

**DANIELE LOPES PEREIRA**

**TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO  
ADIPOSO E “POOL” DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROSE PULMONAR.**

ASSIS  
2016

**DANIELE LOPES PEREIRA**

**TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO  
ADIPOSO E “POOL” DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROSE PULMONAR.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestrado Acadêmico em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientador: João Tadeu Ribeiro Paes

ASSIS

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

P436t      Pereira, Daniele Lopes  
Terapia celular com uso de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano e “pool” de células mononucleares da medula óssea em modelo experimental de fibrose pulmonar / Daniele Lopes Pereira. Assis, 2016.  
55 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista  
Orientador: Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

1. Fibrose pulmonar. 2. Terapia Celular. 3. Células Mononucleares da Medula Óssea. 4. Células-tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo. I. Título.

CDD 616.24

---

DANIELE LOPES PEREIRA

TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO E "POOL" DE  
CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROSE PULMONAR

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências e Letras – UNESP para a obtenção  
do título de Mestrado Acadêmico em  
Biociências (Área de Conhecimento:  
Caracterização e Aplicação da Diversidade  
Biológica)

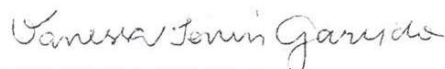
Data da Aprovação: 15/03/2016

COMISSÃO EXAMINADORA



Presidente: PROF. DR. JOÃO TADEU RIBEIRO PAES - UNESP/Assis

Membros: PROFA. DRA. MIRIAN BASSI - UNESP/Araraquara



PROFA. DRA. VANESSA TONIN GARRIDO - UNICAMP/Campinas

*À minha mãe Zeni, aos meus irmãos Welton e Luiz Henrique e ao meu companheiro Bruno, por todo o carinho e incentivo desde sempre.*

PEREIRA, Daniele Lopes. **Terapia Celular com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo e “pool” de células mononucleares da medula óssea em modelo experimental de fibrose pulmonar.** 2016. 55 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2016.

## RESUMO

A Fibrose Pulmonar (FP), também denominada Alveolite Fibrosante, é uma pneumopatia idiopática, crônica e irreversível, que acomete o tecido pulmonar promovendo a deposição de tecido fibroso cicatricial e consequente remodelamento da arquitetura pulmonar. Considerando a inexistência de um tratamento clínico curativo que não seja apenas paliativo, a terapia com células-tronco desponta como alternativa promissora no tratamento da fibrose pulmonar e diversas outras patologias. Neste contexto, este projeto propôs o emprego da terapia celular com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano (CTMTA) e “pool” de células mononucleares da medula óssea (BMMC), isoladas ou conjuntamente, em modelo experimental de fibrose pulmonar. Foram utilizados 36 ratos Wistar divididos em 6 grupos. O grupo controle recebeu instilação intratraqueal de tampão fosfato. Cinco grupos foram instilados com bleomicina (2U/animal) para a indução da doença e, após 14 dias, submetidos ou não a diferentes tratamentos utilizando células mononucleares da medula óssea e/ou células-tronco mesenquimais de tecido adiposo, sendo que um grupo recebeu tratamento placebo com tampão fosfato. A análise histológica evidenciou o desenvolvimento de fibrose nos animais instilados com bleomicina ( $p < 0,0001$ ) e uma melhora do quadro fibrótico nos animais submetidos ao tratamento, independentemente do tipo celular utilizado ( $p < 0,001$ ). A ventilação pulmonar basal revelou a presença de esforço respiratório nos animais instilados com bleomicina ( $p = 0,0260$ ), porém nenhum tipo de terapia foi capaz de reverter esse quadro. Não houve diferença significativa entre o perfil de leucócitos encontrados no lavado broncoalveolar dos animais com e sem fibrose, entretanto a terapia com CTMTA promoveu a redução da porcentagem de linfócitos e o aumento de macrófagos nos animais doentes. O tratamento com BMMC e CTMTA, realizado de modo isolado ou em conjunto, mostrou remissão significativa do quadro de fibrose instalado.

**Palavras-chave:** Fibrose Pulmonar. Terapia Celular. Células Mononucleares da Medula Óssea. Células-tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo.

PEREIRA, Daniele Lopes. **Cell Therapy with adipose tissue-derived stem cells and pool bone marrow mononuclear cells in experimental model of pulmonary fibrosis.** 2016. 55 f. Dissertation (Master Degree in Biosciences) – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2016.

## ABSTRACT

Pulmonary Fibrosis (PF), also known as fibrosing alveolitis, is an idiopathic, chronic, irreversible lung disease that affects the lung tissue by promoting the deposition of fibrous scar tissue and subsequent lung architecture remodeling. Considering the need for curative medical treatment that is not only palliative, stem cell therapy is emerging as a promising alternative for the treatment of pulmonary fibrosis and many other diseases. In this context, it is proposed in this study the cell therapy with mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue (CTMTA) in association with the pool of mononuclear bone marrow cells (BMMC) in an experimental model of pulmonary fibrosis. The disease was induced in 4 groups of *Wistar* rats ( $n = 6$ ) by intratracheal bleomycin (2U / animal). 14 days after instillation, each group was subjected to a specific treatment with BMMC and CTMTA, isolated or combined mode, while a fourth group was treated with phosphate buffer. The control group was instilled and treated with phosphate buffer. Histological analysis showed the development of disease in animals instilled with bleomycin ( $p < 0,0001$ ) and untreated, and improvement in the fibrous framework of animals subjected to cell therapy ( $p < 0,001$ ). The basal ventilation revealed the presence of respiratory effort in animals instilled with bleomycin, submitted or not to therapy ( $p = 0,0260$ ). Treatment with BMMC and CTMTA, performed alone or in conjunction mode showed similar results, since both promoted remission of pulmonary fibrosis.

**Keywords:** Pulmonary fibrosis. Cell Therapy. Adipose Tissue-Derived Stem Cells. Bone Marrow Mononuclear Cells.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	08
1.1. Fibrose Pulmonar.....	08
1.2. Sulfato de bleomicina como indutor de fibrose pulmonar.....	09
1.3. Patogênese.....	10
1.3.1. Hipótese da Inflamação.....	10
1.3.2. Processo cicatricial anômalo: a hipótese atual.....	11
1.4. Tratamentos.....	12
1.5. Células-tronco .....	13
1.5.1. Células-tronco Embrionárias .....	14
1.5.2. Células-tronco Adultas.....	15
1.6. Objetivos .....	18
<b>2. ARTIGO</b> .....	19
2.1. Introdução.....	22
2.2. Metodologia.....	24
2.2.1. Animais.....	24
2.2.2. Grupos Experimentais.....	25
2.2.3. Monitoramento do ganho de peso dos animais.....	26
2.2.4. Indução da fibrose pulmonar .....	26
2.2.5. Obtenção das células para a terapia celular .....	27
2.2.6. Caracterização e validação das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo – Diferenciação celular <i>in vitro</i> .....	29
2.2.7. Infusão de células-tronco.....	29
2.2.8. Medidas de Ventilação Pulmonar.....	30
2.2.9. Coleta e análise do lavado broncoalveolar .....	31
2.2.10. Análise histológica .....	32
2.2.11. Análises estatísticas.....	32

2.3. Resultados .....	33
2.4. Discussão.....	40
2.5. Conclusão.....	45
2.6. Referências .....	45
<b>3. CONCLUSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Fibrose Pulmonar

A Fibrose Pulmonar (FP), também denominada de Alveolite Fibrosante, é uma pneumopatia crônica e irreversível que acomete o tecido pulmonar promovendo, por meio de estímulos ainda não completamente compreendidos, a deposição de tecido fibroso cicatricial e conseqüente remodelamento da arquitetura pulmonar (Gross e Hunninghake, 2001; Wynn 2011). O avanço do quadro clínico envolve um déficit gradual da capacidade pulmonar, acompanhado de tosse não produtiva e dispneia (Kim et al., 2006).

A FP faz parte do espectro das doenças intersticiais pulmonares, de características histopatológicas bastante semelhantes, o que, muitas vezes, apresenta-se como um complicador para uma definição diagnóstica precisa. Desde 2000, uma declaração de consenso internacional, publicada conjuntamente pela *American Thoracic Society*, *European Respiratory Society* e *American College of Chest Physicians*, estabeleceu os critérios de diagnóstico para doenças pulmonares intersticiais difusas, entre elas, a FP. Desde então, inclui-se como critério para o diagnóstico da FP a presença de padrão histológico de Pneumonia Intersticial Usual de amostra tecidual obtida por biópsia e, ainda, a exclusão de diversas patologias pulmonares de causa conhecida e clinicamente bem definidas (Raghu et al. 2011; Xaubet et al. 2013).

Embora não haja um único fator causal para o desenvolvimento da FP e a etiologia permaneça ainda pouco compreendida, admite-se que a patogênese envolva exposição a fatores de risco ambientais e/ou ocupacionais associados à suscetibilidade genética do indivíduo (Verma, Slutsky, 2007). Os principais fatores de risco envolvem tabagismo crônico e exposição a resíduos oriundos da construção civil, como sílica, aço, latão, chumbo e pó de madeira (Baumgartner et al., 1997; Raghu, 2011). Há maior prevalência

entre indivíduos do sexo masculino, acima dos 50 anos de idade, uma vez que correspondem à maior parcela dentre os trabalhadores relacionados às profissões de risco.

Estima-se que a incidência da FP seja de 10,7 casos para cada 100.000 habitantes do sexo masculino, por ano. Nas mulheres a incidência é de 7,4 para cada 100.000 habitantes. A prevalência aproxima-se de 20/100.000 para homens e 13/100.000 para mulheres, sendo a expectativa de vida, após o diagnóstico, inferior a 5 anos (Raghu, 2011). Além disso, o número de pacientes diagnosticados com fibrose pulmonar tem aumentado ao longo dos anos, o que caracteriza a doença como um problema mundial de saúde pública, com elevada incidência entre as doenças intersticiais do pulmão.

## **1.2. Sulfato de bleomicina como indutor de fibrose pulmonar**

Apesar da escassez de dados epidemiológicos, vários estudos com modelos animais vêm sendo realizados com o objetivo de elucidar os mecanismos fisiopatológicos que culminam na formação de tecido fibroso. Embora nenhum dos modelos mimetize de maneira fidedigna o padrão de desenvolvimento da doença em humanos, há a reprodução de algumas características patológicas importantes, o que tem contribuído significativamente para os avanços acerca dos mecanismos fisiopatológicos e etiopatogênicos da doença (Mutsaers et al., 2004; Moore, Hogaboam, 2008).

O modelo experimental mais comumente utilizado baseia-se na toxicidade dose-dependente da bleomicina (BLM), um antibiótico com propriedades quimioterápicas extraído da bactéria *Streptomyces verticillus*, em 1966, por Umezawa e colaboradores.

A BLM induz dano oxidativo no DNA, o que justifica sua atividade anti-tumoral, sendo amplamente empregada no tratamento de diversas neoplasias (Della Latta et al., 2015). A toxicidade pulmonar surge como efeito adverso do tratamento e é dose-

dependente, observada em geral a partir da administração de doses cumulativas superiores a 450 mg em pacientes humanos. Este achado foi o fator determinante para seu emprego como agente indutor da fibrose pulmonar em modelos animais (Thrall et al., 1979).

