RENATO GONÇALVES FELIX

Contribuição da terapia celular com células tronco em fibrose pulmonar em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª Dra. Elenice Deffune

BOTUCATU

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE***

Felix, Renato Gonçalves.
Contribuição da terapia celular com células-tronco em fibrose pulmonar em ratos / Renato Gonçalves Felix. – Botucatu : [s.n], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Elenice Deffune
Coorientador: João Tadeu Ribeiro Paes
Capes: 90400003

1. Pulmões – Doenças - Tratamento. 2. Células-tronco. 3. . Fibrose pulmonar.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais; Fibrose pulmonar idiopática; Terapia celular.

"O Senhor é meu pastor e nada me faltará".

(Salmo 23)



Dedicatória

Dedico este trabalho a **Deus**: *o Médico dos Médicos.*



Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que apoiaram e somaram na realização de mais este sonho em minha vida, em especial:

A Profª. Drª. Elenice Deffune por ter aceitado o desafio de orientar meu trabalho e por ter tanto amor e paciência para transferir seu conhecimento.

À minha mãe, Marlene Gonçalves Felix por todo amor e carinho.

A Profª Drª Giesela Fleischer Ferrari pela compreensão , apoio e amizade.

A Profª Drª Maria Aparecida Custódio Domingues pelo 80

respeito , apoio e carinho para com nosso trabalho.

Ao Dr. Alexandre Fabro pela dedicação, competência e especial carinho perante nosso trabalho.

A Drª Josy Campanhã Vicentini por todo o conhecimento e lições transmitidas e, sobretudo, pela impressionante dedicação demonstrada.

A Drª Michele Janegitz Acorci Valerio pelos ensinamentos e dedicação marcante.

A Profª.Drª Rosana Rossi pelo respeito e admirável carinho para comigo.

Ao Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes pela co-orientação e dedicação nesta jornada.

A Sra. Ondina Silvia Cotrim por sua amizade, dedicação e pronto apoio sempre que necessário.

Ao Sr. Cássio Cunha pela amizade, ajuda e companheirismo durante esta jornada.

Ao Sr. Carlos Roberto Gonçalves Lima e Sr. Ednelson Henrique Bianchi pela experiência, carinho, dedicação, amizade, trabalho e paciência comigo.

As Senhoritas Mônica, Daniela e Natalia de Assis-SP pelo carinho, companheirismo e lealdade demonstrados.

Aos amigos e funcionários do laboratório de engenharia celular e aos alunos do maravilhoso programa de pós-graduação que tive a honra de fazer parte em 2011-2012.





Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS **11**
RESUMO **13**
ABSTRACT **16**
1. INTRODUÇÃO **19**
2. REVISÃO DE LITERATURA **22**
2.1. Patogenia 23
2.2. Morfologia 26
2.3. Quadro Clínico 26
2.4. Tratamento 27
2.4.1. Terapia anti-inflamatória 27
2.4.2. Terapia anti-oxidante 28
2.4.3. Terapia anti-fibrótica 28
2.4.4. Tratamento paliativo 29
2.4.5. O Transplante Pulmonar 29
2.5. O modelo experimental 30
2.5.1. Bleomicina e Indução da FPI 30
2.5.2. Células tronco e terapia celular 32
3. OBJETIVOS **35**
2.1 Geral 36
2.2 Específicos 36
4. MATERIAIS E MÉTODOS **37**
4.1 Animais 38
4.2 Indução experimental de fibrose pulmonar 38
4.3 Obtenção, processamento e caracterização de células-tronco mesenquimais alogênicas, de tecido adiposo (CTM-TA) **38**
5. GRUPOS DE ESTUDO **41**
5.1 Constituição 42
5.2 Comitê de Ética 42
5.3 Paramêtros analisados 43
5.4 Análises macroscópicas e microscópicas 43
6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS **45**
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO **47**
7.1 Obtenção das CTM-TA alogênica 48
7.2 Variação de Peso dos animais 52
7.3 Variação de Saturação 54
7.4 Análise Macroscópica 55
7.5 Análise Histológica Pulmonar 60
7.5.1. Coloração por Hematoxilina-eosina 60
7.5.2. Coloração Tricrômico de Picrosírius **68**
8. CONCLUSÃO **73**
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **76**
ANEXOS **85**
APÊNDICE **87**



Lista de Abreviaturas

Cols ou *et al* -	Colaboradores
FPI ou IPF -	Fibrose Pulmonar Idiopática
CTA-	Célula tronco adulta
CTM ou MSC -	Célula tronco mesenquimal
TA –	Tecido adiposo
DPI-	Doença pulmonar intersticial
PINE-	Pneumonia intersticial não especifica
PH-	Pneumonia de hipersensibilidade
PIU –	Pneumonia intersticial usual
TGF-B1-	Transforming Growth Factor – Beta
TNF-Alfa-	Tumor Necrosis Factor-Alfa
IP-	Intraperitoneal
DMEM-	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
SFB-	Soro fetal bovino
SF-	Soro fisiológico
LMN-	Linfomononuclear



Resumo

Felix, RG. **Contribuição da terapia celular com células tronco em fibrose pulmonar em ratos** [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista; 2013. 90p.

A FPI é definida como um tipo de doença intersticial fibrosante crônica, de etiologia desconhecida, limitada aos pulmões e que apresenta padrão histológico de pneumonia intersticial usual. A prevalência da FPI é estimada em aproximadamente 20/100000 nos homens e 13/100000 nas mulheres, sendo que a média da idade quando do diagnóstico é de 67 anos e a sobrevida média é de 2 a 5 anos. Estima-se cerca de 5 milhões de pessoas afetadas em todo o mundo. O tratamento clínico atual está associado à melhora parcial e transitória com resultados duvidosos ou insatisfatórios. A abordagem cirúrgica da FPI compreende o transplante de pulmão e é raro em decorrência da escassez de doadores e pela limitação de equipes capacitadas para realizar os procedimentos. A terapia celular apresenta-se como uma alternativa terapêutica com grande potencial de aplicabilidade em fibrose pulmonar. Este estudo tem como objetivo a validação do modelo de fibrose pulmonar induzido pela instilação de bleomicina e a análise da contribuição da terapia celular utilizando a injeção de células-tronco mesenquimais, alogênicas, obtidas de tecido adiposo para o tratamento de fibrose pulmonar. Foram utilizados 60 ratos machos, albinos, da raça Wistar, com peso médio de 250g com idade de 8 semanas. Foram constituídos 4 grupos experimentais compostos por 15 animais sendo monitorados: peso e o índice de saturação em 3 momentos: D0, D14 e D28. Em D0 foi realizada a instilação da bleomicina na dose de 1,5U/Kg. Em D14 a infusão das células tronco mesenquimais quantificadas e fenotipadas por citometria de fluxo. Em D28 foi realizado o sacrifício dos animais para análise macro e microscópica. A média de tecido adiposo retirado foi de 3,35g sendo que após a dissociação com o uso de colagenase tipo I a contagem celular foi de 5,3 x 10^4 células linfomononucleares/g de tecido adiposo. Estas células foram expandidas em cultura por 21 dias, meio Knockout DMEM-F12 aditivado com 10% de soro fetal bovino. Foram considerados 3 critérios de comprovação das CTM-TA: adesão ao plástico, expressão de CD90 por citometria de fluxo e a capacidade de

diferenciação em três linhagens de origem mesodérmica. Após a expansão, o controle por citometria de fluxo evidenciou 98% das células expressando CD90. Em D14, foi realizado um pool destas CTM que foram infundidas por via venosa, em veia caudal na concentração de $1X10^6$ células/animal em um volume de 200µl de soro fisiológico. Nenhuma reação adversa ou óbito foi identificado no momento da infusão ou nos 14 dias subsequentes. As análises histológicas foram realizadas por dois diferentes especialistas em estudo duplo cego. A instilação intrataqueal de bleomicina na dose de 1,5U/Kg de peso determinou FP em 100% dos animais sendo que 57,14% dos animais tiveram FP em grau IV. A instilação de bleomicina intratraqueal comprometeu o índice de saturação dos animais e análises histológicas confirmam o padrão de FPI. Os parâmetros de ganho de peso, melhora no índice de saturação, recuperação macroscópica e microscópica do tecido pulmonar foram plenamente alcançados no grupo tratado com CTM-TA. Concluímos que do ponto de vista clínico e histológico as CTM-TA determinaram melhora clínica e histológica comprovadas em animais com fibrose pulmonar de diferentes graus devendo ser considerada como proposta terapêutica inovadora.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais; fibrose pulmonar idiopática; terapia celular.



Abstract

Felix, RG. **Contribution of cell therapy with stem cells in pulmonary fibrosis in rats** [dissertation]. Botucatu: Faculty of Medicine, Universidade Estadual Paulista, 2013. 90p.

The IPF is defined as a type of chronic fibrosing interstitial lung disease of unknown etiology, limited to the lungs and that presents histological pattern of usual interstitial pneumonia. The prevalence of IPF is estimated at approximately 20/100000 in men and 13/100000 in women, and the mean age at diagnosis is 67 years and the median survival is 2 to 5 years. It is estimated about 5 million affected people worldwide. The current clinical treatment is associated with transient and partial improvement with equivocal or unsatisfactory. The surgical approach consists of IPF and lung transplantation is rare due to the scarcity of donors and by limiting teams trained to perform the procedures. Cell therapy is presented as an alternative therapy with a potential application in pulmonary fibrosis. This study aims to validate the model of pulmonary fibrosis induced by bleomycin instillation and analysis of the contribution of cell therapy using injection of mesenchymal stem cells, allogeneic, obtained from adipose tissue for the treatment of pulmonary fibrosis. A total of 60 male rats, albino Wistar rats, weighing 250g aged 8 weeks. 4 experimental groups were formed consisting of 15 animals being monitored: weight and saturation index in 3 stages: D0, D14 and D28. In D0 was performed instillation of bleomycin at a dose of 1.5 U / Kg. In D14 infusion of mesenchymal stem cells quantified and phenotyped by flow cytometry. In D28 was the sacrifice of animals for macro and microscopic analyzes. The mean adipose tissue removed was 3.35 g and that after dissociation using collagenase type I cell count was 5.3 x 10^4 lymphomononuclear cells/g of adipose tissue. These cells were expanded in culture for 21 days Knockout DMEM-F12 medium added with 10% fetal bovine serum. Three criteria were considered proof of MSC: adhesion to plastic, expression of CD90 by flow cytometry and the ability to differentiate into three lineages of mesodermal origin. After expansion, the control flow cytometry showed 98% of cells expressing CD90. In D14, there was a pool of these MSC were infused intravenously into the tail vein at a concentration of 1x10^6 cells / animal in a volume of 200µl saline. No adverse reactions or deaths were identified during the infusion or

within 14 days. Histological analyzes were performed by two different experts double-blind study. Intrataqueal instillation of bleomycin at a dose of 1.5 U / Kg PF determined in 100% of animals whereas animals had 57.14% of PF in grade IV. The instillation of intratracheal bleomycin compromised the saturation index of animals and histological analyzes confirm the pattern of IPF. The parameters of weight gain, improved saturation index, recovery macroscopic and microscopic lung tissue were fully achieved in the group treated with MSC-TA. It was concluded that from the standpoint of clinical and histological MSC-TA determined proven clinical and histological improvement in animals with pulmonary fibrosis of different degree and should be regarded as innovative therapeutic approach.

Keywords: mesenchymal stem cells, idiopathic pulmonary fibrosis, cell therapy.



1. Introdução

As doenças pulmonares intersticiais (DPI) são de difícil abordagem e representam um grande desafio para o pneumologista, tendo em vista a variedade de patologias com quadros clínicos , aspectos radiológicos e apresentação histológica bastante diversificados sendo que para o correto diagnóstico há necessidade de equipe multidisciplinar (Baldi & Castro Pereira, 2012).

Com grande freqüência o diagnóstico das DPI ocorre de modo tardio, seja em razão do desconhecimento por parte do médico , seja pelas alterações clínicas pouco específicas ou ainda pela limitação de recursos locais, como a falta de aparelho de tomografia ou a impossibilidade de realização de exame de biópsia (Baldi & Castro Pereira, 2012).

A semelhança na apresentação clínica entre as várias doenças deste grupo também dificulta e retarda o diagnóstico preciso da patologia trazendo consequências quanto ao tratamento como para sua evolução (Antó, 2001).

A raridade de algumas DPI também dificultam diagnóstico e tratamento até mesmo por parte do especialista, entretanto, um pequeno número destas patologias é mais recorrente , como é o caso da sarcoidose, da pneumonia intersticial não especifica (PINE), da pneumonia de hipersensibilidade (PH) e da fibrose pulmonar idiopática (FPI). (Xaubet *et al*, 2004; Thomeer *et al*, 2001).

A falta de tratamento clínico, cirúrgico ou farmacológico adequado e eficaz também é preocupante e desperta o interesse pelas pesquisas envolvendo DPI. O transplante pulmonar, considerado a principal opção de tratamento, ainda é cercado de problemas de logística. Faltam de equipes capacitadas para a realização dos procedimentos e a sobrevida dos pacientes transplantados ainda é baixa e relacionada com a denominada curva de aprendizagem (Baldi & Castro Pereira, 2012).

Após o efetivo diagnóstico, a sobrevida média dos pacientes é baixa, como é o caso da FPI que se destaca por ser uma das patologias mais comuns entre as DPI (Thabut *et al*, 2009). Estas considerações justificam a necessidade de uma abordagem sistemática para estabelecimento mais precoce do diagnóstico e uma proposta

terapêutica eficaz das DPI, especialmente da mais prevalente e importante delas: a FPI.

Visando propor uma opção terapêutica adequada para a fibrose pulmonar idiopática, realizou-se uma revisão a partir de uma pesquisa atualizada dos principais artigos relacionados a esta patologia nas bases de dados do PubMed, SciELO e LILACS , associada a revisão de capítulos de livros pertinentes ao tema em literatura aceita e recomendada.

O mesmo modelo de revisão foi realizado também sobre a temática da utilização de células tronco e seus benefícios na reparação e regeneração de tecidos, entre eles o pulmonar. Este trabalho de revisão teve como meta o embasamento teórico para se realizar experimento com objetivo de analisar uma opção terapêutica inovadora que seja eficaz no tratamento da FPI.



2. Revisão de Literatura

2. Revisão de Literatura

A FPI é definida como um tipo de doença intersticial fibrosante crônica, de etiologia desconhecida limitada aos pulmões e que apresenta padrão histológico de pneumonia intersticial usual (Raghu *et al*, 2011). Nos países europeus é conhecida mais popularmente como alveolite fibrosante criptogênica (Collard & King, 2003; *American Thoracic Society*, 2002).

A prevalência da FPI é estimada em aproximadamente 20/100000 nos homens e 13/100000 nas mulheres, sendo que a média da idade quando do diagnostico é de 67 anos (Pereira CA *et al* , 2006) e a sobrevida média é de 2 a 5 anos . Tal doença afeta cerca de 5 milhões de pessoas em todo o mundo (Meltzer & Noble, 2008).

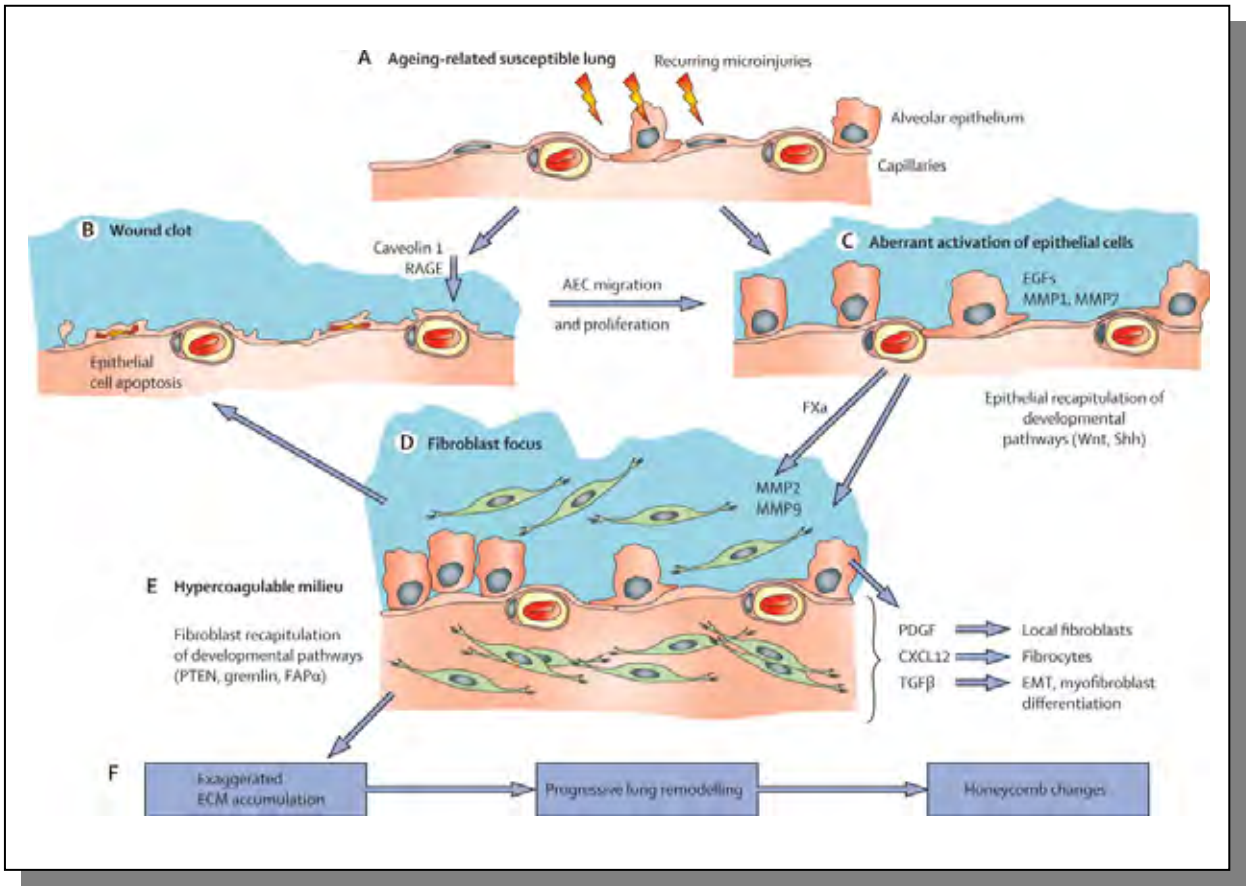
Existem ainda fatores de risco associados a FPI: refluxo gastro -esofágico, diabetes mellitus, agentes infecciosos como o vírus da hepatite C, citomegalovírus e vírus Epstein-Barr, além de exposições ao pó de madeira , poeira de metais, poeira de rochas , areia e sílica (Raghu *et al* ,2011 ; Taskar & Coultas , 2006).

