RAFAEL GUILEN DE OLIVEIRA

Terapia celular com células estromais mesenquimais alogênicas e xenogênicas em modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase ou fumaça de cigarro

Cell therapy with allogeneic or xenogeneic mesenchymal stromal cells in an experimental model of pulmonary emphysema induced by elastase instillation or cigarette smoke exposure

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2018

RAFAEL GUILEN DE OLIVEIRA

Terapia celular com células estromais mesenquimais alogênicas e xenogênicas em modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase ou fumaça de cigarro

Cell therapy with allogeneic or xenogeneic mesenchymal stromal cells in an experimental model of pulmonary emphysema induced by elastase instillation or cigarette smoke exposure

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

Versão original

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

GUILEN DE OLIVEIRA, RAFAEL
Terapia celular com células estromais mesenquimais alogênicas e xenogênicas em modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase ou fumaça de cigarro / RAFAEL GUILEN DE OLIVEIRA; orientador João Tadeu Ribeiro Paes. -- São Paulo, 2018.
95 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Terapia celular. 2. Células estromais mesenquimais. 3. Tecido adiposo. 4. Mecânica ventilatória. 5. Caracterização celular. I. Ribeiro Paes, João Tadeu , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Rafael Guilen de Oliveira

Título da Dissertação: Análise comparativa da terapia celular com células estromais mesenquimais derivadas de diferentes fontes em modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase ou fumaça de cigarro

Orientador: Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....

Instituição: .....

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Ciências e Letras de Assis

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Projeto "**Análise comparativa de terapia celular com células-tronco derivadas de tecido adiposo de ratos e de humanos em modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por fumaça de cigarro**", Registro n° 005/2015, sob responsabilidade do Pesquisador **João Tadeu Ribeiro Paes**, conforme registrado, atende à legislação vigente no que tange o respeito aos princípios éticos na experimentação animal.

CERTIFICAMOS, ainda, que o Relatório Final deverá ser entregue impreterivelmente em outubro/2016.

Assis, 10 de março de 2016.

Edislane Barreiros de Souza
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Av. Dom Antônio, 2100 - ASSIS/SP - CEP. 19806-900 - Fone: (18) 3302-5541– 3302-5811
http//www.assis.unesp.br – e-mail: ceua@assis.unesp.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise comparativa da terapia celular com células-tronco derivadas de tecido adiposo de ratos e de humanos em modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por fumaça de cigarro

Pesquisador: Rafael Guilen de Oliveira

Área Temática: Novos procedimentos terapêuticos invasivos;

Versão: 2

CAAE: 47383115.2.0000.5401

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências e Letras - UNESP/ Campus de Assis

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.691.356

Apresentação do Projeto:

O projeto insere-se em grupo de pesquisa que tem por alvo principal o estudo e aplicação de terapias celulares que possam auxiliar no tratamento de quadros de Fibrose Pulmonar Crônica.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliação da eficácia terapêutica resultante do emprego da terapia celular com células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo humano e de ratos em modelo experimental de indução de enfisema pulmonar por exposição á fumaça de cigarro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O tecido adiposo humano será obtido de indivíduos do sexo feminino, com idade entre 35 - 50 anos, que se submeteram a procedimento de dermolipectomia abdominal, realizados na clínica Maison das Flores – Clínica de Cirurgia Plástica, localizada na cidade Assis – SP, que esta devidamente autorizada para a realização do procedimento. Anterior à coleta do material, as pacientes serão informadas verbalmente sobre o procedimento e assinarão o Termo de Consentimento Livre Esclarecido. Os esclarecimentos sobre os riscos da cirurgia serão detalhados pela equipe médica responsável.

Benefícios: segundo o pesquisador "Fundamentação experimental para possível da terapia em pacientes humanos."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para atingir seus objetivos, o pesquisador solicita autorização para receber uma pequena porção do tecido adiposo (50mL) retirado de 05 pacientes (mulheres de 35-50 anos de idade) que se submeteram à cirurgia de dermoleptomia abdominal em Hospital de cirurgia plástica na cidade de Assis (SP) (Maison das Flores). Uma parte do material será descartado pelo hospital e uma outra parte será cedida à pesquisa que encaminhará os procedimentos para obtenção de células tronco a partir daquele tecido. Tais procedimentos serão realizados no Laboratório de Genética e Terapia Celular da UNESP - Campus de Assis.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A autorização e declaração de infraestrutura do Hospital Maison das Flores no qual cederá as amostras de tecido é apresentada em papel não timbrado.

É apresentada a autorização e declaração de infraestrutura do responsável pela laboratório sede localizado na FCLA-Assis, UNESP e autorização por parte do diretor da faculdade.

O TCLE foi elaborado na forma de convite e esclarece ao participante pontos importantes da pesquisa: objetivos, procedimentos, possíveis riscos, liberdade em deixar o estudo a qualquer momento, sigilo e anonimato do participante.

O TCLE será assinado pelo pesquisador proponte e pelo pesquisador chefe de laboratório como é colocado no TCLE atual. O TCLE traz um telefone de contato, e-mail e endereço do pesquisador chefe de laboratório e do pesquisador proponente. Neste documento, o pesquisador deverá informar os possíveis benefícios da pesquisa em relação aos voluntário.

Recomendações:

O pesquisador deverá apresentar no Relatório Final, conforme cronograma apresentado

1) Apresentar o novo cronograma da pesquisa, de forma detalhada, lembrando que nenhum contato com os participantes poderá ser realizado antes da aprovação do CEP;

2) declaração de infraestrutura do Hospital Maison das Flores, em papel timbrado;
3) esclarecimento sobre os critérios de exclusão dos participantes;

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
vide Recomendações

Considerações Finais a critério do CEP:
O Regimento Interno do CEP prevê que o pesquisador apresente relatórios, de acordo com as datas estabelecidas pelo CEP. O não encaminhamento dos relatórios implicará no impedimento temporário da apresentação de novos protocolos, até que este regularize a situação pendente. Os RELATÓRIOS deverão ser postados na Plataforma como NOTIFICAÇÃO em formulário estabelecido pelo CEP (http://www.assis.unesp.br/#!/comite-de-etica/humanos/formularios/) em Dezembro/2016. Neste relatório deverá ser esclarecidas as pendências e informado como foi realizada a devolutiva aos participantes da pesquisa. ATENÇÃO: QUALQUER ALTERAÇÃO NO PROJETO DEVE SER INFORMADA AO CEP COMO EMENDA AO PROJETO.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_555219.pdf	28/06/2016 10:44:33		Aceito
Outros	Autorizacao_existencia_infraestrutura.pdf	15/06/2016 14:20:48	Rafael Guilen de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_Esclarecido.doc	15/06/2016 14:17:30	Rafael Guilen de Oliveira	Aceito
Outros	Autorizacao_existencia_infraestrutura.jpg	31/03/2016 16:43:15	Rafael Guilen de Oliveira	Aceito
Outros	Autorização e existência de infraestrutura.jpg	17/07/2015 15:37:56		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Mestrado - Rafael.doc	16/07/2015 15:22:14		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto 001.jpg	16/07/2015 15:19:26		Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100
Bairro: Vila Tênis Clube **CEP:** 19.806-900
UF: SP **Município:** ASSIS
Telefone: (18)3302-5607 **Fax:** (18)3302-5804 **E-mail:** cep@assis.unesp.br

Necessita Apreciação da CONEP:
Sim

ASSIS, 23 de Agosto de 2016

Assinado por:
CLAUDIO EDWARD DOS REIS
(Coordenador)

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100
Bairro: Vila Tênis Clube **CEP:** 19.806-900
UF: SP **Município:** ASSIS
Telefone: (18)3302-5607 **Fax:** (18)3302-5804 **E-mail:** cep@assis.unesp.br

À todos aqueles que caminharam, sofreram e se
alegraram comigo ao longo desta jornada.
Gratidão.

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial minha mãe Carmen, que sempre acreditaram em mim e incentivaram a correr atrás dos meus sonhos; sem vocês, este não seria possível.

Aos meus amigos, de todos os lugares, que foram e serão sempre minha segunda família. A vocês toda minha gratidão e amor pelo suporte.

Ao Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes, meu orientador, que abriu as portas de seu laboratório, transmitiu seu conhecimento e me preparou para o futuro que me aguarda. Minha eterna gratidão.

A pesquisadora Natalia Langenfeld Fuoco, que além de amiga, me acolheu no laboratório e transmitiu todo seu conhecimento. Serei eternamente grato.

As Profas. Dras. Edislane Barreiros, Fernanda Degobbi, Marna Sakalem e Angélica Pascon, mulheres fortes, profissionais admiráveis que, junto com suas equipes, contribuíram imensamente para este projeto.

Ao Dr. Rafael Dariolli e sua equipe (Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular – InCor - HCFMUSP) por toda colaboração e incentivo.

A equipe do Laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTe Cel – Unesp – Assis) por toda ajuda e força oferecida, em especial, Gabriela Azevedo, meu braço direito que admiro muito por tudo que fez e pela lealdade.

A todos os funcionários da FCL de Assis (Unesp), em especial, José Gilberto (Giba) e Allan Chiea, com muita paciência e prontidão me ajudaram e socorreram em toda minha trajetória.

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoa de nível superior (CAPES) por fomentar esta pesquisa.

“Happiness can be found even in the darkest of times, if one only remebers to turn on the light”

(Alvo Dumbledore)

RESUMO

OLIVEIRA, RG. **Terapia celular com células estromais mesenquimais alogênicas e xenogênicas em modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase ou fumaça de cigarro.** 2018. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é caracterizada por uma limitação às trocas gasosas, associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas e gases nocivos e representa um importante problema de saúde pública mundial. O enfisema, dentro do espectro da DPOC, apresenta como principal característica, o aumento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, resultantes da destruição das paredes alveolares, sem fibrose pulmonar significativa. A fumaça de cigarro representa o principal agente etiológico relacionado à DPOC, sendo que cerca de 85% dos casos da doença obstrutiva pulmonar estão associados ao hábito tabágico. Apesar da incorporação de novas estratégias terapêuticas e de reabilitação, não se obteve até o presente uma forma de tratamento clínico eficaz. Neste contexto, as células estromais mesenquimais representam uma nova alternativa terapêutica interessante e promissora. O objetivo deste projeto foi avaliar a eficácia terapêutica resultante do emprego da terapia celular alogênica e xenogência com células estromais mesenquimais de tecido adiposo (ASC) em modelo experimental de indução de enfisema pulmonar por instilação de protease ou por exposição à fumaça de cigarro. Ao final dos protocolos de indução do enfisema pulmonar os animais foram tratados com células estromais mesenquimais oriundas do tecido adiposo de humanos, ratos, camundongos ou porcos. Foram realizadas análises de mecânica ventilatória, análises morfológicas e histológicas com material biológico dos diferentes grupos experimentais, como também a caracterização quanto aos marcadores de superfície e diferenciação celular in vitro ASC. A partir dos resultados obtidos nos testes respiratórios, não foi possível observar diferença entre os grupos controle e tratados, seja por instilação de elastase ou por exposição à fumaça de cigarro. Entretanto, para os animais do grupo pASC, expostos à fumaça de cigarro, foi observado melhora na morfologia pulmonar após tratamento com ASC de porcos. A análise diferencial das células inflamatórias presentes no lavado broncoalveolar (LBA) revelou a ausência de um

quadro inflamatório característico de um enfisema pulmonar. As células isoladas das diferentes fontes apresentaram característica morfológica típica de ASC, capacidade de diferenciação nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, como também apresentaram baixa contaminação por outros tipos celulares no teste de citometria de fluxo. O transplante alogênico e xenogênico de ASC representa uma proposição inédita em termos de terapia celular com células estromais mesenquimais em modelo experimental de enfisema pulmonar. Os protocolos para indução do enfisema pulmonar adotados não permitiram a detecção morfológica e funcional da doença. Da mesma forma, não foi possível verificar eficácia terapêutica das ASC no parênquima pulmonar dos animais, após a infusão de células alogências e xenogênicas. Em função destes resultados, deve-se considerar a necessidade de revisão dos protocolos, bem como a padronização dos parâmetros metodológicos para indução do enfisema pulmonar em modelos experimentais.

Palavras-chave: Terapia celular. Células estromais mesenquimais. Tecido adiposo. Mecânica ventilatória. Caracterização celular.