Em 1979, Thrall e colaboradores padronizaram um modelo de indução de fibrose pulmonar em ratos *Wistar* por instilação intratraqueal de bleomicina (BLM). Os achados histopatológicos observados no modelo animal mostraram algumas características similares às verificadas na doença humana. Dessa forma, o modelo experimental proposto por Thrall et al. (1979) representou uma importante contribuição para o avanço nos conhecimentos dos mecanismos-chave implicados na fisiopatologia e desenvolvimento dos processos fibróticos pulmonares.

### **1.3. Patogênese**

#### **1.3.1. Hipótese da Inflamação**

A etiologia da FP, apesar de não totalmente estabelecida, está fortemente vinculada à exposição reiterada das vias aéreas a agentes tóxicos que provocam lesões recidivantes no tecido pulmonar, culminando, em última instância, na deposição de tecido fibroso como medida reparativa (Xaubet, 2013).

As hipóteses iniciais sobre os mecanismos etiopatogênicos da FP propunham que a inflamação aguda seria um fator determinante para o desenvolvimento e estabelecimento da doença (Keogh, Crystal, 1982; Ward, Hunninghake, 1998). De acordo com essa hipótese, o processo inflamatório, desencadeado por agentes tóxicos, causaria lesão pulmonar com morte de células epiteliais alveolares que, por meio da liberação de fatores pró-fibróticos, induziriam a proliferação e ativação de fibroblastos com consequente deposição de matriz extracelular no parênquima pulmonar. A hipótese da

inflamação apoiava-se em achados histopatológicos que indicavam a presença de infiltrados inflamatórios nos espaços intersticiais e intra-alveolares em pacientes com FP, além da expressão de uma série de citocinas pró-inflamatórias (Kamp, 2003). Esses dados colocaram a inflamação como sendo o principal mecanismo etiopatogênico da doença, além de fundamentar na proposição de terapias anti-inflamatórias (Mapel, Samet, 1996). Porém, diante da ineficácia dos tratamentos propostos, qual seja, a não remissão do quadro fibrótico instalado, somada a novos estudos que evidenciaram a ocorrência de fibrose independente do ambiente inflamatório, a hipótese da inflamação perdeu robustez e consistência, abrindo novas vias e abordagens de investigação (Bringardner et al., 2008).

#### 1.3.2. Processo cicatricial anômalo: a hipótese atual

O ambiente alveolar normal é composto por 2 tipos predominantes de células: células epiteliais alveolares tipo 1 (CEA1) e células epiteliais alveolares tipo 2 (CEA2). As primeiras exibem morfologia bastante alongada e são responsáveis pelas trocas gasosas, cobrindo cerca de 95% das paredes alveolares. As CEA2, de formato cuboide, são menos abundantes, correspondendo à cerca de 5% da superfície alveolar. As CEA2 são responsáveis pela produção do líquido surfactante e possuem capacidade de autorrenovação e diferenciação em CEA1 podendo, portanto, em caso de lesão, promover a regeneração tecidual (Barkauskas, Noble, 2014).

Em um epitélio pulmonar saudável, após lesão e morte de CEA1, estas são rapidamente substituídas por CEA2, que se proliferam para cobrir a lâmina basal desprovida de epitélio. Posteriormente, as CEA2 diferenciam-se em CEA1 e o processo de regeneração ocorre de modo rápido e eficaz, sem o desenvolvimento de fibrose (Selman, King et al., 2001; Barkauskas, Noble, 2014).

Atualmente, a hipótese mais aceita para explicar a patogênese da FP envolve a presença de fibroblastos e CEA2 fisiologicamente alterados, com proliferação anormal e incapacidade de diferenciação em CEA1 durante o reparo da lesão (Selman, King et al. 2001; Sisson, Mendez et al. 2010; Barkauskas, Noble, 2014). Muitos trabalhos têm proposto que as causas destas disfunções correlacionam-se com características genéticas do indivíduo e/ou com o estabelecimento de um ambiente pulmonar estressado, após correlação entre certas infecções virais latentes e a presença de fibrose pulmonar em pacientes humanos. Nesse sentido, alguns vírus, como por exemplo, o vírus da Herpes e o Citomegalovírus, que possuem a característica de infectar e permanecer latentes no tecido pulmonar por longos períodos de tempo, seriam os responsáveis por influenciar o funcionamento inadequado das CEA2. (Tang et al., 2003; Dworniczak et al., 2004).

Em um ambiente pulmonar previamente comprometido por agentes agressores endógenos ou exógenos, lesões epiteliais recorrentes provocariam morte de CEA1 com consequente proliferação de CEA2 que, incapazes de se diferenciar em CEA1, promoveriam a cobertura ineficaz da lâmina basal desprovida de epitélio, o que, por sua vez, causaria liberação de fatores pró-fibróticos com consequente recrutamento de fibroblastos, dando origem ao desenvolvimento e estabelecimento de focos fibróticos, característicos da doença (Barkauskas, Noble, 2014).

#### **1.4. Tratamentos**

Os tratamentos disponíveis na atualidade baseiam-se em drogas que apresentam atividade antifibrótica e/ou imunossupressora. Essas abordagens terapêuticas, no entanto, representam apenas medidas paliativas, uma vez que não se verifica remissão completa ou mesmo parcial do quadro patológico instalado (Moeller et al., 2008). Na

tentativa de conter o processo inflamatório, várias drogas imunossupressoras (azatioprina e corticosteroides) e antineoplásicas têm sido empregadas durante o tratamento de pacientes com FP (Gross, Hunninghake, 2001; Raghu et al., 2012). Apesar de não modificarem o desfecho da doença, os tratamentos têm promovido a atenuação dos sintomas, o que tem refletido positivamente na qualidade de vida dos pacientes. Resultados terapêuticos semelhantes foram obtidos com terapias antifibróticas, baseadas na supressão da síntese de matriz extracelular e proliferação de fibroblastos (King et al., 2014).

Apesar dos avanços no arsenal terapêutico, não se logrou até o presente, um tratamento clínico curativo que não seja apenas paliativo, com melhora na qualidade de vida dos pacientes. Neste contexto, a terapia com células-tronco adultas desponta como alternativa promissora no tratamento da fibrose pulmonar, bem como outras patologias pulmonares de caráter obstrutivo (Ribeiro-Paes et al., 2011; Tzouveleakis et al., 2011; de Faria et al., 2012; Longhini-dos Santos et al., 2013; Ribeiro-Paes et al., 2014).

### **1.5. Células-tronco**

Células-tronco são células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação e diferenciação em tipos celulares especializados (NIH, 2001; Melton, Cowan, 2004). As células-tronco podem ser classificadas quanto ao tipo e ao potencial de diferenciação. Quanto ao tipo, podem ser classificadas em embrionárias e adultas. Quanto ao potencial de diferenciação podem ser:

**Totipotentes:** capazes de originar todos os tipos celulares de um organismo adulto, inclusive os anexos embrionários. As células-tronco totipotentes são representadas pelo zigoto e por células resultantes dos primeiros estágios de divisão do embrião.

**Pluripotentes:** são células-tronco isoladas a partir da massa celular interna do

embrião na fase de blastocisto e possuem a capacidade de originar todos os tecidos do adulto, com exceção dos anexos embrionários e placenta.

Multipotentes: possuem um potencial de diferenciação mais limitado, restrito aos tipos celulares presentes no tecido do qual se originaram. O protótipo de célula-tronco multipotente é representado pelas células-tronco hematopoéticas.

Unipotentes: são células-tronco capazes de originar apenas um tipo celular de um único folheto embrionário como, por exemplo, as espermatogônias.

### 1.5.1. Células-tronco Embrionárias

As células-tronco embrionárias (CTE) correspondem às células da massa celular interna do embrião na fase de blastocisto, expressando, portanto, um amplo potencial de diferenciação. Quando mantidas em condições adequadas de cultura, as CTE podem se replicar por longos períodos, sem prejuízo da pluripotência (Huang et al., 2015). Essas características têm sido alvo de inúmeros estudos desde 1981, quando foram pioneiramente isoladas de embriões murinos, por dois grupos independentes de pesquisadores (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981).

Apesar do grande potencial de diferenciação das CTE, o uso em terapia celular é limitado em função de dois aspectos principais. Um aspecto de ordem técnica decorre da própria capacidade inerente da pluripotência das CTE, como decorrência do seu grande potencial de diferenciação, podendo originar, no organismo receptor, teratomas ou teratocarcinomas. Além das implicações de ordem técnica, o emprego de CTE em terapia celular encontra restrições de ordem ética e religiosa, uma vez que envolve a retirada de células de embriões em estágio de blastocisto. Em função destas limitações, as células-tronco adultas representam uma alternativa ao uso de embriões, além de possuírem características que as tornam potencialmente promissoras em terapia celular.

### 1.5.2. Células-tronco Adultas

Células-tronco adultas são células indiferenciadas presentes em tecidos especializados, com capacidade de autorrenovação e potencial de diferenciação multipotente, restrito aos tipos celulares do tecido do qual se originaram (NIH, 2001).

As células-tronco adultas estão presentes em uma ampla gama de tecidos, onde desempenham importante papel na manutenção da homeostase e na regeneração tecidual após lesão (Zago, Covas, 2006). Apesar da possibilidade de isolamento a partir do embrião após a formação dos 3 folhetos embrionários, as células-tronco adultas têm sido obtidas, preferencialmente, de indivíduos adultos, o que tem evitado implicações éticas e religiosas.

De acordo com o tecido de origem, as células-tronco adultas apresentam algumas especificidades e por isso são divididas em grupos distintos. Dentre os grupos mais estudados destacam-se Células-tronco Hematopoéticas (CTH) e Células-tronco Mesenquimais (CTM).

As CTH têm sido classicamente obtidas da medula óssea e sangue periférico - embora em menor quantidade - e apresentam potencial de diferenciação restrito à linhagem sanguínea (Anasetti et al., 2012). As Células-tronco Hematopoéticas representam o protótipo de célula-tronco adulta, sendo uma das mais estudadas, documentadas e empregadas em protocolos clínicos junto ao “pool” de células mononucleares da medula óssea (BMMC).

Além das CTH, o “pool” de BMMC, obtido após o processamento da medula óssea, também engloba um grupo heterogêneo de células, contendo tanto células indiferenciadas, representadas por uma rara população de células-tronco mesenquimais, quanto células diferenciadas, como células endoteliais e linfócitos (Zago, Covas, 2006).

Os trabalhos de James Till, iniciados na década de 50 do século passado,

forneceram resultados fundamentais para o estabelecimento do conceito de célula-tronco. Os autores mostraram, em camundongos letalmente irradiados, o reestabelecimento da hematopoese após transplante de medula óssea proveniente de doadores singênicos. As observações oriundas desse trabalho representaram a base para a compreensão acerca das propriedades de autorrenovação e diferenciação das CTH, investigadas em estudos posteriores.

Células-tronco mesenquimais (CTM) constituem uma subpopulação de células estromais não-hematopoéticas, de aspecto fibroblastóide, com núcleo central e citoplasma abundante (Shi et al., 2012). As CTM foram pioneiramente isoladas por Friedenstein, em 1966, que constatou a presença de uma pequena porção de células aderentes com aspecto fusiforme após o cultivo de células oriundas da medula óssea. No ambiente medular, as CTM constituem uma pequena população, correspondente a cerca de 0,01 a 0,0001% do total de células nucleadas e atuam dando suporte à hematopoese (Bydlowski et al., 2009).