2.1. Patogenia

Apesar da etiologia da Fibrose pulmonar idiopática permanecer desconhecida, os conceitos sobre a patogenia da doença continuam a sofrer mudanças. A visão originalmente apresentada que indicava que a FPI era deflagrada por uma agressão não identificada que gerava um processo inflamatório crônico que resultava no quadro de fibrose caiu em desuso quando identificou-se que a utilização de anti-inflamatórios potentes não influenciavam na evolução da doença (Kumar, 2010).

Atualmente o conceito aceito é que a FPI é gerada por repetição de ciclos de lesão epitelial causados por algum agente desconhecido, existindo inflamação e indução de resposta de linfócitos Th2 com participação de mastócitos, eosinófilos e interleucinas (IL-4 e IL-13, principalmente), entretanto a importância desta resposta inflamatória é desconhecida (Kumar, 2010).

Em recente revisão publicada na Lancet, King (2011) apresenta como etiopatogenia da doença um processo de ativação epitelial, fibroblasto dependente. Uma resposta anômala e exacerbada das células epiteliais alveolares induzem à secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células-tronco mesenquimais (CTM), citocinas estas, ativadoras da proliferação fibroblástica, da indução da formação de miofibroblastos, da proliferação das próprias CTM residentes e da transformação dos fibroblastos em uma grande quantidade de fibrócitos. Este conjunto de células secretoras produz grandes quantidades de proteínas da matriz extracelular e colágeno formando uma resistente cicatriz no tecido pulmonar que determina a deformidade da arquitetura.



Fonte: King *et al*. Lancet 2011; 378: 1949–61

Figura 1 – Mecanismos envolvidos na patogênese da FPI

A tentativa de reparação anormal do epitélio gera uma proliferação fibroblástica/ miofibroblástica excessiva, tal situação leva a formação de "focos fibroblásticos", que são indicativos e característicos da Fibrose Pulmonar Idiopática (Kumar, 2010).

Não existe, entretanto, uma identificação clara de quais mecanismos desencadeiam este reparo epitelial anormal; porém existem evidencias que alguns produtos de células epiteliais servem como iniciadores de todo este processo, como é o caso do TGF-β1. Mais recentemente, fatores epigenéticos, agressões silenciosas ambientais como o cigarro, a inalação de micropartículas, infecções virais de repetição, em especial por herpes-vírus são determinantes importantes da etiopatogenia.

As células epiteliais alveolares de tipo I quando lesionadas liberam o TGF-β1 que é elemento fibrogênico e favorece a formação de miofibroblastos a partir dos fibroblastos, bem como promovem a deposição de várias moléculas, entre elas o colágeno sobre a matriz extracelular (Kumar, 2010).

Existem também evidencias de participação genética na FPI tendo em vista que a FPI familiar tem sido observada em até 5% dos casos (Steele & Brown, 2007). Esta última é marcada por mutações que encurtam os telômeros; estes são responsáveis pelo controle da replicação celular e com seu encurtamento as células alveolares sofrem rápida senescência e entram em apoptose (Tsakiri *et al* , 2007; Armanios *et al*, 2007).

O TGF-β1 também age causando a redução da telomerase, com isso facilita a apoptose/reparação e, ainda, inibe a caveolina-1 que é um inibidor endógeno de fibrose pulmonar mantendo assim o processo de reparo epitelial alveolar que leva a deposição de colágeno e alteração da arquitetura pulmonar pela fibrose (Kumar, 2010).

2.2. Morfologia

A análise macroscópica das superfícies da pleura pulmonar revela um aspecto de "pedra de calçamento" em razão da retração das cicatrizes nos septos interlobulares. Quando da realização de corte superficial no parênquima pulmonar surgem áreas firmes esbranquiçadas de aspecto borrachoso (fibrose) com predominância do lobo inferior e distribuição diferente nas regiões subpleurais (Singh *et al*, 2005; Hubner *et al*, 2008).

No estudo microscópico observa-se uma fibrose intersticial irregular, sendo que as lesões mais jovens apresentam proliferação fibroblástica excessiva (focos fibroblásticos). As lesões mais tardias são colagenosas e com menor densidade celular. Conforme a fibrose se torna mais densa, ela proporciona a destruição da arquitetura alveolar e formação de espaços císticos revestidos por pneumócitos de tipo II, células hiperplásicas ou epitélio bronquiolar (fibrose em favo de mel). Ocorre, ainda, inflamação discreta nas áreas fibróticas, com presença de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (Visscher & Myers, 2006).

2.3. Quadro Clínico

Na apresentação inicial da doença, a maioria dos pacientes tem idade de 40 a 70 anos e apresenta dispnéia gradual e crescente, tosse seca, sendo que frequentemente o diagnóstico é desconhecido (Noth & Martinez , 2007).

A gravidade da dispnéia no quadro inicial é inversamente proporcional a sobrevida Ao exame físico encontra-se estertores crepitantes em até 90% dos pacientes, sendo que o baqueteamento digital é presenciado em 30 a 40% da casuística . Já em fases mais tardias encontramos hipertensão pulmonar em alguns pacientes (Ley *et al* , 2011).

A progressão da doença no paciente é imprevisível, entretanto, a maioria dos casos apresenta gradual deterioração do estado pulmonar, independente do

tratamento clinico com medicamentos, sendo o transplante pulmonar a única opção terapêutica definitiva no momento, porém não de forma universal (Noth & Martinez, 2007).

2.4. Tratamento

Apesar do avanço no entendimento da etiopatogenia da FPI e da importância dos fatores parácrinos ainda são poucas as opções terapêuticas eficazes. Diante da multiplicidade de células envolvidas no processo de destruição do parênquima pulmonar, a terapia celular tem despontado no capítulo da Medicina Regenerativa/Translacional.

Há muitas décadas, a terapia antiinflamória liderava as indicações terapêuticas. Posteriormente surgiram as terapias anti-oxidantes, anti-fibróticas, além de um conjunto de medidas paliativas até a proposição de transplante pulmonar e mais recentemente alguns *trials* envolvendo a terapia celular.

2.4.1. Terapia anti-inflamatória

Tendo em vista a hipótese original de que o processo inflamatório era importante e determinante na fisiopatologia da FPI, as drogas antiinflamatórias foram usadas em larga escala no início. O *follow up* dos pacientes, no entanto, não evidenciaram melhora clínica ou nas taxas de morbidade dos mesmos, sendo assim, tais medicações caíram em desuso, sendo contra indicada sua utilização como única droga para os pacientes com FPI (Raghu *et al* , 2011).

Alguns imunossupressores como a azatioprina e a ciclofosfamida também foram utilizadas associados aos corticóides, porém sem eficácia comprovada nem diferença na função pulmonar, acabaram por se tornar em conduta proscrita (Raghu *et al* , 1991).

A utilização de prednisona em altas doses não se mostrou viável tendo em vista os efeitos secundários, tais como miopatia , hipertensão , hiperglicemia e osteoporose (Gross & Hunninghske, 2001).

2.4.2. Terapia anti-oxidante

O pulmão é exposto a uma tensão de oxigênio maior que os demais tecidos. O estresse oxidativo definido como aumento da exposição aos agentes oxidativos ou a diminuição da capacidade anti-oxidante tem papel importante na FPI, onde são encontrados grande quantidade de substâncias oxidantes . Os antioxidantes são compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos agressores das reações oxidativas do processo inflamatório (Swigris & Brown, 2006).

Uma substância antioxidante bastante importante é a glutationa, que tem papel protetor no pulmão de indivíduos normais e que se apresenta reduzido no paciente com FPI. Essa redução tem importância a medida que sabemos que o estresse oxidativo acelera o processo inflamatório e a formação de fibrose pulmonar (Selman *et al*, 2001 ; Harari & Caminati , 2010).

Uma hipótese de tratamento com anti-oxidantes foi levantada pela utilização de N-acetilcisteína que é um precursor da glutationa e tem potente ação anti-oxidante (Demedts *et al*, 2005). Publicações recentes destacam o papel da N-acetilcisteína, utilizado amplamente como agente mucolítico, sendo um precursor da glutationa interferindo não somente como anti-oxidante, mas atuando diretamente na modulação da produção das citocinas, pelos macrófagos alveolares, em especial TNF-α, TGF-β1 (Tomioka, 2009).

2.4.3. Terapia anti-fibrótica

O papel da inflamação na FPI está bem estabelecido e não é o único alvo da fisiopatologia. Evidências atuais indicam que a resposta fibrótica induzida por ativação anômala de células alveolares epiteliais com a secreção e deposição exagerada de matriz extracelular. As medicações anti-fibróticas têm como objetivo o controle da fibroproliferação na FPI. Isto determinou o desenvolvimento de inúmeras medicações

anti-fibróticas como o gama-interferon, bosentana, etanercepte e a pirfenidona (Baldi & Castro Pereira, 2012).

O gama-interferon, mesmo com a possibilidade de supressão na produção de fatores pró fibróticos ,não demonstrou nenhuma vantagem na sobrevida dos pacientes (King *et al*, 2009) ; a bosentana antagonista da endotelina também se mostrou ineficaz no tratamento da Fibrose Pulmonar Idiopática (King *et al*, 2008 ; King *et al*, 2011).

Já a função pulmonar foi usada como parâmetro após o uso de etanercepte (antagonista do TNF α), porém os testes revelaram não ter ocorrido melhora (Raghu *et al*, 2008).

A pirferidona apresenta características anti-oxidantes, anti-fibróticas e anti-inflamatórias sendo que os vários estudos apresentados ainda foram pouco conclusivos (Noble *et al* , 2011).

2.4.4. Tratamento paliativo

A alta prevalência do refluxo gastro esofágico em pacientes com Fibrose Pulmonar Idiopática levou a diretriz norte americana a recomendar o tratamento imediato desta doença quando detectada (Raghu *et a*l, 2011).

A reabilitação pulmonar com o fornecimento de oxigênio suplementar (Holland *et al*, 2008) , o tratamento da tosse com corticóide (Hope-Gill *et al*, 2003) e o uso de morfina e oxigênio nos pacientes com dispnéia revelaram apenas uma melhora passageira no quadro clínico, sem entretanto mostrar eficácia duradoura (Allen *et al*, 2005). A oxigenioterapia em pacientes com hipoxemia em repouso é fortemente recomendada na diretriz norte americana (Raghu *et al*, 2011).

2.4.5. O Transplante Pulmonar

O transplante pulmonar, apesar de sua complexidade, representa a melhor opção terapêutica nos dias atuais e a única terapêutica que comprovadamente aumenta a sobrevida dos pacientes (Thabut *et al*, 2003). Desenvolvido em 1963, tem tido indicação cirúrgica progressiva, já que a mortalidade no primeiro ano na lista de

espera pelo transplante pode chegar a 40%. Tal situação ocorre devido a curta sobrevida do paciente após o diagnóstico, normalmente não passando de 5 anos e ao encaminhamento tardio dos mesmos (Bjoraker *et al*, 1998; O'Beirne *et al* , 2010). Atualmente as diretrizes utilizadas como critérios para a seleção de candidatos ao transplante pulmonar indicam a necessidade de imediato encaminhamento para a lista de transplante pulmonar para o paciente em que foi diagnosticada fibrose pulmonar idiopática, independente do grau de comprometimento e avanço da doença (Orens *et al*, 2006), salvo contra-indicações como obesidade, uso de corticóides em altas doses, insuficiência renal, infecção por HIV ou outra comorbidade que inviabilize o procedimento cirúrgico (Lynch *et al,* 2006; Kreider & Kotloff, 2009).

A sobrevida média de pacientes com fibrose pulmonar idiopática transplantados nos Estados Unidos é de aproximadamente 4 anos (Thabut *et al,* 2009). O maior problema desta terapêutica no Brasil é o pequeno número de equipes capacitadas para a execução além da limitação na captação do órgão.

2.5. O modelo experimental

O modelo animal ideal é relevante na investigação de doenças, principalmente as pulmonares. Entretanto, doenças crônicas pulmonares são de difícil reprodução independente do modelo adotado, tendo em vista que muitas vezes sua etiologia é desconhecida, como é o caso da FPI (Moeller *et a*l, 2008).

Diferentes modelos de indução a fibrose pulmonar foram propostos nas últimas décadas, sendo que um dos mais comuns e aceitos é a indução experimental de fibrose pulmonar em animais pela utilização de bleomicina (Moeller *et al*, 2008).

2.5.1. Bleomicina e Indução da FPI

A bleomicina é um antibiótico quimioterápico extraído como produto de processo fermentativo do fungo "Streptomyces verticillus", sendo de importante

utilização no tratamento clínico oncológico de diversos linfomas e sarcomas (Da Silva & Prolla, 1995).

A utilização experimental da bleomicina reside no fato de que durante o tratamento quimioterápico percebeu-se que entre 4 a 10% dos pacientes apresentavam toxicidade pulmonar a droga e isto resultava em processo de fibrose pulmonar (Umerazawa *et al*, 1966).

A indução experimental de Fibrose Pulmonar foi descrita pela primeira vez em 1971 em cães e realizado por (Fleischman *et al* 1971). A utilização de bleomicina por instilação intratraqueal em ratos foi realizada de modo pioneiro em 1979 (Thrall *et al*, 1979) e gerou um modelo confiável e utilizado frequentemente, tendo em vista a capacidade de desenvolvimento de fibrose pulmonar de modo rápido e previsível (Ferreira, 1996).

Após a instilação intratraqueal de dose única da bleomicina, pode-se perceber 3 etapas distintas da evolução: a primeira etapa (estágio agudo da inflamação) corresponde aos primeiros sete dias após a instilação quando ocorre migração de células inflamatórias, edema intersticial e de alvéolos, além da ativação de mediadores de inflamação . Na segunda etapa (estágio subagudo) que dura do 7º ao 15º dia após a instilação, percebe-se um processo inflamatório intenso com aumento de células epiteliais cubóides com objetivo de reparar o epitélio agredido e nota-se também a presença de fibrose pulmonar. Na terceira etapa (estágio de resolução) que perdura do 15º ao 30º dia após a instilação, o processo inflamatório diminui e é perceptível a reepitelização alveolar e o depósito de colágeno no tecido de granulação com a formação da fibrose no pulmão (Rossari, 2004).

Entende-se o 14º dia após a instilação como o melhor para quantificar o processo de fibrose tendo em vista o extenso quadro de fibrose, porém com menor variabilidade na resposta fibrótica (Özyurt *et al*, 2004). Cutroneo e colaboradores (2006) descrevem que o uso da bleomicina para produzir a FPI estimula o fator de crescimento pró-fibrótico TGF-B1 que é considerado um dos mais importantes na fibrogênese. Este fator é produzido por fibroblastos e miofibroblastos. A reprodução

do modelo de fibrose utilizando a bleomicina foi a técnica escolhida neste experimento, em especial, pela colaboração de centro da UNESP com experiência no uso da mesma. Este Centro, localizado em Assis, é chefiado pelo Prof. João Tadeu Ribeiro Paes da Faculdade de Biotecnologia e parceiro neste experimento.

2.5.2. Células tronco e terapia celular

Por definição células tronco ou *stem cells* são aquelas dotadas de auto-renovação, com capacidade de diferenciação em pelo menos três linhagens celulares diferentes oriundas do mesmo folheto embrionário (Bogliolo, 2012).

As células tronco embrionárias são células progenitoras pluripotentes, que detêm a capacidade de formar células das 3 camadas germinativas. Estas células dependem de fatores de transcrição que regulam uma rede de genes que controlam sua manutenção e proliferação (Mitsui *et al*, 2003). A partir da identificação de que a terapia utilizando células-tronco embrionárias gerava sarcomas e teratomas, novos esforços científicos foram estabelecidos no sentido de induzir células-tronco adultas a um comportamento semelhante aos das embrionárias, mas sem usar estas últimas. A utilização de terapia com células-tronco pluripotentes induzidas em pesquisas possui varias vantagens sobre as células tronco embrionárias tendo em vista que as primeiras são derivadas do próprio paciente e com isso apresentam menor rejeição imunológica em relação a aloenxertos ou xenoenxertos de células tronco embrionárias (Kim *et al*, 2010; Bar-Nur *et al*, 2011).

Além disso, do ponto de vista ético é mais fácil obter precursores de células tronco pluripotentes induzidas do paciente em comparação as derivadas de células embrionárias. Outra característica, não menos importante é o fato das células tronco pluripotentes induzidas guardarem a predisposição para a diferenciação no seu tipo de célula original, o que pode acabar sendo aproveitado na síntese de tipos específicos celulares, fato este não observado nas células tronco embrionárias (Kim *et al*, 2010 ; Bar-Nur *et al*, 2011).

Inúmeros estudos têm sido elaborados com o intuito de verificar a segurança e eficácia da terapêutica com diferentes tipos de células-tronco, entre elas, as células-tronco mesenquimais.

Desde a década de 50 as células-tronco hematopoiéticas têm sido utilizadas em terapias experimentais e tratamento de patologias como o mieloma múltiplo e as leucemias (Thomas *et al*, 1957; Fernand *et al*, 1995). As células-tronco hematopoiéticas vêm sendo testadas em doenças de depósito lisossômico e metabólicas, como síndrome de Hurler e também aumentaram as taxas de sobrevivência dos pacientes (Wynn *et al*, 2009). Diversas outras aplicações para as células-tronco hematopoiéticas têm sido descritas, com uso em cardiologia, dermatologia, vascular, e mais recentemente, um transplante de medula óssea resultou na cura bem sucedida de um paciente HIV e renovou o interesse na busca de tratamento eficaz para esta epidemia (Cohen, 2011).