ABSTRACT

OLIVEIRA, RG. **Cell therapy with allogeneic or xenogeneic mesenchymal stromal cells in an experimental model of pulmonary emphysema induced by elastase instillation or cigarette smoke exposure.** 2018. 96 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is characterized by a limitation of gas exchange associated with an abnormal inflammatory response of the lungs to harmful particles and gases and represents a major public health problem worldwide. Emphysema, within the spectrum of COPD, presents as the main characteristic, the increase of the air spaces distal to the terminal bronchiole, resulting from the destruction of the alveolar walls, without significant pulmonary fibrosis. Cigarette smoke represents the main etiological agent related to COPD, and about 85% of the cases of obstructive pulmonary disease are associated with smoking. Despite the incorporation of new therapeutic and rehabilitation strategies, a form of effective clinical treatment has not yet been obtained. In this context, mesenchymal stromal cells represent a new interesting and promising therapeutic alternative. The objective of this project was to evaluate the therapeutic efficacy resulting from the use of allogeneic and xenogeneic cell therapy with adipose-derived stem cells (ASC) in an experimental model of pulmonary emphysema inducted by protease instillation or cigarette smoke exposure. At the end of the protocols for induction of pulmonary emphysema, the animals were treated with adipose-derived stem cells from humans, rats, mice or pigs. Ventilatory mechanics analyzes, morphological and histological analyzes with biological material of the different experimental groups were performed, as well as the characterization of surface markers and in vitro cellular differentiation ASC. From the results obtained in the respiratory tests, it was not possible to observe difference between the control and treated groups, either by instillation of elastase or exposure to cigarette smoke. However, for animals of the pASC group exposed to cigarette smoke, an improvement in lung morphology was observed after treatment with ASC of pigs. Differential analysis of the inflammatory cells present in bronchoalveolar lavage (BAL) revealed the absence of an inflammatory condition characteristic of pulmonary emphysema. Cells isolated from the different sources presented a typical morphological characteristic of ASC,

differentiation capacity in the adipogenic, osteogenic and chondrogenic lines, and presented low contamination by other cell types in the flow cytometry test. The allogeneic and xenogeneic ASC transplantation represents an unprecedented proposition in terms of cell therapy with mesenchymal stromal cells in an experimental model of pulmonary emphysema. The protocols for induction of pulmonary emphysema adopted did not allow the morphological and functional detection of the disease. Likewise, it was not possible to verify the therapeutic efficacy of ASCs in the pulmonary parenchyma of the animals after the infusion of allogeneic and xenogenic cells. Due to these results, consideration should be given to the need to review the protocols, as well as standardization of methodological parameters for induction of pulmonary emphysema in experimental models.

Keywords: Cell therapy. Mesenchymal stromal cells. Adipose tissue. Ventilatory mechanics. Cell characterization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esteira motorizada para teste de esforço. 34
Figura 2 - Procedimento cirúrgico para indução do enfisema pulmonar por instilação intratraqueal de elastase. 35
Figura 3 - Perfusão dos pulmões. 36
Figura 4 - Procedimento para coleta do lavado broncoalveolar. 39
Figura 5 - Tecido adiposo humano sendo preparado para a desinfecção inicial. 39
Figura 6 - Etapas do isolamento das ASC do tecido adiposo humano. 41
Figura 7 - Extração do tecido adiposo de ratos *Wistar.* 42
Figura 8 - Etapas do isolamento de ASC de porco. 45
Figura 9 - Infusão intravenosa (veia caudal) de ASC. 50
Figura 10 - Perfusão dos pulmões. 50
Figura 11 - Análise morfométrica dos pulmões. 51
Figura 12 - Distância percorrida (metros) durante teste de esforço em esteira motorizada dos diferentes grupos experimentais. 54
Figura 13 - Distância percorrida (metros) em esteira motorizada durante teste de esforço nas diferentes etapas do protocolo experimental. 55
Figura 14 - Fotomicrografias das lâminas histológicas dos pulmões direito e esquerdo dos diferentes grupos experimentais (FASE 1). 57
Figura 15 - Valores do intercepto linear médio (Lm) - FASE 1. 58
Figura 16 - Parâmetros empregados para avaliação da mecânica ventilatória dos pulmões nos diferentes grupos experimentais. 59
Figura 17 - Fotomicrografia de lâmina de LBA. 60
Figura 18 - Comparação dos diferentes tipos celulares presentes no LBA dos grupos experimentais. 61
Figura 19 - Fotomicrografia das lâminas histológicas dos pulmões direito e esquerdo dos diferentes grupos experimentais (FASE 2). 62
Figura 20 - Valores do intercepto linear médio (Lm) - FASE 2. 63
Figura 21 - Fotomicrografia de culturas primárias das ASC obtidas de diferentes fontes 654
Figura 22 - Culturas de ASC com formação de monocamada 65

Figura 23 - Histograma representativo para marcadores de hASC avaliados por citometria de fluxo. 67
Figura 24 - Histograma representativo para marcadores de pASC avaliados por citometria de fluxo. 67
Figura 25 - Histograma representativo para marcadores de rASC avaliados por citometria de fluxo. 68
Figura 26 - Histograma representativo para marcadores de cASC avaliados por citometria de fluxo. 70
Figura 27 - Diferenciações das ASC em adipócitos, condrócitos e osteócitos dos diferentes grupos experimentais.....70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	α-1-antitripsina
AA	Antibiótico-antimicótico
ANOVA	Análise de variância, do inglês analysis of variance
APC	Aloficocianina, do inglês allophycocyanin
ASC	Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo, do inglês adipose-derived stem cell
bg	*Beigemice*
cASC	Células estromais mesenquimais do tecido adiposo de camundongos ou grupo de animais tratados com infusão de células estromais de camundongo
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CONEP	Comissão nacional de ética em pesquisa
CT	Células-tronco
CTA	Células-tronco adultas
CTRL	Grupo de animais que não foram submetidos ao protocolo de indução do enfisema e não receberam qualquer tratamento
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, do inglês fluorescein isothiocyanate
FUM	Grupo de animais expostos à fumaça de cigarro e tratados
GOLD	Iniciativa global para doença pulmonar obstrutiva crônica, do inglês global initiative for chronic obstructive lung disease
Gtis	Resistência tecidual
hASC	Células estromais mesenquimais do tecido adiposo humano ou grupo de animais tratados com infusão de células estromais humanas
ISCT	Sociedade internacional de terapia celular, do inglês internacional society fo cellular therapy
H&E	Corante hematoxilina-eosina
Htis	Elastância do tecido pulmonar

LBA	Lavado broncoalveolar
Lm	Intercepto linear médio
Li	Número de interceptos de estruturas alveolares com as retas do retículo
Ltot	Comprimento total das retas do retículo de Weibel
MSC	Células estromais mesenquimais, do inglês mesenchymal stem cell
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês major histocompatibility complex
n	Tamanho amostral
OMS	Organização mundial da saúde
pa/pa	*Pallidmice*
pASC	Células estromais mesenquimais do tecido adiposo de porcos ou grupo de animais que receberam infusão de células estromais mesenquimais de porco
PBS	Solução salina tamponada com fosfato, do inglês phosphate buffered saline
PE	Ficoeritrina, do inglês phycoerythrin
PCR	Reação em cadeia de polimerase, do inglês polymerase chain reaction
PPE	Elastase pancreática de porco, do inglês porcine pancreatic elastase
rASC	Células estromais mesenquimais do tecido adiposo de ratos ou grupo de animais que receberam infusão de células estromais mesenquimais de rato
Raw	Resistência isolada das vias aéreas
SFB	Soro fetal bovino
TA	Tecido adiposo
TSK-/+	*Tightskin*
Unesp	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
VEH	Grupo de animais que tiverem o enfisema pulmonar induzido e receberam tratamento com solução salina sem células

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
"	Polegadas
cm	Centímetros
cm^2	Centímetros quadrados
cm^3	Centímetros cúbicos
cm/s	Centímetros por segundo
CO_2	Gás carbônico
g	Gramas
g	Aceleração da gravidade
G	Calibre
h	Horas
kg	Quilogramas
m	Metros
mA	Miliampère
m/min	Metros por minuto
mg	Miligramas
mg/kg	Miligramas por quilograma
mg/mL	Miligramas por mililitros
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
pH	Potencial hidrogeniônico
µL	Microlitro
µm	Micrômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
2 REVISÃO DE LITERATURA 24
2.1 Modelos experimentais de DPOC 24
2.1.1 Indução de DPOC pelo uso de proteases 24
2.1.2 Modelos genéticos de DPOC 25
2.1.3 Indução de DPOC por exposição à fumaça de cigarro 26
2.2 Terapia celular em enfisema pulmonar 27
2.3 Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo 29
3 MATERIAL E MÉTODOS 32
3.1 Divisão experimental 32
3.1.1 FASE 1 – Indução do enfisema por instilação de elastase 32
3.1.1.1 Animais 32
3.1.1.2 Grupos experimentais 32
3.1.1.3 Teste de esforço em esteira motorizada 33
3.1.1.4 Indução de enfisema pulmonar por elastase 34
3.1.1.5 Lavado broncoalveolar 35
3.1.2 FASE 2 – Indução da DPOC por exposição à fumaça de cigarro 37
3.1.2.1 Animais 37
3.1.2.2 Grupos experimentais 37
3.1.2.3 Indução do enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro 37
3.1.2.4 Mecânica ventilatória dos pulmões 38
3.1.2.5 Lavado broncoalveolar 38
3.2 Obtenção e cultivo das células estromais mesenquimais de tecido adiposo 39
3.2.1 Obtenção do tecido adiposo humano 39
3.2.2 Isolamento das células estromais mesenquimais do tecido adiposo humano (hASC) 40
3.2.3 Obtenção do tecido adiposo de ratos 41
3.2.4 Isolamento das células estromais mesenquimais do tecido adiposo de ratos (rASC) 42
3.2.5 Obtenção do tecido adiposo de camundongos 43
3.2.6 Isolamento das células estromais mesenquimais do tecido adiposo de camundongos (cASC) 43
3.2.7 Obtenção do tecido adiposo de porcos 44
3.2.8 Isolamento das células estromais mesenquimais do tecido adiposo de porcos (pASC) 45
3.2.9 Manutenção e proliferação das ASC 46
3.2.10 Procedimento de criopreservação das ASC 46
3.3 Caracterização das células estromais mesenquimais do tecido adiposo 47
3.3.1 Citometria de fluxo 47
3.3.2 Diferenciações celulares 48
3.4 Transplante celular 49

3.5 Análise histológica 50
3.6 Morfometria – medida do intercepto linear médio (Lm) 51
3.7 Análises estatísticas 52
3.8 Aspectos éticos 52
4 RESULTADOS 53
4.1 FASE 1 – Indução do enfisema por instilação de elastase 53
4.1.1 Teste de esforço em esteira 53
4.1.2 Lavado broncoalveolar 55
4.1.3 Morfometria – medida do intercepto linear médio 56
4.2 FASE 2 – Indução do enfisema por exposição à fumaça de cigarro 58
4.2.1 Mecânica ventilatória dos pulmões 58
4.2.2 Lavado broncoalveolar 59
4.2.3 Morfometria – medida do intercepto linear médio 61
4.3 Isolamento, cultivo e proliferação das células estromais mesenquimais do tecido adiposo 63
4.4 Caracterização das células estromais mesenquimais do tecido adiposo 65
4.4.1 Citometria de fluxo 65
4.4.2 Diferenciações condrogênica, osteogênica e adipogênica das ASC 69
5 DISCUSSÃO 71
5.1 FASE 1 – Indução do enfisema por instilação de elastase 71
5.2 FASE 2 – Indução do enfisema por exposição à fumaça de cigarro 74
5.3 Isolamento, cultivo e caracterização celular 77
6 CONCLUSÕES 79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 80
APÊNDICE(S) 90

1 INTRODUÇÃO

Em 1998, o programa Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) foi criado com o intuito de elaborar um relatório contendo as estratégias para o diagnóstico, conduta e prevenção da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), com base nas melhores informações científicas disponíveis. Segundo o relatório de 2017 (GOLD, 2017) a DPOC é definida como uma “doença comumente prevenível e tratável, caracterizado por sintomas respiratórios persistentes e limitação do fluxo aéreo, devido a anormalidades das vias aéreas e/ou alveolares, normalmente causadas por exposição significativa a partículas ou gases nocivos”. Caracteriza-se, ainda, por uma limitação de troca gasosa lenta e obstrutiva, com aceleração da perda da função pulmonar, que culmina em incapacitação e, consequentemente, morte prematura (ANTUNES; SILVA; ROCCO, 2017; GEIGER; HIRSCH; HERMANN, 2017; GOLD, 2017; HE et al., 2015; JARDIM et al., 2007; KRUK et al., 2018; RIBEIRO-PAES et al., 2009).

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é considerada um grave problema de saúde pública, apresentando alta prevalência e considerável impacto econômico e social (CHENG et al., 2017; GOLD, 2017; KIM et al., 2015; LONGHINI-DOS-SANTOS et al., 2018; MURRAY; LOPEZ, 1997). Atualmente, a DPOC é considerada a quarta causa de morte no mundo e, segundo estimativas recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS), 210 milhões de indivíduos sofrem da doença, sendo 80 milhões de grau moderado e severo. Estima-se que em 2020 a DPOC atingirá a terceira posição em causa de morte, devido à exposição contínua aos fatores de risco, em especial à fumaça de cigarro (FARIA et al., 2012; GOLD, 2017; WHO, 2008). Considerando-se que os tabagistas representam cerca de 24% da população brasileira e que, do total de fumantes, 15% irão desenvolver DPOC, pode-se estimar uma prevalência de 5 a 6 milhões de pessoas acometidas por doença pulmonar obstrutiva no Brasil (JARDIM et al., 2007; RIBEIRO-PAES et al., 2009).

A limitação crônica de troca gasosa característica da DPOC é causado pela combinação da bronquiolite com o enfisema, sendo que a contribuição de cada um dos agentes causadores varia de pessoa para pessoa e podem ocorrer ou não concomitantemente (ANTUNES; SILVA; ROCCO, 2017; RAHMAN et al., 2017;

GOLD, 2017; KRUK et al., 2018; MATTOS et al., 2009). A inflamação crônica pulmonar acarreta mudanças estruturais, estreitamento das vias aéreas e destruição do parênquima (BARNES; SHAPIRO; PAUWELS, 2003; FARIA et al., 2012; GOLD, 2017; JARDIM et al., 2007; RIBEIRO-PAES et al., 2009; SAETTA et al., 2001).