Em relação ao potencial de diferenciação, as CTM são consideradas multipotentes, podendo diferenciar-se em células da linhagem mesodérmica. CTM possuem características que as tornam potencialmente atraentes em terapia celular. Além de mais facilmente obtidas, apresentam baixa expressão de antígenos de histocompatibilidade – HLA - tipo I e praticamente não apresentam HLA - tipo II, o que permite sua utilização em transplantes alogênicos e, até mesmo, xenogênicos, com probabilidade mínima de rejeição tecidual (Shi et al., 2011). Através da secreção de fatores de crescimento e outras citocinas, as CTM apresentam importante papel na proliferação celular e indução da angiogênese tecidual. Além disso, são conhecidas por possuir propriedades antiapoptóticas, anti-inflamatórias e imunomodulatórias (Murphy et al., 2013).

De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society*

for Cellular Therapy – ISCT), para que uma célula-tronco seja considerada mesenquimal deve obedecer a 3 critérios mínimos: (1) capacidade de aderência ao plástico em cultura; (2) expressão positiva ( $\geq 95\%$ ) para os marcadores de superfície: CD73, CD90 e CD105 e expressão negativa ( $\leq 2\%$ ) para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a OU CD19 e HLA-DR e, por fim (3) potencial de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica em meio condicionado (Horwitz et al., 2005; Dominici et al., 2006).

As células-tronco mesenquimais podem ser obtidas a partir de uma ampla gama de tecidos adultos. Em 1964, Martin Rodbell, ao estudar o tecido adiposo de ratos *Wistar* em relação à lipólise e metabolismo de glicose, mostrou a possibilidade de isolamento de uma fração vascular estromal a partir do emprego de colagenase durante o processamento tecidual. Com base no trabalho de Rodbell, Patricia Zuk, em 2001, obteve pioneiramente o isolamento de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano.

Embora a medula óssea tenha sido a primeira e clássica fonte para o isolamento de CTM, o tecido adiposo vem se constituindo, mais recentemente, como uma importante fonte para obtenção deste tipo celular, o que tem permitido grandes avanços nos conhecimentos sobre aspectos básicos e aplicações terapêuticas. Entre as propriedades que conferem vantagem ao tecido adiposo como fonte de CTM vale destacar: facilidade de obtenção e quantidade abundante de material, além de constituir material de descarte em clínicas de cirurgia plástica.

Não há, no entanto, nenhum registro prévio na literatura com emprego de tecido adiposo humano como fonte para isolamento de células-tronco mesenquimais e posterior emprego destas células para terapia celular em modelo experimental de fibrose pulmonar. Não há também nenhum trabalho anteriormente descrito que empregue uma associação de células-tronco hematopoéticas e células-tronco mesenquimais como alternativa terapêutica para a fibrose pulmonar. Considerando estes aspectos, objetivou-se com este

trabalho, de forma inédita e pioneira, o emprego de terapia celular com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (CTMTA) em associação ao “pool” de células mononucleares da medula óssea em modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por instilação intratraqueal de bleomicina em ratos *Wistar*.

## **1. 6. Objetivos**

### 1.6.1. Objetivo Geral

- Avaliar o emprego de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano e células mononucleares da medula óssea alogênicas, individualmente ou em associação de ambos os tipos celulares, como uma nova alternativa terapêutica em modelo experimental de fibrose pulmonar.

### 1.6.2. Objetivos Específicos

- Padronizar, nas condições do laboratório, um modelo animal de fibrose pulmonar por instilação intratraqueal de bleomicina;
- Avaliar a influência da fibrose pulmonar, bem como da terapia celular no ganho de peso dos animais;
- Avaliar o efeito da terapêutica com células-tronco no desenvolvimento fisiopatológico e sobrevida dos animais (ratos *Wistar*) instilados com bleomicina;
- Realizar análises histológicas de tecido pulmonar como forma de comprovar a ocorrência de fibrose e eventual melhora do quadro histopatológico dos animais tratados e controle;
- Avaliar a ventilação pulmonar basal nos animais dos grupos experimentais e controle.

## 2. ARTIGO

- Página de apresentação conforme normas do Jornal Brasileiro de Pneumologia.

**TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSE E “POOL” DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROSE PULMONAR.**

**“CELL THERAPY WITH HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS AND BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS IN EXPERIMENTAL MODEL OF PULMONARY FIBROSIS”.**

**Autores:**

- Daniele Lopes Pereira - M.Sc.  
- danielelopesp@hotmail.com
- João Tadeu Ribeiro-Paes M.D., Ph.D.  
- jtrpaes@yahoo.com.br
  
- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências e Letras – UNESP, Campus de Assis.  
Av. Dom Antônio, 2100. Parque Universitário, CEP 19806-900, Assis/SP.  
Tel. (18) 3302-5856.

### Resumo

Objetivo: Avaliar a eficácia da terapia celular com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo e “pool” de células mononucleares da medula óssea em modelo experimental de fibrose pulmonar. Métodos: Foram utilizados 36 ratos *Wistar* divididos em 6 grupos. O grupo controle recebeu instilação intratraqueal de tampão fosfato. Cinco grupos foram instilados com bleomicina (2U/animal) e após 14 dias, submetidos ou não a diferentes tratamentos utilizando células mononucleares da medula óssea e células-tronco mesenquimais de tecido adiposo, isoladas ou em conjunto, sendo que um grupo recebeu tratamento placebo com tampão fosfato. Após 28 dias da instilação de bleomicina, os animais foram submetidos a testes de ventilação basal e, após eutanásia, o lavado broncoalveolar foi coletado e os pulmões extraídos para análises histológicas. Resultados: A análise histológica evidenciou o desenvolvimento de fibrose nos animais instilados com bleomicina ( $p < 0,0001$ ) e remissão do quadro fibrótico nos animais submetidos ao tratamento, independentemente do tipo celular utilizado ( $p < 0,001$ ). A ventilação basal revelou a presença de esforço respiratório nos animais instilados com bleomicina ( $p = 0,0260$ ), porém nenhum tipo de terapia foi capaz de reverter esse quadro. Não houve diferença significativa entre o perfil de leucócitos encontrados no lavado broncoalveolar dos animais sadios e doentes, entretanto a terapia com CTMTA promoveu a redução da porcentagem de linfócitos e o aumento de macrófagos nos animais instilados com bleomicina. Conclusões: Todos os tratamentos com células-tronco promoveram resultados semelhantes quanto a remissão do quadro de fibrose pulmonar instalado, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos com BMMC e CTMTA, de modo isolado ou em associação.

**Palavras-chave:** Fibrose Pulmonar; Terapia Celular; Células Mononucleares da Medula Óssea; Células-tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo.

### **Abstract**

**Objective:** Evaluate cell therapy efficacy with human adipose tissue-derived stem cells and pool bone marrow mononuclear cells in an experimental model of pulmonary fibrosis. **Methods:** The disease was induced in 4 groups of Wistar rats (n = 6) by intratracheal bleomycin (2U / animal). 14 days after instillation, each group was subjected to a specific treatment BMMC and CTMTA, isolated or combined mode, while a fourth group was treated with phosphate buffer. The control group was instilled and treated with phosphate buffer. After 28 days the bleomycin instillation, the animals were subjected to ventilation baseline testing and following euthanasia, bronchoalveolar lavage was collected and lungs removed for histological analysis. Tissues were stained with hematoxylin and eosin and Mallory Trichrome, specific to collagen fibers. **Results:** Histological analysis showed the development of the disease in animals instilled with bleomycin and untreated ( $p < 0,0001$ ), as well as improvement in the fibrotic framework of animals treated with cell therapy ( $p < 0,001$ ). The basal ventilation revealed the presence of respiratory effort in animals instilled with bleomycin ( $p = 0,0260$ ), submitted or not to therapy, but more experiments are needed to confirm this hypothesis. **Conclusions:** All treatments stem cells promoted, with similar results, the remission of pulmonary fibrosis framework installed ( $p < 0,001$ ), no significant differences between treatments with BMMC and CTMTA, in isolation or together.

**Keywords:** Pulmonary Fibrosis; Cell Therapy; Bone Marrow Mononuclear Cells; Adipose Tissue-Derived Stem Cells.

## 2.1. INTRODUÇÃO

A Fibrose Pulmonar (FP), também denominada de Alveolite Fibrosante, é uma pneumopatia crônica e irreversível que acomete o tecido pulmonar promovendo, por meio de estímulos ainda não completamente compreendidos, a deposição de tecido fibroso cicatricial e conseqüente remodelamento da arquitetura pulmonar (1, 2). O avanço do quadro clínico envolve um déficit gradual da capacidade pulmonar, acompanhado de tosse não produtiva e dispneia (3).

Embora não haja um único fator causal para o desenvolvimento da FP e a etiologia permaneça ainda pouco compreendida, admite-se que a patogênese envolva exposição a fatores de risco ambientais e/ou ocupacionais associados à suscetibilidade genética do indivíduo (4). Os principais fatores de risco envolvem tabagismo crônico e exposição a resíduos oriundos da construção civil, como sílica, aço, latão, chumbo e pó de madeira (5, 6). Há maior prevalência entre indivíduos do sexo masculino, acima dos 50 anos de idade, uma vez que correspondem à maior parcela dentre os trabalhadores relacionados às profissões de risco (7).

Vários estudos com modelos animais vêm sendo realizados com o objetivo de elucidar os mecanismos fisiopatológicos que culminam na formação de tecido fibroso. O modelo experimental mais comumente utilizado baseia-se na toxicidade dose dependente da bleomicina (BLM), um antibiótico com propriedades quimioterápicas extraído da bactéria *Streptomyces verticillus*, em 1967, por Umezawa e colaboradores (8).

Apesar dos avanços no arsenal terapêutico, não se logrou até o presente, um tratamento clínico curativo que não seja apenas paliativo, com melhora na qualidade de vida dos pacientes. Neste contexto, a terapia com células-tronco adultas desponta como alternativa promissora no tratamento da fibrose pulmonar, bem como outras patologias pulmonares de caráter obstrutivo (9-13).

Células-tronco são células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação e diferenciação em tipos celulares especializados (14, 15). Quanto ao tipo, as células-tronco são classificadas em embrionárias (CTE) e adultas (CTA). As primeiras são representadas por células da massa celular interno do blastocisto e possuem amplo potencial de diferenciação. As CTA, por sua vez, estão presentes em tecidos adultos, após a formação dos 3 folhetos embrionários e possuem potencial de diferenciação mais restrito em comparação às CTE, podendo se diferenciar nos tipos celulares do tecido do qual se originaram (15). Dentre as células-tronco adultas mais estudadas destacam-se: Células-tronco Hematopoéticas (CTH) e Células-tronco Mesenquimais (CTM).

A CTH representa o protótipo de célula-tronco adulta, sendo uma das mais estudadas, documentadas e empregadas em protocolos clínicos junto ao “pool” de células mononucleares da medula óssea (BMMC). As CTH podem se diferenciar dando origem aos elementos figurados do sangue, além de possuir a capacidade de reestabelecer a hematopoese em animais letalmente irradiados, o que evidencia o importante papel destas células no desenvolvimento e homeostase do tecido sanguíneo (16, 17).

