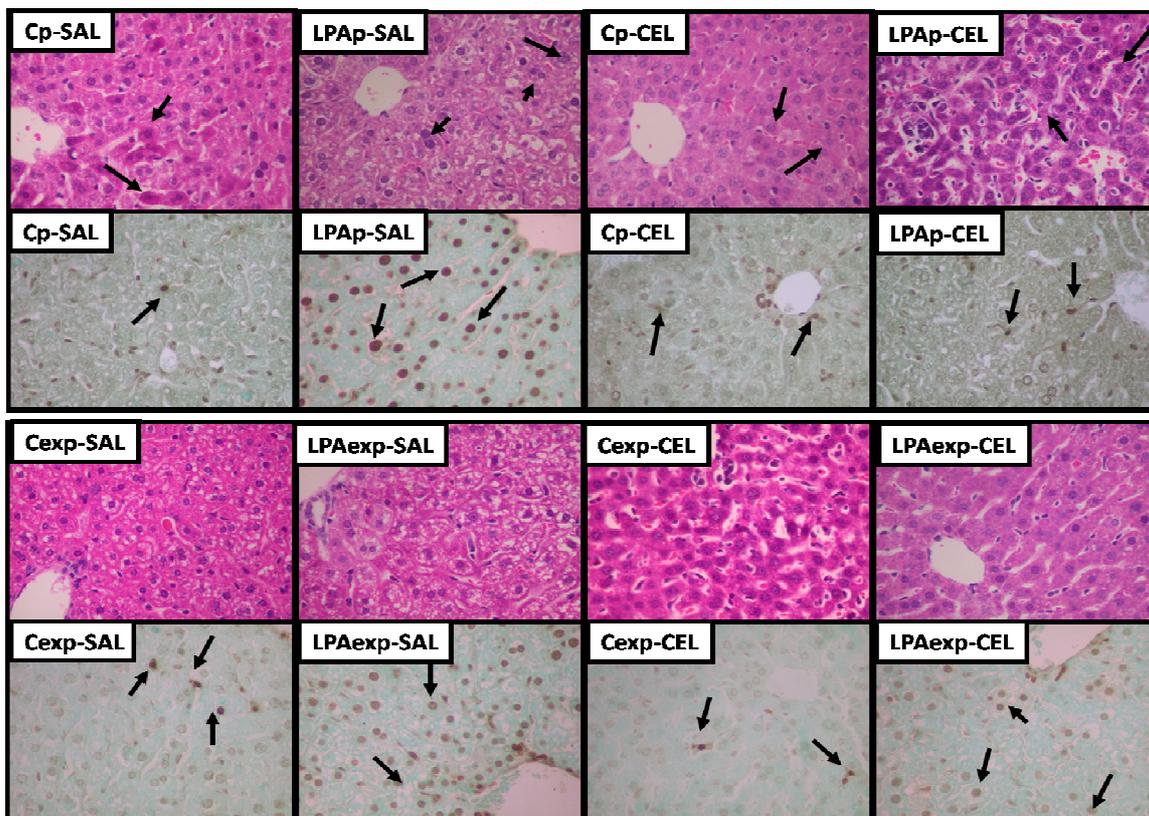


**Figura 15.** Fotomicrografia representativa do pulmão, corado com hematoxilina-eosina (HE) (primeira e terceira linhas) e técnica de TUNEL (segunda e quarta linhas) no dia 7. Nos grupos controle (C), salina foi instilada intratraquealmente (Cp-SAL) ou injetada intraperitonealmente (Cexp-SAL) e submetidos a infusão de salina intravenosa. Nos grupos LPA-CEL, LPS de *E. coli* foi instilado intratraquealmente (LPAp-CEL) ou injetado intraperitonealmente (LPAexp-CEL) e submetidos a infusão de CMMO. Note que nos grupos LPA-SAL, o número de células epiteliais apoptóticas é maior do que nos seus respectivos grupos controle (C-SAL) e reduz com o tratamento com CMMO (LPA-CEL). As setas demonstram as células apoptóticas nos diferentes tecidos.



**Figura 16.** Fotomicrografia representativa do rim corado com hematoxilina-eosina (HE) (primeira e terceira linhas) e técnica de TUNEL (segunda e quarta linhas) no dia 7. Nos grupos controle (C), salina foi instilada intratraquealmente (Cp-SAL) ou injetada intraperitonealmente (Cexp-SAL) e submetidos a infusão de salina intravenosa. Nos grupos LPA-CEL, LPS de *E. coli* foi instilado intratraquealmente (LPAp-CEL) ou injetado intraperitonealmente (LPAexp-CEL) e submetidos a infusão de CMMO. Note que nos grupos LPA-SAL, o número de células epiteliais apoptóticas é maior do que nos seus respectivos grupos controle (C-SAL) e reduz com o tratamento com CMMO (LPA-CEL). As setas demonstram as células apoptóticas nos diferentes tecidos.