A DPOC pode ser entendida como uma doença sistêmica com várias comorbidades que acompanham a doença de base, e que estão associadas aos mesmos fatores de risco (tabagismo, envelhecimento, inatividade etc.). Nos casos de patologias secundárias coexistindo com a DPOC, os tratamentos devem ser realizados de forma concomitante, independentemente de existir uma relação entre a doença e a DPOC. Dentre as comorbidades mais comuns, destacam-se as doenças cardiovasculares, fibrose pulmonar, anemia, osteoporose, diabetes e síndrome metabólica, desordens de ansiedade e depressão. (CAVAILLÈS et al., 2013; GOLD, 2017).

O enfisema pulmonar, dentro do espectro da DPOC, apresenta como principal característica a destruição do parênquima alveolar, o alargamento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal e a redução da área de trocas gasosas, sem fibrose significativa. Por consequência, os pacientes sofrem com oxigenação inadequada e quadro de dispneia (FARIA et al., 2012; GOLD, 2017; KRUK et al., 2018).

O principal fator de risco para o enfisema pulmonar é a prática do tabagismo (GOLD, 2017; HE et al., 2015; KIM et al., 2015; KRUK et al., 2018; LONGHINI-DOS-SANTOS et al., 2018; MATTOS et al., 2009; RAHMAN et al., 2017; WHO, 2008). Outros fatores causais incluem a poluição atmosférica e exposição ocupacional a poluentes, que contribuem para a aceleração da perda funcional e morfológica pulmonar, limitando gradualmente as trocas gasosas (LEE; SANDFORD; MAN, 2011; LONGHINI-DOS-SANTOS et al., 2018). Cerca de 90% dos casos apresenta um padrão multifatorial, relacionado à interação entre fatores genéticos e agentes agressores. Uma outra parcela, menos significativa do ponto de vista epidemiológico, que corresponde à cerca de 1 a 3% dos casos, é decorrente da deficiência da protease sérica α-1-antitripsina (AAT), anomalia genética com padrão de herança autossômico recessivo. (BASSI, 2014; FARIA et al., 2012; FERREIRA, 2014; FREITAS, 2009; LONGHINI-DOS-SANTOS, 2014; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; RIBEIRO-PAES et al., 2012; STESSUK et al., 2013).

Apesar de uma série de importantes avanços no que concerne ao arsenal terapêutico farmacológico e de técnicas de reabilitação, não se dispõe, até o momento, de nenhuma abordagem terapêutica curativa para a DPOC. Os tratamentos existentes podem ser considerados apenas paliativas, com melhora dos sintomas e qualidade de vida, sem, no entanto, resultar na cura dos pacientes ou inibir a progressão da doença. (ANTUNES; SILVA; ROCCO, 2017; CHAPMAN et al., 2011; CHENG et al., 2017; FARIA et al., 2012; FREITAS, 2009; LONGHINI-DOS-SANTOS, 2014; MAGNUSSEN et al., 2014. OLIVEIRA et al., 2013; KLOOSTER et al., 2015, RIBEIRO-PAES et al., 2009, 2011, 2014; RIBEIRO-PAES; STESSUK; KOZMA, 2012; STESSUK et al., 2013). Diante deste contexto, buscou-se neste trabalho testar a eficácia de uma metodologia inédita para a terapia do enfisema pulmonar induzido por elastase ou exposição à fumaça de cigarro com o emprego de células estromais mesenquimais do tecido adiposo oriundas de diferentes fontes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Modelos experimentais de DPOC

Considerando o aspecto paliativo dos tratamentos disponíveis para a DPOC, os modelos animais tornam-se uma ferramenta de grande importância pois permitem extrapolações quanto à patofisiologia da doença humana. Outro aspecto interessante da manipulação animal em laboratório compreende à possibilidade de investigar e ampliar as abordagens terapêuticas existentes. Dentre os modelos animais de enfisema pulmonar existentes na literatura, destacam-se o uso de proteases, exposição à fumaça de cigarro e utilização de linhagens que apresentam mutações naturais ou induzidas por manipulação genética (BROEKMAN et al., 2018; GEIGER; HIRSCH; HERMANN, 2017; HE et al., 2015; KRUK et al., 2018; MARCELINO et al., 2014; RAHMAN et al., 2017).

2.1.1 Indução de DPOC pelo uso de proteases

O uso de proteases em modelo de indução de enfisema pulmonar foi pioneiramente descrito por Gross, Pfitzer e Tolker (1965), utilizando de uma enzima proteolítica (papaína) para o desenvolvimento da doença nos animais. Este estudo teve papel fundamental para o surgimento de novos modelos de indução de enfisema pulmonar por instilação de proteases, além de fundamentar os conhecimentos sobre as características fisiopatológicas da DPOC. A partir deste trabalho, pode-se também fortalecer a hipótese do desequilíbrio protease-antiprotease que explica o desenvolvimento do enfisema pulmonar, devido à significativa destruição do tecido alveolar, causada pela administração da papaína.

Esta metodologia para indução do enfisema pulmonar teve grande impacto entre os pesquisadores da DPOC por se tratar de uma técnica simples e de fácil reprodução, que proporciona o surgimento de alterações morfológicas e funcionais características da doença humana em um período de tempo inferior (aproximadamente 21 dias em camundongos) às outras metodologias existentes,

como por exemplo, a exposição à fumaça de cigarro (até 6 meses em camundongos) (MARCELINO et al., 2014; RINALDI, et al., 2012; RIBEIRO-PAES et al., 2012).

A elastase pancreática de porco (porcine pancreatic elastase – PPE) é a enzima proteolítica mais utilizada em protocolos de indução de enfisema pulmonar em modelo animal. A instilação intratraqueal de elastase resulta no alargamento dos espaços aéreos pulmonares, acúmulo macrofágico e neutrofílico nos pulmões, além da ocorrência de hemorragias (FUJITA; NAKANISHI, 2007; KAWAKAMI et al., 2008; KRUK et al., 2018; SHAPIRO, 2000). Este modelo resulta ainda em alterações morfológicas e funcionais que são detectáveis mesmo após longos períodos à administração da enzima (ANTUNES; ROCCO, 2011; MARCELINO et al., 2014).

Em contrapartida, o uso de proteases para a indução da DPOC em modelo animal apresenta alguns aspectos divergentes à doença humana, por exemplo, a ausência ou surgimento tardio de componentes inflamatórios responsáveis pela obstrução das vias aéreas, e por consequência, o fluxo aéreo (MARCH et al., 2000).

O modelo de indução de DPOC por meio de instilação de proteases representa uma alternativa simples, reprodutível e bastante útil em estudos relacionados à doença, principalmente na avaliação da eficácia de novas terapêuticas para a reparação do tecido pulmonar lesado pela ação proteolítica das enzimas (ANTUNES; ROCCO, 2011; KRUK et al., 2018; SHAPIRO, 2000).

2.1.2 Modelos genéticos de DPOC

Os modelos genéticos representam uma inovadora ferramenta para o estudo da DPOC. Estes consistem no uso de linhagens de camundongos que apresentam mutações naturais ou induzidas (*gene targeting*) geralmente relacionadas à baixa ou disfuncional produção de proteínas importantes para o desenvolvimento pulmonar, ou à antiproteases, como a α-1-antitripsina. Tais alterações genéticas acabam por gerar anormalidades no desenvolvimento animal culminando no surgimento da DPOC (MARCELINO et al., 2014; RAHMAN et al., 2017; RIBEIRO-PAES et al., 2012; SHAPIRO, 2000; WRIGHT et al., 2008).

Dentre as linhagens de camundongos descritas na literatura, destacam-se os *Tightskin* (Tsk-/+) e *Pallidmice* (pa/pa), que apresentam produção deficiente da

antiprotease α-1-antitripsina, tornando-os propensos ao desenvolvimento do enfisema pulmonar (KIELTY et al., 1998; MARTORANA et al., 1989; MARCH et al., 2000), assim como os *Beigemice* (bg), que desenvolvem alterações no tecido pulmonar características da DPOC (KEIL, 1996; MARCH et al., 2000).

Dessa forma, a criação de modelos genéticos para o estudo da DPOC é de grande importância, uma vez que as linhagens mimetizam uma série de aspectos ligados a fisiopatologia da doença humana, proporcionando maior compreensão do papel de determinadas proteases no desenvolvimento da doença, bem como dos processos inflamatórios envolvidos.

2.1.3 Indução de DPOC por exposição à fumaça de cigarro

Na tentativa de aproximar os modelos experimentais com a doença humana, principalmente em relação aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na geração do enfisema, Huber et al. (1980) propuseram o primeiro modelo animal de indução do enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro (FARIA et al., 2012; KOZMA et al., 2014; MARCELINO et al., 2014).

Os estudos utilizando este modelo em murinos revelaram que a exposição contínua à fumaça de cigarro estimula o surgimento do infiltrado inflamatório que está diretamente envolvido com a degeneração do parênquima pulmonar. Assim, podem ser visualizados uma série de aspectos relacionados à anatomia e fisiopatologia da DPOC humana (enfisema, remodelamento das vias aéreas inferiores e hipertensão pulmonar) (KRUK et al., 2018; WRIGHT; CHURG, 2010).

Os modelos experimentais de indução de DPOC a partir da exposição à fumaça de cigarro são relativamente recentes se comparados a outras metodologias. Portanto, ainda não há um consenso entre os pesquisadores quanto a uma série de parâmetros, tais como a forma como o animal é exposto à fumaça, tipo de câmara de exposição, número de cigarros utilizados e, principalmente, o período total de exposição (BRACKE et al., 2006; CENDON et al., 1997; KOZMA et al., 2014; KRUK et al., 2018; RAHMAN et al., 2017; RIBEIRO-PAES et al., 2012; RINALDI et al., 2012; SCHWEITZER et al., 2011; WRIGTH et al., 2008; ZHENG et al., 2009).

Na literatura, há uma grande variação entre diferentes autores no que se refere ao período de exposição, sendo que os melhores resultados são obtidos

durante períodos crônicos de exposição (acima de 6 meses) (BRACKE et al., 2006; WRIGTH et al., 2008; ZHENG et al., 2009). Entretanto, Peron e colaboradores (2015) demonstraram o estabelecimento do enfisema pulmonar em camundongos fêmeas C57BL/6 por meio de exposição diária à fumaça de cigarro, durante 75 dias.

A origem da fumaça que entra em contato com os animais também representa outro fator divergente entre os modelos existentes. Na literatura, é possível encontrar trabalhos que utilizaram a fumaça da queima lenta do cigarro, simulando assim as condições fisiológicas de um “fumante passivo”, enquanto que outros utilizam um aparato de aspiração que emitira a fumaça do cigarro “tragada” para outro compartimento, onde se encontram os animais, simulando a condição de um “fumante ativo” (HUH et al., 2011; JARDIM et al., 2010; TOLEDO et al., 2012; ZHANG et al., 2011; ZHENG et al., 2009). Apesar disso, a exposição à fumaça originadas por ambos os métodos tem induzido enfisema em animais, sendo que, o grau da doença está relacionado ao período total de exposição (WRIGTH et al., 2008).

O emprego do modelo experimental para indução de DPOC/enfisema por exposição à fumaça de cigarro é de grande importância, pois corresponde ao modelo que reproduz de forma mais fiel a patologia humana, sobretudo no que se refere aos aspectos fisiopatológicos e morfológicos que caracterizam a doença (KOZMA et al., 2014; LONGHINI-DOS-SANTOS et al., 2013; LONGHINI-DOS-SANTOS et al., 2014; MARCELINO et al., 2014; WRIGTH et al., 2008; WRIGHT; CHURG, 2010).

2.2 Terapia celular em enfisema pulmonar

As abordagens terapêuticas atuais para a DPOC apresentam potencial limitado, proporcionando controle dos sintomas, porém sem mudar de forma significante o curso natural da doença. Neste contexto, faz-se necessário a busca por novas terapias mais eficazes ou curativas. A terapia celular com células-tronco vem sendo aplicada em modelos experimentais e protocolos clínicos em pacientes humanos, como alternativa terapêutica promissora para a DPOC/enfisema pulmonar (BROEKMAN et al., 2018; FARIA et al., 2012; KRUK et al., 2018).

Em 1995, Pereira e colaboradores demonstraram que as células da medula óssea podem migrar para o pulmão e atuar como precursores de células locais. Por meio de técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR), constataram a presença de células da medula no parênquima pulmonar por um período de até cinco meses. Posteriormente, outros autores mostraram, por diferentes metodologias, em modelos experimentais e pacientes humanos, que células-tronco adultas (CTA) também podem migrar para o parênquima pulmonar e desencadear respostas biológicas que auxiliam na recuperação fisiológica do pulmão (ANTUNES; SILVA; ROCCO, 2017; LONGHINI-DOS-SANTOS et al., 2013; LONGHINI-DOS-SANTOS et al., 2018; RIBEIRO-PAES, et al., 2009, 2012; ROJAS et al., 2005; YAMADA et al., 2004).