Células-tronco Mesenquimais são células multipotentes com capacidade de diferenciação restrita ao tecido mesodérmico (15, 16). As CTM foram pioneiramente isoladas e estudadas por Friedenstein e colaboradores com os trabalhos realizados nas décadas de 60 e 70 do século passado e foram inicialmente denominadas de Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos – CFU (18, 19, 20).

As CTM apresentam uma série de propriedades que as tornam atraentes em terapia celular. Entre essas propriedades destaca-se a baixa expressão de antígenos de histocompatibilidade, o que permite a utilização em transplantes alogênicos e, até mesmo, xenogênicos, com probabilidade mínima de rejeição tecidual (21). Além disso, secretam fatores de crescimento e outras citocinas, que desempenham importante papel na

proliferação celular e indução da angiogênese tecidual, além de possuírem propriedades antiapoptóticas, anti-inflamatórias e imunomodulatórias (22).

Em 2001, Patricia Zuk, embasada no trabalho prévio de Martin Rodbell, publicado em 1964, utilizou, de forma pioneira, colagenase para isolamento de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano (23, 24). O emprego de tecido adiposo representou um grande avanço no conhecimento sobre aspectos básicos e aplicados das CTM. Há uma série de vantagens decorrentes do emprego do tecido adiposo como fonte de CTM, entre as quais vale citar: quantidade abundante de material e facilidade de obtenção, por meio de procedimentos pouco invasivos.

Não há, no entanto, nenhum registro prévio na literatura do emprego de tecido adiposo humano como fonte para isolamento de células-tronco mesenquimais e posterior emprego destas células para terapia celular em modelo experimental de fibrose pulmonar. Não há também nenhum trabalho anteriormente descrito que empregue uma associação de células-tronco hematopoéticas e células-tronco mesenquimais como alternativa terapêutica para a fibrose pulmonar.

Considerando estes aspectos, objetivou-se com este trabalho, de forma inédita e pioneira, o emprego de terapia celular com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (CTMTA) em associação ao “pool” de células mononucleares da medula óssea em modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por instilação intratraqueal de bleomicina em ratos *Wistar*.

## **2.2. Metodologia**

### **2.2.1. Animais**

Foram utilizados 42 ratos saudáveis da linhagem *Wistar*, com idade aproximada de 8 semanas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu

(Unesp) e foram acomodados no biotério da Faculdade de Ciências e Letras de Assis, onde foram mantidos em caixas forradas com maravalha, em sala com temperatura (22°C) e luminosidade controladas (ciclo Claro/Escuro de 12/12h), com luzes acesas às 7:00h e apagadas às 19:00h. Os animais receberam dieta sólida e água filtrada *ad libitum* durante todo o procedimento experimental, realizado em conformidade com os aspectos éticos do Comitê de Pesquisa Animal (CEUA) da FCL, UNESP – Assis (registro nº 002/2015).

### 2.2.2. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 6 grupos (n=6), constituídos de acordo com a tabela 1. Assim sendo, Grupo CTL: animais instilados com tampão fosfato (PBS). Grupo BLM: animais instilados com sulfato de bleomicina (BLM). Grupo BLM+PBS: animais instilados com BLM e tratados com PBS. Grupo BLM+BMMC: animais instilados com BLM e tratados com o “pool” de células mononucleares da medula óssea alogênicas (BMMC). Grupo BLM+CTMTA: animais instilados com BLM e tratados com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano (CTMTA). Grupo BLM+BMMC+CTMTA: animais instilados com BLM e tratados com infusão concomitante de BMMC e CTMTA.

**Tabela 1. Grupos experimentais**

Grupo	nº de animais	Dia instilação	Solução instilada	Dia Tratamento	Tratamento infundido	Dia Eutanásia
CTL	6	0	PBS	-----	-----	28
BLM	6	0	Bleomicina	14	-----	28
BLM+PBS	6	0	Bleomicina	14	PBS	28
BLM+BMMC	6	0	Bleomicina	14	BMMC	28
BLM+CTMTA	6	0	Bleomicina	14	CTMTA	28
BLM+BMMC+CTMTA	6	0	Bleomicina	14	BMMC+CTMTA	28

**Legenda:** CTL= controle; PBS = tampão fostato; BLM = bleomicina; BMMC = “pool” de células mononucleares da medula óssea; CTMTA = células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano.

### 2.2.3. Monitoramento do ganho de peso dos animais

O monitoramento do peso dos animais foi realizado com o intuito de avaliar o efeito da indução da fibrose pulmonar e da terapia celular sobre o ganho de peso. Para tanto, os animais foram pesados em 3 períodos ao longo do experimento, assim sendo: Dia 0 - dia da instilação da bleomicina, Dia 14 - dia da infusão de células para a terapia celular e, por fim, no Dia 28 - dia da eutanásia.

### 2.2.4. Indução da fibrose pulmonar

Os animais foram anestesiados com 70 mg/kg de Ketamina (Dopalen, Sespo, São Paulo, Brasil) combinados com 7 mg/kg de Xilasina (Anasedan, Sespo, São Paulo, Brasil) e, posteriormente, submetidos a uma microcirurgia na região cervical para exposição da traqueia. Com o auxílio de uma seringa, foram instilados 2U de sulfato de bleomicina (BONAR, Biossintética, São Paulo, Brasil) diluídos em 100 µL de solução fisiológica. Após a instilação, os animais foram encaminhados para o biotério da UNESP, Campus de Assis, onde ficaram alojados até o momento da intervenção terapêutica. O dia da

instilação intratraqueal de bleomicina foi adotado como dia "0". Durante o período pós-operatório os animais receberam água contendo analgésico.

## **2.2.5. Obtenção das células para a terapia celular**

### 2.2.5.1. Obtenção do "pool" de células mononucleares da medula-óssea

As células foram obtidas de 6 machos *Wistar* – que não faziam parte de nenhum dos grupos experimentais - sendo 3 animais para o grupo BLM+BMMC e 2 para o grupo BLM+BMMC+CTMTA, e administradas no mesmo dia da coleta. Os animais foram eutanasiados via dose letal de 100 mg/Kg de tiopental sódico (Thiopentax, Cristália, São Paulo, Brasil) e tiveram fêmures e tíbias extraídos. Em seguida, as epífises foram cortadas e a medula óssea extraída por "flushing", com o auxílio de uma seringa contendo meio de cultura. A suspensão celular foi homogeneizada em meio "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" - DMEM (LGC, São Paulo, Brasil), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (Gibco, New York, USA) e 1% de antibiótico e antimicótico. A seguir, as células foram centrifugadas a 800 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o "pellet" ressuspenso em meio de cultura e tampão fosfato (PBS, pH 7,4) na proporção de 1:1. As células foram separadas por densidade em gradiente de Ficoll (Sigma, São Paulo, Brasil) a 50%. Para tanto, a suspensão celular resultante da diluição em meio de cultura e PBS foi adicionada a tubo de centrifuga – Falcon (Sarstedt, Numbrecht, Germany) contendo 2 mL de Ficoll (Sigma). A suspensão foi centrifugada a 700 g por 30 minutos. Ao final da centrifugação, o concentrado de células mononucleares da medula óssea, presente na interface do meio de cultura com o Ficoll, foi recolhido e lavado 3 vezes em solução de PBS. A concentração celular foi determinada em câmara hematómica de Neubauer. Posteriormente, as células obtidas foram diluídas em PBS para uma concentração final de  $10^6$  células/mL.

#### 2.2.5.2. Obtenção e desinfecção das células-tronco de tecido adiposo humano

O tecido adiposo, utilizado como fonte de células-tronco mesenquimais humanas, foi obtido de doadores saudáveis que submeteram-se à dermoleptomia abdominal e recolhido em clínicas de cirurgia plástica na cidade de Assis, estado de São Paulo, em conformidade com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP - Plataforma Brasil, sob o CAAE nº 43038915.0.0000.5401. Cerca de 10 g do tecido adiposo foi mantido em PBS suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (Gibco) e 1% de antibiótico – antimicótico (Gibco, New York, USA), a 4°C durante aproximadamente uma hora para desinfecção.

#### 2.2.5.3. Isolamento e cultura das células-tronco de tecido adiposo humano

Posteriormente ao processo de desinfecção, o tecido adiposo foi coletado em placa de Petri e fragmentado com auxílio de pinça e bisturi para aumentar a superfície de contato para a ação da colagenase. Em seguida, o tecido foi coletado em tubo Falcon de 50 mL contendo colagenase (Gibco, New York, EUA) a 0,075%, na proporção de 1:1 e seguiu para Banho Maria à 37° C, por 30 min. Em seguida, para neutralizar a ação da colagenase, adicionou-se ao tubo a mesma quantidade em meio de cultura DMEM e, então, o material foi centrifugado a 800 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuscitado em 1 mL de tampão de lise e encubado em gelo por 10 minutos. Em seguida, acrescentou-se ao tubo 10 mL de PBS. A solução foi novamente centrifugada por 10 minutos, a 800 g. Em seguida, o “pellet” foi ressuscitado em 1 mL de meio de cultura e filtrado em filtro de 70 µm (CellStrainer - BD Falcon™, New Jersey, USA) para a separação de adipócitos maduros e debris celulares. Uma alíquota de 10 µL foi retirada para contagem em câmara de Neubauer e mensuração da viabilidade celular com Azul de Tripán (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Após a contagem, as células foram

semeadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> a uma concentração de 1x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>, na presença de meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico/antimicótico. Em seguida, as células foram incubadas em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A primeira troca do meio de cultura ocorreu após 48 horas, assim como as trocas subsequentes. Ao atingirem aproximadamente 80% de confluência da superfície das garrafas de cultura, as células foram dissociadas com a utilização de Tripsina (Gibco, New York, EUA), durante 5 minutos. A reação foi interrompida com adição de meio de cultura, suplementado com SBF. A suspensão celular foi semeada em novos frascos de cultura (primeira passagem) para proliferação. A cultura de células foi mantida até a quinta passagem.

#### **2.2.6. Caracterização e validação das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano - Diferenciação celular *in vitro*.**

Para induzir a diferenciação, as CTMTA foram semeadas a uma concentração de 1x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico – antimicótico, até atingirem uma confluência de 60-80%. Após a proliferação, as células foram cultivadas para diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica, empregando-se o kit de diferenciação StemPro (Gibco, New York, USA), sendo o cultivo por 7 dias (adipogênica), 14 dias (condrogênica) e 21 dias (osteogênica), segundo o protocolo descrito pelo fabricante. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela análise da coloração com Oil Red O (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Para a confirmação da diferenciação condrogênica, empregou-se a análise após coloração com Alcian Blue (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). A diferenciação osteogênica, por fim, foi confirmada pela análise da coloração com Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

### **2.2.7. Infusão de células-tronco**

A infusão das células foi realizada pela veia peniana no 14º dia após a instilação intratraqueal de bleomicina. Antes da infusão das células os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilasina (Sespo). Cada um dos animais dos grupos BLM+BMMC e BLM+CTMTA, recebeu infusão de 100 µL de PBS contendo  $10^6$  células mononucleares da medula óssea ou  $10^6$  células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano, respectivamente. O grupo BLM+BMMC+CTMTA, da mesma forma, recebeu 100 µL de PBS contendo  $5 \times 10^5$  do “pool” de células mononucleares e  $5 \times 10^5$  células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano, num total de  $1 \times 10^6$  células por animal. Adicionalmente, o grupo BLM+PBS recebeu infusão de 100 µL de PBS, também por veia peniana.