### Fígado



**Figura 17.** Fotomicrografia representativa do fígado, corado com hematoxilina-eosina (HE) (primeira e terceira linhas) e técnica de TUNEL (segunda e quarta linhas) no dia 7. Nos grupos controle (C), salina foi instilada intratraquealmente (Cp-SAL) ou injetada intraperitonealmente (Cexp-SAL) e submetidos a infusão de salina intravenosa. Nos grupos LPA-CEL, LPS de *E. coli* foi instilado intratraquealmente (LPAp-CEL) ou injetado intraperitonealmente (LPAexp-CEL) e submetidos a infusão de CMMO. Note que nos grupos LPA-SAL, o número de células epiteliais apoptóticas é maior do que nos seus respectivos grupos controle (C-SAL) e reduz com o tratamento com CMMO (LPA-CEL). As setas demonstram as células apoptóticas nos diferentes tecidos.

## 7 Discussão

O presente estudo observou que a terapia com CMMO por via venosa na LPA de etiologias pulmonar e extrapulmonar, com alterações mecânicas similares 24 horas após indução da lesão, levou aos seguintes achados: 1. Significativa redução na taxa de mortalidade, elastância estática, fração de área de colapso alveolar e celularidades total e diferencial do tecido pulmonar e BALF em ambos os grupos LPA, principalmente no grupo extrapulmonar comparado ao pulmonar, e 2. diminuição no conteúdo de fibras colágenas no septo alveolar e reparo na membrana basal, epitélio e endotélio independentemente da etiologia da LPA. Estes achados podem ser atribuídos aos efeitos parácrinos em função do balanço entre citocinas pró- e anti-inflamatórias e/ou fatores de crescimento.

A instilação intratraqueal ou injeção intraperitoneal de LPS de *E. coli* foi usada para induzir LPA pulmonar e extrapulmonar, respectivamente, uma vez que infecções por bactérias gram-negativas contribuem para inflamação local e sistêmica, sendo a forma mais comum de indução de LPA (ROCCO e cols., 2003; MENEZES e cols., 2005; ROJAS e cols., 2005). A maioria dos efeitos mediados pelo LPS se dá através da interação ligante-receptor com várias células do sistema imune, favorecendo a liberação de mediadores pró-inflamatórios incluindo inúmeras citocinas que estão envolvidas com a aderência de neutrófilos nas células endoteliais levando a infiltração e migração de neutrófilos (FAFFE e cols., 2000).

Alguns autores demonstraram que este modelo de LPA é capaz de reproduzir alterações similares de mecânica respiratória na LPA pulmonar e

extrapulmonar, facilitando o entendimento dos efeitos de diferentes terapias (MENEZES e cols., 2005; SANTOS e cols., 2006). No presente estudo, camundongos C57BL/6 foram utilizados ao invés de BALB/c uma vez que eles oferecem a possibilidade de modelos modificados geneticamente para identificação de células com marcadores específicos (GFP+) importante para confirmação da fixação das CMMO. Neste contexto, as doses de LPS de *E. coli* necessárias para alcançar um aumento de 1,5x na Est comparados aos camundongos BALB/c foram testadas, e doses dez vezes maiores foram utilizadas para ambos os modelos, pulmonar e extrapulmonar.

Vários estudos investigaram a capacidade regenerativa das células mesenquimais devido a suas propriedades regenerativas *in vitro* e fácil cultura em modelos experimentais de LPA. Eles demonstraram que essas células contribuem para o reparo na LPA, diminuindo a taxa de mortalidade, melhorando a histologia pulmonar e a resposta inflamatória local e sistêmica (YAMADA e cols., 2004; GUPTA e cols., 2007; XU e cols., 2007). Entretanto, as células MSC apresentam algumas desvantagens relacionadas a condições de cultura para o transplante de células e o risco de contaminação e reações imunológicas (NAUTA e cols., 2006). Um estudo recente em porcos mostrou que o transplante alogênico de MSC induziu uma resposta celular e humoral específica contra as células MSC do doador com citotoxicidade mediada pelo sistema anticorpo-complemento (PONCELET e cols., 2007) sugerindo que características *in vivo* das MSC alogênicas podem diferir das características *in vitro* (PONCELET e cols., 2007; PONCELET e cols., 2008; POPP e cols., 2009).

Baseado nessas limitações e uma vez que a LPA/SDRA necessita ser

tratada o mais precocemente possível, as CMMO foram escolhidas para o presente estudo. Neste contexto, as CMMO podem ser administradas no mesmo dia da sua obtenção, são seguras, expressam vários genes envolvidos na resposta inflamatória e quimiotaxia, a técnica é fácil e os custos são menores que as células MSC (OHNISHI e cols., 2007). Ademais, evidências têm mostrado que a quantidade de células CMMO após administração intravenosa é vinte vezes maior comparada as MSC (FISCHER e cols., 2009), o que pode favorecer aos efeitos do transplante das CMMO no tratamento de doenças pulmonares. Adicionalmente, apesar de termos utilizado camundongos machos doadores para tentar identificar a presença de cromossomo Y no parênquima pulmonar das fêmeas, optou-se em utilizar camundongos GFP+ para avaliar a presença das células CMMO no pulmão (ROJAS e cols., 2005).