Suratt et al. (2003) evidenciaram a migração e incorporação de células-tronco (CT) da medula óssea de doadores do sexo masculino em tecido do pulmão de pacientes do sexo feminino. Os resultados obtidos neste estudo forneceram o referencial teórico que justifica o emprego de CT em terapias para a regeneração do tecido pulmonar (FARIA et al., 2012; FREITAS, 2009; OLIVEIRA et al., 2013; RIBEIRO-PAES et al., 2009, 2011).

Longhini-dos-Santos et al. (2013) mostraram a recuperação morfológica do parênquima pulmonar de camundongos tratados com células mononucleares da medula óssea após sofrerem lesão por instilação intranasal de elastase. Este trabalho mostrou a migração celular e permanência das células no pulmão por até 21 dias.

Estudos em modelos animais (ratos e camundongos) têm demonstrado que a administração das células mesenquimais é um processo eficaz e seguro (BROEKMAN et al., 2018; CHENG et al., 2017; LE BLANC et al., 2008; REINDERS et al., 2010; ROJAS et al., 2005), apresentando resultados satisfatórios em modelos animais de DPOC, uma vez que desaceleram as alterações degenerativas características do enfisema (ANTUNES; SILVA; ROCCO, 2017; GEIGER; HIRSCH; HERMANN, 2017; LONGHINI-DOS-SANTOS et al., 2018; ZHENG, 2009). Quando administradas em camundongos que sofreram instilação de bleomicina, as células mesenquimais migraram para o pulmão e apresentaram características de pneumócitos tipo I (KOTTON et al., 2001) bem como efeito protetor, reduzindo a fibrose e o quadro inflamatório (ORTIZ et al., 2003; ROJAS et al., 2005). O emprego

das células mesenquimais em camundongos com enfisema pulmonar induzido por elastase promoveu a regeneração pulmonar (KATSHA et al., 2011). Já em camundongos com enfisema pulmonar induzido por exposição à fumaça de cigarro, o tratamento com as células mesenquimais promoveu a recuperação do parênquima pulmonar e melhora aparente em outros aspectos da DPOC (GEIGER; HIRSCH; HERMANN, 2017; SCHWEITZER et al., 2011).

O primeiro relato mundial com emprego de terapia celular em pacientes humanos com enfisema pulmonar em grau avançado foi pulicado por Ribeiro-Paes et al. (2011). O acompanhamento destes pacientes por até 23 meses após a aplicação mostrou que a terapia celular com células-tronco em pacientes com enfisema representa uma abordagem terapêutica segura e com perspectivas potencialmente interessantes em DPOC (STESSUK et al., 2013).

O transplante alogênico e xenogênico de células estromais mesenquimais (MSC) vem sendo realizado em estudos clínicos e experimentais como proposta terapêutica para diferentes doenças, de forma segura e livre de reações adversas (CALIARI-OLIVEIRA et al., 2016; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ et al., 2015; LIU et al., 2016; MARIA et al., 2016; PIGOTT et al., 2013; WEISS et al., 2013). Apesar do pressuposto que as células autólogas apresentem baixa imunogenicidade, os procedimentos para obtenção e proliferação destas células demandam tempo, não podendo ser disponibilizadas para o tratamento imediato. O uso de células alo/xenogênicas derivadas de doadores saudáveis pode ser uma alternativa viável para tratamentos iniciais, devido a possibilidade de seu prévio isolamento, proliferação e estocagem (CALIARI-OLIVEIRA et al., 2016).

2.3 Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo

As células estromais mesenquimais constituem população heterogêneas de células estromais, multipotentes, não-hematopoiéticas e de aspecto fibroblastóide que têm sido objeto de grande interesse em estudos clínicos e pré-clínicos em função do grande potencial terapêutico na regeneração de órgãos e/ou tecidos lesados (BARBOZA et al., 2014; BROEKMAN et al., 2018; DOMINICI et al., 2006; GEIGER; HIRSCH; HERMANN, 2017; KRUK et al., 2018; LONGHINI-DOS-SANTOS et al., 2013; OLIVEIRA, 2013; SILVA et al., 2018). Estas células possuem

propriedades anti-apoptóticas e regenerativas que contribuem para a homeostase tecidual como também podem atuar em conjunto com as células do sistema imunológico na regulação de processos inflamatórios (BROEKMAN et al., 2018; LIU et al., 2016). Além disso, as MSC apresentam baixa expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), de modo que a resposta imune à essas células pode não ocorrer quando transplantadas (ASSONI, 2015; CALIARI-OLIVEIRA et al., 2016; LIU et al., 2016; WEISS et al., 2013).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, há três critérios básicos para que uma célula seja considerada mesenquimal: capacidade de aderência à superfície plástica; potencial de diferenciação (in vitro) em osso, cartilagem e tecido adiposo; além de apresentarem fenótipo antigênico padrão para esse tipo celular. Entretanto, dependendo da fonte de obtenção, processo de isolamento e características das células presentes na cultura, os marcadores de superfície podem se expressar quantitativamente de forma variável (BROEKMAN et al., 2018; DOMINICI et al., 2006; KRUK et al., 2018; OLIVEIRA, 2013; SILVA et al., 2018).

Estudos prévios demonstraram que as MSC podem ser obtidas de diferentes órgãos e tecidos, podendo a partir disto, serem cultivadas in vitro (BROEKMAN et al., 2018). O tecido adiposo (TA) destaca-se atualmente como importante fonte de MSC devido à grande disponibilidade de material, como também pela fácil obtenção, por meio de procedimentos pouco invasivos e com baixa incidência de morbi-mortalidade (BARBOZA et al., 2014; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ et al., 2015; GINANI; SOARES; KAKUDO et al., 2014; OLIVEIRA, 2013).

As células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ASC) humano foram pioneiramente isoladas por Zuk et al. (2001) e desde então, tem sido extensivamente estudadas, uma vez que podem ser adquiridas do próprio paciente, diferenciar-se em múltiplas linhagens celulares de maneira reprodutível, podendo o transplante ser seguro em hospedeiros autólogos, alogênicos e xenogênicos (BROEKMAN et al., 2018; CALIARI-OLIVEIRA et al., 2016; CHENG et al., 2017; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ et al., 2015; LIU et al., 2016; MARCELINO et al., 2015).

Considerando todos os aspectos discutidos anteriormente, objetivou-se com este projeto, avaliar a eficácia terapêutica resultante do emprego da terapia celular com células estromais mesenquimais obtidas do tecido adiposo de humanos,

porcos, ratos e camundongos em modelo de indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro ou instilação de elastase. Esta abordagem metodológica representa uma proposição inédita em termos de terapia celular com ASC em modelo experimental de enfisema pulmonar e abre novas perspectivas de estudo quanto a terapia celular com células estromais mesenquimais em transplantes alogênicos e xenogênicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3. 1 Divisão experimental

O presente estudo foi desenvolvido em duas etapas, denominadas FASE 1 e FASE 2. Diferentes protocolos para indução do enfisema pulmonar foram utilizados em cada fase, assim como a escolha do modelo animal, testes respiratórios aplicados, além dos métodos para a coleta e análise do lavado broncoalveolar. Os demais experimentos descritos foram desenvolvidos e analisados de forma análoga em ambas as fases.

3.1.1 FASE 1 – Indução do enfisema por instilação de elastase

3.1.1.1 Animais

Foram utilizados 20 ratos albinos machos da linhagem *Wistar*, espécie *Rattus norvegicus*, com 16 semanas de idade e peso entre 320 - 380 g. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno forradas com serragem, em sala com temperatura e luminosidade controladas (22 ± 2 °C; ciclos claro/escuro de 12 horas, respectivamente), e receberam dieta sólida em forma de *pellets* (Nuvilab; Paraná, Brasil) e água filtrada *ad libitum* durante todo o procedimento experimental, realizado em conformidade com os aspectos éticos do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências e Letras – Unesp / Assis (registro n° 005/2015).

3.1.1.2 Grupos experimentais

Os ratos foram submetidos ao protocolo de indução do enfisema pulmonar por instilação intratraqueal de elastase e divididos em cinco grupos experimentais (n= 5 / grupo) de acordo com o tratamento recebido:

a) **grupo VEH (Veículo):** animais tratados com o veículo (solução fisiológica) sem células;

b) **grupo hASC:** animais tratados com infusão de células estromais mesenquimais humanas em solução fisiológica;
c) **grupo rASC:** animais tratados com infusão de células estromais mesenquimais de rato em solução fisiológica;
d) **grupo pASC:** animais tratados com infusão de células estromais mesenquimais de porco em solução fisiológica.

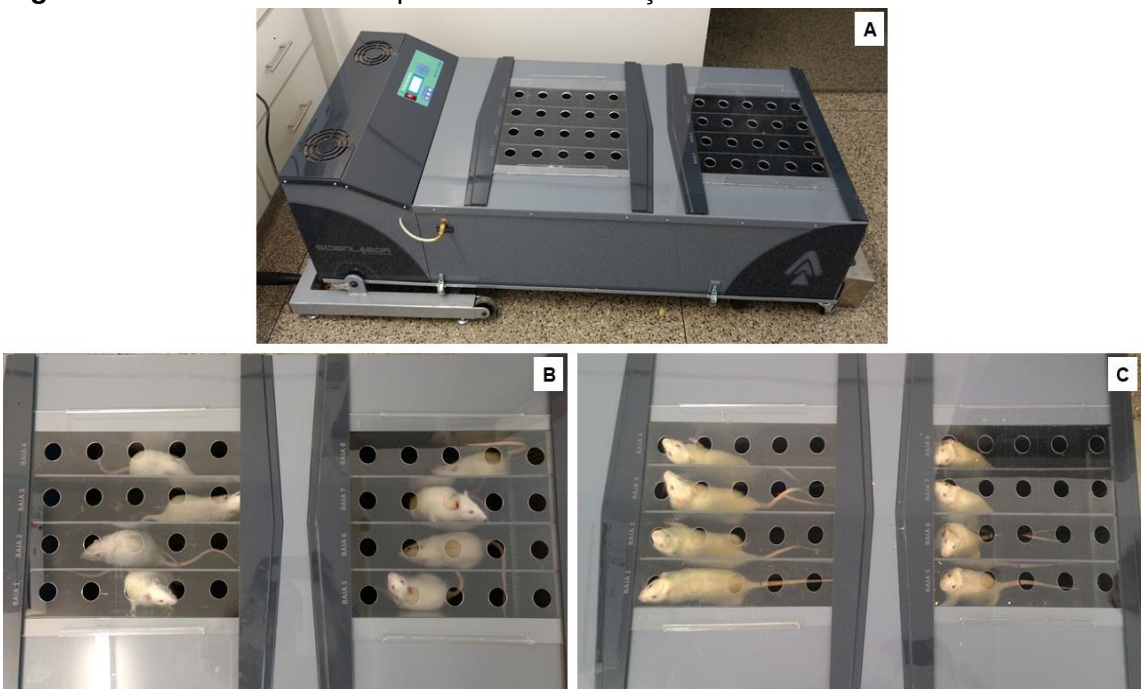
3.1.1.3 Teste de esforço em esteira motorizada

A fim de investigar alterações na capacidade respiratória dos animais decorrentes da indução do enfisema pulmonar e/ou da terapia celular, os ratos foram expostos a um protocolo de exercício físico em esteira motorizada em pontos estratégicos: antes da indução do enfisema; 14 dias após a indução do enfisema, momento antes dos grupos receberem a infusão das ASC; e 14 dias após a infusão das ASC, imediatamente antes da eutanásia dos animais. O teste de esforço foi realizado em uma esteira motorizada SLP 037 (Scienlabor, São Paulo, Brasil) que possui as seguintes características (Figura 1 - A):

a) 320 mm de altura x 570 mm de largura x 1440 mm de comprimento;
b) 8 baias;
c) painel com controle de velocidade digital (cm/s ou m/min) com indicador de tempo e distância;
d) ajuste de inclinação progressiva (0 a 60 graus);
e) grade de choque em cada baia (máximo 4 mA);
f) carenagem em acrílico.

Neste protocolo, os animais foram treinados durante 3 dias consecutivos com exercício de carga incremental, para habituação ao aparelho da esteira. O treinamento teve duração de 10 minutos diários, sendo que nos primeiros 4 min foi mantida uma velocidade constante de 5 m/min. Decorrido os primeiros minutos, a intensidade do exercício foi aumentada em 2 m/min a cada 3 min a 0% de grau de inclinação (Figura 1 - B e C). A primeira avaliação foi realizada dois dias após o término do treinamento.

Figura 1 - Esteira motorizada para teste de esforço.



A – Esteira motorizada utilizada para o teste de esforço; **B –** Animais posicionados nas baias antes do início do protocolo; **C –** Animais em corrida durante o desenvolvimento do teste. FONTE: Próprio autor.

As avaliações da capacidade respiratória foram realizadas com carga incremental, sendo que a intensidade do exercício era aumentada em 2 m/min a cada 3 min a 0% de inclinação, até a exaustão do animal. A exaustão foi interpretada pela permanência do mesmo por mais de 5 segundos na área de choque. Parâmetros como a distância e tempo percorrido foram registrados. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo um grupo avaliado no segundo dia subsequente ao término dos exercícios de treinamento e o segundo grupo avaliado no terceiro dia subsequente. O teste realizado durante os dois dias foi cuidadosamente desenvolvido dentro das mesmas condições.