### **2.2.8. Medidas de Ventilação Pulmonar**

As medidas de ventilação pulmonar foram obtidas pelo método de pletismografia de corpo inteiro adaptado para pequenos animais (25). Nesse método, o animal é colocado em uma câmara rígida de acrílico semiaberta que permite livre movimentação. Após um período de aclimatação (~40 min) a câmara de pletismografia é vedada à entrada de gases permitindo o registro da ventilação pulmonar por ~1 minuto. Os sinais gerados no interior da câmara rígida são ocasionados pela diferença de temperatura entre o gás inspirado (25°C) e o gás expirado (37°C) pelo animal. Essas pequenas oscilações pressóricas no interior da caixa de pletismografia foram captadas por um espirômetro (ADInstruments Mod. ML-141), permitindo o registro de duas variáveis respiratórias, a frequência respiratória (fR, Resp.min<sup>-1</sup>) e o volume corrente (VC, mL.Kg<sup>-1</sup>), sendo a última variável calculada pela seguinte fórmula:

$$V_T = V_K \cdot \frac{(\Delta P)_T}{(\Delta P)_K} \cdot \frac{T_a}{T_a'} \cdot \frac{P_B - P_{aH_2O}}{(P_B - P_{aH_2O}) - T_a/T_L (P_B - P_{LH_2O})}$$

Onde:

$V_T$ : volume corrente

$T_a'$ : temperatura do interior da câmara

$V_K$ : volume da calibração

$T_L$ : temperatura pulmonar

$(\Delta P)_T$ : registro da ventilação

$P_B$ : pressão barométrica

$(\Delta P)_K$ : registro da calibração

$P_{aH_2O}$ : pressão de vapor d'água

$T_a$ : temperatura ambiente

$P_{LH_2O}$ : pressão de vapor d'água no pulmão

O sistema foi calibrado com ar por meio de uma seringa de 1 ml e a Ventilação Pulmonar ( $VE$ ,  $mL \cdot min^{-1} \cdot Kg^{-1}$ ) foi calculada pelo produto entre  $fR$  e  $VC$ .

### 2.2.9. Coleta e análise do Lavado Broncoalveolar

Para a coleta do lavado broncoalveolar (LBA), os animais foram eutanasiados com dose letal de Thiopentax (100mg/Kg) intraperitoneal. Com o auxílio de um cateter intravenoso Angiocath 20G x 1.16" 1,1 x 30 mm (Becton Dickinson, Minas Gerais, Brasil) inserido na traqueia do animal, o pulmão foi lavado por duas vezes com 1,5 mL de soro fisiológico 0,9% a cada vez. O material coletado foi centrifugado a 800 g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" ressuscendido em 0.3 mL de PBS para a contagem diferencial de células inflamatórias em câmara hematimétrica de Neubauer, considerando-se linfócitos, macrófagos e neutrófilos.

## **2.2.10. Análise histológica**

### 2.2.10.1. Fixação do tecido pulmonar e coloração com hematoxilina-eosina

Após a coleta do LBA os animais foram imobilizados e submetidos a procedimento cirúrgico para a extração dos pulmões. Logo após a extração, os órgãos foram insuflados com pressão positiva constante de 20 cm de solução tamponada de paraformaldeído a 4%, por um período de 24 horas, utilizando-se um aparato para perfusão pulmonar adaptado e modificado pelo grupo do Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel (UNESP – Campus de Assis). Os pulmões foram submetidos a rotina histológica e incluídos em parafina. As lâminas foram confeccionadas com cortes de 5 µm de espessura, sendo 2 lâminas por animal. Uma das lâminas foi corada em Hematoxilina e Eosina (HE), enquanto a outra seguiu para a coloração em Tricrômico de Mallory, específica para fibras colágenas.

Para a mensuração da espessura das fibras colágenas presentes no parênquima pulmonar dos animais, 6 regiões bronquiolocêntricas aleatórias em dois cortes teciduais (n=6) corados em Tricrômico de Mallory, foram analisadas por animal, em um total de 72 medidas por grupo. As medidas foram realizadas utilizando-se do software AxionVison Rel. 4.7.

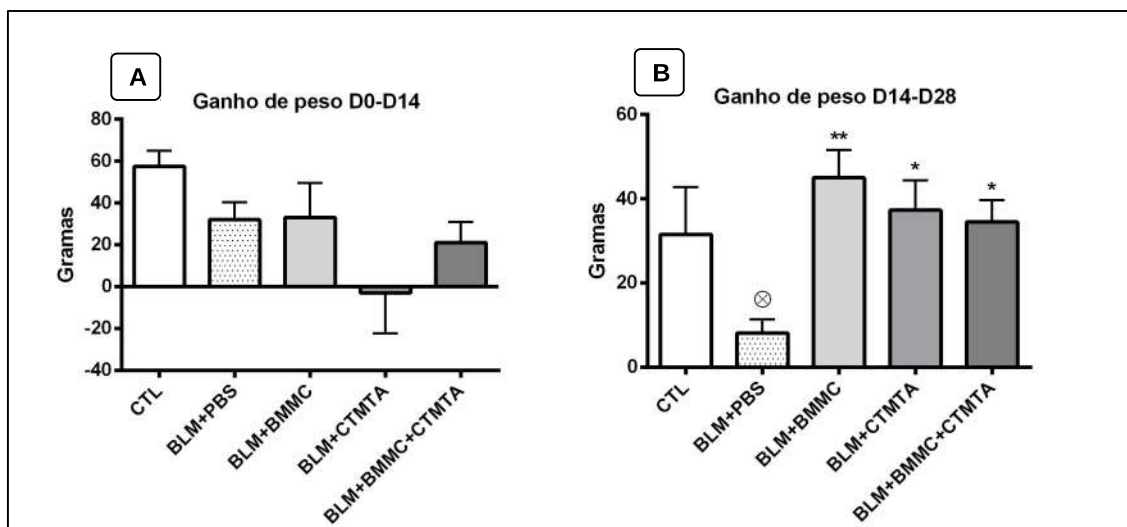
## **2.2.11. Análises Estatísticas**

Para as análises referentes ao lavado broncoalveolar, ventilação basal, morfometria e variação de peso entre dois grupos de animais, foi empregado o teste estatístico de Mann Whitney, para dados não paramétricos. Para estabelecer a comparação entre os demais grupos experimentais em relação às mesmas variáveis, empregou-se o teste de Kruskal Wallis, seguido da análise post hoc de Dunn.

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Variação de peso nos animais

O monitoramento do peso dos animais foi realizado em 3 momentos distintos. A primeira pesagem foi realizada no dia da instilação da bleomicina (Dia 0), a segunda foi realizada no dia da intervenção terapêutica (Dia 14) e a última pesagem, no dia da eutanásia (Dia 28). De acordo com os resultados, apresentados na figura 1, não houve diferenças significativas ( $p=0,0649$ ) no ganho de peso dos animais instilados com bleomicina (BLM+PBS, BLM+BMMC, BLM+CTMTA e BLM+BMMC+CTMTA) em relação àqueles instilados com PBS (CTL), no período que se estende do dia 0 ao dia 14 (D0-D14). Após a intervenção terapêutica (D14-D28), o ganho de peso foi mais expressivo ( $p<0,001$ ) no grupo que recebeu infusão de células mononucleares da medula óssea (grupo BLM+BMMC) em relação aos animais tratados com PBS (BLM+PBS). Resultados similares foram encontrados na análise comparativa entre os demais grupos tratados com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano (BLM+CTMTA), isoladas ou em associação às BMMC (BLM+BMMC+CTMTA), que também apresentaram maior ganho de peso ( $p<0,05$ ) em relação aos animais do grupo BLM+PBS (Figura 1, B).

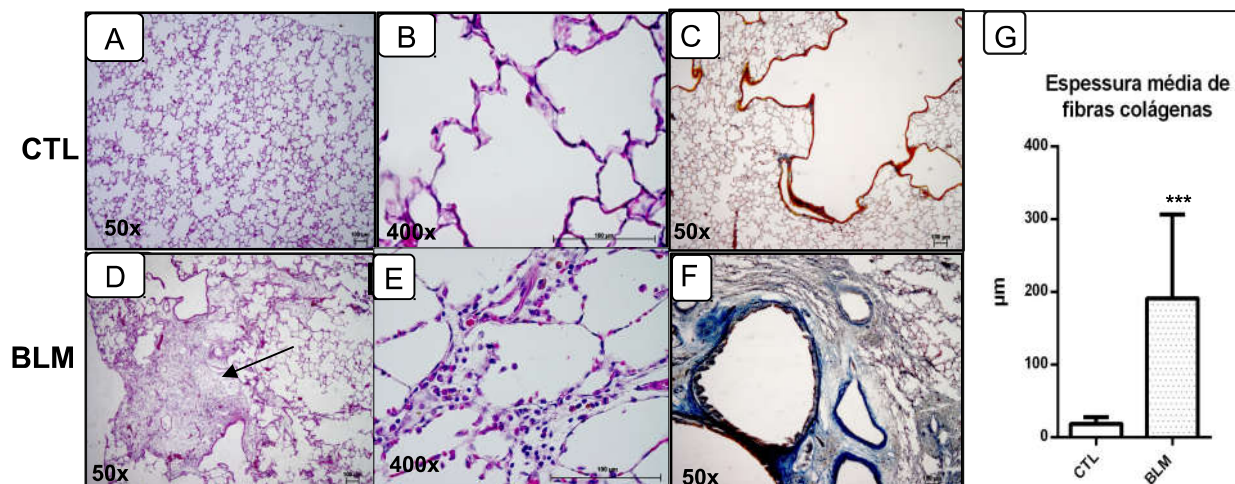


**Figura 1.** Variação no ganho de peso entre os grupos experimentais ao longo de 28 dias (n=6). A pesagem dos animais foi realizada em três momentos distintos: no dia da instilação de bleomicina (Dia 0), no dia do tratamento (Dia 14) e no dia da eutanásia (Dia 28). A. Variação de peso dos animais no período D0-D14 ( $p=0.649$ , Mann-Whitney). B. Variação de peso dos animais no período D14-D28 ( $p<0.05$ , Kruskal Wallis).

### 2.3.2. Análise Histológica

A fim de se avaliar a eficácia na indução da fibrose pulmonar por instilação intratraqueal de bleomicina, foram realizadas análises histológicas do tecido e coloração com Hematoxilina-Eosina, além da coloração específica em Tricrômico de Mallory, para fibras colágenas. Conforme se verifica na Figura 2, a estrutura do parênquima pulmonar dos animais do grupo controle (CTL), animais que foram instilados com PBS e não sofreram nenhum tipo de intervenção terapêutica, apresenta, em diferentes aumentos, estruturas alveolares com paredes e lúmen bem definidos (Fig. 2, A e B) e ausência de infiltrados inflamatórios, caracterizando um aspecto morfológico compatível com a normalidade. A análise histológica do grupo experimental instilado com bleomicina (BLM), evidencia, após 28 dias da instilação, áreas de intensa deposição de matriz extracelular fibrótica, caracterizada pelo espessamento dos septos alveolares e remodelamento da arquitetura pulmonar, com distribuição aleatória de focos fibróticos ao longo do

parênquima. Adicionalmente, no grupo BLM, foi constatado o desenvolvimento de fibrose em regiões subpleurais e bronquiolocêntricas (Fig. 2, seta).