Com o intuito de simular o que ocorre na prática clínica diária nos pacientes com LPA/SDRA, a terapia com CMMO foi realizada 6 horas após indução da lesão uma vez que em 3 horas já se observam alterações na mecânica e histologia pulmonares (FAFFE e cols., 2000; MENEZES e cols., 2005; XU e cols., 2007; LEITE JUNIOR e cols., 2008) e elevação nos níveis de mediadores inflamatórios (MENEZES e cols., 2005; XU e cols., 2007) em modelos experimentais de LPA induzida por LPS. Contrariamente, nos estudos que utilizaram células derivadas de medula óssea em modelo de LPA, a administração foi realizada imediatamente após a indução da lesão (YAMADA e cols., 2004) ou não mais do que 4 horas (GUPTA e cols., 2007). Dentre os vários estudos envolvendo terapia celular em modelos de LPA, este é o primeiro estudo mostrando os efeitos da CMMO em modelos de LPA de etiologia pulmonar e extrapulmonar.

As modificações na elastância estática (Est) dos animais submetidos à LPA pulmonar e extrapulmonar por LPS de *E. coli* no presente estudo (Figura 6) estão relacionadas a presença de colapso alveolar, infiltrado de células inflamatórias e aumento da deposição de fibras colágenas no septo alveolar (Tabela 1 e Figura 8) (MENEZES e cols., 2005; SANTOS e cols., 2006; LEITE-JUNIOR e cols., 2008 ). A resposta inflamatória observada no parênquima pulmonar pode ser mediada pela liberação de várias citocinas pró-inflamatórias ou fatores de crescimento (Figuras 12 e 13) favorecendo a amplificação, perpetuação e comprometimento de órgãos à distância. No presente estudo, tais alterações foram minimizadas após o transplante de CMMO (Figuras 12 e 13).

Neste contexto, vários estudos têm demonstrado a capacidade das células-tronco suprimir a resposta inflamatória local e sistêmica induzida por endotoxemia Xu e colaboradores (2007) demonstraram que as células MSC diminuem os níveis de citocinas sistêmicas prevenindo o edema pulmonar, o recrutamento de células inflamatórias no parênquima alveolar e reduzem o nível de citocinas plasmáticas. Similarmente, alguns autores descreveram que a instilação intravenosa (MEI e cols., 2007) ou intrapulmonar (GUPTA e cols., 2007) de MSC após instilação intratraqueal de LPS reduziu a resposta inflamatória associada à modulação de vários mediadores inflamatórios e conseqüente melhora histológica do parênquima pulmonar. Na maioria destes estudos, não há evidências de fixação ou diferenciação celular ou quando na presença da fixação, esta é muito baixa, geralmente menor que 8%, um valor insuficiente para explicar os efeitos benéficos associados à terapia celular. No presente estudo, a presença de CMMO foi menor que 5% e quando comparados os grupos LPA pulmonar e extrapulmonar, sendo

que observou-se mais CMMO na LPA extrapulmonar comparado ao pulmonar, podendo sugerir que a intensidade do dano endotelial contribui para o aumento local de células.

A análise ultra-estrutural também demonstra o reparo de pulmões lesados que ocorrem independentemente do número de células GFP+ no pulmão (Figura 9) (KRAUSE e cols., 2001; ORTIZ e cols., 2003; ABE e cols., 2004; YAMADA e cols., 2004). Portanto, esses efeitos devem ser atribuídos a atividade parácrina dessas células, como previamente demonstrado em vários estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* (YAMADA e cols., 2004; MEI e cols., 2007; GUPTA e cols., 2007; XU e cols., 2007).

No presente estudo, observou-se que a terapia com CMMO levou a uma redução nos níveis de IL-6, KC, e IL-10 em ambos os grupos LPA, pulmonar e extrapulmonar (Figura 12), diminuindo a resposta inflamatória local e sistêmica com conseqüente redução no número de neutrófilos no parênquima pulmonar (XING e cols., 1998). O IL-6 é um importante regulador do tráfego de neutrófilos durante a resposta inflamatória por orquestrar a produção de quimiocinas e apoptose de leucócitos (FIELDING e cols., 2008), enquanto a KC é atua atraindo neutrófilos. Esses eventos estimulam a liberação de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (FERNADEZ e cols., 2004). KC reduziu mais na LPA extrapulmonar comparado a LPA pulmonar, que é consistente com os achados de menor acúmulo de neutrófilos no parênquima pulmonar no grupo extrapulmonar após CMMO. Embora o IL-10 tenha reduzido após a administração de CMMO, essa redução também foi mais pronunciada na LPA extrapulmonar. Contrariamente, Nemeth e colaboradores (2009) em modelo experimental de sepse induzida por

ligadura e perfuração do ceco (CLP) e Mei e colaboradores (2007) em modelo experimental de LPA induzida por instilação de LPS intrapulmonar propuseram que os efeitos benéficos das células MSC estariam relacionados a produção de IL-10. Essas diferenças podem ser atribuídas ao tipo de célula utilizada no estudo assim como ao modelo de indução de LPA. Em resumo, nossos resultados sugerem que a terapia com CMMO altera o perfil de citocinas no pulmão que favorece um eficiente controle da lesão inflamatória, reduzindo a quantidade de colapso alveolar e prevenindo as alterações na mecânica pulmonar.