3.1.1.4 Indução de enfisema pulmonar por elastase

O método de indução do enfisema pulmonar empregado foi, em linhas gerais, o mesmo descrito por Manchini (2010). Os animais dos grupos VEH, hASC, rASC e pASC foram anestesiados com 116 mg/kg de ketamina (Dopalen, Sespo, São Paulo, Brasil) combinados com 11,5 mg/kg de xilasina (Anasedan, Sespo, São Paulo, Brasil) e, em seguida, submetidos a uma microcirurgia para exposição da traqueia.

Com o auxílio de uma seringa de insulina, foram instilados 0,2 mL de elastase pancreática de porco 0258 (type IV - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluídos em solução salina tamponada pH 7,2 (PBS 1X - LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) na concentração de 2 mg/mL. Concluído o procedimento cirúrgico, os animais ficaram sob observação e mantidos aquecidos em luz vermelha (36 °C) até sua recuperação (Figura 2). Após a recuperação os animais foram levados de volta ao biotério e receberam analgésico diluído em água.

Figura 2 - Procedimento cirúrgico para indução do enfisema pulmonar por instilação intratraqueal de elastase.

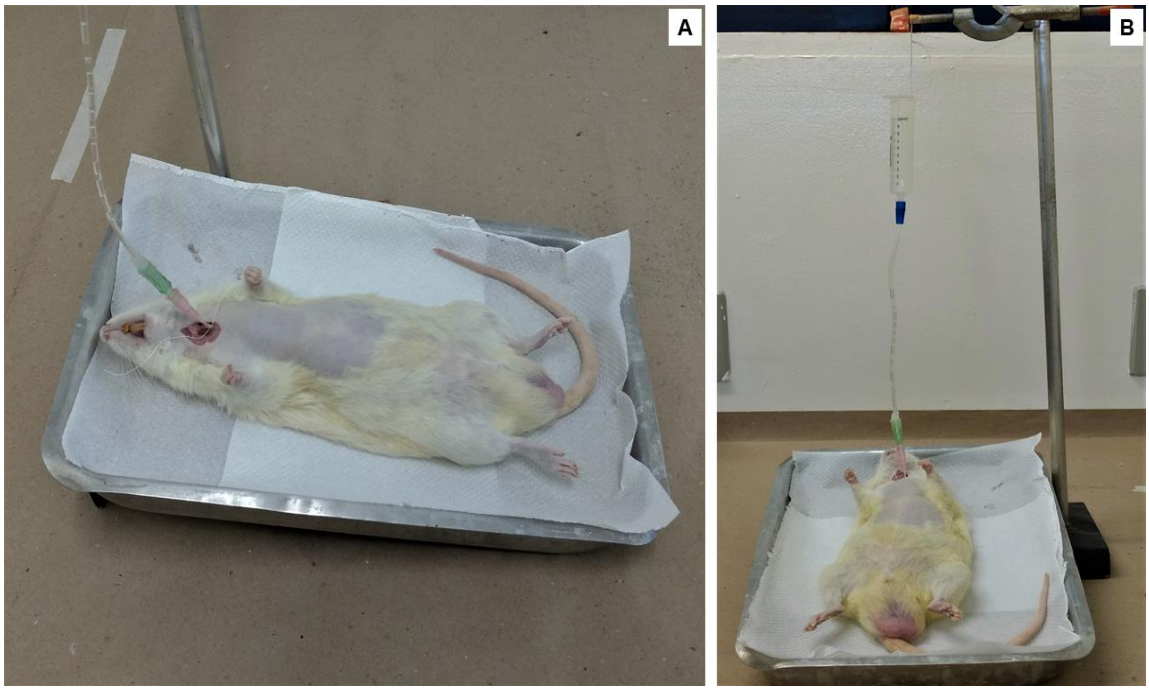
A - Animal anestesiado e tricotomizado na região de projeção da traquéia; **B -** Incisão superficial para exposição da traqueia; **C -** Instilação intratraqueal da elastase; **D –** Fechamento da incisão com sutura. FONTE: Próprio autor.

3.1.1.5 Lavado broncoalveolar

Após o último teste de exercício em esteira, os animais foram sacrificados com dose letal (400 mg/kg) de Tiopental Sódico (Cristália, SP, Brasil), por via intraperitonial. Os animais tiveram a traqueia exposta e canulada com o auxílio de um cateter intravenoso Angiocath 20G x 1,16" 1,1 x 30 mm (Becton Dickinson Ind. Cir. LTDA – Juiz de Fora – MG – Brasil) (Figura 3 - A). Foi conectado ao cateter, um aparato desenvolvido em nosso laboratório (Figura 3 - B) que consiste na junção de

uma seringa de 10 mL (sem o êmbolo) com uma cânula, para perfusão dos pulmões logo após a eutanásia dos animais.

Figura 3 - Perfusão dos pulmões.



A - Animal com a traqueia canulada e acoplada ao aparato (**B**) para a difusão do paraformaldeído nos pulmões. FONTE: Próprio autor.

O aparato de perfusão permite que se conserve a integridade física dos pulmões quando realizado o procedimento cirúrgico para a remoção dos mesmos. Assim, por ação da gravidade, foi instilado aproximadamente 14 mL de paraformaldeído 4% que permaneceu no pulmão do animal por 20 minutos. Após esse período de tempo, o aparato foi desconectado da cânula ainda inserida na traqueia, e a caixa torácica do animal foi levemente massageada para que o lavado broncoalveolar (LBA) pudesse ser expelido pela cânula. O material coletado foi centrifugado a 800 *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* celular foi ressuspendido em 0,3 mL de PBS 1X para contagem diferencial de células inflamatórias em câmara hematimétrica de Neubauer, considerando-se macrófagos, linfócitos, células polimorfonucleares e outros tipos celulares.

3.1.2 FASE 2 – Indução do enfisema por exposição à fumaça de cigarro

3.1.2.1 Animais

Foram utilizados 47 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*, espécie *Mus musculus*, com 8 semanas de idade e peso entre 30 - 40 g. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno forradas com serragem, em sala com temperatura e luminosidade controladas (22 ± 2 °C; ciclos claro/escuro de 12 horas, respectivamente), e receberam dieta sólida em forma de *pellets* (Nuvilab; Paraná, Brasil) e água filtrada *ad libitum* durante todo o procedimento experimental, realizado em conformidade com os aspectos éticos do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências e Letras – Unesp / Assis (registro n° 005/2015).

3.1.2.2 Grupos experimentais

Os camundongos foram divididos em cinco grupos experimentais:

a) **grupo CTRL (Controle):** animais que não foram submetidos ao protocolo de indução de enfisema e não receberam qualquer tratamento (n=10);
b) **Grupo FUM (Fumaça):** animais expostos à fumaça de cigarro e tratados com o veículo (solução fisiológica) sem células (n=10);
c) **Grupo hASC:** animais tratados com infusão de células estromais mesenquimais humanas em solução fisiológica (n=9);
d) **Grupo cASC:** animais tratados com infusão de células estromais mesenquimais de camundongo em solução fisiológica (n=9);
e) **Grupo pASC:** animais tratados com infusão de células estromais mesenquimais de porco em solução fisiológica (n=9).

3.1.2.3 Indução do enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro

O protocolo para indução do enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro, como também o aparato utilizado, foram os mesmos descritos por Longhini-dos-Santos (2014) com modificações. Os animais dos grupos FUM, hASC, cASC e

pASC foram expostos à fumaça de 36 cigarros por dia, sem interrupções, durante 120 dias. Os cigarros utilizados neste projeto foram da marca Derby® (Souza Cruz, Rio de Janeiro, Brasil), embalagem vermelha com 20 unidades, sendo cada unidade composta por um filtro, 10 mg de alcatrão, 10 mg de monóxido de carbono e 0,8 mg de nicotina.

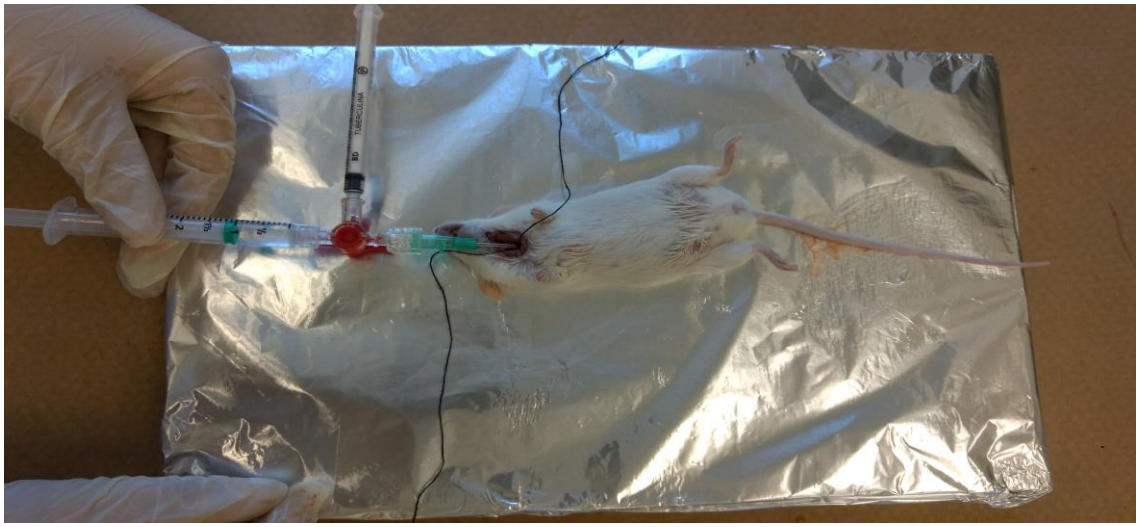
3.1.2.4 Mecânica ventilatória dos pulmões

Após 14 dias do tratamento dos grupos experimentais com infusão das ASC, os animais foram anestesiados com Tiopental Sódico (70 mg/kg, via intraperitoneal), traqueostomizados com um cateter intravenoso 20G e conectados a um respirador para pequenos animais (FlexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá), segundo protocolo descrito por Lourenço (2016). Dados referentes à resistência isolada das vias aéreas (Raw), resistência tecidual (Gtis) e elastância do tecido pulmonar (Htis) foram coletados e analisados utilizando o software GraphPad Prism, versão 7.0 (GraphPad Software Inc., EUA).

3.1.2.5 Lavado broncoalveolar

A coleta do lavado broncoalveolar foi realizada imediatamente após o término do teste de mecânica respiratória. O pulmão dos animais foi lavado com 0,5 mL de solução salina por duas vezes (Figura 4). O material coletado foi centrifugado a 800 *g*, durante 10 minutos a 5 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 0,3 mL de PBS 1X para posterior confecção e coloração das lâminas com azul de Giemsa. As lâminas foram avaliadas por microscopia convencional e, a partir das fotomicrografias obtidas, foi realizada a contagem diferencial de 500 células (considerando macrófagos, linfócitos, células polimorfonucleares e outros tipos celulares) utilizando o software Adobe Photoshop CC 2017.

Figura 4 - Procedimento para coleta do lavado broncoalveolar.



FONTE: Próprio autor.

3.2 Obtenção e cultivo das células estromais mesenquimais de tecido adiposo

3.2.1 Obtenção do tecido adiposo humano

O tecido adiposo humano foi obtido de indivíduos do sexo feminino, com idade entre 35 - 50 anos, que se submeteram a procedimento de dermolipectomia abdominal, realizados no Hospital de Cirurgia Plástica “Fontana Della Gioventú”, localizada na cidade Assis – SP, que está devidamente autorizada para a realização do procedimento (Figura 5). As pacientes foram informadas sobre o procedimento e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo 1).

Figura 5 - Tecido adiposo humano sendo preparado para a desinfecção inicial.

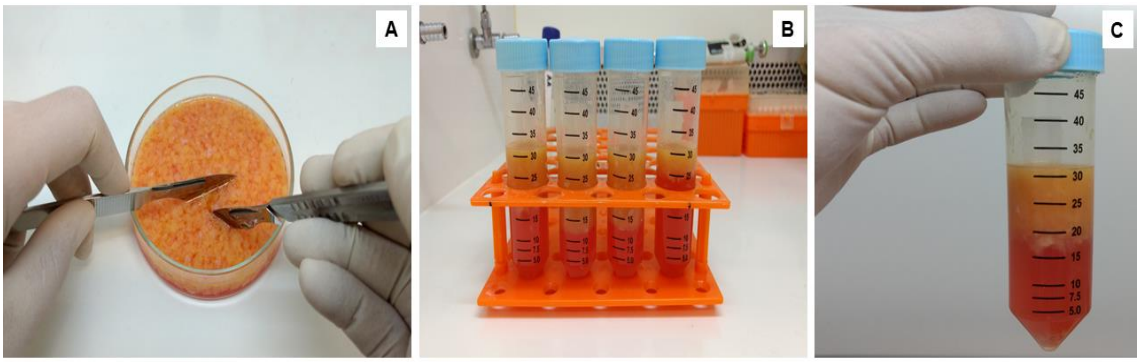
FONTE: Próprio autor.