A utilização bem sucedida de células-tronco adultas foi primariamente verificada com as células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea em ensaios de terapias regenerativas na obtenção de células ósseas e de cartilagem (Caplan, 1991). De lá para cá, outras fontes de obtenção de células-tronco têm sido utilizadas. O uso do tecido adiposo como fonte de células progenitoras tem despontado em medicina regenerativa nos últimos anos com supremacia (Gimble *et al*, 2010). O uso da gordura para a extração da fração vascular estromal e células-tronco foi inicialmente descrito por Zuk (2002) sendo que as características de não envolver problemas éticos, ser de fácil obtenção, não necessitar de agentes mobilizadores, como a células-tronco hematopoiéticas, expressarem minimamente antígenos do Complexo Maior de Histocompatibilidade, entre eles Classe II, as coloca em destaque. Além de serem imunomodularoras, crescem bem em cultura e apresentam poucas alterações cromossômicas e após longo cultivo (Gimble *et al*, 2010). A figura 1 representa as vantagens do uso das CTM-TA em pesquisa clínica, medicina translacional e em terapêutica.

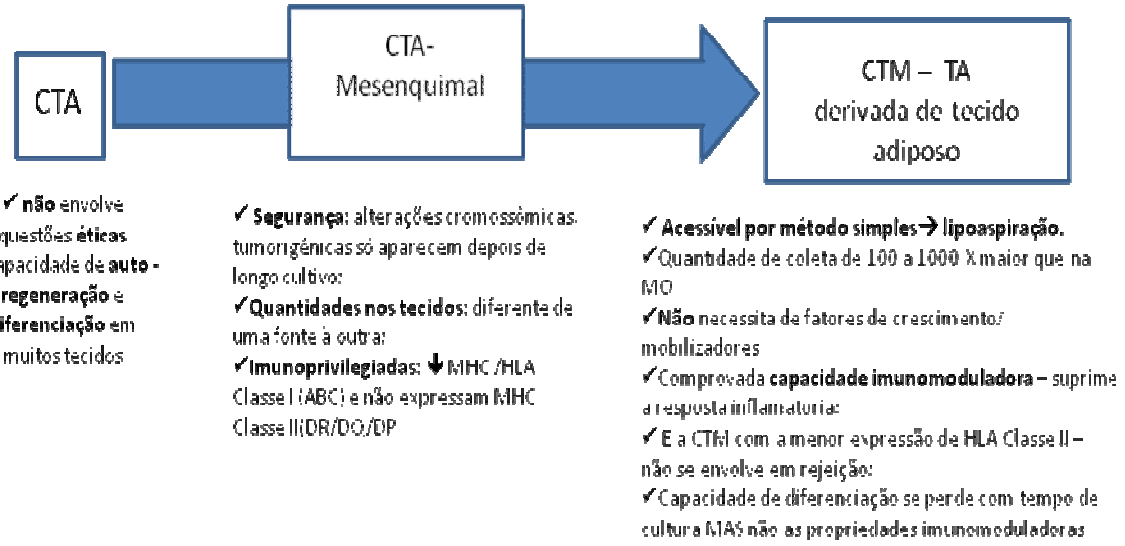


Figura 2 – Representação das características das células-tronco adultas, mesenquimais e das mesenquimais originárias do tecido adiposo.

Um fator importante na utilização de células-tronco mesenquimais quando comparadas às células-tronco embrionárias e mesmo as induzidas é que a utilização das primeiras não leva a formação de teratomas (Knoepfler, 2009).

Células-tronco mesenquimais também podem ser obtidas a partir de tecido adiposo, sinovial, sangue periférico, tecido muscular e a partir de material do cordão umbilical (Zhang *et al*, 2012). O tecido adiposo constitui rica fonte de células mesenquimais que já foram usadas na regeneração dos ossos e tecidos cartilaginosos em humanos (Pak,2011). A utilização de células mesenquimais de tecido adiposo se mostra bastante viável tendo em vista a fácil extração por lipoaspiração, sendo processo minimamente invasivo (Schreml *et al*, 2009). Além do papel de regeneração de ossos e cartilagem, outros estudos vêm sendo realizados quanto a segurança e o grau de eficácia terapêutica em esclerose múltipla, diabetes e transplante renal entre outros (Siatskas *et al*, 2010).

O uso da terapia celular em pulmão tem como marco histórico o artigo publicado em 2001 por Krause *et al* (2001) que evidenciam que a infusão de CT hematopoiética adulta repopula até 20% do parênquima pulmonar. Outros autores apontam que o reparo do tecido pulmonar por células-tronco é pequeno e ainda não realista para o momento (Loebinger & Janes, 2007).



3. Objetivos

3.1 Geral

- Avaliar a contribuição da terapia celular em modelo animal de fibrose pulmonar

3.2 Específicos

- Estabelecer modelo animal de fibrose pulmonar em ratos albinos da linhagem Wistar.
- Expandir e caracterizar células-tronco mesenquimais alogênicas a partir de tecido adiposo (CTM-TA).
- Infundir CT-TA por via intravenosa (veia caudal) e monitorar a recuperação do tecido pulmonar.



4. Materiais e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados 60 ratos machos albinos da linhagem Wistar (peso médio de 250-300g; 8 semanas de idade) procedentes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno revestidas com serragem, em salas com temperatura e luminosidade controladas (22°C e 12 h – luz e 12 h – escuro, respectivamente). Durante o período do experimento, os ratos receberam dieta sólida e água suplementada com vitamina, *ad libitum*.

4.2 Indução experimental de fibrose pulmonar

Para indução da fibrose pulmonar em ratos, utilizou-se o modelo experimental proposto por Punithavathi *et al.*, 2000.

Os animais foram sedados com a utilização de Xilazina (0,5ml/kg) e Ketamina (1ml/kg) , em seguida foi realizada a antissepsia e tricotomia dos pêlos do pescoço , produzida abertura de 2-3cm da pele para visualização e exposição da traquéia , seguida de canulação da mesma com *angiocath* 22 BD® (0,9x25mm) por onde foi instilada a bleomicina na dose de 1,5 U (0,3mg/kg) + 0,2ml de Soro fisiológico ou Soro fisiológico puro , dependendo do grupo experimental.

Após a instilação, o catéter foi retirado. Foi procedida a sutura da pele dos animais com fio reabsorvível. Os mesmos foram re-colocados nas gaiolas onde receberam analgésicos e demais cuidados necessários.

4.3 Obtenção, processamento e caracterização de células-tronco mesenquimais alogênicas, de tecido adiposo (CTM-TA)

Levando em consideração as características das células-tronco mesenquimais, inquestionáveis na literatura especializada tais como o bom desempenho e fácil amplificação em cultura; baixa expressão de antígenos HLA tipo II (DR,DP,DQ) e sua

capacidade imunomoduladora, optou-se neste experimento pelo uso das CTM-TA. O tecido adiposo (TA) desponta nos últimos 5 anos como fonte promissora de CTM para terapia celular. O sítio de coleta do TA foi definido em função de resultados preliminares do laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu que demonstra que as CT obtidas de TA de abdômen apresentam curva de crescimento superior ao TA obtido de outras partes do corpo do animal (Campos, 2011).

Para a obtenção do tecido adiposo (TA) abdominal foram utilizados 4 animais da linhagem Wistar, com o mesmo peso e idade , porém não pertencentes a nenhum dos quatro grupos de trabalho. Após anestesia dos animais com 30 mg/Kg de tiopental sódico a 2,5%, via intraperitonial (IP), os mesmos foram colocados em fluxo laminar com filtro Hepa para se proceder a retirada do fragmento de TA. Foi realizada a antissepsia do pêlo, abertura de 2-3 cm da pele, identificação do TA e remoção de fragmento com peso médio de 3,35g por animal.

O fragmento de TA foi lavado abundantemente com soro fisiológico 0,9% (100-200mL) e depois colocado em tubo cônico estéril contendo meio de transporte HEPES com antibióticos.

O material foi acondicionado em caixa de isopor e transportado para Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu. Ao receber o material, o tecido foi pesado passando por lavagem em tampão PBS sofrendo posterior incubação com colagenase tipo I Invitrogen®por 12 horas em repouso, em estufa a 37^{o}C. A ação enzimática foi bloqueda com a adição de soro fetal bovino (SFB) por 5 minutos. O conjunto foi transferido para tubo Falcon de 15mL. Centrifugou-se o material por 10 minutos, aspirou-se o sobrenadante, dissolveu-se o *pellet* novamente em PBS e centrifugou-se a 1200 rpm durante 10 min para retirada completa da enzima.

Em câmara de Neubauer determinou-se a viabilidade e contagem celular por método de exclusão do corante azul de tripan. Uma alíquota das células foi encaminhada para caracterização por citometria de fluxo utilizando os marcadores: CD90 (marcador positivo) e CD34, CD44 e CD 45 como marcadores negativos. As

células foram plaqueadas em frascos T de 25cm^2 mantendo-as em meio seletivo Mesencult Invitrogen® e observação microscópica com uso do microscópio invertido Axiovert 200, Zeiss®. A cultura foi mantida em condições específicas de incubadora de CO_2, com jaqueta de água à 37ºC,Thermo®. Após 4 dias aproximadamente (estabelecimento das colônias de células fibroblastóides aderentes) trocou-se o meio de cultura DMEM Knockout Invitrogen® (5mL) a cada dois dias. Após observar-se a confluência celular, as células foram novamente submetidas ao processamento enzimático para descolamento da placa de cultura e nova alíquota foi processada por citometria de fluxo utilizando os marcadores citados. A análise foi realizada no citômetro de fluxo FACS Calibur da BD® através da leitura em Software Cell Quest Pro®. Importante salientar que as CTM-TA plaqueadas foram amplificadas até a 8ª passagem para se obter o número adequado de células para o experimento, sendo as mesmas armazenadas congeladas em nitrogênio líquido.

No momento do uso foi procedido o descongelamento e a realização do *pool* das CTM-TA para posterior infusão por via intravenosa (veia caudal) nos animais.



5. Grupos de Estudo

5.1 - Constituição

Os animais foram divididos em 4 grupos de 15 animais **,** mantidos sob estrito controle de bioterista e médico veterinário durante os 28 dias de observação a partir da data de instilação traqueal da bleomicina ou soro fisiológico. Os 4 grupos foram assim constituídos

- ✓ **Grupo 1 Bleo-soro= controle de fibrose:** Animais instilados com solução de bleomicina e "tratados" com soro fisiológicos, quadro 1.
- ✓ **Grupo 2 Soro-soro= animais controle:** Animais instilados com solução fisiológica e tratados com SF.
- ✓ **Grupo 3 Bleo-CTM= grupo estudo:** Animais instilados com solução de bleomicina e tratados com células-tronco obtidas do tecido adiposo.
- ✓ **Grupo 4 Soro-CTM = controle da ação das CT:** Animais instilados com solução fisiológica e tratados com células-tronco obtidas do tecido adiposo.

Grupo	Dia instilação	Solução instilada	Dia infusão	Solução infundida	Dia sacrifício
G1Bleo-Soro	0	**Bleomicina**	14º	SF	28º
G2Soro-Soro	0	Soro	14º	SF	28º
G3Bleo-CTM	0	**Bleomicina**	14º	CTM-TA	28º
G4Soro-CTM	0	Soro	14º	CTM-TA	28º

* SF= soro fisiológico

Quadro 1 – Constituição dos 4 grupos de estudo, instilação da bleomicina, infusão das CTM-TA ou SF e sacrifício.

Todos os animais foram submetidos ao mesmo grau de estresse de manipulação e receberam no 14º o procedimento de infusão de CTM-TA, ou soro.

5.2 Comitê de Ética

O certificado do comitê de Ética foi obtido em 25 de novembro de 2010 , sob registro Protocolo CEEA 852/2010 conforme fotocópia anexo 1.

5.3 Paramêtros analisados

Os animais foram acompanhados quanto ao ganho/perda de peso e quanto aos valores de saturação em 3 momentos diferentes (D0, D14 e D28) do experimento. A figura abaixo representa as ações realizadas dentro do protocolo estabelecido, vide figura 2.

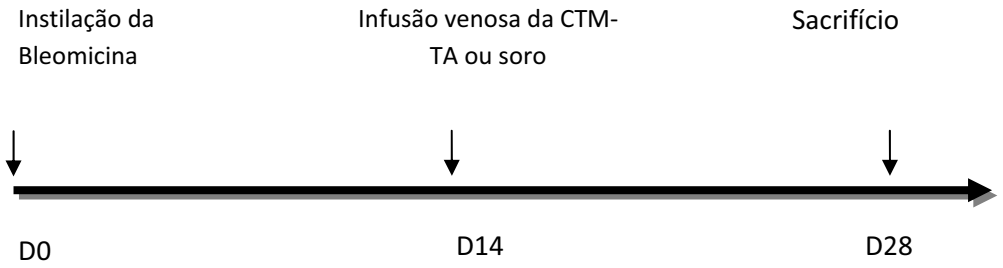


Figura 2 – Protocolo de indução da fibrose pulmonar, abordagem terapêutica e sacrifício dos animais.

5.4 Análises macroscópicas e microscópicas

Uma vez sacrificados os animais em D+28, após a determinação da saturometria e pesagem dos mesmos, os pulmões eram transportados em frascos devidamente identificados por ordem numérica sequencial ao Serviço de Patologia da FMB-UNESP. O material foi analisado por dois diferentes patologistas em estudo duplo cego. Após processamento dos pulmões, tendo sido processado sempre o mesmo lobo pulmonar, a saber, lobo médio direito, o restante foi mantido preservado para eventuais análises. O material emblocado foi submetido a cortes em criótomo e procedido as colorações de hematoxilina-eosina e Picrossírius. Para a avaliação pelos patologistas foi estabelecida a classificação semi-quantitaviva de Singh (2005) para inflamação perivascular.

Escore	Descrição
0	Sem inflamação
1	Uma ou duas filas de células inflamatórias concêntricas
2	Três ou mais filas de células inflamatórias concêntricas
3	acúmulo de células inflamatórias entre vasos e bronquíolos

Quadro 1 – Classificação semi-quantitativa de Singh

A quantificação da fibrose pulmonar valeu-se da escala de Ashcroft modificada por Hübner (2008), quadro 2.

Grau de fibrose	Escala Modificada
0	**Septo alveolar** – sem fibrose ou poucas fibras em paredes alveolares
	Arquitetura pulmonar - normal
1	**Septo alveolar –** alterações fibróticas discretas; septo ≤ 3X espessa que o normal
	Arquitetura pulmonar – alvéolos alargados e rarefeitos, sem massas fibróticas
2	**Septo alveolar –** alterações fibróticas evidentes (septo 3 X mais espesso que o normal) com formação de nós sem conexões entre eles.
	Arquitetura pulmonar - alvéolos alargados e rarefeitos, sem massas fibróticas
3	**Septo alveolar –** parede fibróticas contínuas septo 3 X mais espesso que o normal) predominando em todo o campo microscópico.
	Arquitetura pulmonar - alvéolos alargados e rarefeitos, sem massas fibróticas
4	**Septo alveolar -** Variável
	Arquitetura pulmonar – massas fibróticas isoladas (≤ 10% do campo microscópico)
5	**Septo alveolar -** Variável
	Arquitetura pulmonar – massas fibróticas confluentes (entre 10 e 50% do campo microscópico). Estrutura pulmonar gravemente alterada, porém, ainda preservada.
6	**Septo alveolar –** Variável maioria não existente.
	Arquitetura pulmonar - Grande massas fibróticas contíguas (> 50% do campo microscópico). A maioria da arquitetura pulmonar não preservada.
7	**Septo alveolar –** não existente
	Arquitetura pulmonar - alvéolos quase obliterados com massas fibrosas, mas ainda até cinco bolhas de ar
8	**Septo alveolar -** não existente
	Arquitetura pulmonar – Campos microscópicos com obliteração completa por massas fibróticas

Quadro 2 – Escala quantitativa de fibrose pulmonar proposta por Ashcroft, modificada por Hübner (2008).



6. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software Stat*. Para as variáveis, saturação, peso e graus de fibrose os cálculos foram realizados pelo teste Kruskal-Wallis, de dados não paramétricos (método ANOVA), com pós-teste de múltiplas comparações pelo método de Dunn.



7. Resultados e Discussão

7.1 Obtenção das CTM-TA alogênica

As células tronco mesenquimais foram obtidas a partir de tecido adiposo abdominal de 4 animais machos de linhagem Wistar pesando entre 250 e 300 g e com 8 semanas de vida, que não faziam parte dos 60 animais que foram divididos nos 4 grupos experimentais, tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos animais e do peso, em gramas, de TA retirado

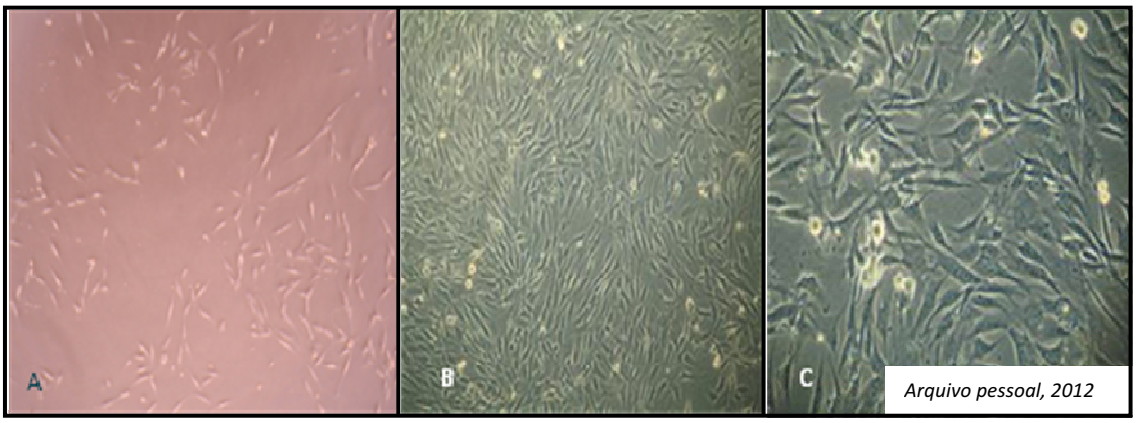
Animal	Peso em gramas de TA retirado
1	1,7
2	2,0
3	4,7
4	5,0
Média	3,35

A média de tecido adiposo retirado foi de 3,35g sendo que após a dissociação com o uso de colagenase tipo I, a contagem celular média (LMN) foi de 5,3 x 10^4 células/g de tecido adiposo, valor este considerado suficiente para as necessidades do experimento, tendo em vista as etapas subseqüentes de amplificação em cultura. As células plaquedas foram expandidas até a 8ª passagem em meio Knockout DMEM, mantidas em condições de cultivo estéril.