O VEGF tem sido identificado como uma molécula chave no controle da permeabilidade vascular através da interação com células endoteliais, e sua atividade biológica depende da interação com diferentes receptores que estão presentes em macrófagos e neutrófilos ativados, em células endoteliais e células epiteliais tipo II. Portanto, os efeitos do VEGF podem alterar a função tanto do epitélio alveolar quanto do endotélio vascular pulmonar (THICKETT e cols., 2001). Contrariamente, durante o período de reparo, o VEGF pode participar no processo de angiogênese (MURA e cols., 2004 e 2006) além de promover proliferação de células endoteliais vasculares e favorecer sua sobrevivência por indução de proteínas anti-apoptóticas (MEDFORT & MILLAR, 2006). Na LPA, os níveis de VEGF diminuem (ABADIE e cols., 2005) ou aumentam (THICKETT e cols., 2001) dependendo das condições fisiopatológicas, tempo e grau da lesão epitelial e endotelial (THICKETT e cols., 2001; ABADIE e cols., 2005; LAHM e cols., 2007). Neste contexto, observou-se que a expressão de VEGF no tecido pulmonar foi maior na LPA extrapulmonar do que na LPA pulmonar (Figura 13), corroborando estudos prévios (THICKETT e cols., 2001). A terapia com CMMO levou ao

aumento no VEGF em ambos os grupos LPA, pulmonar e extrapulmonar (Figura 13). Logo, pode-se inferir que o aumento na expressão de VEGF após o transplante com CMMO leva a efeitos protetores e regenerativos nas células do endotélio vascular pulmonar, aumentando o número de capilares (ZHAO e cols., 2005; MEDFORD & MILLAR, 2006) e reduzindo a permeabilidade capilar.

Após LPA, macrófagos alveolares são observados em contato com as células epiteliais alveolares no espaço alveolar enquanto monócitos circulantes estão presentes dentro do espaço vascular em contato com as células endoteliais. Os macrófagos alveolares são responsáveis pela liberação de vários mediadores pró-inflamatórios e fatores de crescimento incluindo TGF- $\beta$ , PDGF, fator de crescimento fibroblástico (FGF) e IGF. Esses fatores influenciam diretamente a migração de células mesenquimais, proliferação e deposição da matriz extracelular, resultando na progressão da desordem fibroproliferativa na LPA (PITTET e cols., 2001; KREIN e cols., 2002 DOS SANTOS, 2008; PELOSI & ROCCO, 2008; CHOI e cols., 2009). No presente estudo também constatou-se aumento na expressão de TGF- $\beta$ , PDGF e IGF em ambos os grupos LPA, principalmente na LPA pulmonar, o que pode ter contribuído para o aumento na deposição de fibras colágenas no septo alveolar em função do maior grau de lesão epitelial no grupo LPAp (Figura 13).

Os animais tratados com CMMO têm marcada redução na quantidade de fibras colágenas independente da etiologia da lesão pulmonar (Figura 9). Vários fatores regulam o processo de deposição de colágeno, incluindo citocinas, metaloproteinases e fatores de crescimento (MENEZES e cols., 2005; PELOSI & ROCCO, 2008). A redução de fibrose em função da terapia com CMMO pode ser

atribuída a diminuição do processo inflamatório assim como redução nos fatores de crescimento tais como TGF- $\beta$ , PDGF e IGF. Nesse contexto, CHOI e colaboradores demonstraram que a elevação nos níveis de IGF no BALF de pacientes na fase inicial da LPA favoreceu a sobrevivência de fibroblastos e que a sua diminuição induz apoptose de fibroblastos pulmonares podendo ter um importante papel na resolução da LPA já que favorece a resolução da fibrose (CHOI e cols., 2009). Não se pode esquecer que o eficiente reparo epitelial pulmonar reduz a fibrogênese, uma vez que a presença de uma camada epitelial alveolar intacta suprime a proliferação fibroblástica e a deposição da matriz (ADAMSON e cols., 1988). Nosso experimento evidenciou em ambos os grupos LPA-CEL reparo das células epiteliais alveolares (Figura 10).