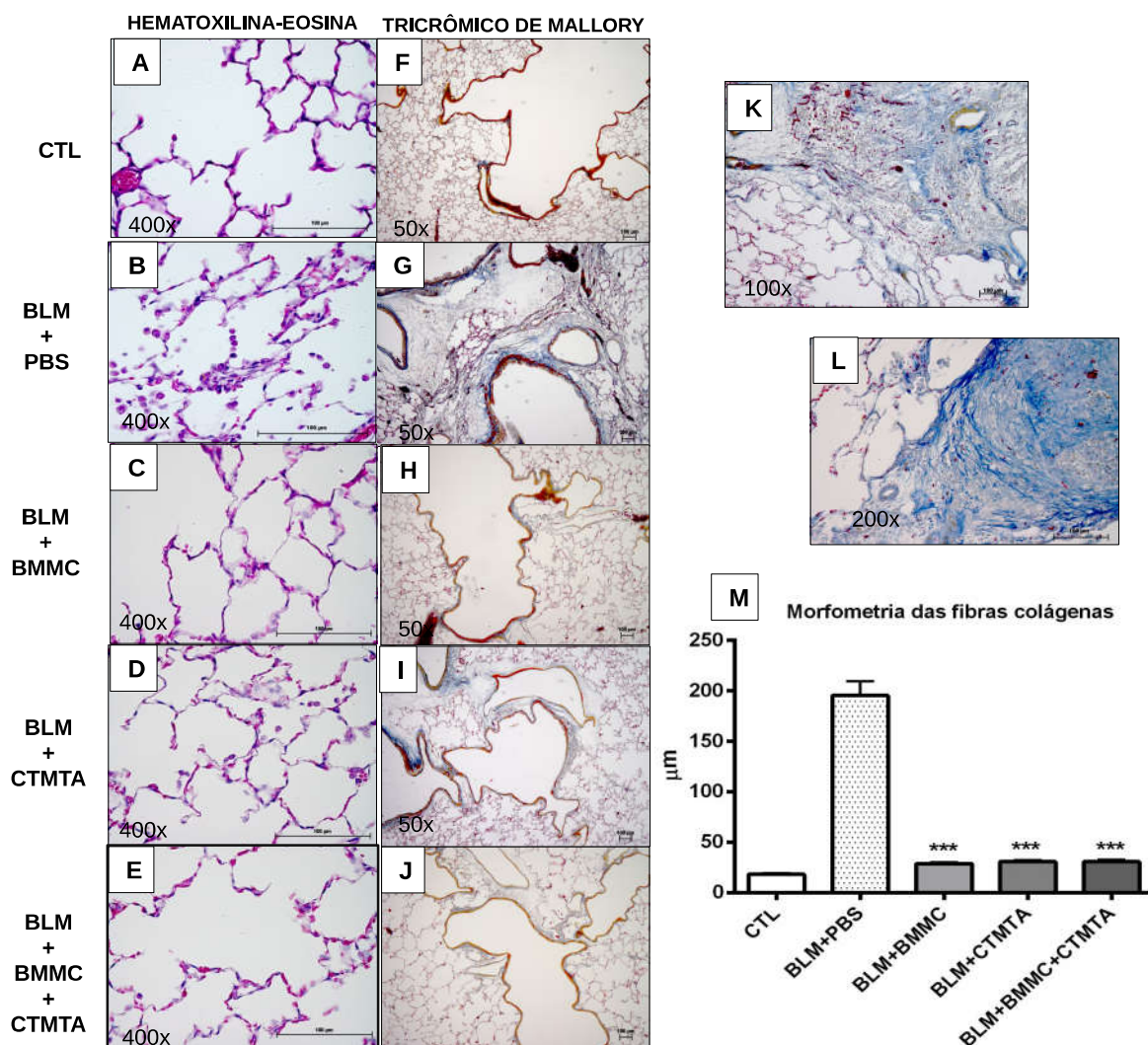
**Figura 2.** Aspecto histológico do parênquima pulmonar corado com Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Mallory nos grupos CTL: animais instilados com tampão fosfato e BLM: animais instilados com bleomicina. A. Parênquima pulmonar compatível com a normalidade (grupo CTL, hematoxilina-eosina, 50x). B. Aspecto pulmonar compatível com a normalidade (grupo CTL, hematoxilina-eosina, 400x). Bronquíolos pulmonares com finas camadas de fibras colágenas ao entorno (grupo BLM, tricrômico de mallory, 5x). D. Achado histológico de fibrose subpleural (grupo BLM, seta, 5x) E. Alvéolos pulmonares com espessamento septal (grupo CTL, hematoxilina-eosina, 40x). F. Regiões bronquiolocêntricas acometidas por fibrose pulmonar (grupo BLM, tricrômico de mallory, 5x). G. Comparação gráfica entre a morfometria de fibras colágenas dos grupos CTL e BLM.

Para confirmar o estabelecimento da fibrose, foram também realizadas medidas referentes à espessura da camada de fibras colágenas presentes ao redor dos bronquíolos em cada um dos grupos experimentais. A comparação entre os resultados obtidos com os grupos CTL e BLM indicou diferença estatisticamente significativa, com  $p < 0,0001$ , sendo que a média da espessura das camadas fibróticas bronquiolocêntricas do grupo BLM foi cerca de 100 vezes maior em relação à média do grupo CTL (Figura 2, G).

Após a confirmação do desenvolvimento da fibrose nos animais instilados com

bleomicina, a mesma metodologia foi usada para induzir a doença nos grupos que receberiam tratamento com células-tronco. A infusão das células foi realizada no 14º dia após a instilação de bleomicina e as análises histológicas no 28º dia. Verifica-se, na Figura 3 (F), grupo CTL, a presença de uma fina camada de fibras colágenas, em azul, no entorno dos bronquíolos. Em contrapartida, no grupo BLM+PBS (Fig. 3, G), há intensa deposição de fibras colágenas, marcada pela presença de espessas camadas em regiões bronquiocêntricas, além da ocorrência de focos fibróticos espalhados de modo aleatório ao longo de todo o parênquima pulmonar (Fig. 3, K e L), o que concorreu para a perda da arquitetura tecidual.

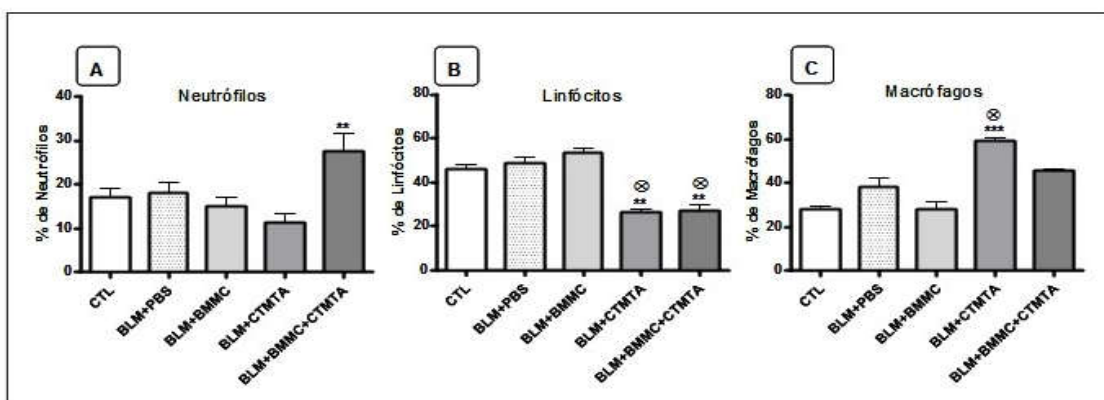
Em relação aos grupos tratados (BLM+BMMC, BLM+CTMTA e BLM+BMMC+CTMTA), é notável a remissão da fibrose bronquiocêntrica, o que ocorreu também, com os focos fibróticos parenquimatosos ( $p < 0,001$ ) (Fig. 3, M). Em comparação com os animais doentes, que receberam tratamento com PBS (BLM+PBS), a estrutura pulmonar evidencia septos alveolares com paredes mais finas e definidas, com pouca expressividade nos exudatos intraalveolares (Fig. 3, B, C, D e E).



**Figura 3.** Aspecto histológico do tecido pulmonar dos diferentes grupos, corados com Hematoxilina-Eosina(HE) e Tricrômico de Mallory (MAL) em diferentes aumentos. A. Aspecto alveolar compatível com a normalidade (CTL, 400x, HE). B. Alvéolos pulmonares com espessamento septal (BLM+PBS, 400x, HE). C. D. e E. Aspectos alveolares representativos dos grupos BLM+BMMC, BLM+CTMTA e BLM+BMMC+CTMTA, respectivamente (400x, HE). F. Regiões bronquiocêntricas com fina camada de fibras colágenas, compatível com a normalidade (CTL, 50x, MAL). G. Região bronquiocêntrica acometida por espessas camadas de fibras colágenas (BLM+PBS, 50x, MAL). H. I. e J. Regiões bronquiocêntricas representativas dos grupos BLM+BMMC, BLM+CTMTA e BLM+BMMC+CTMTA, respectivamente (50x, MAL). K. Achado histológico de fibrose subpleural (BLM+PBS, 100x, MAL). L. Achado histológico de fibrose parenquimatosa (BLM+PBS, 200x, MAL). M. Análise gráfica da morfometria dos grupos experimentais em relação à espessura de fibras colágenas em regiões bronquiocêntricas (Kruskal Wallis, \* p<0,001).

### 2.3.3. Lavado Broncoalveolar

O lavado broncoalveolar foi realizado com o intuito de investigar o processo inflamatório alveolar e intersticial desencadeado por ação da bleomicina. A análise dos gráficos na figura 4, evidencia a estreita proximidade entre a percentagem de neutrófilos nos grupos CTL e BLM+PBS, que não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p=0.4177$ ). Resultados similares foram obtidos em relação à percentagem de neutrófilos ( $p=0.6234$ ) e macrófagos ( $p=2532$ ) entre os dois grupos.



**Figura 4.** Análise comparativa entre a percentagem de células inflamatórias em lavado broncoalveolar dos animais dos grupos CTL (n=6), BLM+PBS (n=6), BLM+BMMC (n=6), BLM+CTMTA (n=6) e BLM+BMMC+CTMTA (n=6). A. Percentagem de Neutrófilos. B. Percentagem de Macrófagos. C. Percentagem de Linfócitos.

A figura 4, apresenta também a comparação gráfica em relação às percentagens de células inflamatórias entre os grupos que receberam tanto o tratamento com PBS quanto o tratamento com células-tronco (BLM+BMMC, BLM+CTMTA e BLM+BMMC+CTMTA). Em relação à percentagem de neutrófilos, a análise dos dados evidenciou um aumento significativo ( $p<0.05$ ) no número destas células no grupo BLM+BMMC+CTMTA em comparação ao grupo BLM+CTMTA, porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos. A percentagem de linfócitos foi significativamente menor ( $p<0,05$ ) nos grupos BLM+CTMTA e

BLM+BMMC+CTMTA quando comparados aos grupos BLM+PBS e BLM+BMMC. Adicionalmente, analisando a presença de macrófagos, encontramos uma porcentagem maior dessa célula no grupo BLM+CTMTA em relação aos grupos BLM+PBS e BLM+BMMC.