Para comprovar o padrão das CTM-TA obtidas do tecido adiposo foi seguido a orientação da *International Society for Stem Cell Research* (ISSCR). A ISSCR destaca 4 métodos para a caracterização das CTM, sendo que 3 deles confirmam o perfil das células. Os 4 critérios são: 1) aderência ao plástico e formação de colônias fibroblastóides; 2) a análise do perfil das células por citometria de fluxo utilizando marcadores positivos e negativos; 3) diferenciação em 3 linhagens teciduais de origem mesodérmica e 4)análise de expressão gênica por biologia molecular. Neste protocolo valeu-se dos 3 primeiros critérios. Para a confirmação de que as CTM eram capazes de

se diferenciar em três diferentes tecidos de linhagem mesodérmica tal foram utilizados meios específicos de cultura, condicionados para diferenciação condrogênica, osteogênica e adipogênica, seguindo os Procedimentos Operacionais Padrão do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu.

O critério de comprovação para células-tronco baseado na aderência ao plástico e na presença de unidades formadoras de colônias fibroblastóides foi conseguido com sucesso, conforme fotomicrografias obtidas por microscopia invertida de contraste de fase.



A = Aspecto da cultura após 4 dias do plaqueamento (aumento de 5x); B = Presença de unidades formadoras de colônia fibroblastóides 15 dias após o início da cultura (aumento de 10x) e C= Presença de unidades formadoras de colônia fibroblastóides 15 dias após o início da cultura (aumento de 20x)

Figura 3 – Microscopia Investida por Contraste de Fase do primeiro critério de comprovação das CTM-TA: aderência ao plástico.

O segundo critério utilizado foi a análise do perfil das células por Citometria de Fluxo, que utiliza marcadores de superfície específicos. As melhores análises são aquelas que ocorrem na faixa entre 5.000 e 10.000 eventos (células). Foram calculadas as médias das 4 amostras analisadas . Os marcadores CD45 e CD90, específicos para rato, foram executados em dois momentos: logo após a dissociação, antes do plaqueamento, quando as células eram consideradas linfomononucleares, e após o cultivo. O número mínimo de eventos (células) analisadas neste experimento foi de 8.436 e máximo de 10.000 células. O número máximo é determinado pelo próprio equipamento. A tabela abaixo mostra os resultados numéricos das análises efetuadas.

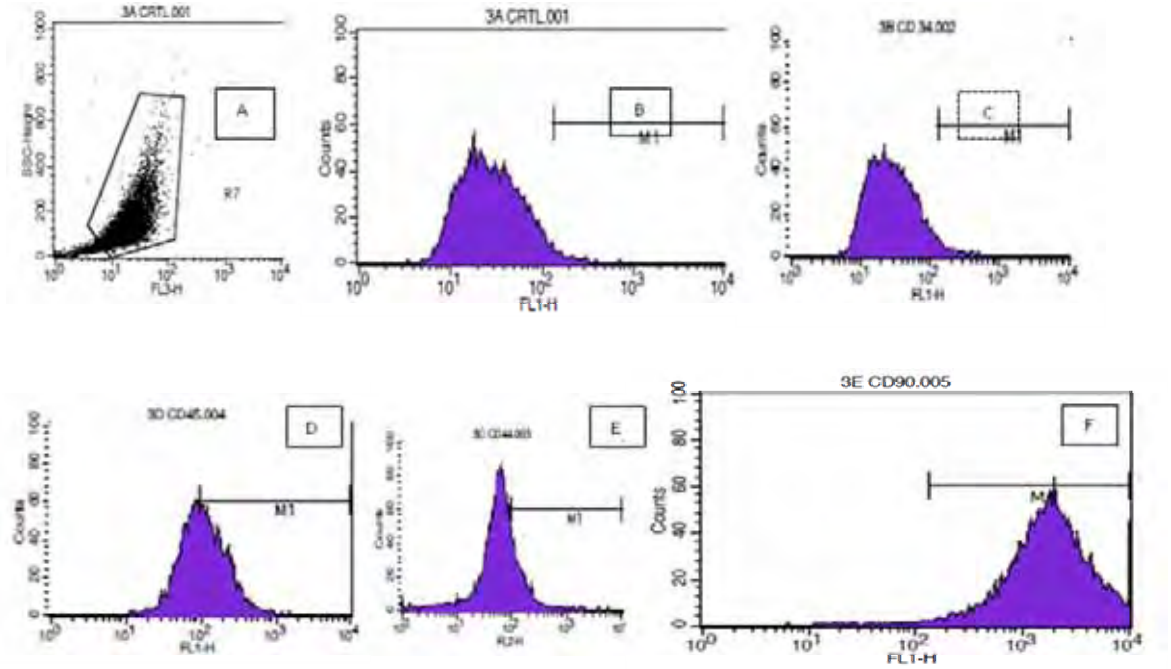
Tabela 2 – Resultado do perfil fenotípico das CTM-TA pelo método de citometria de fluxo frente aos marcadores CD34, CD44, CD45 e CD90.

Marcador	Controle Negativo	CD34	CD44	CD45	CD90
Número médio de eventos (células) analisadas	9013	8857	10.000	8436	10.000
Média de Intensidade de fluorescência(%)	1,83	1,70	18,59	53,38* 1,72**	17,35* 98,97**

*= após a dissociação enzimática, antes do plaqueamento; ** após 21 dias de cultura com meio de cultura específico para CTM.

Na figura 4 estão representados em **A**: distribuição das células linfomononucleares após a dissociação enzimática em gráfico de dispersão por tamanho e granulosidade das mesmas. Em **B**, a população de células, sem marcador específico, considerado como controle negativo. A barra com a denominação M1 delimita a área correspondente ao pico das células que expressam marcadores positivos para CTM. Em **C,** o resultado da expressão de CD34 onde foi observada uma reatividade de 1,70% em média, resultado este esperado para esta amostragem.

Na análise da tabela 1 pode-se observar que o critério da ISSCR que preconiza a utilização de marcadores positivos e negativos está respeitada no presente estudo. Os marcadores CD34 e CD45 são considerados negativos e os marcadores CD 44 e CD90, como positivos. Kolf *et al* (2007) publicam em revisão, a dificuldade de se utilizar marcador de superfície para caracterização de CTM, em função da origem das mesmas, do tipo de animal que está sendo utilizado e da disponibilidade/ indisponibilidade de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo para uso em citometria de fluxo. Analisando-se os resultados deste trabalho, como os resultados mais consistentes foram obtidos com anti-CD90, tendo em vista de que foi o marcador disponível para o mercado e específico para rato. Os demais eram anticorpos de outras espécies animais, cujo fabricante descrevia reação cruzada com ratos. O desempenho do marcador CD90, com 98,7% em média, de positividade não deixa dúvidas sobre o perfil das CTMs.



A= gráfico de dispersão das LMN; B= controle negativo; C=CD34; D= CD45 pré-plaqueamento; E= CD44 e em F= CD90 pós amplificação em cultura

Figura 4 – Gráficos das análises por citometria de Fluxo com marcadores fluorescentes.

O terceiro critério de comprovação do perfil das CTM-TA utilizado foi a capacidade de diferenciação em 3 diferentes tecidos. Comprovou-se a capacidades das células amplificadas em se diferenciar com meios condicionados em condrócitos, osteoblastos e adipócitos. A comprovação foi realizada pelo método de citoquímica utilizando Alizarin Red para diferenciação osteogênica, Oil red para adipogênica e Alcian Blue.

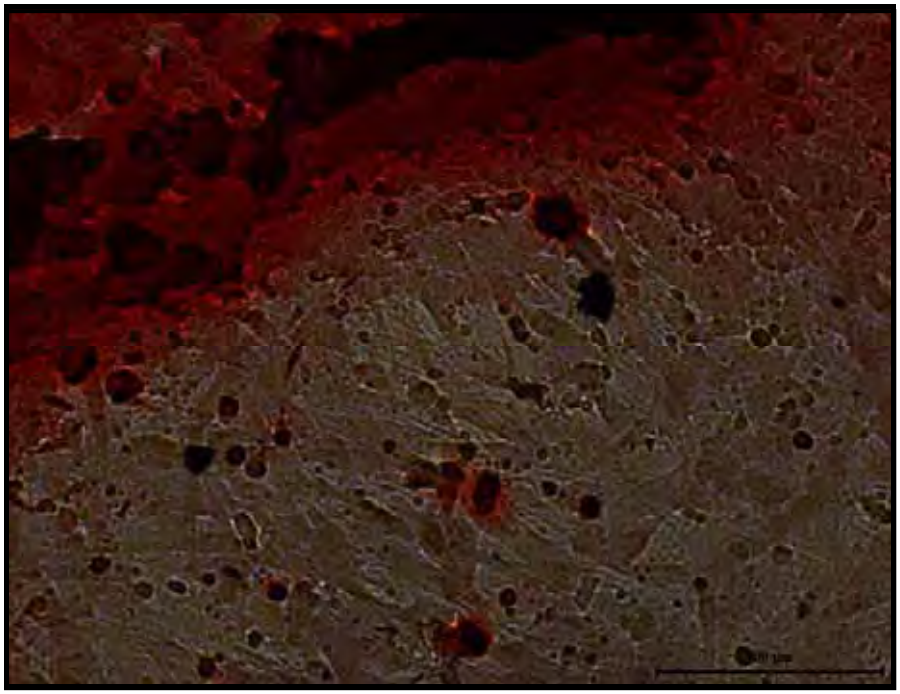


Figura 5 – Aspecto da coloração por citoquímica com *Alizarin Red* de CTM com diferenciação osteogênica

7.2 Variação de Peso dos animais

A literatura indica a perda de peso dos animais submetidos a instilação com bleomicina intratraqueal (Rossari, 2004). Para verificar este dado, os animais, mantidos em condições idênticas, foram pesados em 3 momentos: D0, D14 e D28. A hipótese deste trabalho era de que a fibrose pulmonar induzida por bleomicina diminuiria o de peso dos animais, que poderia ser re-estabelecido com a terapêutica com CTM. A análise estatística evidenciou diferenças significantes, $p<0,0001$ em D0, visto não houve a decisão de parear os animais por peso. Quando comparados o peso dos animais dos grupos G1Bleo-soro G2 soro-soro, não houve diferença estatística, $p> 0,05$, o mesmo ocorrendo entre G3 bleo-CTM e G4 soro-CTM. As comparações entre os diferentes grupos em D+28 também não identificou diferença estatística significante, gráfico 1 (dados originais, apêndice 1).

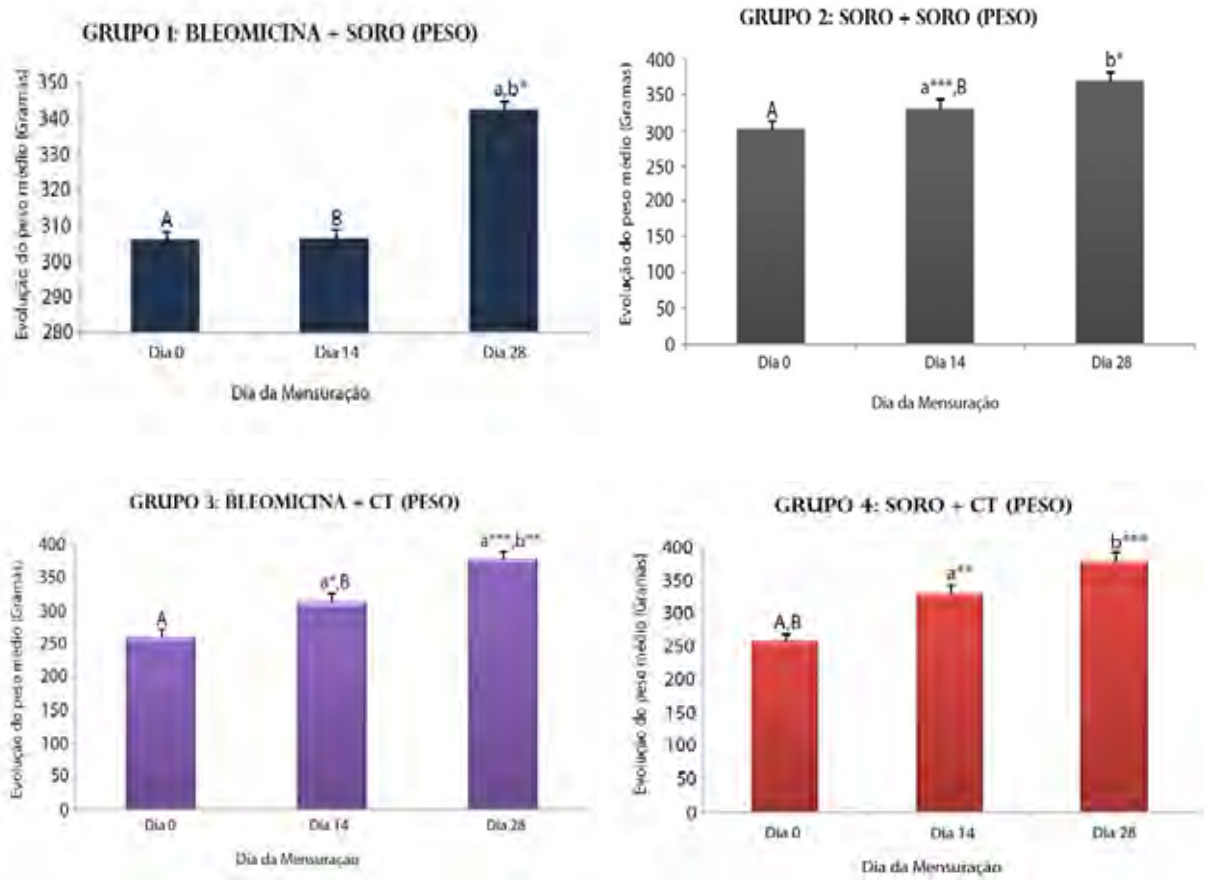


Gráfico 1 – Análise estatística do peso dos animais (em gramas) em 3 momentos, nos diferentes grupos analisados.

Martinez (2008) publica que o uso isolado da bleomicina está associado a perda significativa do peso corporal total e a uma alta taxa de mortalidade (40%) em comparação aos grupos controles . Os dados do presente estudo não corroboram os resultados daquele autor, pois a taxa de mortalidade no presente estudo, foi baixa e não houve diferença estatística significante com relação ao peso.Durante os 28 dias de monitoramento registraram-se duas perdas em diferentes grupos (2/60 ou 3,33%), no momento da instilação da bleomicina, podendo estar relacionados com o processo de anestesia ou ao quimioterápico propriamente dito. Não foi registrado nenhum óbito entre os animais nos dias subsequentes à instilação de bleomicina, nem processo infeccioso sistêmico.

7.3 Variação de Saturação

Para monitorar a Fibrose induzida utilizou-se a saturometria, com equipamento pediátrico BCI 3.300 *hand –held pulse oximeter*® fixando o sensor na porção proximal da cauda. A hipótese formulada era de que a mesma diminuiria com a instalação do processo de fibrose, e que ocorreria a recuperação dos índices de saturação com uso da CTM-TA. Este fato seria um indicador de melhora clínica e anátomo-patológica. Os dados obtidos confirmam a queda do índice de saturação em animais em que foi instilada a bleomicina (G1Bleo-soro e G3 Bleo-CTM). Em D0, não foram registradas diferenças estatisticamente significativa entre os grupos, como esperado (p=0.6313). As análises estatísticas da saturometria em D14 entre os grupos G2/ G3 e G2/G4 mostram diferenças significantes com p<0,05. Em D+28 p <0,049, muito significante (apêndice2, planilha de dados primários da saturometria dos animais).

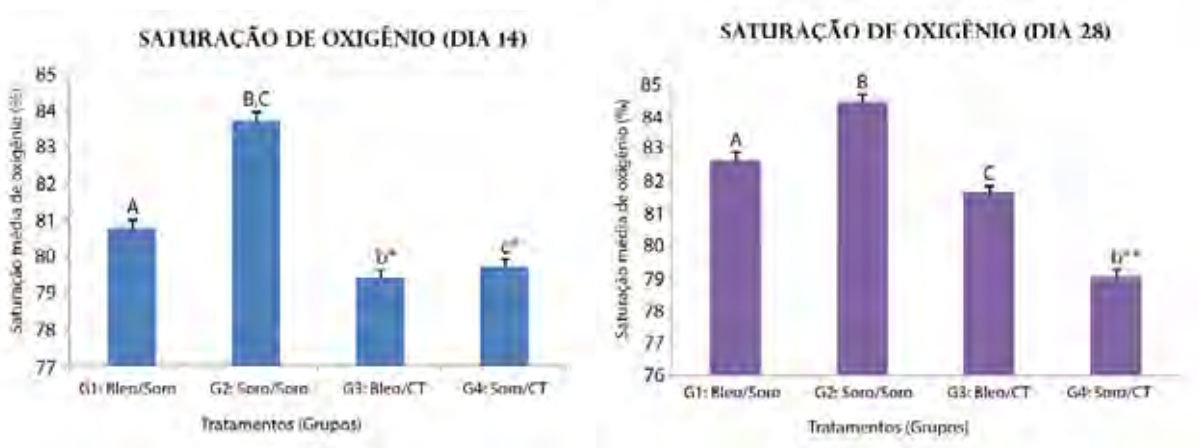


Gráfico 2 - Média do índice de Saturação nos diferentes grupos em D14 e D28.

Os dados obtidos apontando a supremacia do grupo controle G2 soro-soro sobre os demais, inclusive sobre o grupo G4 soro-CTM. Isto pode ser explicado pelo fato de que os animais foram manipulados em biotério convencional sem ar filtrado. No entanto, pode ser observada uma recuperação dos índices de saturometria dentro dos grupos, segundo o momento a ser analisado (D+14, ou D+28), mesmo em G1 bleo-soro. Este resultado é esperado, pois King (2011) aponta que uma das limitações do

modelo de fibrose pulmonar com uso da bleomicina é a potencial recuperação espontânea, no entanto, trata-se do modelo mais utilizado. A decisão, neste experimento, de sacrifício em 28 dias, se deu basicamente por este fato. Ou seja, para intervenção com as CTM antes do início da regressão espontânea. Na realidade, muitos outros autores fazem a crítica aos modelos animais de FP, que não retratam com fidelidade o intrincado mecanismo que ocorre em seres humanos.

7.4 Análise Macroscópica

A análise macroscópica do pulmão levou em conta as seguintes características: a arquitetura, proporção, coloração e superfície e confirmou as alterações esperadas e descritas pela literatura (Singh *et al* 2005; Hubner *et al*, 2008).