A apoptose pode ser lesiva ou benéfica, dependendo do tipo celular, das circunstâncias, e tempo de disparo e pode contribuir na patogênese da fibrose pulmonar assim como na sua resolução (UHAL, 2002; MARTIN e cols., 2003). Estímulo de apoptose em miofibroblastos e fibroblastos assim como células inflamatórias podem ser benéficas (LI e cols., 2004), mas excesso de apoptose de células epiteliais podem levar a destruição do parênquima acometido levando a perda do arcabouço necessário para o reparo tecidual, assim promovendo uma resposta fibrótica. O número de células epiteliais apoptóticas no pulmão assim como a expressão de RNAm para caspase 3 foi maior na LPA pulmonar, enquanto constatou-se que o número de células apoptóticas no rim e fígado foi maior na LPA extrapulmonar (Tabela 4 e Figura 14) em função da fisiopatologia da lesão. Rim e fígado são mais susceptíveis a lesão mediada por leucócitos com agregação de neutrófilos em resposta a citocinas liberadas pela endotoxina

(THIJS & THIJS, 1998; DHAINAULT e cols., 2001). Na sepse, o fígado emprega importante papel no mecanismo de defesa do organismo. As células de Kupffer são responsáveis pela inativação dos produtos de bactérias, produção e *clearance* de mediadores inflamatórios, podendo atrair e ativar neutrófilos favorecendo distúrbios na microcirculação, deposição de fibrina, lesão de hepatócitos e falência de múltiplos órgãos (KENNEDY e cols., 1999). As CMMO preveniram não só o aumento de células apoptóticas no pulmão, mas também em órgãos distais (Tabela 4 e Figuras 15, 16 e 17) provavelmente devido a presença dessas células nos diferentes órgãos e/ou atividade parácrina com secreção de citocinas e fatores de crescimento (HAGIMOTO e cols., 2002).

Embora nossos resultados corroborem com vários outros estudos envolvendo LPA e utilização de células-tronco para sua resolução, nosso estudo tem algumas limitações que necessitam ser levadas em consideração: 1. o modelo experimental escolhido para nosso estudo é freqüentemente utilizado, mas não reflete totalmente a LPA em humanos. Entretanto, o uso de bactérias para induzir LPA pulmonar e extrapulmonar com grau similar de lesão pulmonar é muito difícil devido a alta variabilidade da lesão e 2. alguns autores usam terapia com fibroblastos como controle (GUPTA e cols., 2007; MEI e cols., 2007; XU e cols., 2007). Entretanto, uma vez que o uso de fibroblastos não acarreta nenhum efeito (SUN e cols., 2009), no presente estudo nós administramos salina como controle ao invés de fibroblastos

## **8 Conclusão**

Embora a terapia com CMMO tenha sido efetiva em ambos os modelos de LPA, pulmonar e extrapulmonar, os efeitos sobre a mortalidade e alterações morfofuncionais foram mais evidentes no modelo de lesão extrapulmonar. O impacto da administração das CMMO parece difuso, afetando todos os aspectos da LPA e não agindo especificamente nas definidas vias de reparo ou lesão, que inclui alterações na mecânica pulmonar, infiltrado celular, deposição da matriz extracelular, expressão de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, e apoptose celular local e distal. Estes resultados foram observados a despeito do pequeno grau de fixação celular das células, sugerindo a existência de um efeito parácrino.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadie Y, Bregeon F, Papazian L, et al. Decreased VEGF concentration in lung tissue and vascular injury during ARDS. **Eur Respir J**, 25:139-146, 2005.

Abe S, Boyer C, Liu X, et al. Cells derived from the circulation contributes to the repair of lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 170:1158-1163, 2004.

Abreu SC, Maron-Gutierrez T, Garcia CSNB, et al. Stem cell and respiratory diseases. **Braz Arch Biol Technol**, 51:23-30, 2008.

Adamson IY, Young L, Bowden DH. Relationship of alveolar epithelial injury and repair to the induction of pulmonary fibrosis. **Am J Pathol**, 130: 377-383, 1988.

Aliotta JM, Passero M, Meharg J, et al. Stem Cells and pulmonary metamorphosis: new concepts in repair and regeneration. **J Cell Physiol**, 204: 725-741, 2005.

Aliotta JM, Keaney P, Passero M, et al. Bone marrow production of lung cells: the impact of G-CSF, cardiotoxin, graded doses of irradiation, and subpopulation phenotype. **Exp Hematol**, 34:230-241, 2006.

Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, 338:347-34, 1998.

Aslam M, Baveja R, Liang OD, et al. Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease. **Am J Respir Crit Care Med**, 180:1122-1130, 2009.

Artigas A, Bernard GR, Carlet J, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS, Part 2. Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. **Am J Respir Crit Care Med**, 157:1332-1347, 1998.

Balasubramaniam V, Ryan SR, Seedorf GJ, et al. Bone Marrow Derived Angiogenic Cells Restore Lung Alveolar and Vascular Structure After Neonatal Hyperoxia in Infant Mice . **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 0: 00089.2009v1, 2009.

Bates JHT, Rossi A, Milic-Emili J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant flow. **J Appl Physiol**, 58:1840-1848, 1985.

Bates JH, Baconnier P, Milic-Emili J. A theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics. **J Appl Physiol**, 64:2204-2214, 1988.

Bates JHT, Shadornofsky F, Stewart DE. The low frequency dependence of respiratory system resistance and elastance in normal dogs. **Respir Physiol**, 78: 369-382, 1989.

Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, clinical trial coordination. **Am J Respir Crit Care Med**, 149:818-824, 1994.