#### 2.3.4. Análise da Ventilação Pulmonar Basal

A fim de se avaliar o grau de comprometimento da função pulmonar em relação à incidência da fibrose, foram realizadas medidas de Ventilação pulmonar (VE), Volume corrente (Vc) e Frequência respiratória (fR) em pletismógrafo de corpo inteiro. A análise da figura 6 (A, B e C) evidencia uma fR mais elevada no grupo BLM em relação ao CTL, o que conseqüentemente elevou a VE deste grupo ( $p=0,0260$ ). Apesar disso, o volume corrente (ar inspirado e expirado a cada respiração) foi semelhante em ambos os grupos, não revelando diferenças significativas ( $p>0,05$ ).

Nos grupos tratados, observa-se um pequeno aumento dos parâmetros respiratórios mensurados (Fig.6D-F). Comparados ao grupo CTL, todos os tratamentos promoveram um leve aumento da fR, o que conseqüentemente, elevou também a VE. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com células-tronco e o tratado com PBS ( $p>0.05$ ).



Figura 6. Análise comparativa da função pulmonar basal realizada em pletismografia de corpo inteiro. A. B. e C.: Frequência respiratória (fR), Ventilação (VE) e Volume Corrente (Vc), respectivamente, referentes ao grupo controle (CTL), animais instilados com PBS, e ao grupo BLM, instilado com bleomicina. E. F. e G.: Fr, VE e Vc referentes aos grupos experimentais (CTL, BLM+PBS, BLM+BMMC, BLM+CTMTA e BLM+BMMC+CTMTA). Mann-Whitney e Kruskal Wallis, n=6; \* p<0,05.

## 2.4. Discussão

Há vários relatos na literatura em modelos de fibrose pulmonar, nos quais empregou-se terapia celular com “pool” de células mononucleares da medula óssea (BMMC) ou células-tronco mesenquimais obtidas do tecido adiposo (CTMTA) ou medula óssea (CTMBM) (26-29). Não há, no entanto, nenhum relato prévio em modelo

experimental de fibrose pulmonar em ratos empregando-se a infusão concomitante de BMMC e CTMTA. Esta abordagem constitui-se no aspecto inovador deste trabalho, qual seja, o emprego pioneiro da infusão concomitante de BMMC e CTMTA.

Além dos efeitos da terapia celular sobre a fibrose pulmonar, objeto central do trabalho, um outro parâmetro, ganho de peso, foi avaliado ao longo do estudo. Diversos estudos da literatura reportam uma perda significativa no ganho de pesos dos animais tratados com bleomicina em relação aos controles (30, 31). A análise de nossos resultados, referentes a pesagem dos animais após a instilação de bleomicina (D0-D14), não revelou diferença estatística significativa entre os grupos, havendo apenas uma tendência à redução no ganho de peso daqueles instilados com a droga, conforme os resultados apresentados na Figura 1 A. No entanto, o ganho de peso no período subsequente à terapia celular foi significativamente maior nos animais que receberam infusão de BMMC, CTMTA, isoladamente ou uma associação de BMMC e CTMTA, em relação aos animais tratados apenas com PBS. Estes resultados indicam a influência terapêutica das células-tronco no restabelecimento do ganho de peso dos animais após instilação com bleomicina.

De acordo com Degryse et al. (2010), o desenvolvimento da fibrose pulmonar em roedores pode ser avaliado histologicamente a partir do 14º dia após a instilação do sulfato de bleomicina, sendo que as lesões mais marcantes acometem o tecido por volta do 28º dia (32). Para a confirmação do desenvolvimento da doença nos grupos tratados com bleomicina, diferentes cortes histológicos do tecido foram realizados e submetidos à coloração em Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Mallory, além da mensuração da espessura das camadas de fibras colágenas presentes ao redor dos bronquíolos, por morfometria. As análises histológicas comparativas entre os grupos CTL e BLM, permitiram confirmar, neste último, o estabelecimento da doença após 28 dias da

instilação de bleomicina, o que corrobora os dados da literatura. De acordo com a figura 2, o grupo BLM apresentou características histopatológicas compatíveis com o diagnóstico histológico de fibrose pulmonar, evidenciado, principalmente, pela deposição de tecido fibroso, rico em fibras colágenas, com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (CTL). Adicionalmente, a deposição de fibras colágenas no tecido pulmonar concentrou-se nas regiões bronquiocêntricas, conforme se verifica na Figura 3 (G, K e L). Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos nos quais verifica-se que a distribuição e intensidade do dano tecidual, ocasionado pela toxicidade da bleomicina, é dose dependente, levando à formação de fibrose com maior intensidade ao redor dos bronquíolos (33).

A fibrose pulmonar, como doença intersticial pulmonar progressiva, frequentemente leva à dispneia e insuficiência respiratória aguda em pacientes humanos (34). Para investigar a ocorrência de dano respiratório nos animais instilados com bleomicina, foram realizadas medidas de ventilação pulmonar basal em pletismografia de corpo inteiro. De forma coerente com os resultados das análises histológicas, o estudo da função pulmonar também evidenciou diferença significativa entre os grupos CTL e BLM, com frequência respiratória e ventilação mais elevados nos animais tratados com bleomicina (BLM). Resultados similares foram encontrados por Phillips et al. (2012), que demonstraram um aumento significativo no trabalho respiratório em camundongos instilados com bleomicina (35). Esses resultados indicam a presença de esforço respiratório consequente às lesões causadas pela fibrose. Porém, outros experimentos são necessários para comprovar essa hipótese. De acordo com os resultados apresentados na figura 6, mesmo com a melhora histológica do quadro fibrótico instalado nos animais que receberam tratamento com células-tronco, a análise comparativa com o grupo BLM+PBS não mostrou diferença significativa entre os parâmetros respiratórios avaliados (fR, VE e Vc). O teste de

pletismografia objetivou avaliar a ventilação basal, ou seja, durante o repouso, no entanto, levando-se em consideração a remissão da fibrose evidenciada na histologia, talvez a exposição dos animais em condições de desafio e/ou esforço como, por exemplo, condições de hipóxia ou exercício físico, poderia expressar melhor o efeito terapêutico das células-tronco infundidas. Estudos adicionais são, no entanto, necessários para confirmar esta hipótese.

A utilização de sulfato de bleomicina como agente indutor de fibrose pulmonar tem sido frequentemente vinculada à ocorrência de inflamação intersticial e intra-alveolar aguda. De acordo com Della Latta (2015), pesquisas mais recentes têm indicado a instalação de processo inflamatório durante a primeira quinzena após a instilação da droga, sendo que após essa fase a inflamação torna-se menos proeminente, dando lugar ao desenvolvimento de um quadro fibrótico mais intenso (33). Corroborando estes dados, o emprego da técnica do lavado broncoalveolar (LBA), seguido da contagem diferencial das células inflamatórias encontradas, conforme apresentado na Figura 4, não revelou a presença de inflamação nos animais instilados com bleomicina, uma vez que não houve variação na porcentagem de neutrófilos, linfócitos e macrófagos entre os grupos CTL e BLM. Esse achado pode indicar, portanto, que o efeito inflamatório desencadeado por ação da bleomicina, que se manifesta de modo agudo, seria dificilmente passível de detecção após 28 dias da instilação, momento em que o LBA foi coletado. Contudo, é notável que o tratamento com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano, de modo isolado ou em conjunto com as células mononucleares da medula óssea, exerce alguma influência no perfil dos leucócitos presentes no pulmão. Nesse sentido, estudos adicionais com novas abordagens metodológicas são necessários para que se possa definir com maior precisão e avançar nos conhecimentos acerca da influência do perfil de células inflamatórias no tecido pulmonar acometido por fibrose.

Os resultados encontrados neste estudo são consistentes com dados prévios que indicam a eficácia e efetividade da ação terapêutica tanto do “pool” de células mononucleares da medula óssea (12, 13, 26), quanto do emprego de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (10, 29) no tratamento de diversas patologias, incluindo as pulmonares. Este estudo representa uma proposta inédita de terapia celular com emprego concomitante de BMMC e CTMTA. Entre as hipóteses de trabalho propunha-se, previamente à realização dos experimentos, que houvesse uma resposta terapêutica mais eficaz e pronunciada, tanto nos parâmetros morfológicos quanto funcionais, nos animais com fibrose induzida por bleomicina e, a seguir, tratados com a associação de BMMC e CTMTA, considerando-se a possibilidade de um efeito aditivo ou sinérgico resultante desta associação. Esta hipótese estava fundamentada em relatos anteriores, como explicitado acima, acerca dos possíveis efeitos terapêuticos individuais das BMMC e CTMTA (36, 37, 38). No entanto, a não obtenção de tais resultados pode indicar que, em terapia celular, a presença de apenas um tipo de célula-tronco é suficiente para promover as alterações terapêuticas necessárias à contenção e melhora no desenvolvimento da fibrose pulmonar.

Conforme anteriormente relatado, buscou-se neste trabalho avaliar comparativamente a eficácia da terapia celular, por meio da infusão individual e concomitante de CTMTA e BMMC, como alternativa terapêutica experimental em modelo murino de fibrose pulmonar. Paralelamente, foi possível verificar que o transplante xenogênico de células humanas (CTMTA) isoladamente ou em associação com células heterólogas (BMMC) de ratos não provocou reações imunológicas agudas de maior gravidade. Os animais permaneceram vivos até o sacrifício para análises histológicas (14 dias após a infusão das células). Em um relato prévio, Maria e colaboradores (2016) realizaram o transplante de CTMTA humano em modelo experimental de esclerose

sistêmica em ratos, mostrando que também não houve reações adversas detectáveis (38). Não há, no entanto, nenhum relato prévio da infusão concomitante de CTMTA xenogênicas em associação com BMMC heterólogas, sem a detecção de reações imunológicas agudas de maior gravidade. Estes achados representam evidências adicionais e reforçam resultados anteriores sobre as características pouco imunogênicas das CTM, com pouca expressão de HLA tipo I e, praticamente, nenhuma expressão de HLA tipo II (39).

## **2.5. Conclusão**

O presente estudo mostrou que a instilação intratraqueal de sulfato de bleomicina, em dose única de 2U/animal, foi suficiente para causar lesões pulmonares que levaram à deposição de fibras colágenas ao longo do tecido depois de 28 dias, culminando na perda da arquitetura pulmonar. Adicionalmente, em terapia celular, o emprego do “pool” de células mononucleares da medula óssea e células mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano, isoladas ou em conjunto, promoveram remissão do quadro fibrótico instalado com o mesmo grau de intensidade, sem diferenças significativas entre os tratamentos propostos.

## **2.6. Referências**

1. Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(7):517-25.
2. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(7):1339-50.
3. Kim DS, Collard HR, King Jr TE. Classification and natural history of the idiopathic

interstitial pneumonias. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006;3(4):285-92.

4. Verma S, Slutsky AS. Idiopathic pulmonary fibrosis-new insights. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(13):1370.

5. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;183(6):788-824.

6. Baumgartner KB, Samet JM, Stidley CA, Colby TV, Waldron JA. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(1):242-8.