Para o grupo 1 (bleo-soro), onde foi induzida a fibrose e não houve a infusão de CTM-TA, dos 15 animais iniciais ocorreu em D0 a perda um deles pois o animal foi à óbito, 2 minutos após a instilação da bleomicina. Dos 14 animais vivos até o final do experimento (D28), as análises macroscópicas evidenciaram alterações em 100% dos pulmões, e os mesmos puderam ser divididos em 4 grupos de acordo com o grau de progressão das lesões macroscópicas identificadas, figura 6.

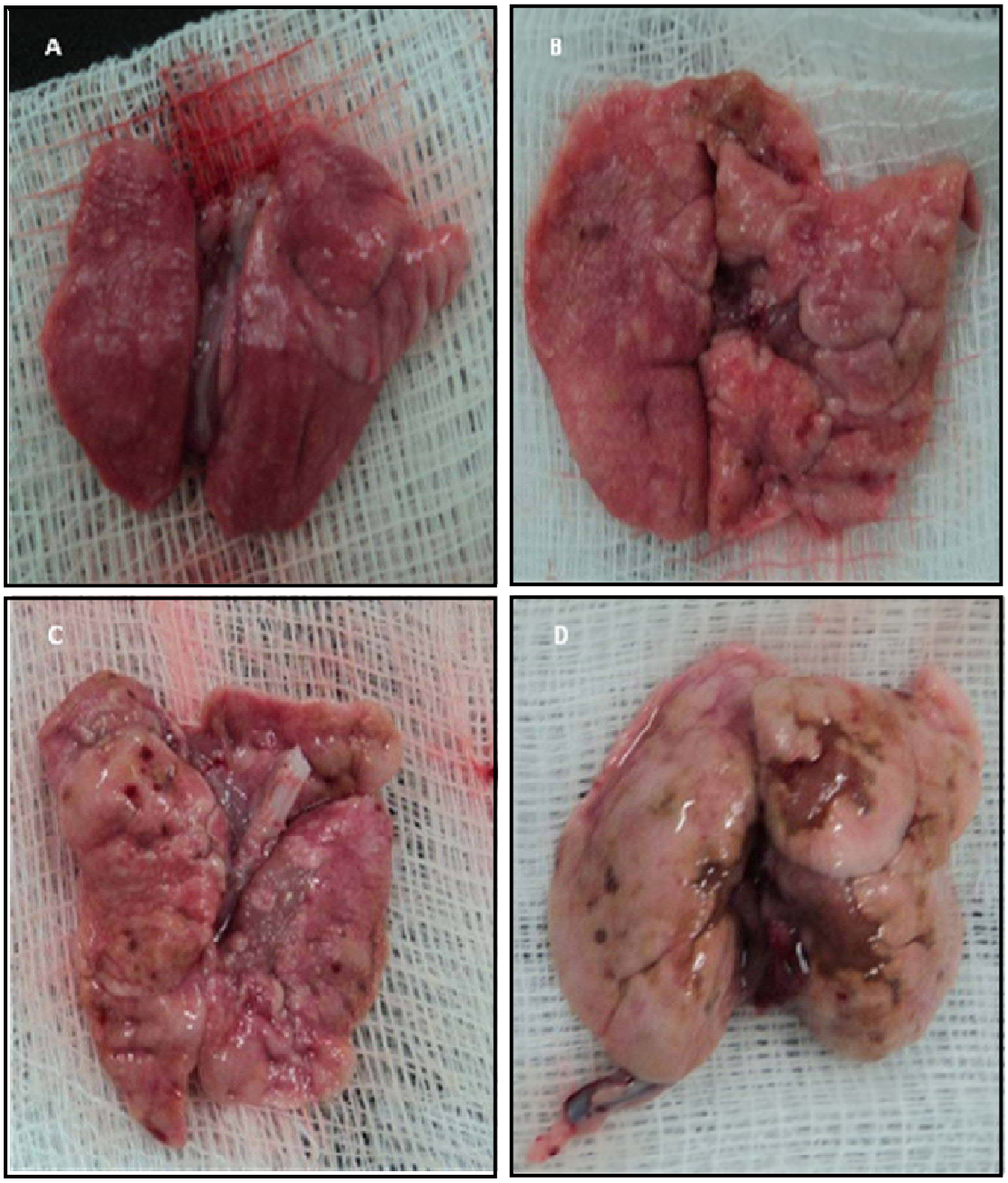


Figura 6 - Classificação dos graus de fibrose segundo a análise macroscópica dos pulmões dos animais do grupo G1(Belo-soro) em D28. A= grau I(leve); B= grau moderado (intermediário); C= grau III avançado e D = grau avançado com complicações

Foi identificado apenas 1 animal/14 (7,14%) que apresentava poucas placas em superfície e mantinha as demais características macroscópicas de um pulmão saudável, figura 6A.

Dois animais apresentaram grau II moderado ou intermediário (N = 2/14) correspondendo a 14,28% do grupo, com placas por toda a superfície, alteração de coloração, porém mantinham a proporcionalidade e arquitetura pulmonar. Ao toque o tecido pulmonar se mostrava friável, figura 6B.

Na classificação grau III ou avançado (N = 3/14, ou 21,42%) os pulmões apresentavam placas por toda a superfície, evidente alteração de cor, observando-se perda de proporção e da arquitetura pulmonar, além do tecido ser bastante friável, figura 6C.

A maior parte dos animais (57,14%) desenvolveu uma fibrose grau IV, avançada com complicações (8/14). Observaram-se placas por toda a superfície, com alteração de coloração, ocorrendo perda de proporção e arquitetura, tecido bastante friável sendo que em 6 animais foram detectados vários pontos de necrose,figura 6D.

Para o Grupo 2(soro-soro), portanto para estes animais não houve a indução da fibrose e nem o uso de CTM-TA. Este grupo corresponde ao grupo controle, não tendo sido registrado nenhuma intercorrência. Foram avaliados os 15 animais do grupo controle sendo que os pulmões apresentaram preservação de arquitetura, proporção, coloração e superfície, imagem abaixo:



Figura 7 – Aspecto da análise macroscópica de pulmão de animal integrante do Grupo G1(soro-soro). Controle normal.

O grupo experimental, G3 (bleo-CTM), cujos animais sofreram a FP induzida pela instilação traqueal da bleomicina, tiveram em D+14 a infusão de $1X10^6$ CTM-TA infundidas por veia caudal. Este grupo teve a perda de 1 animal em D0, 1 minuto após a instilação da bleomicina, fato este semelhante ao ocorrido em G1.

Nos pulmões dos 14 animais vivos até o final do experimento (D+28) observaram-se em 100% dos espécimes: ausência de placas em superfície, preservação de arquitetura e proporção e um parênquima não friável. A coloração rósea viva com superfície mais brilhante chamava a atenção. Em 50% dos casos além das características citadas era perceptível alguns pequenos pontos necróticos com aparente recuperação circunjacente, figura 8.

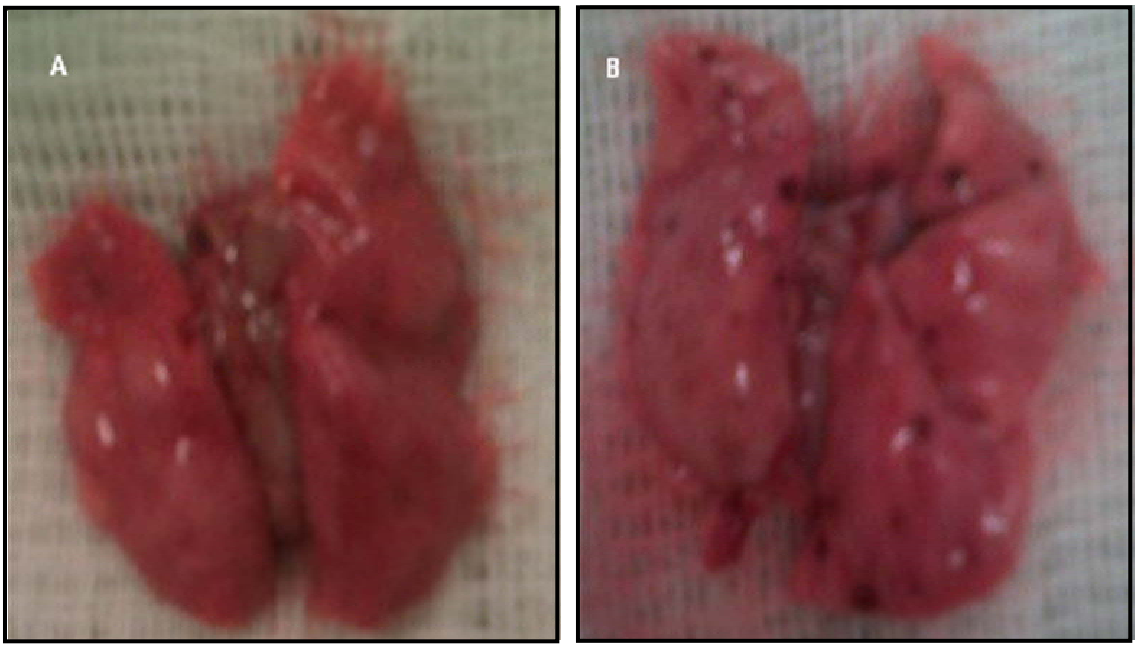


Figura 8 - Análise macroscópica dos pulmões dos animais do grupo G3 (Bleo-CTM-TA) em D28 com arquitetura, proporção e coloração preservadas. A e B representam diferentes animais. Em B observam-se pontos de necrose com tecido recuperado circunjacente.

No grupo 4 (soro-CTM) nos quais os animais foram expostos ao mesmo estresse de manipulação em D0, pela instilação intratraqueal de soro fisiológico e em D+14 receberam quantidades semelhantes de CTM-TA em relação ao grupo G3 também não foi observado nenhum óbito entre os 15 animais do grupo. Os pulmões dos animais deste grupo apresentaram preservação de arquitetura e proporção e coloração rósea mais intensa, superfície mais brilhante e como esperado, o tecido não era friável, figura 8.



Figura 8 – Análise macroscópica dos pulmões dos animais do grupo G4(soro-CTM-TA) com tecido normal, arquitetura, proporção e coloração normais.

7.5. Análise Histológica Pulmonar

7.5.1. Coloração por Hematoxilina-eosina

Esta análise foi realizada em estudo duplo cego através da interpretação de dois patologistas especializados em histopatologia pulmonar. As análises envolveram coloração clássica de hematoxilina-eosina e citoquímica de Picrossírius. A avaliação da inflamação perivascular utilizou o sistema semiquantitativo de avaliação histopatológica para inflamação perivascular descrito por Singh conforme descrito no de materiais e métodos, enquanto que a quantificação da fibrose pulmonar valeu-se da escala de Ashcroft modificada por Hübner. A planilha individual dos animais de cada grupo encontra-se no apêndice 3.

No grupo G1 (bleo-soro) nota-se um padrão de fibrose pulmonar difuso, tendendo a região subpleural, porém sem a formação franca de massas (exceto caso 15), e sim uma característica apresentação de remodelamento parenquimatoso sacular, onde os alvéolos mostram grande espessamento septal formando a aberrante estrutura sacular não funcional. A inflamação é acentuada e acomete principalmente os vasos periféricos, os quais mostram grande hipertrofia da camada média. Também há franca bronquite e bronquiolite com destruição epitelial Intensa.

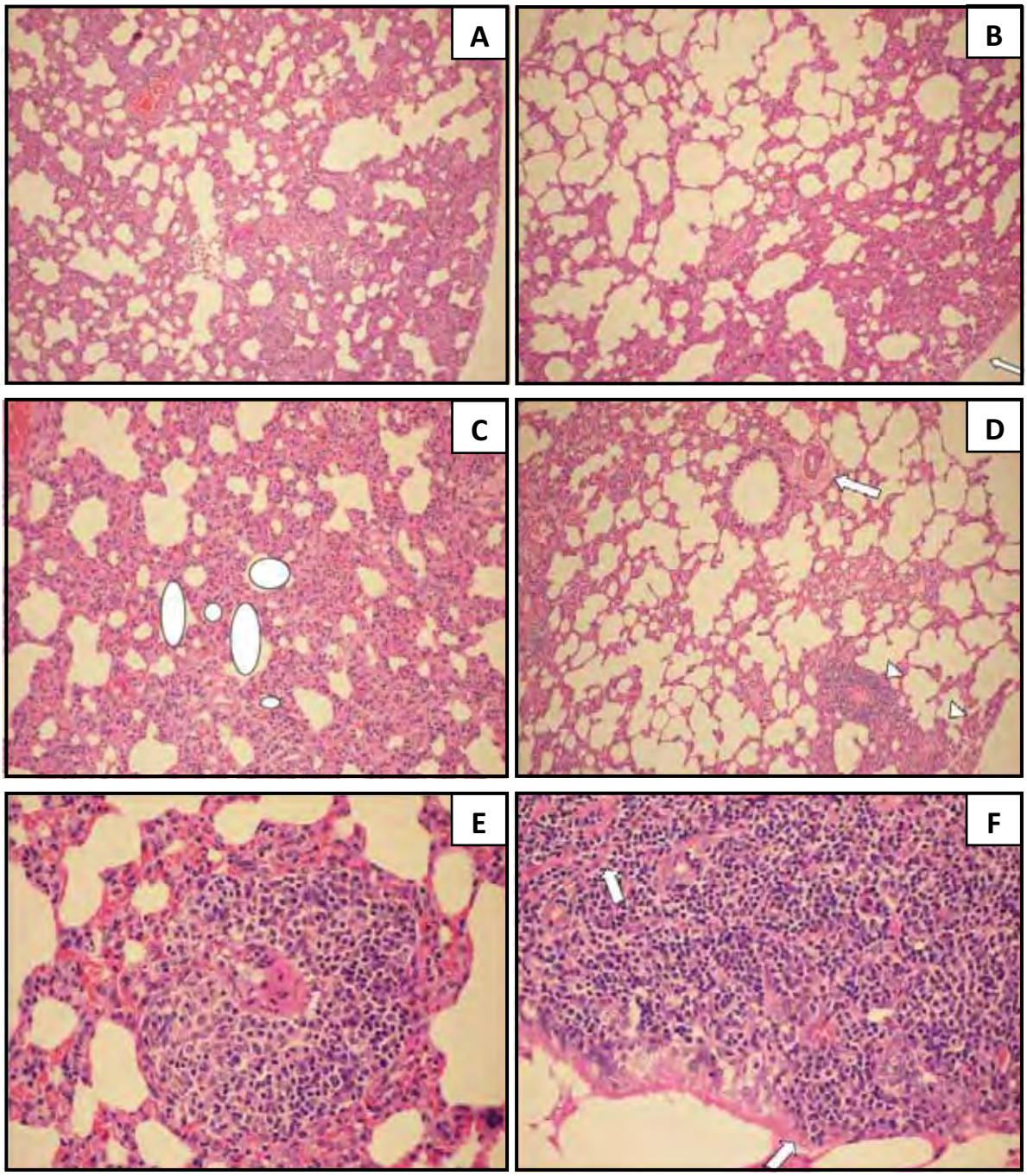


Figura 9 – Padrão de fibrose pulmonar - Aspecto histológico, com coloração em HE, representativa do grupo G1(bleo-soro). Em A = Espessamento septal difuso sem formação de massas fibróticas. Em B = Espessamento septal difuso acometendo mais região subpleural (seta). Em C = Padrão de remodelamento parenquimatoso sacular (elipses). Em D = Ausência de inflamação de vaso peribronquiolar (seta) e inflamação perivascular periférica intensa (cabeça de seta). Aumento 10x. Em E = Vaso em maior aumento, acometido de inflamação (40X). Em F = Bronquite crônica intensa com destruição epitelial e da camada muscular (seta). 40x

Na análise histomorfológica do grupo G2 (soro-soro), observa-se uma fibrose mais densa com acometimento difuso, mas com mais foco peribrônquico e bronquiolar, além do subpleural. O remodelamento parenquimatoso acomete quase todos os septos e observa-se na fronteira entre as áreas de massa fibróticas e septos levemente espessados estruturas fibróticas semelhantes a focos fibroblásticos, nos quais ocorre a ativação miofibroblástica e progressão da fibrogênese pulmonar. A inflamação é leve a moderada e eventualmente acompanha os vasos, os quais estão muitas vezes com hipertrofia da média. Percebe-se franca bronquite e bronquiolite com destruição epitelial intensa (figuras 10 e 11).