Bernard GR. Acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, 172:798-806, 2005.

Breen EC. Mechanical strain increases type I collagen expression in pulmonary fibroblasts in vitro. **J Appl Physiol**, 88:203-209, 2000.

Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, et al. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALI studies. **Intensive Care Med**, 30(1):51-61, 2004.

Burnham E, Moss M. Progenitor cells in acute lung injury. **Minerva Anestesiol**, 72:369-374, 2006.

Burnham EL, Taylor WR, Quyyumi AA, et al. Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 172:854-860, 2005.

Cepkova M, Matthay MA. Pharmacotherapy of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **J Intensive Care Med**, 21:119-143, 2006.

Chang HK, Mortola JP. Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurement. **J Appl Physiol**, 51:218-225, 1981.

Cheung AM, Tansey CM, Tomlinson G, et al. Two-Year outcomes, health care use, and costs of survivors of acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, 174:538-544, 2006.

Choi JE, Lee SS, Sunde DA, et al. Insulin-like growth factor-I receptor blockade improves outcome in mouse model of lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**; 179:212-219, 2009.

D'Angelo E, Calderini E, Torri G, et al. Respiratory mechanics in anesthetized paralyzed humans: effects of flow, volume, and time. **J Appl Physiol**, 67:2556-2564, 1989.

Deal EM, Hollands JM, Schramm GE, et al. Role of corticosteroids in the management of acute respiratory distress syndrome. **Clin Ther**, 30:787-799, 2008.

Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, et al. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. **Crit Care Med**, 29:S42-47, 2001.

Dooner MS, Aliotta JM, Pimentel J, et al. Conversion Potential of Marrow Cells into Lung Cells Fluctuates with Cytokine-Induced Cell Cycle. **Stem Cell Develop**, 17:207-219, 2008.

Dos Santos CC. Advances in mechanisms of repair and remodelling in acute lung injury. **Intensive Care Med**, 34:619-630, 2008.

Eissa NT, Ranieri VM, Corbeil C, et al. Effect of PEEP on the mechanics of the respiratory system in ARDS patients. **J Appl Physiol**, 73:1728-35, 1992.

Esteban A, Fernandez-Segoviano P, Frutos-Vivar F, et al. Comparison of clinical criteria for the acute respiratory distress syndrome with autopsy findings. **Ann Intern Med**, 141:440-445, 2004.

Faffe DS, Seidl VR, Chagas PS, et al. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. *Eur Respir J*, 15:85-91, 2000

Fernandez S, Jose P, Avdiushko MG, et al. Inhibition of IL-10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists. **J Immunol**, 172:2613-2620, 2004.

Fielding CA, McLoughlin RM, McLeod L, et al. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. **J Immunol**, 181(3):2189-2195, 2008

Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. **Stem Cells Dev**, 18:683-692, 2009.

Gattinoni L, Pelosi P, Suter PM, et al. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease: Different syndromes. **Am J Respir Criti Care Med**, 158:3-11, 1998.

Geiser T. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury a translational approach. **Swiss Med Wkly**, 3:586-590, 2003.

Griffiths MJ, Bonnet D, Janes SM. Stem cells of the alveolar epithelium. **Lancet**, 366: 249-260, 2005.

Gupta N, Su X Popov B, et al. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. **J Immunol**, 172:1266-1272, 2004.

Gunther A, Ruppert C, Reinhold S, et al. Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. **Respir Res**, 2:353-364, 2001.

Hagimoto N, Kuwano K, Inoshima I, et al. TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. **J Immunol**, 168:6470-6478, 2002.

Hamano K, Li TS, Kobayashi S, Matsuzaki M, et al. Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis. **Cell Transplant**, 9:439-443, 2000.

Hashimoto N, Jin H, Liu T, et al. Bone marrow-derived progenitors cells in pulmonary fibrosis. **J Clin Investigation**, 113:243-252, 2004.

Herzog EL, Krause DS. Engraftment of marrow-derived epithelial cells. The role of fusion. **Proc Am Thorac Soc**, 3:691-695, 2006.

Idell S. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. **Crit Care Med**, 31:S213-S220, 2003.

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

Lahm T, Crisostomo PR, Markel TA, et al. The critical role of vascular endothelial growth factor in pulmonary vascular remodeling after lung injury. **Shock**, 28:4-14, 2007.

Lee JW, Fang X, Gupta N, Serikov V, Matthay MA. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. **Proc Natl Acad Sci USA**, 106:16357-16362, 2009.

Leite-Junior JH, Garcia CS, Souza-Fernandes AB, et al. Methylprednisolone improves lung mechanics and reduces the inflammatory response in pulmonary but not in extrapulmonary mild acute lung injury in mice. **Crit Care Med**, 36:2621-2628, 2008.

Li HP, Li X, He GJ, et al. The influence of dexamethasone on the proliferation and apoptosis of pulmonary inflammatory cells in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **Respirology**, 9:25-32, 2004.

Loi R, Beckett T, Goncz KK, et al. Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells. **Am J Respir Crit Care Med**, 173:171-179, 2006.