Após a coleta, o material foi mantido em solução contendo PBS 1X e 2% de antibiótico-antimicótico (AA) (Penicilina, Streptomicina e Fungizona; Gibco, New York, USA), durante 2h a 4 °C para desinfecção. Posteriormente, 100 g do material foi submetido a processo de limpeza para retirada de coágulos, vasos sanguíneos e partes fibrosas.

3.2.2. Isolamento das células estromais mesenquimais do tecido adiposo humano (hASC)

Para a digestão enzimática, foi utilizado o método empregado por Zuk et al. (2001) com pequenas modificações. O tecido adiposo foi colocado em uma placa de Petri contendo meio ALPHA MEM (Gibco, New York, USA) suplementado com 1% de AA e, com o auxílio de bisturis, foi dissociado mecanicamente a fragmentos de aproximadamente 0,5 cm^3 para otimizar a ação da enzima (Figura 6 - A). O material foi transferido para tubos Falcon de 50 mL (SARSTEDT, Nümbrecht, Germany) e adicionado colagenase tipo I (Gibco, New York, USA), a uma concentração de 0,075% e proporção de 1:1 (1 mL de colagenase para 1 g de tecido adiposo) (Figura 6 - B). Os tubos seguiram para banho-maria a 37 °C, sendo agitado manualmente em intervalos de 5 min durante 1 hora. Em seguida, a enzima foi neutralizada mediante adição de meio ALPHA MEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, New York, USA), na mesma proporção de colagenase utilizada, e o material foi centrifugado a 400 g por 10 min, em temperatura ambiente (Figura 6 - C). Ao final da centrifugação a gordura sobrenadante foi descartada e o material sedimentado foi filtrado com auxílio de um filtro de náilon de 70 µm. A solução filtrada foi centrifugada novamente, a 700 *g* por 5 min em temperatura ambiente, para a formação do precipitado (*pellet*) celular.

Figura 6 - Etapas do isolamento das ASC do tecido adiposo humano.



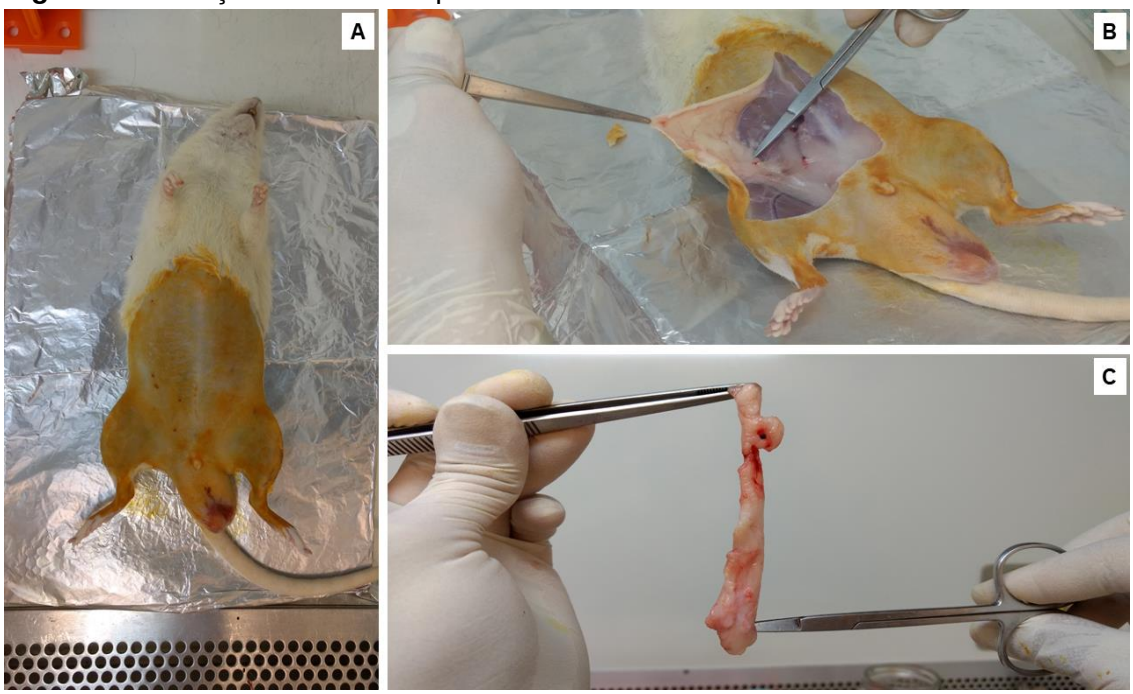
A – Tecido adiposo humano dissociado mecanicamente; **B –** Material dissociado em tubos Falcon com adição da colagenase; **C –** Final do processo de digestão enzimática. FONTE: Próprio autor.

O *pellet* obtido foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura ALPHA MEM e uma alíquota de 10 µL foi corada com Azul de Trypan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para contagem e análise da viabilidade celular em câmara de Neubauer. A suspensão celular foi semeada em frascos de cultura de 25 cm^2 (BD, New Jersey, USA), numa concentração aproximada de 1 x 10^5 células, com meio ALPHA MEM suplementado com 10% SFB e 1% de AA. Após 4 horas da semeadura das células, o meio de cultura foi totalmente descartado e os frascos lavados com PBS 1X afim de eliminar restos celulares não aderentes e tornar a cultura de células mais homogênea. Ao final desse processo, foi adicionado novamente meio de cultura ALPHA MEM suplementado com 10% de SFB e 1% de AA.

3.2.3 Obtenção do tecido adiposo de ratos

Para a obtenção do tecido adiposo, 4 ratos machos *Wistar* da espécie *Rattus Norvergicus* foram sacrificados com dose letal (400 mg/Kg) de Tiopental Sódico, por via intraperitonial. Após a tricotomização e esterilização da pele com iodopolividona a 10% (Farmax, MG, Brasil), os animais foram transferidos para um fluxo laminar e aproximadamente 15 g de tecido adiposo subcutâneo foram extraídos da região inguinal e abdominal de cada animal (Figura 7).

Figura 7 - Extração do tecido adiposo de ratos *Wistar.*



A – Limpeza da pele com iodopolividona; **B –** Identificação do tecido adiposo subcutâneo; **C –** Extração da amostra. FONTE: Próprio autor.

Após a extração, o tecido adiposo foi submetido a desinfecção em PBS 1X suplementado com 2% de AA por 10 min. Em seguida, o tecido adiposo foi transferido para outro tubo e acrescentado novamente PBS 1X suplementado com 2 % de AA. Esse processo foi realizado três vezes.

3.2.4 Isolamento das células estromais mesenquimais do tecido adiposo de ratos (rASC)

Posteriormente ao processo de desinfecção, resíduos de pele, músculo, pelos e vasos sanguíneos foram removidos e o tecido adiposo foi dissociado mecanicamente. O material dissociado foi transferido para tubo Falcon de 50 mL e adicionado colagenase tipo I a uma concentração de 0,075% e proporção de 1:1 (1 mL de colagenase para cada 1 g de gordura). O tubo seguiu para banho-maria a 37 °C, sendo agitado manualmente em intervalos de 5 min durante 1 hora. Em seguida, a enzima foi neutralizada mediante adição de meio ALPHA MEM suplementado com 20% de SFB, na mesma proporção de colagenase utilizada. O tubo contendo o material foi centrifugado a 400 *g* por 10 min, em temperatura ambiente. Ao final da

centrifugação a gordura sobrenadante foi descartada e o material sedimentado foi filtrado com auxílio de um filtro de naylon de 70 µm. A solução filtrada foi centrifugada novamente, a 700 g por 5 min em temperatura ambiente, para a formação do precipitado (*pellet*) celular.

O *pellet* obtido foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura ALPHA MEM e uma alíquota de 10 µL foi corada com Azul de Trypan para contagem e análise da viabilidade celular em câmara de Neubauer. A suspensão celular foi semeada em frascos de cultura de 25 cm^2 com meio ALPHA MEM suplementado com 20% de SFB e 1% de antibiótico-antimicótico. Após 24 horas da semeadura das células, o meio de cultura foi totalmente descartado e os frascos lavados com PBS 1X afim de eliminar restos celulares não aderentes e tornar a cultura de células mais pura. Ao final desse processo, foi adicionado novo meio de cultura ALPHA MEM suplementado com 10% de SFB e 1% de AA.

3.2.5 Obtenção do tecido adiposo de camundongos

O tecido adiposo foi obtido de 20 camundongos machos *Swiss*, da espécie *Mus musculus*, que foram sacrificados por deslocamento da cervical. Após a tricotomização e esterilização da pele com iodopolividona a 10%, os animais foram transferidos para um fluxo laminar e aproximadamente 1 - 2 g de tecido adiposo subcutâneo foram extraídos da região inguinal e abdominal de cada animal. O mesmo procedimento de desinfecção utilizado para o tecido adiposo de ratos foi aplicado para este material.

3.2.6 Isolamento das células estromais mesenquimais do tecido adiposo de camundongos (cASC)

Posteriormente ao processo de desinfecção, resíduos de pele, músculo, pelos e vasos sanguíneos foram removidos e o tecido adiposo foi dissociado mecanicamente à fragmentos de aproximadamente 0,5 cm^3. O material dissociado foi transferido para tubo Falcon de 50 mL e adicionado colagenase tipo I a uma concentração de 0,075%, na proporção de 1:1 (1 mL de colagenase para cada 1 g de gordura). O tubo seguiu para banho-maria a 37 °C, sendo agitado manualmente

em intervalos de 5 min durante 1 hora. Em seguida, a enzima foi neutralizada mediante adição de meio ALPHA MEM suplementado com 20% de SFB, na mesma proporção de colagenase utilizada. O tubo contendo o material foi centrifugado a 400 *g* por 10 min, em temperatura ambiente. Ao final da centrifugação a gordura sobrenadante foi descartada e o material sedimentado foi filtrado com auxílio de um filtro de náilon de 70 µm. A solução filtrada foi centrifugada novamente, a 700 *g* por 5 min em temperatura ambiente, para a formação do precipitado (*pellet*) celular.

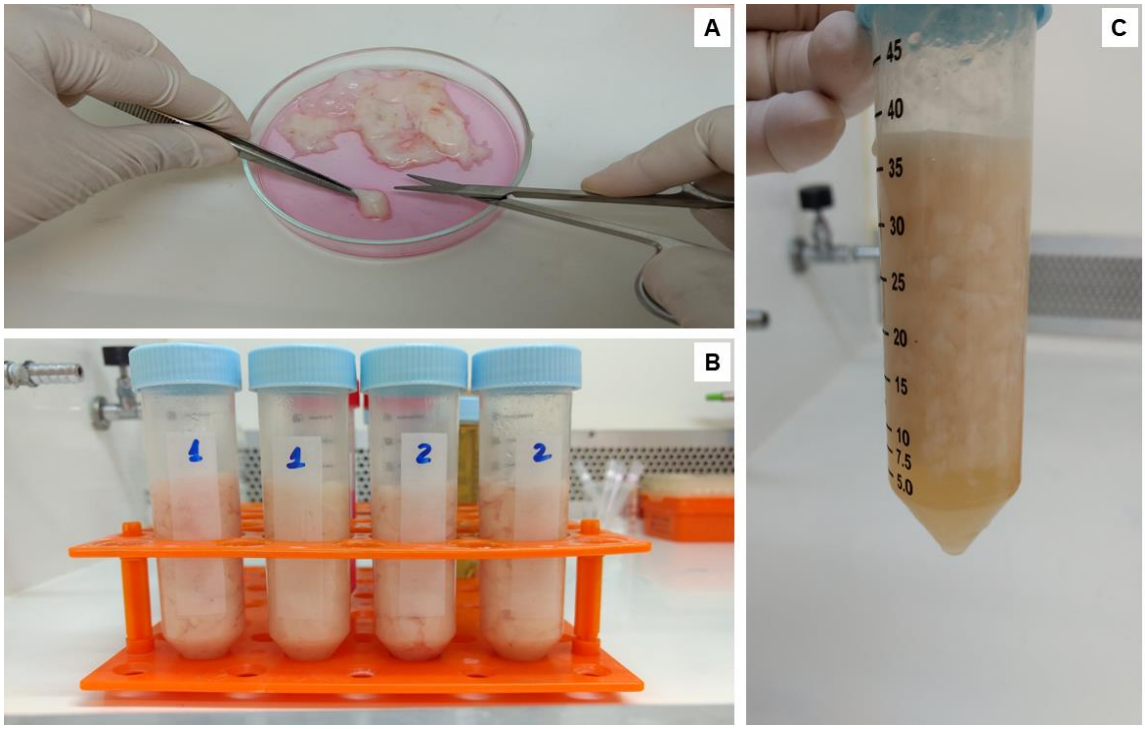
O *pellet* obtido foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura ALPHA MEM e uma alíquota de 10 µL foi corada com Azul de Trypan para contagem e análise da viabilidade celular em câmara de Neubauer. A suspensão celular foi semeada em frascos de cultura de 25 cm^2 com meio ALPHA MEM suplementado com 20% de SFB e 1% de AA. Após 24 horas da semeadura das células, o meio de cultura foi totalmente descartado e os frascos lavados com PBS 1X afim de eliminar restos celulares não aderentes e tornar a cultura de células mais pura. Ao final desse processo, foi adicionado novo meio de cultura ALPHA MEM suplementado com 10% de SFB e 1% de AA.