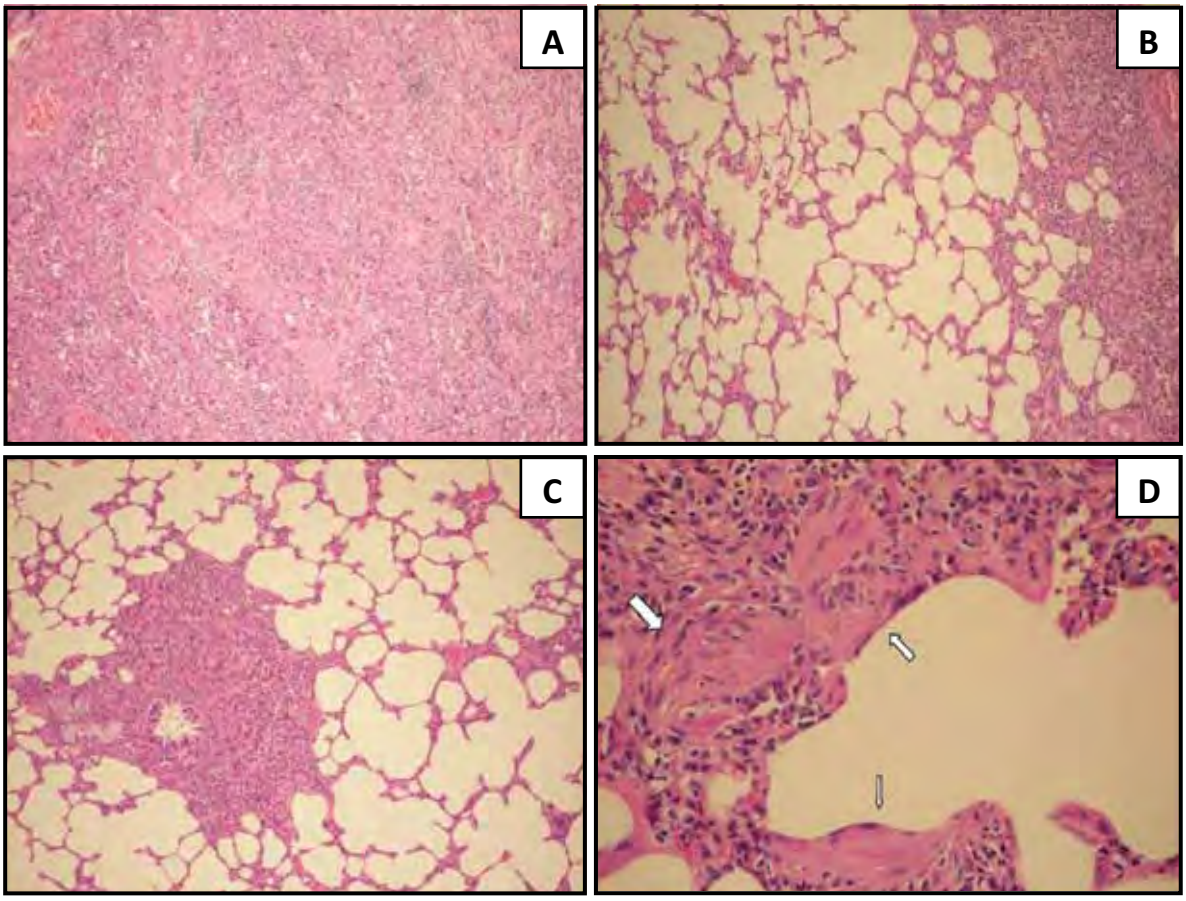


Figura 10 - Aspecto histológico, com coloração em HE, representativa do grupo G2 (soro-soro). A = Grande área fibrótica contínua com completa perda da arquitetura pulmonar. 10x; B = Interface entre áreas fibróticas e parênquima pulmonar com espessamento septal. 10x; C= Maior acometimento fibrótico peribronquiolar, com septos alveolares anormalmente espessados. 10x; D = Estrutura matricial com miofibroblastos ativos, provável foco fibroplástico da Fibrose Pulmonar Idiopática (seta). 40x

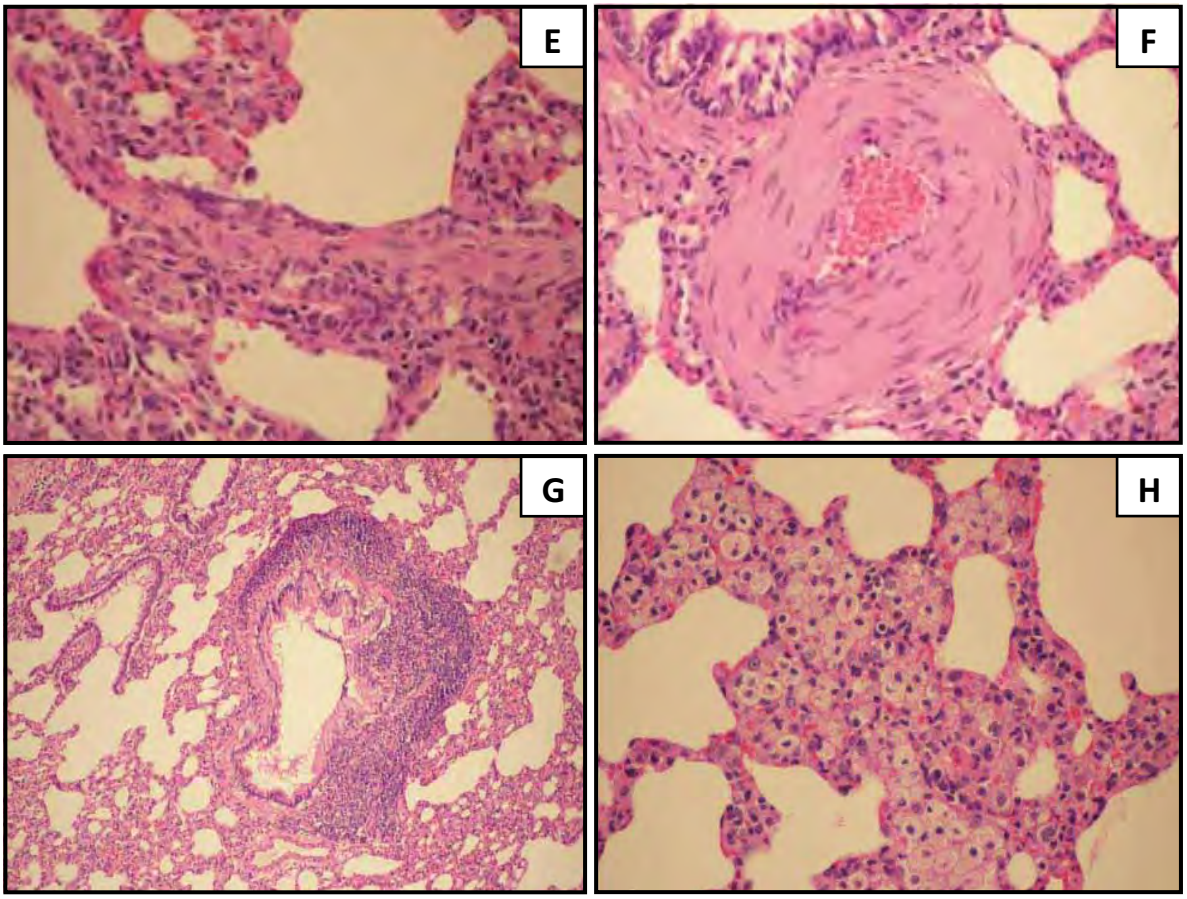


Figura 11 - Aspecto histológico, com coloração em HE, representativa do grupo G2(soro-soro). E = Região com a estrutura matricial fibrótica, miofibroblastos em paralelo a hiperplasia de pneumócitos tipo II. Aumento 40x. F = Hipertrofia da camada média dos vasos periféricos. Aumento 40x; G = Bronquite crônica ativa com destruição do epitélio e camada. Aumento 10x e H = Acúmulo eventual focal de macrófagos alveolares em área pouco acometida. Aumento20x.

A observação histomorfológica do grupo G3(bleo-CTM) identifica notável redução da fibrose, porém na maioria dos casos notam-se ainda massas fibróticas isoladas. Os septos ora se apresentam com estrutural habitual fina e delicada, ora mostram diferentes graus de espessamento até formarem verdadeiras massas fibróticas densas. Não se observam septos alveolares anômalos ou arquitetura septal anormal nas áreas preservadas. Notam-se macrófagos com citoplasma finamente granular azulado de entremeio a algumas regiões fibróticas e perivascular, podendo representar algum pigmento exógeno e/ou bactérias ou outros. A inflamação é centrada no eixo brônquio-bronquiolo vascular caracterizada por células

mononucleares e epitélio-tropismo. Broncopneumonia foi identificada em alguns casos por infiltrado inflamatório neutrofílico intrabronquial, abscesso intra-epitelial e sua consequente pneumonia organizante. Nota-se hipertrofia da camada média das arteríolas e artérias pulmonares, talvez em menor grau que os outros grupos. Interessantemente houve uma "hiperplasia" de suas células endoteliais, as quais se mostram muito bem definidas e "saudáveis". Houve hiperplasia mesotelial focal, geralmente associada a áreas fibróticas.

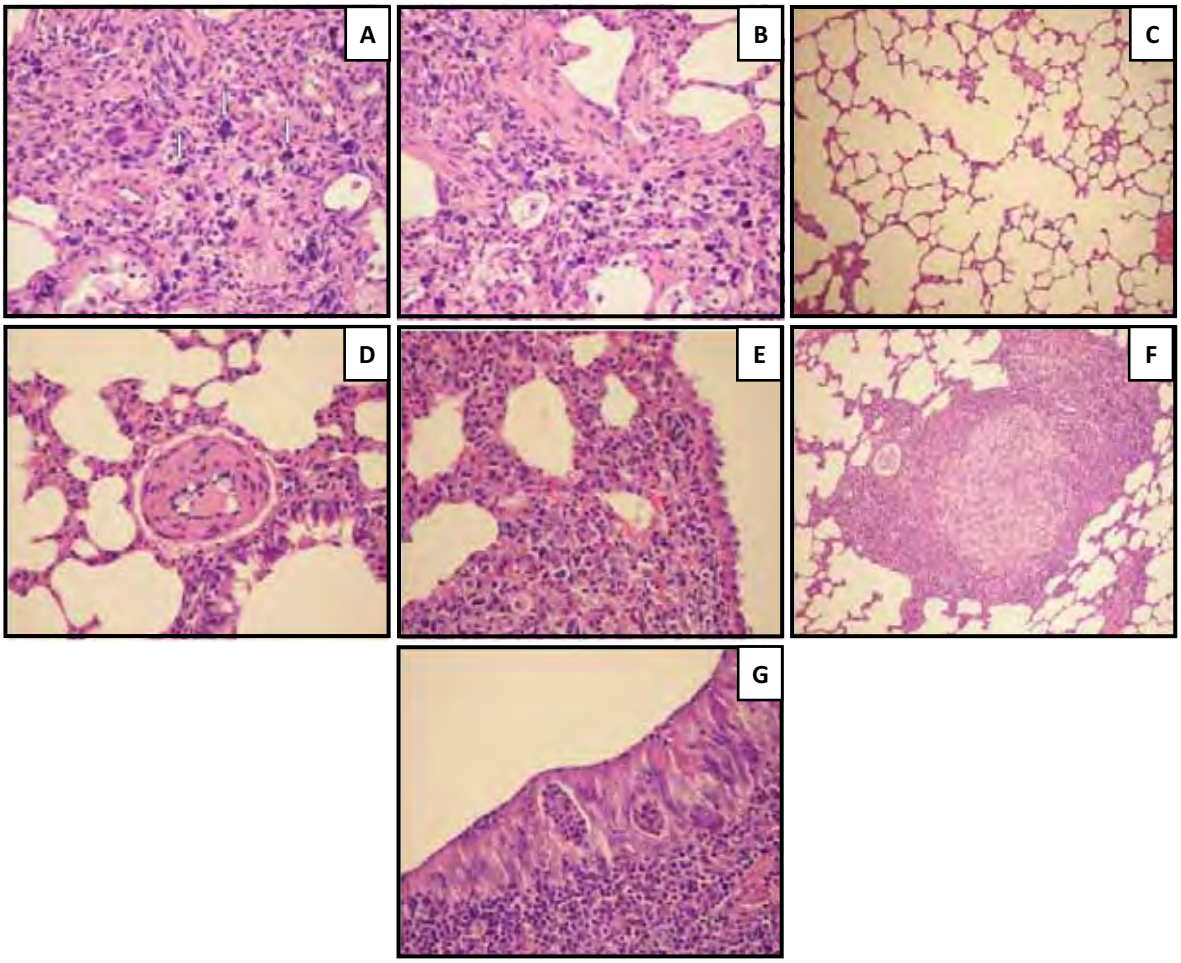


Figura 12 – Histomorfologia grupo G3(bleo-CTM) com coloração de Hematoxilina-eosina

A = massa fibrótica única composta por (mio) fibroblastos, matriz extracelular e vasos. Vaso com moderada hipertrofia da média e células endoteliais preservadas (cabeça de seta). Macrófagos microvacuolizados basofílicos estão distribuídos pela massa (seta). Aumento 20x. B = Estruturas semelhantes a focos fibroblásticos estão presentes em algumas massas fibróticas. Aumento 20x. C= Septos alveolares de aspecto habitual com áreas contiguas de espessamento discreto adjacente a áreas de septos com moderado espessamento. Aumento 10x. D= Eixo bronquíolo-vascular preservado em discreto espessamento septal adjacente. Hipertrofia da camada média do vaso e seu endotélio hiperplásico. Aumento 20x. E= Hiperplasia mesotelial adjacente a área fibrótica. Aumento 20x. F = Area de Bronquiolite intensa com preenchimento da luz por proliferação miofibroblástica (pneumonia organizante). Aumento 10x. G = Abscesso intraepitelial bronquiolar. Aumento 40x.

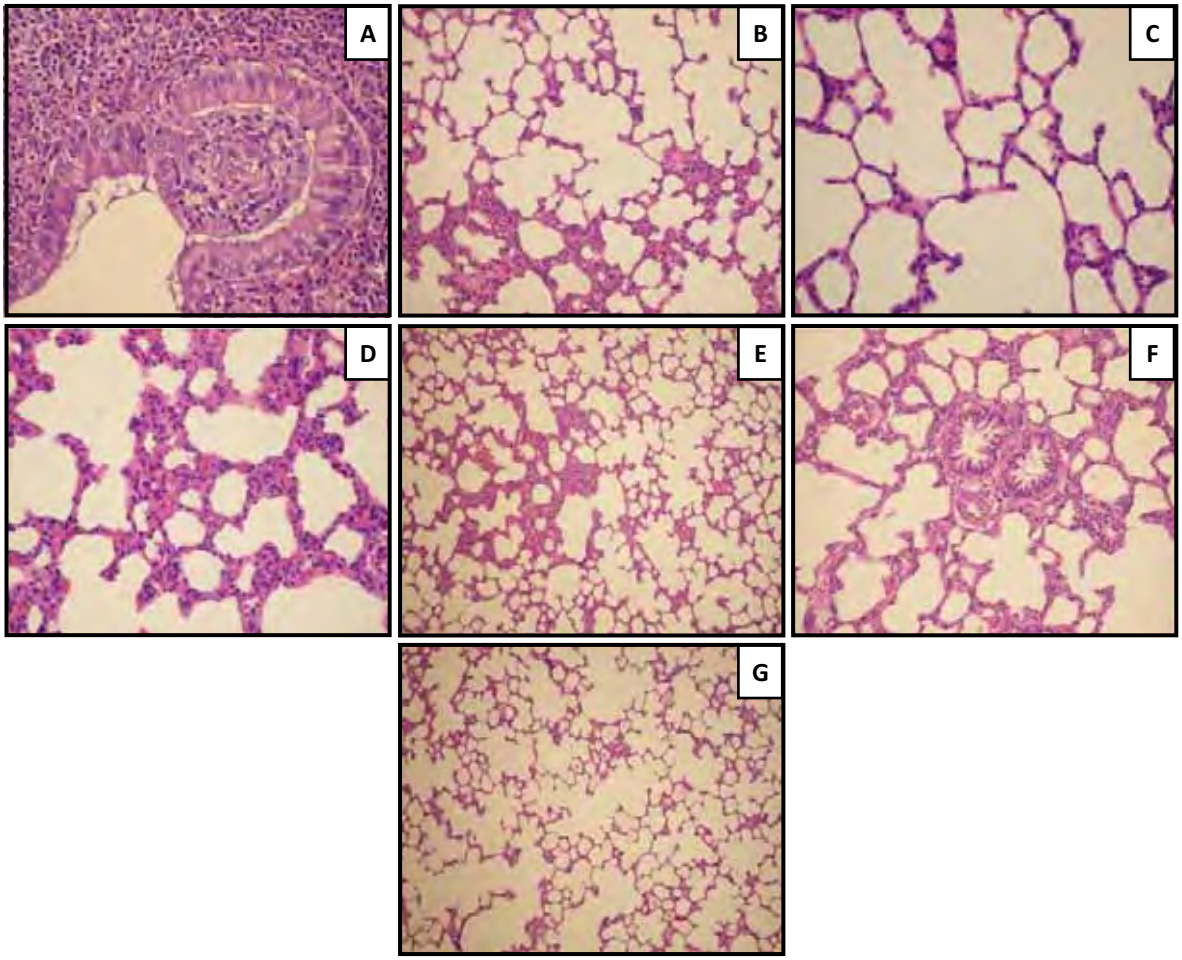


Figura 13 – Histomorfologia grupo G3(bleo-CTM) com coloração de Hematoxilina-eosina
A = Pneumonia organizante clássica. Aumento 40x; B = Interface entre área septal mais preservada e área com nítido espessamento. Aumento 20x; C= Área septal com alterações matriciais mínimas. Aumento 40x; D= Espessamento septal contínuo. Aumento 40x; E= Área focal de espessamento septal contínuo e áreas nodulares adjacentes. Aumento10x; F= Eixo brônquio vascular preservado. Discreto espessamento septal focal. Aumento 20x; G = Área septal preservada. Mínimas áreas com espessamento focal. Aumento 10x

O grupo controle G4 (soro-CTM) apresentou aspectos histomorfológicos onde percebe-se uma atenuação importante da fibrose, sem a formação de massas fibróticas, exceto para o pulmão de um dos animais (animal 11). A maior parte dos septos apresenta seu aspecto delicado habitual ou com alterações mínimas. Já outras áreas há um espessamento maior e eventualmente com a presença de pequenos nódulos fibróticos. A inflamação é moderada com acometimento perivascular variável. Nota-se intensa bronquite e bronquiolite crônica em atividade, denotando estimulo antigênico importante. Observam-se sinais de hipertensão pulmonar, mas parecem em menor grau.