7. Mollica C, Paone G, Conti V, Ceccarelli D, Schmid G, Mattia P, et al. Mechanical ventilation in patients with end-stage idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration*. 2010;79(3):209-15.

8. Umezawa H, Ishizuka M, Maeda K, Takeuchi T. Studies on bleomycin. *Cancer*. 1967;20(5):891-5.

9. Ribeiro-Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Marcelino MY, Stessuk T, et al. Unicentric study of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease/pulmonary emphysema. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2011:63-71.

10. Tzouvelekis A, Koliakos G, Ntolios P, Baira I, Bouros E, Oikonomou A, et al. Stem cell therapy for idiopathic pulmonary fibrosis: a protocol proposal. *J Transl Med*. 2011;9:182.

11. de Faria CA, de las Heras Kozma R, Stessuk T, Ribeiro-Paes JT. Experimental basis and new insights for cell therapy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2012;8(4):1236-44.

12. Longhini-dos-Santos N, Barbosa-de-Oliveira VA, Kozma RH, de Faria CA, Stessuk

T, Frei F, et al. Cell therapy with bone marrow mononuclear cells in elastase-induced pulmonary emphysema. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2013;9(2):210-8.

13. Ribeiro-Paes J, Stessuk T, Marcelino M, Faria C, Marinelli T, Ribeiro-Paes M. Proposta de um protocolo de terapia celular para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 2014;20(2):84-91.

14. National Institute of Health (NIH). *Stem Cells: scientific progress and future research directions*. Bethesda, 2001. Cap. 1-4.

15. Melton DA, Cowan C. Stemness: Definitions, criteria, and standards. *Essentials of stem cell biology*. 2004.

16. Zago MA, Covas DT. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*: Atheneu; 2006.

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

18. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development*. 1966;16(3):381-390.

19. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic Transplants of Bone Marrow. *Transplantation*. 1968;6(2):230-247.

20. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*. 1970;3(4):393-403.

21. Shi Y, Niedzinski JR, Samaniego A, Bogdanský S, Atkinson BL. Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone regeneration. *Tissue engineering Part A*. 2012;18(13-14):1313-21.

22. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & molecular medicine*. 2013;45(11):e54.

23. Rodbell M. The metabolism of isolated fat cells. *Comprehensive Physiology*. 1964.
24. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001;7(2):211-28.
25. Malan A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respiration physiology*. 1973;17(1):32-44.
26. Maron-Gutierrez T, Castiglione RC, Xisto DG, Oliveira MG, Cruz FF, Peçanha R, ... & Rocco PRM. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy attenuates silica-induced lung fibrosis. *European Respiratory Journal*. 2011;37(5):1217-1225.
27. Nakashima T, Liu T, Yu H, Ding L, Ullenbruch M, Hu B, ... & Phan SH. Lung Bone Marrow-derived Hematopoietic Progenitor Cells Enhance Pulmonary Fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;188(8):976-984.
28. Lee SH, Lee EJ, Lee SY, Kim JH, Shim JJ, Shin C, ... & Yang, KS. The effect of adipose stem cell therapy on pulmonary fibrosis induced by repetitive intratracheal bleomycin in mice. *Experimental lung research*. 2014;40(3):117-125.
29. Felix RG, Fabro AT, Vicentini-Oliveira JC, Bianchi EH, de Assis Golim M, Cotrim OS, Ribeir-Paes JT, Deffune E. Rat Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue Reduce Bleomycin-Induced Lung Remodeling in Late Stage. *Stem Cell Discovery*. 2015;6(01):24.
30. Galuppo M, Esposito E, Mazzon E, Di Paola R, Paterniti I, Impellizzeri D, et al. MEK inhibition suppresses the development of lung fibrosis in the bleomycin model. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2011;384(1):21-37.
31. Borzone G, Moreno R, Urrea R, Meneses M, Oyarzun M, Lisboa C. Bleomycin-induced chronic lung damage does not resemble human idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(7):1648-53.
32. Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Jones BR, McMahon FB, et al.

Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2010;299(4):L442-L52.

33. Della Latta V, Cecchetti A, Del Ry S, Morales M. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: from biological mechanisms to counteractions. *Pharmacological Research*. 2015;97:122-30.

34. Mallick S. Outcome of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) ventilated in intensive care unit. *Respiratory medicine*. 2008;102(10):1355-9.

35. Phillips JE, Peng R, Burns L, Harris P, Garrido R, Tyagi G, et al. Bleomycin induced lung fibrosis increases work of breathing in the mouse. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2012;25(4):281-5.

36. Abreu SC, Antunes MA, de Castro JC, de Oliveira MV, Bandeira E, Ornellas DS, Silva AL, Diaz BL, Ab'Saber AM, Capelozzi VL, Xisto DG, Moralez MM, Rocco PR. Bone marrow-derived mononuclear cells vs. mesenchymal stromal cells in experimental allergic asthma. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2013;187(2):190-198.

37. Longhini-dos-Santos N, Barbosa-de-Oliveira VA, Kozma RH, de Faria CA, Stessuk T, Frei F, et al. Cell therapy with bone marrow mononuclear cells in elastase-induced pulmonary emphysema. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2013;9(2):210-8.

38. Maria AT, Toupet K, Maumus M, Fonteneau G, Le Quellec A, Jorgensen C, Philippe G, Noël D. Human adipose mesenchymal stem cells as potent anti-fibrosis therapy for systemic sclerosis. *Journal of autoimmunity*. 2016;70:31-39.

39. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*. 2007;25(11):2739-2749.

### 3. CONCLUSÃO

Conclui-se, com o presente estudo, que a bleomicina instilada em dose única de 2U por animal é suficiente para causar fibrose pulmonar em ratos *Wistar*, evidenciada histologicamente após 28 dias. Além disso, conclui-se também que a terapia celular com células-tronco promoveu remissão do quadro fibrótico instalado nos animais instilados com bleomicina, não havendo diferença significativa entre o emprego da terapia com células mononucleares da medula óssea ou células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano, realizado de modo isolado ou em conjunto.

#### 4. REFERÊNCIAS

1. Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(7):517-25.
2. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(7):1339-50.
3. Kim DS, Collard HR, King Jr TE. Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2006;3(4):285-92.
4. Baumgartner KB, Samet JM, Stidley CA, Colby TV, Waldron JA. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(1):242-8.
5. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;183(6):788-824.
6. Xaubet A, Ancochea J, Bollo E, Fernández-Fabrellas E, Franquet T, Molina-Molina M, et al. Normativa sobre el diagnóstico y tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática. *Archivos de Bronconeumología*. 2013;49(8):343-53.
7. Verma S, Slutsky AS. Idiopathic pulmonary fibrosis-new insights. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(13):1370.
8. Mutsaers SE, McAnulty RJ, Laurent GJ, Knight DA. Evaluation of experimental models of idiopathic pulmonary fibrosis. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2004;1(3):329-36..
9. Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008;294(2):L152-L60
10. Umezawa H, Ishizuka M, Maeda K, Takeuchi T. Studies on bleomycin. *Cancer*.

1967;20(5):891-5.

10. Della Latta V, Cecchetti A, Del Ry S, Morales M. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: from biological mechanisms to counteractions. *Pharmacological Research*. 2015;97:122-30.

11. Thrall R, McCormick J, Jack R, McReynolds R, Ward P. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: inhibition by indomethacin. *The American journal of pathology*. 1979;95(1):117.

12. Keogh B, Crystal R. Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders. *Thorax*. 1982;37(1):1.

13. Ward PA, Hunninghake GW. Lung inflammation and fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1998;157(4):S123-S9.

14. Kamp DW. Idiopathic pulmonary fibrosis: the inflammation hypothesis revisited. *CHEST Journal*. 2003;124(4):1187-90.

15. Mapel DW, Samet JM, Coultas DB. Corticosteroids and the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: past, present, and future. *CHEST Journal*. 1996;110(4):1058-67.

16. Bringardner BD, Baran CP, Eubank TD, Marsh CB. The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10(2):287-302.

17. Barkauskas CE, Noble PW. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 7. New insights into the cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2014;306(11):C987-C96.

18. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Annals of internal medicine*. 2001;134(2):136-51.

19. Sisson TH, Mendez M, Choi K, Subbotina N, Courey A, Cunningham A, et al.

Targeted injury of type II alveolar epithelial cells induces pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;181(3):254-63.

20. Tang Y-W, Johnson JE, Browning PJ, Cruz-Gervis RA, Davis A, Graham BS, et al. Herpesvirus DNA is consistently detected in lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(6):2633-40.

21. Dworniczak S, Ziora D, Kapral M, Mazurek U, Niepsuj G, Rauer R, et al. Human cytomegalovirus DNA level in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Physiol Pharmacol*. 2004;55(Suppl 3):67-75.

22. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(3):362-82.

23. Raghu G, Anstrom KJ, King J, Talmadge E, Lasky JA, Martinez FJ. A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Trial Of Combined Prednisone, Azathioprine And N-Acetylcysteine In Idiopathic Pulmonary Fibrosis. C91 LATE-BREAKING CLINICAL TRIALS: *Am Thoracic Soc*; 2012. p. A6859-A.

24. King Jr TE, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(22):2083-92.

25. Ribeiro-Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Marcelino MY, Stessuk T, et al. Unicentric study of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease/pulmonary emphysema. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2011:63-71.

26. Tzouveleakis A, Koliakos G, Ntolios P, Baira I, Bouros E, Oikonomou A, et al. Stem cell therapy for idiopathic pulmonary fibrosis: a protocol proposal. *J Transl Med*. 2011;9:182.

27. Longhini-dos-Santos N, Barbosa-de-Oliveira VA, Kozma RH, de Faria CA, Stessuk

T, Frei F, et al. Cell therapy with bone marrow mononuclear cells in elastase-induced pulmonary emphysema. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2013;9(2):210-8.

28. Ribeiro-Paes J, Stessuk T, Marcelino M, Faria C, Marinelli T, Ribeiro-Paes M. Proposta de um protocolo de terapia celular para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 2014;20(2):84-91.

29. National Institute of Health (NIH). *Stem Cells: scientific progress and future research directions*. Bethesda, 2001. Cap. 1-4.

30. Melton DA, Cowan C. Stemness: Definitions, criteria, and standards. *Essentials of stem cell biology*. 2004.

31. Huang G, Ye S, Zhou X, Liu D, Ying Q-L. Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015;72(9):1741-57.

32. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *nature*. 1981;292(5819):154-6.

33. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981;78(12):7634-8.

34. Zago MA, Covas DT. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*: Atheneu; 2006.

35. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *New England Journal of Medicine*. 2012;367(16):1487-96.

36. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961;14.213-22.

37. Shi Y, Niedzinski JR, Samaniego A, Bogdanský S, Atkinson BL. Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone

regeneration. *Tissue engineering Part A*. 2012;18(13-14):1313-21.

38. Friedenstein A, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova K. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development*. 1966;16(3):381-90.

39. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LM, Janz FL. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009;31:25-35.

40. Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clinical & Experimental Immunology*. 2011;164(1):1-8.

41. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & molecular medicine*. 2013;45(11):e54.

42. Horwitz E, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.

43. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

44. Rodbell M. The metabolism of isolated fat cells. *Comprehensive Physiology*. 1964.

45. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001;7(2):211-228.