3.2.7 Obtenção do tecido adiposo de porcos

O tecido adiposo foi obtido da região abdominal de suídeos de granja, das raças Duroc, Pietram, Landrac e Larg White. O tecido foi extraído pós-abate de animais com idade entre 6 meses a 1 ano. O material foi cedido pelo abatedouro comercial Assiscarnes – Distribuidora de Carnes Ltda (Fribom), localizado na cidade de Assis-SP.

Após a extração no abatedouro, fragmentos de 25 gramas do tecido foram submetidos a 3 lavagens com PBS 1X contendo 2% de AA por um período de 10 minutos a cada lavagem (Figura 8).

Figura 8 - Etapas do isolamento de ASC de porco.



A – Dissociação mecânica do tecido adiposo de porco; **B –** Material transferido para tubos Falcon; **C –** Digestão enzimática do tecido com colagenase. FONTE: Próprio autor.

3.2.8 Isolamento das células estromais mesenquimais do tecido adiposo de porcos (pASC)

Empregou-se a metodologia descrita por Dariolli (2011), com pequenas modificações. Posteriormente aos processos de desinfecção e fragmentação, o material foi dissociado mecanicamente com o auxílio de pinças e lâminas de bisturi. Em seguida, o material foi transferido para tubos cônicos do tipo Falcon de 50 mL e submetido à digestão enzimática com colagenase tipo I a uma concentração de 0,150%, numa proporção de 1:1 (Figura 8-a). Os tubos contendo o material suspenso na enzima foi mantido em banho-maria a 37 ºC por 1 h e agitado manualmente em intervalos de 5 minutos. Após o tempo de digestão, a enzima foi neutralizada mediante adição de meio ALPHA MEM suplementado com 20% de SFB, na mesma proporção de colagenase utilizada, e o material foi centrifugado duas vezes a 400 *g* por 5 min, em temperatura ambiente (Figura 8-b). Ao final de cada centrifugação o sobrenadante era descartado e o material filtrado com auxílio de um filtro de 70 µm.

O precipitado (*pellet*) obtido foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura ALPHA MEM e uma alíquota de 10 µL foi corada com Azul de Trypan para contagem e análise da viabilidade celular em câmara de Neubauer. A suspensão celular foi semeada em frascos de cultura de 25 cm^2, numa concentração aproximada de 3 x 10^5 células, com meio ALPHA MEM suplementado com 10% de SFB e 1% de AA. Após 4 horas da semeadura das células, o meio de cultura foi totalmente descartado e os frascos lavados com PBS 1X afim de eliminar restos celulares não aderentes e tornar a cultura de células mais pura. Ao final desse processo, foi adicionado novamente meio de cultura ALPHA MEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico-antimicótico.

3.2.9 Manutenção e proliferação das ASC

O meio de cultura das células obtidas das diferentes fontes foi renovado a cada 48h durante todo o processo de cultivo. Para tal renovação, 50% do meio presente nos frascos era descartado e acrescentado novo meio suplementado na mesma proporção. Ao atingirem 80 – 90% de confluência, as células foram dissociadas com a utilização de Tripsina-EDTA 0,25% e a densidade celular determinada pela contagem em câmara de Neubauer, com a utilização de Azul de Trypan. Posteriormente, as células foram replicadas em novos frascos (passagem) para proliferação, sendo cultivadas até a segunda passagem em incubadora de CO_2 a 37 °C, para então serem submetidas à criopreservação.

3.2.10 Procedimento de criopreservação das ASC

Para o procedimento de criopreservação das células, o meio de cultura dos frascos de cultivo foi totalmente descartado e as células aderidas foram lavadas três vezes com PBS 1X. Em seguida, as células foram dissociadas dos frascos por meio da adição de 4 mL de Tripsina. A suspensão celular foi transferida para tubos Falcon de 15 mL (SARSTEDT, Nümbrecht, Germany) para serem centrifugados por 5 minutos a 800 *g* em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o *pellet* celular foi ressuspenso em 2 mL de meio de congelamento preparado previamente. O meio de congelamento consiste em 50% de meio ALPHA MEM sem antibiótico-

antimicótico, 40% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido - DMSO (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

Após a ressuspensão, o material foi transferido para tubos criogênicos e deixados em freezer a -22 °C até o congelamento do material. Em seguida, os tubos foram armazenados em freezer -80 °C até o descongelamento para posterior infusão nos animais e testes de caracterização dessas células.

3.3 Caracterização das células estromais mesenquimais do tecido adiposo

Amostras de ASC provenientes do tecido adiposo de humanos, porcos, ratos e camundongos foram descongeladas e cultivadas até a 3ª passagem. As células foram dissociadas com Tripsina-EDTA 0,25%, centrifugadas a 700 *g* a temperatura ambiente. O *pellet* celular obtido foi ressuspenso em meio de cultura ALPHA MEM e uma alíquota de 10 µL foi coletada para análise da densidade e viabilidade celular com azul de Trypan em câmara de Neubauer.

3.3.1 Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para caracterizar fenotipicamente as células obtidas do tecido adiposo de humano, porco, rato e camundongo. As ASC de cada tipo de fonte foram centrifugadas a 400 *g* durante 5 min a 23 °C e o pellet celular obtido ressuspendido em 3 mL de meio de cultura. As células foram contadas em câmara de Neubauer e alíquotas contendo 5 x 10^5 células foram preparadas. Em seguida as amostras foram lavadas por três vezes com tampão de lavagem (PBS 1X; 2% SFB; 0,02% azida sódica) e centrifugadas novamente a 400 *g* por 5 minutos a 23 °C.

As alíquotas foram incubadas a 23 °C por 30 min com anticorpos primários conjugados com: PE, APC, FITC ou purificados, conforme apresentado na Tabela 1. Então, mais 3 lavagens foram realizadas e incubadas com anticorpo secundário Alexa 488 ou 647 (Invitrogen™) a 23 °C por 30 min. Ao final do processo, as alíquotas foram novamente lavadas (3x) e o *pellet* ressuspendido em 200 µL de tampão de lavagem suplementado com paraformaldeído a 1%, para fixação do material.

Tabela 1 - Relação de anticorpos primários testados para cada tipo celular.

	Anticorpos primários positivos	Per test (µL)	Anticorpos primários negativos	Per test (µL)
hASC	CD29 (cód. 559892) CD90 (cód. 555593) CD73 (cód. 561014) CD105 (cód. 562408)	20 5 20 5	CD30 (cód. 555829) CD31 (cód. 555446) CD45 (cód. 340943) CD106* (cód. 305809)	20 20 5 10
pASC	CD29 (cód. 552369) CD90 (cód. 555593)	2 5	CD30 (cód. 555829) CD31 (cód. 555027) CD45 (cód. 340943)	20 2 5
rASC	CD29 (cód. 555005) CD90 (cód. 554898)	2 5	CD106 (cód. 559165) CD31 (cód. 555027) CD45 (cód. 554877)	2 2 2
cASC	CD29 (cód. 5555005)	2	CD102 (cód. 557444) CD31 (cód. 553373) CD45 (cód. 553082)	5 5 5

O anticorpo identificado com * foi adquirido da empresa BioLegend (San Diego, CA) enquanto os demais, da BD Biosciences (San Jose, CA). FONTE: Próprio autor.

Um total de 20.000 eventos foram adquiridos no citometro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences San Jose, CA) e os dados obtidos foram analisados utilizando o software do próprio equipamento (BD Accuri™ C6 Software).

3.3.2 Diferenciações celulares

Os processos de diferenciação celular das ASC em linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica foram realizados conforme métodos propostos pelo fabricante dos kits indutores de diferenciação (StemPro Differentiation Kit - Gibco, New York, USA), com modificações.

Para induzir a diferenciação condrogênica, gotas de 10, 20 e 30 µL contendo concentrações individuais de 1,6 x 10^5, 1,6 x 10^6 ou 1,6 x 10^7 células foram semeadas em placas de 6 poços (TPP, Switzerland) e permaneceram em incubadora de CO_2 por 4 horas para formação da micromassa celular. Em seguida, o meio indutor de diferenciação foi adicionado e as células foram mantidas em cultivo durante 14 dias. Ao final do processo a diferenciação condrogênica foi confirmada pela análise da coloração com Alcian Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

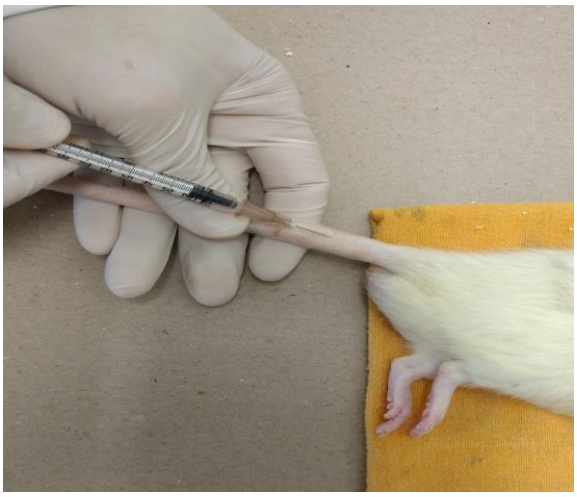
Para induzir a diferenciação osteogênica, as ASC foram semeadas em placas de 6 poços e mantidas em meio ALPHA MEM suplementado com 1% de AA e 10% de SFB por 72 h. Em seguida, o meio de cultivo foi substituído pelo meio indutor de diferenciação e as células foram mantidas em cultura durante 21 dias. A diferenciação condrogênica foi confirmada pela análise da coloração com Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Para induzir a diferenciação adipogênica, as ASC foram semeadas em placas de 6 poços e mantidas em meio ALPHA MEM suplementado com 1% de AA e 10% de SFB por 72 h. Em seguida, as células foram cultivadas durante 7-14 dias em meio indutor de diferenciação. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela análise da coloração com Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.4 Transplante celular

A terapia celular foi realizada 14 dias após o fim dos protocolos de indução do enfisema pulmonar. Os animais foram anestesiados com 116 mg/kg de ketamina combinados com 11,5 mg/kg de xilasina e as células infundidas por via intravenosa (veia caudal) (Figura 9). Os animais da FASE 1 receberam tratamento com infusão de 2 x 10^6 células em 200 µL de solução salina (Grupos hASC, rASC e pASC), enquanto o grupo veículo (VEH) recebeu o tratamento com a solução sem células. Da mesma forma, os animais da FASE 2 receberam tratamento com infusão de células em 200 µL de solução fisiológica, nas concentrações de 5 x 10^4 células (Grupo hASC) e 8,2 x 10^4 (Grupos cASC e pASC), enquanto o grupo FUM recebeu o tratamento com a solução sem células.

Figura 9 - Infusão intravenosa (veia caudal) de ASC.

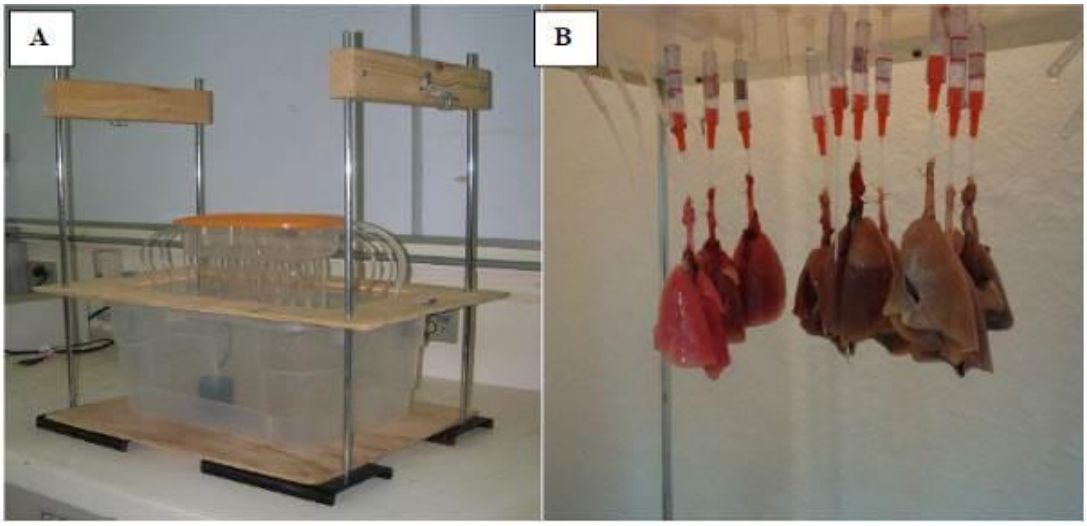


FONTE: Próprio autor.

3.5 Análise histológica

Após a coleta do LBA, a caixa torácica dos animais foi aberta e o conjunto coração-pulmão foi retirado. Os pulmões foram insuflados com pressão positiva constante de 20 cm de uma solução tamponada de paraformaldeído a 4%, por um período de 24 horas, utilizando-se de um aparato de perfusão pulmonar (Figura 10) adaptado e modificado pelo grupo do Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel (UNESP – Campus de Assis), conforme proposto por Barbosa-de-Oliveira et al. (2011).

Figura 10 - Perfusão dos pulmões.



A – Aparato de perfusão; **B –** Pulmões acoplados ao aparato sendo perfundidos com paraformaldeído 4%. FONTE: Kozma (2012).