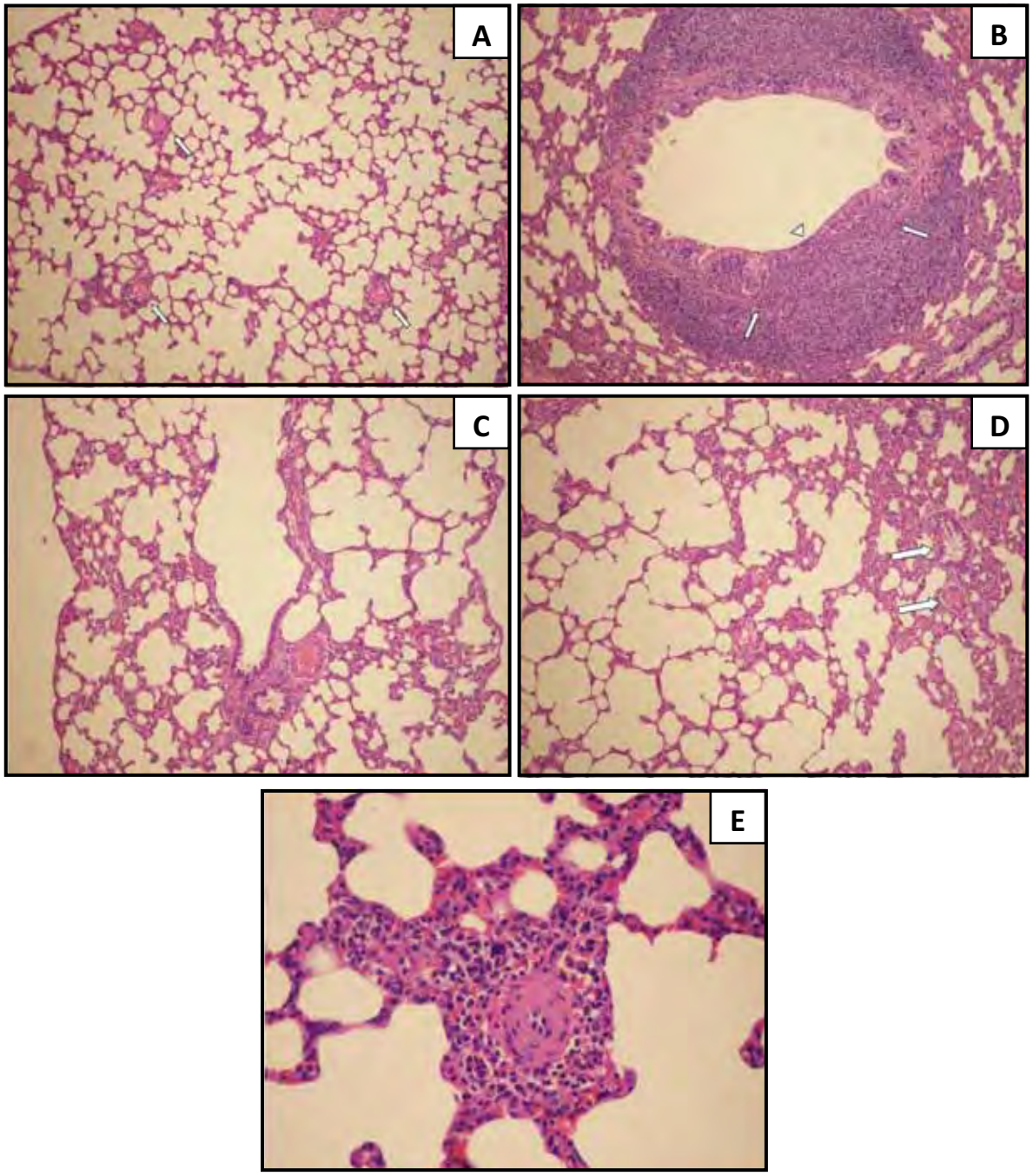


Figura 14 – Histomorfologia grupo G4(soro-CTM) com coloração de Hematoxilina-eosina.
A=Septos alveolares de aspecto delicado fino habitual ou com alterações mínimas no componente intersticial. Intenso infiltrado inflamatório perivascular (setas). Aumento 10x; B = Bronquíolo terminal e bronquíolo respiratório de aspecto habitual. Aumento 10x; C = Intensa bronquite crônica em atividade. Destruição da camada muscular (seta) e infiltração intraepitelial (cabeça de seta). Aumento 10x; D = Interface entre áreas de aspecto habitual com áreas de espessamento continuo do septo alveolar. Eixo bronquíolo vascular não está acometido por processo inflamatório (setas). Aumento 10x; E = Arteríola com hipertrofia da camada média e intenso processo inflamatório perivascular. Pouco espessamento nos septos ao redor. Aumento 40x

7.5.2. Coloração Tricrômico de Picrosírius

O método de coloração por Tricrômico de Picrosírius consiste na coloração em vermelho pelo *Sirius Red* da proteína colágeno, presente nas fibras colágenas, reticulares, cartilagens e nas membranas basais. Quando associada à microscopia de polarização, possibilita a visualização de colágeno pela organização paralela das moléculas de tropocolágeno. As fibras de colágeno tipo I apresentam coloração que varia do vermelho ao amarelo brilhante com intensa birrefringência. O colágeno tipo II apresenta birrefringência menos intensa e coloração amarelo pálida. O colágeno tipo III aparece como fibras delicadas de coloração esverdeada (Junqueira *et al*, 1979).

A análise do grupo G1(Bleo-soro) evidencia em na figura 15 **A** massa fibrótica com espessamento e distorção septal intensa evidenciados pela coloração de Picrosírius sob luz polarizada. Note o remodelamento parênquimatoso determinado pela deposição de fibras colágenas espessas como o colágeno I (vermelho e amarelo) e fina como o colágeno III (verde), no aumento de 200 vezes. Na mesma figura, em **B**, massa fibrótica confluente e extensa, em **C** remodelamento parênquimatoso intenso por abundante deposição de colágeno, espessamento septal e distorção do eixo bronquíolo alveoloar. Em **D** remodelamento parenquimatoso e espessamento pleural adjacente. Na figura **15 E**, aspecto de espessamento septal envolvendo pequeno bronquíolo e distorcendo a arquitetura pulmonar habitual. Em **F**, interface entre massa fibrótica confluente e estruturas septais distorcidas (linha tracejada).

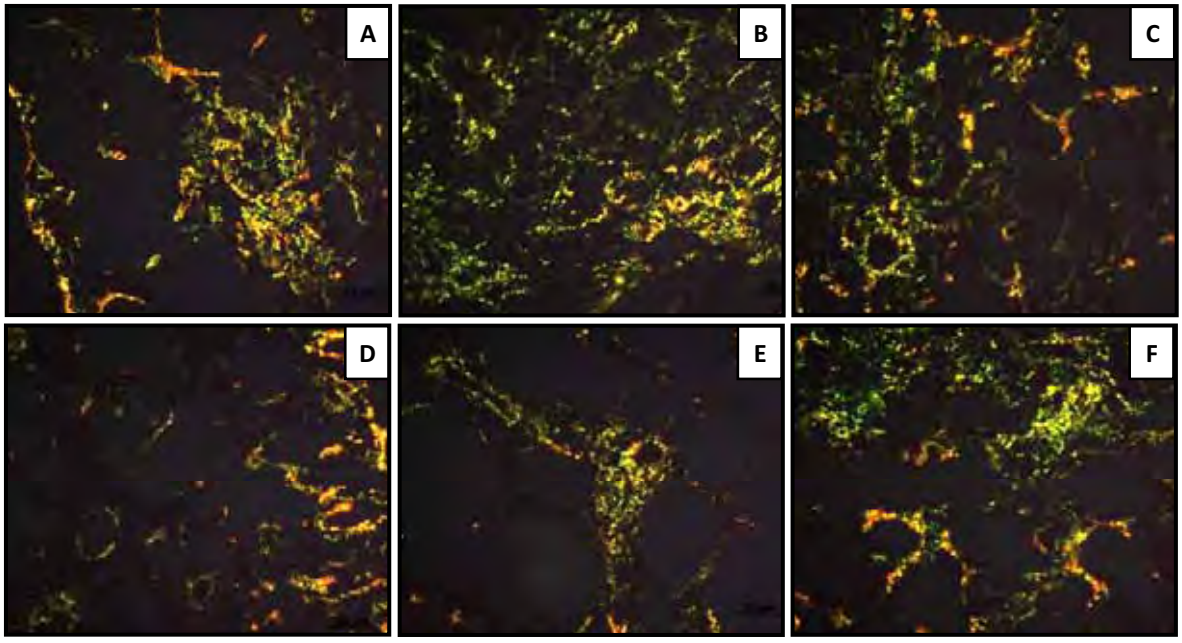


Figura 15 – Histomorfologia grupo G1(bleo-soro) com coloração tricrômica de Picrosírius. Aumento de 200 X, barra de 50µm.

No grupo G2(soro-soro) apesar da análise clássica por hematoxilina-eosina evidenciar estrutura matricial fibrótica, miofibroblastos em paralelo a hiperplasia de pneumócitos tipo II e quadro de bronquite crônica ativa com destruição do epitélio e camada, a coloração tricrômica evidencia na figura 16 **A** Parenquima pulmonar de aspecto habitual. Pontual deposição de matriz extracelular remetendo os achados iniciais às condições de biotério convencional em que os animais foram mantidos. Estas condições podem ter determinado quadros de bronquites, bronquiolites e até pneumonias em função da instilação intratraqueal utilizada, que neste grupo, correspondeu ao soro fisiológico. A provável contaminação vem do ambiente de manipulação. Em **B**, parênquima e pleura de aspecto habitual. Focal deposição de colágeno. Note como a pleura mostra se delicada e se conecta aos septos de maneira harmônica e em **C** eixo bronquíolo alveolar de aspecto habitual. Os bronquíolos são envolvidos por um esperado arcabouço de fibras colágenas. Os septos ancoram os bronquíolos sem causar distorção da arquitetura.

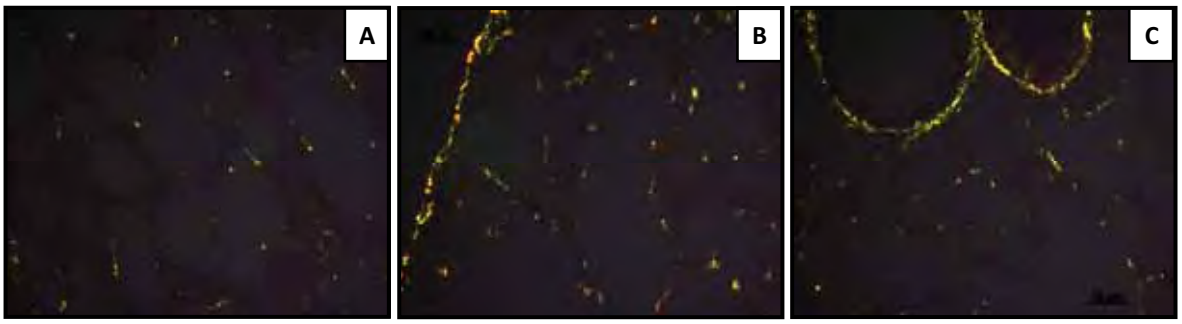


Figura 16 – Histomorfologia grupo G2(soro-soro) com coloração tricrômica de Picrosírius. Aumento de 200 X, barra de 50µm.

No grupo estudo denominado G3(bleo-CTM), onde análises por hematoxilina-eosina evidenciavam a regressão do quadro de fibrose com a permanência de massas fibróticas isoladas, não se observando anomalias de septos, a coloração específica, tricrômica de Picrosírius mostra estrutura alveolar de aspecto preservado, entretanto com moderada deposição de fibras colágenas (figura **17 A**), como esperado, uma vez que a infusão de CTM-TA foi realizada com objetivo de analisar a contribuição, sem efetivo ajuste de dose, como a concentração de células, que foram injetadas por veia caudal. Como muitos trabalhos mostram, a efetividade do uso das CTM é dose (número) dependente. Provável aumento da concentração de células mesenquimais injetadas pudesse, no mesmo tempo, trazer um benefício maior. Observa-se na figura **17 B** bronquíolo de aspecto habitual. Note que os alvéolos adjacentes mostram algum grau de espessamento septal com deposição de fibras colágenas. Em **C** Pleura de aspecto habitual com sua arquitetura delicada de deposição de matriz extracelular. Contudo o parênquima pulmonar periférico apresenta espessamento septal devido a presença de fibras colágenas. Em **D** pequeno bronquíolo com discreto espessamento peribronquiolar, mas sem distorção da arquitetura. Septos com leve espessamento. Em **E** parenquima pulmonar periférico mostra arquitetura preservada. A deposição de fibras colágenas nas paredes septais é marcante.

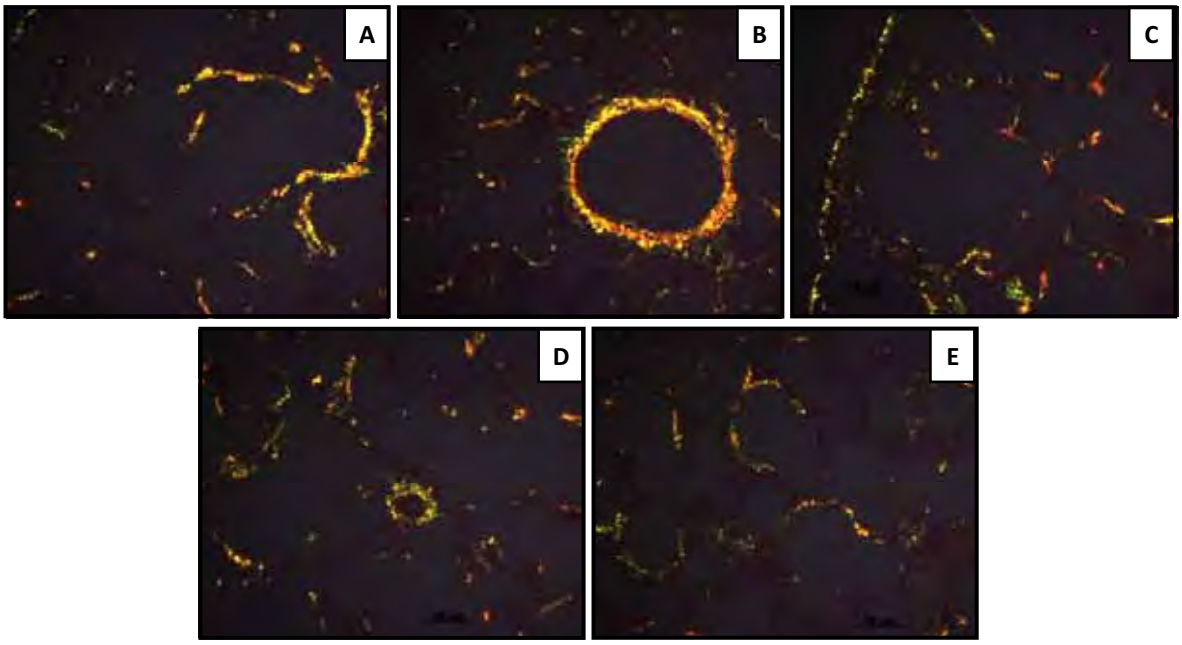


Figura 17 – Histomorfologia grupo G3(bleo-CTM) com coloração tricrômica de Picrosírius. Aumento de 200 X, barra de 50µm.

No grupo G4 (soro-CTM), onde na macroscopia se observou aspecto normal do pulmão e na análise por hematoxilina-eosina alterações mínimas, entre elas infiltrado inflamatório justificável pelos motivos acima descritos que se referem ao tipo de ambiente da manipulação, do biotério, e das condições de instilação intra-traqueal, estes achados foram confirmados pela coloração de picrosírius, sendo que na figura **18 A** observa-se leve espessamento septal margeado por deposição "em dot" de fibras colágenas. Em **B**, leve a moderado espessamento septal margeado por deposição "em dot" de fibras colágenas, em **C**, eixo bronquíolo alveolar preservado (seta). Os septos espessados com fibras colágenas nas suas bordas se mantém e em **D** pleura de aspecto habitual. Os septos espessados com fibras colágenas nas suas bordas se mantém.

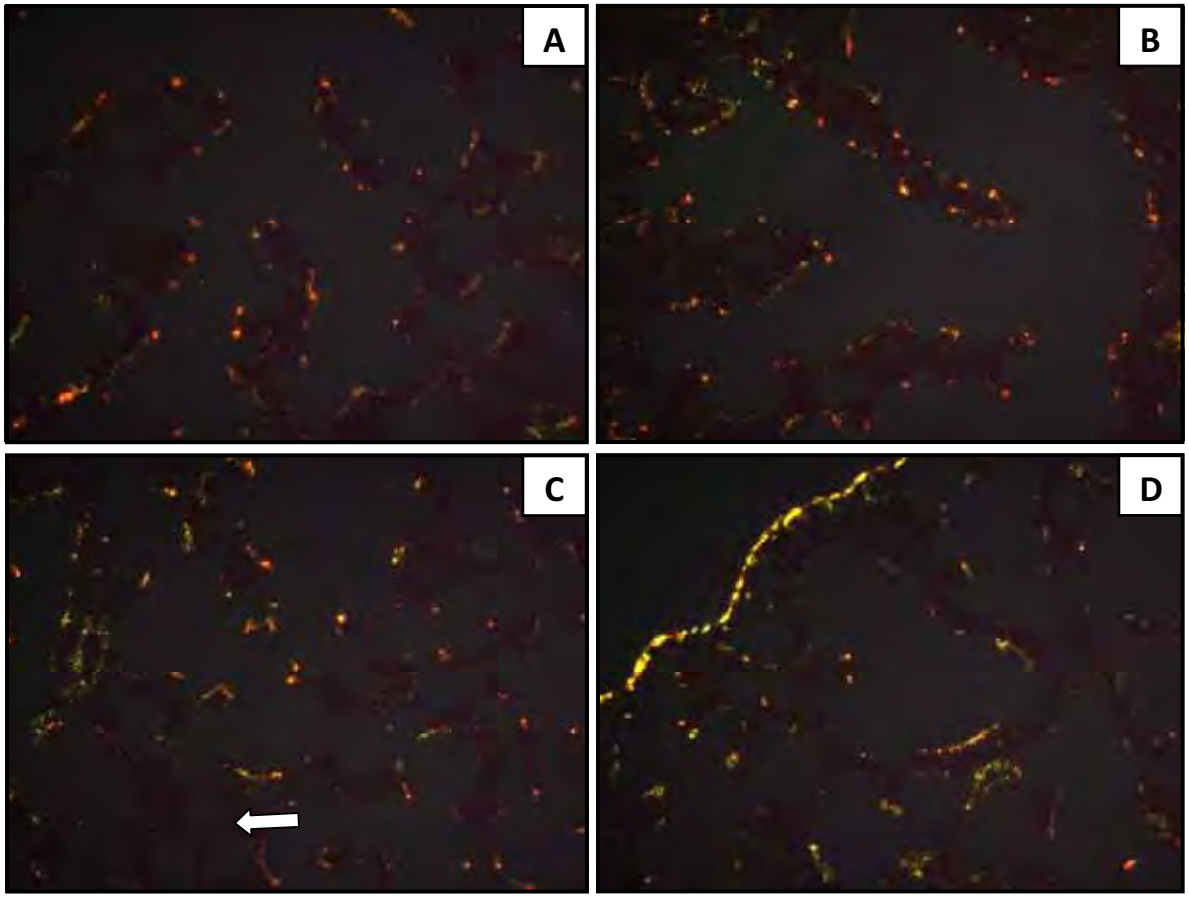


Figura 18 – Histomorfologia grupo G4 (soro-CTM) com coloração tricrômica de Picrosírius. Aumento de 200 X, barra de 50µm.



8. Conclusão

A partir do exposto, e com base nos objetivos propostos para este trabalho, concluímos:

1. A terapia celular com célula-tronco mesenquimal de tecido adiposo interfere positivamente no controle do processo da fibrose pulmonar, em modelo animal, induzida pela bleomicina.