Loring SH, Elliott EA, Drazen JM. Kinetic energy loss and convective acceleration in respiratory resistance measurements. **Lung**, 156:33-42, 1979.

Kennedy JA, Clements WD, Kirk SJ, et al. Characterization of the Kupffer cell response to exogenous endotoxin in a rodent model of obstructive jaundice. **Br J Surg**; 86:628-633,1999.

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. **Circ Res**, 95:354-363, 2004.

Kobayashi T, Hamano K, Li TS, et al. Enhancement of angiogenesis by the implantation of self-bone marrow cells in rat ischemic heart model. **J Surg Res**, 89:189-195, 2000.

Kochi T, Okubo S, Zin AW, et al. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. **J Appl Physiol**, 64:441-450, 1998a.

Kochi T, Okubo S, Zin AW, et al. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects on flow and volume. **J Appl Physiol**, 64:2636-2646, 1998b.

Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. **Development**, 128:1581-1588, 2001.

Kotton DN, Fabian AJ, Mulligan RC. Failure of bone marrow to reconstitute lung epithelium. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 33:328-334, 2005.

Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell**, 105:369-377, 2001.

Krause DS. Bone marrow-derived cells and stem cells in lung repair. **Proc Am Thorac Soc**, 5:323-327, 2008.

Krein PM, Winston BW. Roles for insulin-like growth factor I and transforming growth factor-beta in fibrotic lung disease. **Chest**, 122:289S-293S, 2002.

Marshall RP, Bellingan G, Webb S, et al. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. **Am J Respir Crit Care Med**, 162:1783-1788, 2000.

Martin TR, Nakamura M, Matute-Bello G. The role of apoptosis in acute lung injury. **Crit Care Med**, 31:S184-188, 2003.

Matthay MA, Wiener-Kronish JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. **Am Rev Respir Dis**, 142:1250-1257, 1990.

Matthay MA, Zimmerman GA, Esmon C, et al. Future researchs directions in acute lung injury. Summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group. **Am J Respir Crit Care Med**, 167:102-1035, 2003.

Mattsson J, Jansson M, Wernerson A, et al. Lung epithelial cells and type II pneumocytes of donor origin after allogeneic stem cell transplantation. **Transplantation**, 78:154-157, 2004.

Medford AR, Milar AB. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS): paradox or paradigm? **Thorax** 61:621-626, 2006.

Meduri GU, Belenchia JM, Estes RJ, et al. Fibroproliferative phase of ARDS. Clinical findings and effects of corticosteroids. **Chest**, 100:943-952, 1991.

Mei SHJ, McCarter SD, Deng Y, et al. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1. **PLoS Med**, 4:1525-1537, 2007.

Menezes SLS, Bozza PT, Castro Faria Neto HC, et al. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammator Y and ultrastructural analyses. **J Appl Physiol**, 98:1777-1783, 2005.

Mura M, dos Santos CC, Stewart D, et al. Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury. **J Appl Physiol**, 97(5):1605-1617, 2004.

Mura M, Han B, Andrade CF, et al. The early responses of VEGF and its receptors during acute lung injury: implication of VEGF in alveolar epithelial cell survival. **Crit Care**, 10(5):R130, 2006.

Mortola JP, Noworaj A. Two sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurement in small animals. **J Appl Physiol**, 55:250-53,1983.

Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. **Blood**, 108:2114-2120, 2006.

Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nat Med**, 15:42-49, 2009.

Neuringer IP, Randell SC. Stem cells and repair of lung injuries. **Respir Res**, 5:1-9, 2004.

Nishiba M, Li TS, Hirata K, et al. Improvement of cardiac function by bone marrow cell implantation in a rat hypoperfusion heart model. **AnnThorac Surg**, 75: 768-773, 2003.

Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. **Proc Natl Acad Sci USA**, 100:8407-8411, 2003.

Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, et al. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. **Stem Cells**, 25:683:692, 2007.

Pelosi P, D'Onofrio D, Chiumello D, et al. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different. **Eur Respir J**, 22:48s-56s, 2003.

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

Phua J, Badia JR, Adhikari NK, et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decrease over time? A systematic review. **Am J Respir Crit Care Med**, 179:220-227, 2009.

Pittet JF, Griffiths MJ, Geiser T, et al. TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury. **J Clin Invest**, 107(12):1537-1544, 2001.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 284:143-148, 1999.

Poncelet AJ, Nizet Y, Vercruyssen J, et al. Inhibition of humoral response to allogeneic porcine mesenchymal stem cell with 12 days of tacrolimus. **Transplantation**, 86:1586-95, 2008.

Poncelet AJ, Vercruyssen J, Saliez A, et al. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. **Transplantation**, 83:783-790, 2007.

Popp FC, Eggenhofer E, Renner P, et al. Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. **Transpl Immunol**. 20:55-60, 2008.

Presneill JJ, Harris TH, Stewart AG, et al. A randomized phase II trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in severe sepsis with respiratory dysfunction. **Am J Respir Crit Care Med**, 166:138-143, 2002.