2. A instilação intrataqueal de bleomicina na dose de 1,5U/Kg de peso determinou fibrose pulmonar em 100% de ratos albinos, da linhagem Wistar, sendo que em 57,14% dos animais o grau de fibrose pulmonar foi IV.

3. Foi obtido, expandido em cultura e caracterizado com sucesso as CTM-TA de ratos, a partir de uma média 3, 35g de gordura da parede abdominal dos animais. Este fragmento digerido por colagenase tipo I obteve em média 5,3 X 10^4 células linfomonucleares. As LMN expandidas em culturas até a 8ª passagem aderiram ao plástico determinando o aparecimento de unidades formadoras de colônias fibroblastóides e se diferenciaram, em meios de cultura condicionados, específicos, em adipócitos, condrócitos e osteoblastos/osteócitos. O Perfil fenotípico das CTM-TA foi confirmado por citometria de fluxo com a expressão de 98,97% de CD90 e 1,70% de CD34, além de outros marcadores.

4. A instilação de bleomicina intratraqueal comprometeu o índice de saturação dos animais.

5. A infusão de CTM alogênicas por via caudal não determinou óbito em nenhum animal.

6. Análises histológicas confirmaram o padrão de fibrose pulmonar.

7. A infusão de 1 X 10^6 células por veia caudal recuperou o índice de saturação nos animais. A infusão de CTM agiu de forma efetiva na diminuição do grau de fibrose. Não foram identificados aspectos histológicos compatíveis com rejeição (DECH), apesar da infusão alogênicas de CTM-TA.

A partir dos promissores resultados obtidos neste estudo, acreditamos que a CTM-TA mereça ser considerada em futuros estudos abordando o tratamento de fibrose pulmonar, não só por seus efeitos diretos na remodelação do tecido, enquanto unidade funcional propriamente dita (célula), mas em especial por seus efeitos parácrinos, como a produção de citocinas, quimiocinas, inibidores e moduladores do dano tecidual.



9. Referências Bibliográficas

1. Allen S, Raut S, Woollard J, Vassallo M. Low dose diamorphine reduces breathlessness without causing a fall in oxygen saturation in elderly patients with end-stage idiopathic pulmonary fibrosis. Palliat Med. 2005;19(2):128-30.

2. American Thoracic Society / European Respiratory Society International Multidisciplinary Concensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. Am J Respir Crit Care Med . 2002; 165:277.

3. Antó JM, Cullinan P. Clusters, classification and epidemiology of interstitial lung diseases: concepts, methods and critical reflections. Eur Respir J. 2001; 32: 101-106.

4. Armanios MY et al. Telomerase mutations in families with idiophatic pulmonary fibrosis. N Engl J Med . 2007; 356:1317.

5. Baldi B, Castro Pereira CA. Diretrizes de doenças pulmonares intersticiais . Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia- SBPT, 2012.

6. Bar-Nur O, Russ HA, Efrat S and Benvenisty N. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. Cell Stem Cell.2011; 9(1):17–23.

7. Bjoraker JA, Ryu JH, Edwin MK, Myers JL, Tazelaar HD, Schroeder DR, et al. Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 1998;157(1):199-203.

8. Bogliolo, patologia/[editor] Geraldo Brasileiro Filho.- 8.ed.- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2012; 8ªEd: 383-442.

9. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. Journal of Orthopaedic Research. 1991; 9(5): 641–650.

10. Cohen J. The emerging race to cure HIV infections. Science. 2011;332(6031): 784–789.

11. Collard, King, Bartelson, et al.Changes in Clinical and Physiologic Variables Predict Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003; 168(5): 538-542.

12. Cutroneo KR. Evidence for TGF-beta1 and bleomycin intracellular signaling through autocrine regulation of Smad 3 binding to the proximal promoter of the Smad 7 gene. J Cell Biochem. 2006 Apr 1;97(5):933-9.

13. Da Silva VD, Prolla JC. Estudo comparative entre microscopia otica convencional e imagens microscópicas digitalizadas de derrames serosos. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia. UFRGS, 1995.

14. Demedts M, Behr J, Buhl R, Costabel U, Dekhuijzen R, Jansen HM, et al;IFIGENIA Study Group. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med. 2005;353(21):2229-42.

15. Fermand JP, Ravaud P, Chevret S, et al. High-dose therapy and autologous blood stem cell transplantation in multiple myeloma: preliminary results of a randomized trial involving 167 patients. Stem Cells. 1995; 13(2):156–159.

16. Ferreira Filho, AF. Fibrose pulmonar induzida por bleomicina intratraqueal em ratos Wistar. Descrição do modelo experimental de Sindrome da Angustia Respiratoria do Adulto e uso do Polissulfato de Pentosan. Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia. UFRGS, 1996.

17. Fleischman RW, Baker JR, Thompson GR, et al. Bleomycin-induced interstitial pneumonia in dogs. Thorax.1971;26:675-682.

18. Gimble JM, Guilak F and Bunnell BA . Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells .Stem Cell Research & Therapy. 2010; 1:19 .

19. Gross J and Hunninghake G. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. N Engl J Med. 2001 ; 345(7) :517-525.

20. Harari S, Caminati A. IPF: new insight on pathogenesis and treatment. Allergy.2010;65(5):537-53.

21. Holland AE, Hill CJ, Conron M, Munro P, McDonald CF. Short term improvement in exercise capacity and symptoms following exercise training in interstitial lung disease. Thorax. 2008;63(6):549-54.

22. Hope-Gill BD, Hilldrup S, Davies C, Newton RP, Harrison NK. A study of the cough reflex in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2003;168(8):995-1002.

23. http://www.isscr.org/ acessado em 15 de outubro de 2010.

24. Hubner RH, Gitter W, El Mokhtari NE, Mathiak M, Both M, Bolte H, et al. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. BioTechniques. 2008;44(4):507-11, 14-7.

25. Inácio JC. Produção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos de células-tronco adulta de origem humana e de coelho. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011.

26. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochemical Journal. 1979; 11(4):447-55.

27. Kim K, Doi A , Wen B ,et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. Nature.2010; 467(7313): 285–290.

28. King TE Jr, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Hormel P, Lancaster L, et al. Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. Lancet. 2009;374(9685):222-8.

29. King TE Jr, Behr J, Brown KK, du Bois RM, Lancaster L, de Andrade JA, et al. BUILD-1: a randomized placebo-controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2008;177(1):75-81.

30. King TE Jr, Brown KK, Raghu G, du Bois RM, Lynch DA, Martinez F, et al. BUILD-3: a randomized, controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2011;184(1):92-9.

31. King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. Lancet. 2011; 378(9807):1949-61.

32. Klingsberg, R.; Mutsaers, S. and Lasky J. Current clinical trials for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. J Asian Pacific Society of Respirology. 2010; 15: 19-31.

33. Knoepfler PS. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. Stem Cells.2009; 27(5): 1050–1056.

34. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells. Regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res Ther. 2007;9(1):204.

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

36. Kreider M, Kotloff RM. Selection of candidates for lung transplantation. Proc Am Thorac Soc. 2009;6(1):20-7.

37. Kumar V, Abbas AK, Fausto N , Aster JC. Robbins & Cotran, bases patológicas das doenças. 2010; 8ªED: 685-746.

38. Ley B, Collard HR, King TE Jr. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(4):431-40.

39. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. J Cell Biochem. 2009;106(6):984-91.

40. Loebinger MR ,Janes SM. Stem Cells for Lung Disease. Chest. 2007; 132:279–285.

41. Lynch JP, Saggar R, Weigt SS, Ross DJ, Belperio JA. Overview of lung transplantation and criteria for selection of candidates. Semin Respir Crit Care Med. 2006;27(5):441-69.

42. Meltzer, E. and Noble, P.C. Idiopathic pulmonary fibrosis. Orphanet Journal of Rare Diseases, 3:8, 2008. Respirology. 2009; 14: 915–916.

43. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H , et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell. 2003; 113(5): 631–642.

44. Moeller, A., Ask K., Warburton D, Gauldie J and 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: 362–382.

45. Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. Lancet. 2011;377(9779):1760-9.

46. Noble PW, Homer RJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: new insights into pathogenesis.Clin Chest Med. 2004; 25:749.

47. Noth I and Martinez FJ . Recent advances in idiopathic pulmonary fibrosis . Chest. 2007; 132:637.

48. O'Beirne S, Counihan IP, Keane MP. Interstitial lung disease and lung transplantation. Semin Respir Crit Care Med. 2010;31(2):139-46.

49. Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, Conte JV, Corris P, Egan JJ, et al. International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update – a consensus report from the pulmonary scientific council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. J Heart Lung Transplant. 2006;25(7):745-55.

50. Özyurt H, Sögut S, Yildirim Z, Kart L, Iraz M, Amutçu F, Temel I, Özen S, Uzun A , Akyol Ö. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl Ester on bleomycine-induce lung fibrosis in rats. Clin Chin Acta.2004; 339(1-2): 65-75.

51. Pak J. Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. Journal of Medical Case Reports. 2011; 5: 296.

52. Pereira CA, Malheiros T, Coletta EM, Ferreira RG, Rubin AS, Otta JS, et al.Survival in idiopathic pulmonary fibrosis-cytotoxic agents compared to corticosteroids. Respir Med. 2006;100(2):340-7.

53. Punithavathi D, Venkatesan N, Babu M. Curcumin inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. British Journal of Pharmacology. 2000; 131: 169-172.

54. Raghu G, Brown KK, Costabel U, Cottin V, du Bois RM, Lasky JA, et al. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with etanercept: an exploratory, placebo-controlled trial. Am J Respir Crit Care Med. 2008;178(9):948-55.

55. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An Official ATS/ERJ/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(6):788-824.

56. Raghu G, Depaso WJ, Cain K, Hammar SP, Wetzel CE, Dreis DF, et al. Azathioprine combined with prednisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. Am Rev Respir Dis. 1991;144(2):291-6.

57. Rossari, J.R.F. Fibrose pulmonar induzida por bleomicina intratraqueal em ratos wistar: uso do interferon-a-2b em um modelo experimental de síndrome da distrição respiratória aguda - SDRA. 2004. 99f. Dissertação (Mestrado em Pneumologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.

58. Schreml S, Babilas P, Fruth S , et al. Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction. Cytotherapy. 2009; 11(7): 947–957.

59. Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis : the myofibroblast in focus. Chest. 2007; 132:1311.

60. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypothesis about its pathogenesis and implications for therapy. Ann Intern Med. 2001;134(2):136-51.

61. Siatskas C, Payne NL, Short MA , et al. A consensus statement addressing mesenchymal stem cell transplantation for multiple sclerosis: it's time! . Stem Cell Reviews and Reports. 2010; 6(4): 500–506.

62. Singh B, Shinagawa K, Taube C, Gelfand EW, Pabst R. Strain-specific differences in perivascular inflammation in lungs in two murine models of allergic airway inflammation. Clinical and experimental immunology. 2005;141(2):223-9.

63. Steele MP, Brown KK. Genetic predisposition to respiratory diseases: infiltrative lung diseases. Respiration. 2007;74(6):601-608.

64. Swigris JJ, Brown KK. Fibrose pulmonar idiopática: uma década de progressos. J Bras Pneumol. 2006;32(3):249-60.

65. Taskar VS, Coultas DB. Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease? Proc Am Thorac Soc. 2006;3(4):293-8.

66. Thabut G, Christie JD, Ravaud P, Castier Y, Dauriat G, Jebrak G, et al. Survival after bilateral versus single-lung transplantation for idiopathic pulmonary fibrosis. Ann Intern Med. 2009;151(11):767-74.

67. Thabut G, Mal H, Castier Y, Groussard O, Brugière O, Marrash-Chahla R,et al. Survival benefit of lung transplantation for patients with idiopathic pulmonary fibrosis. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003;126(2):469-75.

68. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC and Ferrebee JW . Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. The New England Journal of Medicine. 1957; 257(11): 491–496.

69. Thomeer MJ, Costabel U, Rizzato G, Poletti V, Demedts M. Comparison of registries of interstitial lung diseases in three European countries. Eur Respir J Suppl. 2001;32:114-118.

70. Thrall RS, McCormick JR , Jack RM , McReynolds RA , Ward PA . Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat : inhibition by indomethacin. Am J Pathol .1979; 95(1): 117-30 .

71. Tomioka H. Antioxidant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. A promising therapeutic prospect. Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases. 2009; 26: 83-84.

72. Tsakiri KD et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. Proc Natl Acad Sci USA . 2007; 104:7552.

73. Umezawa H, Suhara Y, Takita T, Maeda K. New antibiotics, bleomycin A and B. J Antibiot.1996; 19:200-9.

74. Visscher DW and Myers JL. Histologic spectrum of idiopathic interstitial pneumonias. Proc Am Thorac Soc . 2006; 3:322.

75. Wynn RF , Wraith JE, Mercer J, et al. Improved metabolic correction in patients with lysosomal storage disease treated with hematopoietic stem cell transplant compared with enzyme replacement therapy. Journal of Pediatrics. 2009;154(4): 609–611.

76. Xaubet A, Ancochea J, Morell F, Rodriguez-Arias JM, Villena V, Blanquer R, et al. Report on the incidence of interstitial lung diseases in Spain. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2004;21(1):64-70.

77. Zhang Y, Khan D, Delling J, et al. Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. The Scientific World Journal. 2012; 2012:1-14.

78. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. Molecular Biology of the Cell . 2002; 13: 4279–4295.



Anexos

Anexo 1

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

FMB

CEEA

Comissão de Ética em Experimentação Animal

Criada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99

Certificado

Certificamos que o (Protocolo CEEA 852-2010) "Contribuição da terapia celular com células tronco em fibrose pulmonar em ratos", a ser conduzido pro Renato Gonçalves Felix, orientado pela Profª. Drª. Elenice Deffune, co-orientado pelo Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes, com a colaboração de Monica Yonashiro Marcelino e apoio técnico de Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 25/11/2010.

Profª Drª Noeme Sousa Rocha
Presidente no exercício da CEEA

Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-8143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Apêndice

Apêndice 1 – Controle do peso dos animais, em gramas, segundo o dia de avaliação

G1 Bleo-soro	D0	D14	D28
R1	315,4	345	397,5
R2	303,5	319	362,8
R3	305,7	323	339,9
R4	289,5	305	361,5
R5	289,2	210	204,8
R6	286,2	289	311,5
R7	306,4	321	337,4
R8	286,5	302	329,9
R9	363,7	382	436,2
R10	332,5	334	384,9
R11	336,7	317	372,3
R12	303,1	288	327,6
R13	279,3	276	324,1
R14	288,2	obito	obito
R15	287,3	279	303,1

G2 soro-soro	D0	D14	D28
R1	307,8	337	380,4
R2	338,6	344	385,1
R3	315,4	353	394,6
R4	249,3	284	334,1
R5	286,6	315	353,9
R6	332,9	358	393,5
R7	283,6	284	316,2
R8	310,5	334	376,5
R9	284,4	305	330,1
R10	315,2	390	441,5
R11	291,8	334	366,1
R12	288,5	316	344,7
R13	291,4	333	392,9
R14	343,1	332	359,9
R15	292,4	334	366,1

G3 Bleo-CT	D0	D14	D28
R1	281	346	415
R2	Obito	obito	obito
R3	276	326	372
R4	265	309	364
R5	269	343	413
R6	249	296	366
R7	255	309	386
R8	257	275	352
R9	244	315	367
R10	255	267	335
R11	260	322	387
R12	238	318	401
R13	288	357	416
R14	241	291	345
R15	260	310	362

G4 soro-CT	D0	D14	D28
R1	279	353	417
R2	245	285	318
R3	192	237	285
R4	264	345	390
R5	257	332	370
R6	240	307	350
R7	236	294	346
R8	244	310	355
R9	308	409	460
R10	283	349	386
R11	268	344	383
R12	285	368	430
R13	240	316	375
R14	258	341	378
R15	279	379	434

Apêndice 2 – Controle da saturometria dos animais, segundo o dia de avaliação

Saturometria

G1 Bleo-soro	D0	D14	D28
R1	71	86	81
R2	81	78	85
R3	77	84	94
R4	79	86	83
R5	74	71	86
R6	80	88	81
R7	73	81	82
R8	82	77	88
R9	97	80	80
R10	81	72	78
R11	86	81	80
R12	79	85	78
R13	83	82	79
R14	98	0	0
R15	81	80	82

G2 soro-soro	D0	D14	D28
R1	80	85	88
R2	81	83	86
R3	84	83	89
R4	88	80	83
R5	84	86	82
R6	86	89	85
R7	76	86	90
R8	96	87	83
R9	81	82	84
R10	83	79	84
R11	85	87	80
R12	80	82	83
R13	75	81	82
R14	88	84	87
R15	76	82	81

G3 Bleo-CT	D0	D14	D28
R1	78	77	79
R2	0	0	0
R3	76	81	85
R4	84	81	77
R5	76	78	86
R6	82	79	86
R7	85	80	72
R8	94	73	80
R9	77	81	78
R10	79	82	79
R11	80	72	94
R12	81	80	78
R13	81	79	84
R14	83	81	84
R15	89	88	81

G4 soro-CT	D0	D14	D28
R1	82	83	77
R2	77	88	78
R3	85	80	74
R4	82	80	77
R5	84	82	80
R6	83	79	76
R7	79	76	78
R8	74	83	92
R9	80	74	83
R10	83	78	80
R11	76	77	80
R12	82	80	88
R13	87	80	72
R14	78	79	79
R15	72	77	72

Apêndice 3 – Escores referentes a análise dos cortes histológicos dos pulmões, animal por animal, em cada um dos grupos segundo a classificação de Ashroft modificada por Hübner

	FIBROSE				INFLAMAÇÃO			
Animal	G2 soro-soro	G1 bleo-soro	G3 bleo-CTM	G4 soro-CTM	G2 soro-soro	G1 bleo-soro	G3 bleo-CTM	G4 soro-CTM
1	4	5	3	2	0	0	2	2
2	5	5	3	-	0	0	2	-
3	4	4	3	4	2	0	1	1
4	3	3	3	4	2	1	2	1
5	3	5	2	2	2	1	1	2
6	3	5	3	4	2	2	0	2
7	3	4	2	4	2	2	2	3
8	3	3	2	4	2	2	0	2
9	3	4	3	4	2	2	2	3
10	4	5	3	2	1	2	2	3
11	5	5	4	3	1	1	3	3
12	3	5	3	3	2	0	1	1
13	4	5	3	3	1	2	1	2
14	4	-	3	3	2	-	2	1
15	5	3	2	4	1	0	2	1