Puybasset L, Cluzel P, Chao N, et al. A computed tomography scan assessment of regional lung volume in acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 158:1644-1655, 1998.

Quesnel C, Marchand-Adam S, Fabre A, et al. Regulation of hepatocyte growth factor secretion by fibroblast in patients with acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 294:L334-343, 2008.

Rocco PRM, Negri EM, Kurts PM, et al. Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, 164:1067-1071, 2001.

Rocco PR, Momesso DP, Figueira RC, et al. Therapeutic potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. **Eur Respir J**, 22:20-27, 2003.

Rocco PR, Facchinetti LD, Ferreira HC, Negri EM, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA. Time course of respiratory mechanics and pulmonary structural remodeling in acute lung injury. **Respir Physiol Neurobiol**, 143:49-61, 2004.

Rocco PMR, Zin, WA. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different? **Curr Opin Crit Care**, 11:10-17, 2005.

Rocco PMR, Pelosi, P. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: myth or reality? **Curr Opin Crit Care**, 14:50-55, 2008.

Rocco PRM, Dos Santos C, Pelosi P. Lung parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome. **Minerva Anesthesiol**, 75:730-740, 2009.

Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell in repair of the injured lung. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 33:145-152, 2005a.

Rojas M, Woods CR, Mora AL, et al. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 288:L333-341, 2005b.

Rubinfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. **N Engl J Med**, 353:1685-1693, 2005.

Santos FB, Nagato LKS, Boechem NM, et al. Time course of lung parenchyma remodeling in pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. **J Appl Physiol**, 100:98-106, 2006.

Schuster DP. What is acute lung injury. What is ARDS. **Chest**, 6:1721-1726, 1995.

Shimabukuro DW, Sawa T, Gropper MP. Injury and repair in lung and airways. **Crit Care Med**, 31:S524-S531, 2003.

Shyamsundar M, McKeown STW, O'Kane CM, et al. Simvastatin Decreases Lipopolysaccharide-induced Pulmonary Inflammation in Healthy Volunteers. **Am J Respir Crit Care Med**, 179:1107-1114, 2009.

Souza AB, Santos BF, Negri EM, Zin WA, et al. Remodelamento do tecido pulmonar na síndrome do desconforto respiratório agudo. **Jornal de Pneumologia**, 29:1-10, 2003.

Stripp BR. Hierarchical organization of lung progenitor cells: is there an adult lung tissue stem cell? **Proc Am Thorac Soc**, 5:695-698, 2008.

Sun CK, Chang LT, Sheu JJ, et al. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy alleviates left ventricular remodeling and improves heart function in rat-dilated cardiomyopathy. **Crit Care Med**, 37: 1197-1205, 2009.

Suratt BT, Cool CD, Seris AE, et al. Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. **Am J Respir Crit Care Med**, 168:318-322, 2003.

Takahashi M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, et al. 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: H886-H893, 2006.

Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. **Nature**, 416:542-545, 2002.

Thickett DR, Armstrong L, Christie SJ, et al. Vascular endothelial growth factor may contribute to increased vascular permeability in acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, 164:1601-1605, 2001.

Thijs A, Thijs LG. Pathogenesis of renal failure in sepsis. **Kidney Int Suppl**, 66:S34-37, 1998.

Uhal BD. Apoptosis in lung fibrosis and repair. **Chest**, 122:293S-298S, 2002.

- Villar J, Pérez-Mendez L, López J, et al. An Early PEEP/FIO<sub>2</sub> Trial Identifies Different Degrees of Lung Injury in Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, 176:795-804, 2007.
- Xing Z, Gauldie J, Cox G, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory response. **J Clin Investigation**, 101:311-320, 1998.
- Xu J, Woods CR, Mora AL, et al. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cell in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 293:L131-L141, 2007.
- Warburton D, Perin L, DeFilippo R, et al. Stem/progenitor cells in lung development, injury repair, and regeneration. **Proc Am Thorac Soc**, 5:703-706, 2008.
- Wang H, Shun C, Hsu S, et al. Fas/FasL ligand pathway is involved in the resolution of type II pneumocyte hyperplasia after acute lung injury: Evidence from a rat model. **Crit Care Med**, 30:1528-1534, 2002.
- Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, 342:1334-1349, 2000.
- Weiss DJ, Berberich MA, Borok Z, et al. Adult Stem cells, lung biology, and lung disease. **Proc Am Thorac Soc**, 3:193-207, 2006.
- Weiss DJ. Stem cells and cell therapies for fibrosis and other lung diseases. **Pulm Pharmacol Ther**, Dec 7, 2007.
- Weiss DJ, Kolls JK, Ortiz LA, et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. **Proc Am Thorac Soc**, 5:637-667, 2008.
- Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, et al. Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. **J Immunol**, 172:1266-1272, 2004.

Yen CC, Yang SH, Lin CY, et al. Stem cell in the lung parenchyma and prospects for lung therapy. **Eur J Clin Invest**, 36:310-319, 2006.

Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, et al. Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. **Circ Res**, 96(4):442-450, 2005.

# 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](#)