Ao final do processo de perfusão, cortes de ambos os lados dos pulmões foram realizados e as amostras seguiram rotina histológica. As lâminas foram confeccionadas com cortes de 5 µm de espessura e coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E), e seguiram para a análise do Intercepto Linear Médio (Lm).

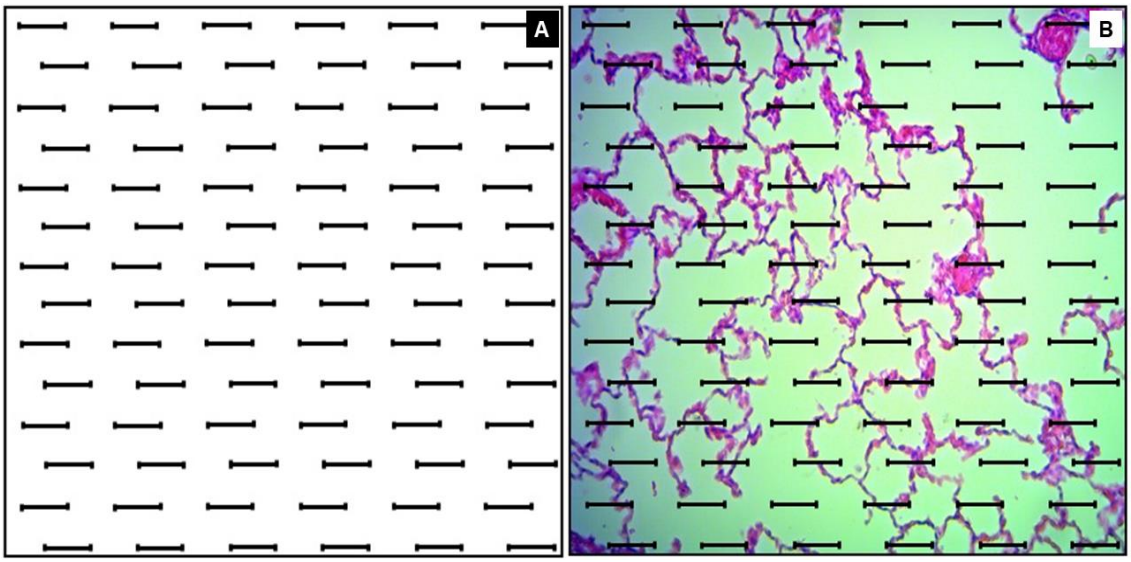
3.6 Morfometria – medida do intercepto linear médio (Lm)

A análise morfométrica foi avaliada pelo tradicional método descrito por Weibel (1963), no qual se utiliza um sistema de linhas e pontos em um gradiculado de 168 pontos. O enfisema pulmonar foi avaliado mediante cálculo do Lm, indicador do intercepto linear médio (em micrômetros), utilizando a fórmula:

$$Lm = \frac{Ltot}{Li},$$

onde Ltot representa o comprimento total das retas do gradiculado e Li sendo o número de vezes que as retas interceptaram as estruturas alveolares. Foram analisados 10 campos aleatórios de cada lâmina histológica por microscopia convencional. As fotomicrografias foram adquiridas e o gradiculado sobreposto para posterior análise (Figura 11).

Figura 11 - Análise morfométrica dos pulmões.



A – Gradiculado de 168 pontos; **B –** Sobreposição do gradiculado à fotomicrografia do parênquima pulmonar para obtenção dos valores do Lm. FONTE: Próprio autor.

3.7 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados e comparados utilizando o software IBM SPSS Statistics 21. Todos os dados foram avaliados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk), sendo aplicado ANOVA para os valores paramétricos e Kruskal-Wallis ou Friedman para os valores não-paramétricos, com nível de significância 5%.

3.8 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Campus de Assis (Assis, São Paulo, Brasil) (n° de registro: 005/2015) e registrado na Plataforma Brasil (CAAE: 47383115.2.0000.5401). Foram incluídos no estudo apenas pacientes que autorizaram a doação das amostras tecido adiposo, conforme Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP – Portaria 196/96, Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde).

4 RESULTADOS

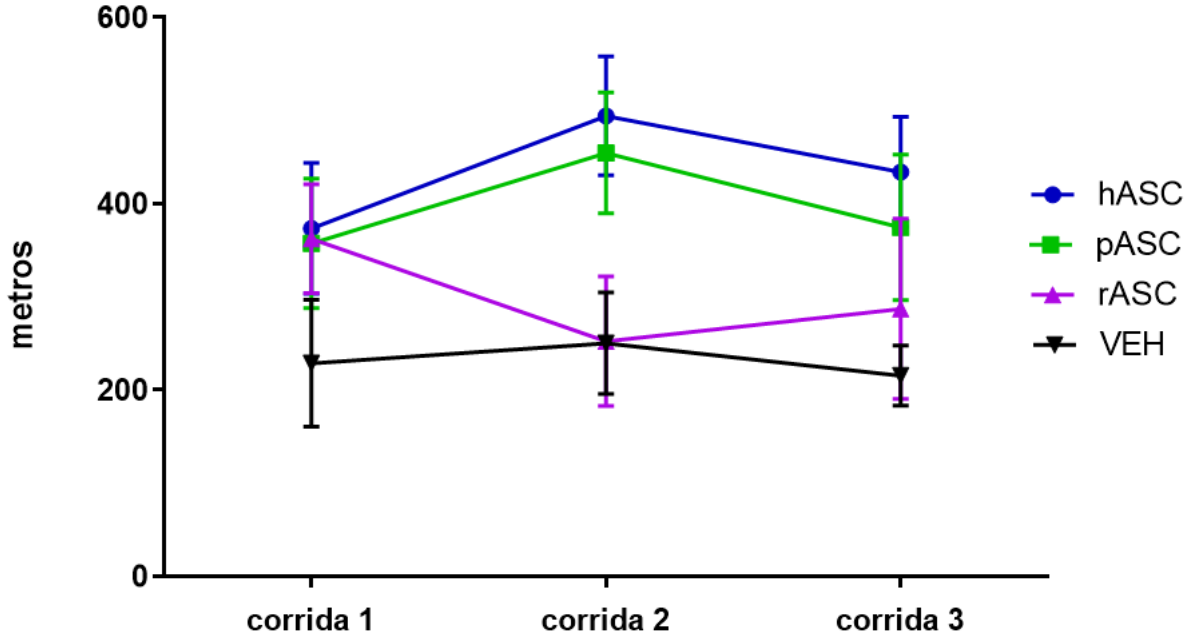
4.1 FASE 1 – Indução do enfisema por instilação de elastase

4.1.1 Teste de esforço em esteira

O teste de esforço realizado em esteira motorizada teve por objetivo medir, em diferentes momentos do protocolo experimental, a capacidade respiratória dos animais durante um exercício forçado. A análise comparativa dos resultados, aplicando o teste de Shapiro-Wilk, revelou que somente a Corrida 1, realizada anteriormente à indução do enfisema, apresentou distribuição normal dos dados. Para avaliar a progressão dos diferentes grupos no decorrer das etapas do protocolo experimental foi realizado o teste de Friedman para medidas repetidas. Além disso, os resultados foram avaliados independentemente pela análise de variância (ANOVA), para as variáveis com distribuição paramétrica, ou pelo teste de Kruskal-Wallis para as demais.

A partir da análise da distância percorrida durante cada uma das três corridas, realizadas em momentos distintos, foi possível verificar que, para o grupo veículo (VEH), não houve diferença significativa entre os valores obtidos (X^2= 1,200, *df*= 2, *p*= 0,549). Este mesmo resultado foi observado para os grupos de animais tratados com ASC de ratos (X^2= 4,105, *df*= 2, *p* = 0,128), de porcos (X^2= 2,800, *df*= 2, *p* = 0,247) e de humanos (X^2= 5,200, *df*= 2, *p* = 0,074) (Figura 12).

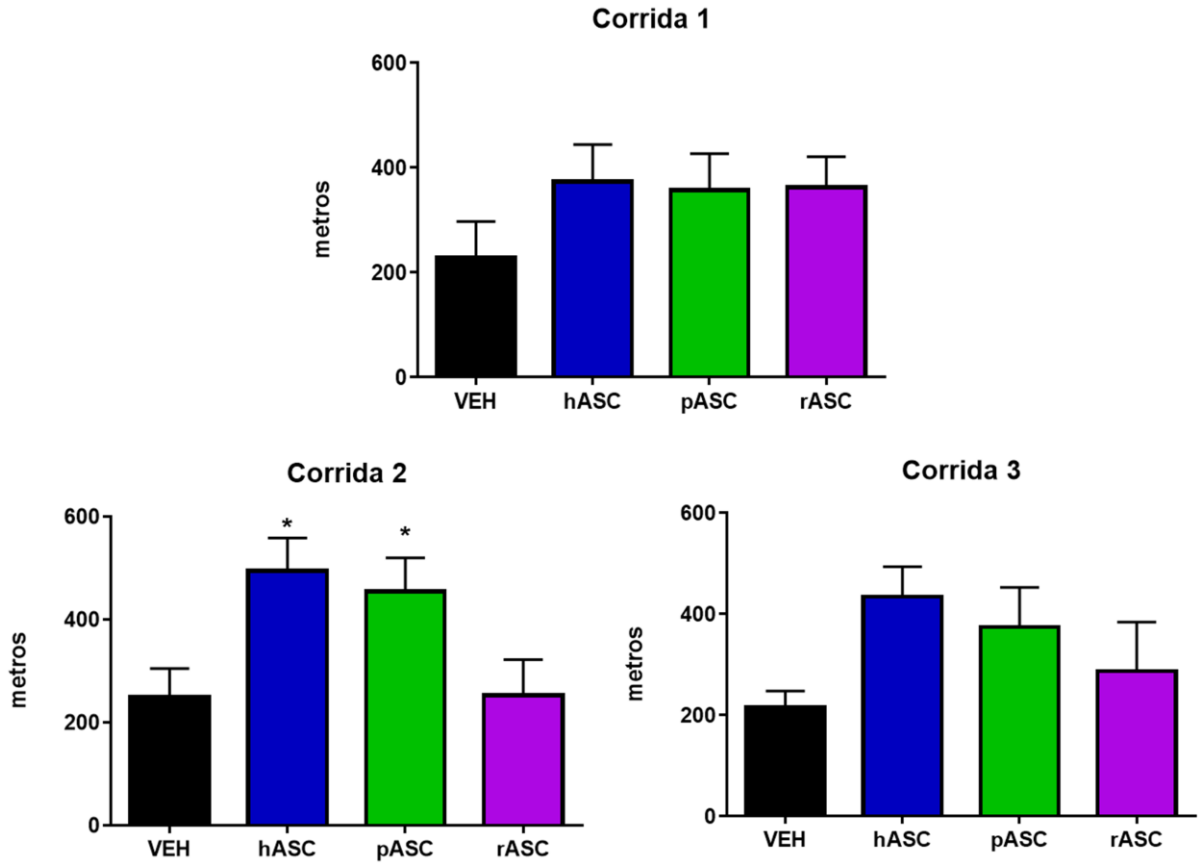
Figura 12 - Distância percorrida (metros) durante teste de esforço em esteira motorizada dos diferentes grupos experimentais.



Avaliação realizada em três momentos estratégicos: corrida 1 - antes da indução do enfisema; corrida 2 - 14 dias após a indução do enfisema; corrida 3 - 14 dias após o tratamento com infusão de ASC. Grupo hASC: animais tratados com células de origem humana; grupo pASC: animais tratados com células de origem suína; grupo rASC: animais tratados com células de ratos; grupo VEH: grupo tratado com solução sem células. FONTE: Próprio autor.

A análise de cada variável isoladamente revelou não haver diferença significativa entre os grupos avaliados para a Corrida 1 [F(3,16) = 2,360, *p*= 0,501] e Corrida 3 [F(3,16) = 5,962, *p*= 0,113]. Entretanto, foi verificado diferença significativa entre os grupos para a Corrida 2 [F(3,16) = 9,709, *p*= 0,021]. O teste de post-hoc Dunn indicou que a diferença está presente entre os grupos hASC e pASC quando comparados com o grupo VEH (*p* = 0,019 e *p* = 0,042, respectivamente), e dos mesmos grupos (hASC e pASC) quando comparados com o grupo rASC (*p*= 0,019 e *p* = 0,042, respectivamente) (Figura 13).

Figura 13 - Distância percorrida (metros) em esteira motorizada durante teste de esforço nas diferentes etapas do protocolo experimental.



O * representa diferença estatística significativa entre os grupos. Corrida 1 – realizada antes da indução do enfisema por instilação intratraqueal de elastase; Corrida 2 – realizada 14 dias após a indução do enfisema; Corrida 3 – realizada 14 dias após infusão de ASC; FONTE: Próprio autor.

4.1.2 Lavado Broncoalveolar

O lavado broncoalveolar foi realizado com o intuito de investigar o processo inflamatório alveolar e intersticial desencadeado por ação da elastase. O material (LBA) obtido foi submetido a coloração com Cristal Violeta (Vetec, São Paulo, Brasil) e uma alíquota de 10 µL foi coletada para avaliação e contagem de macrófagos, linfócitos, células polimorfonucleares e outros tipos celulares em câmara de Neubauer. As análises das amostras do LBA coletados de todos os grupos experimentais apresentaram baixa densidade celular, com padrão morfológico mal

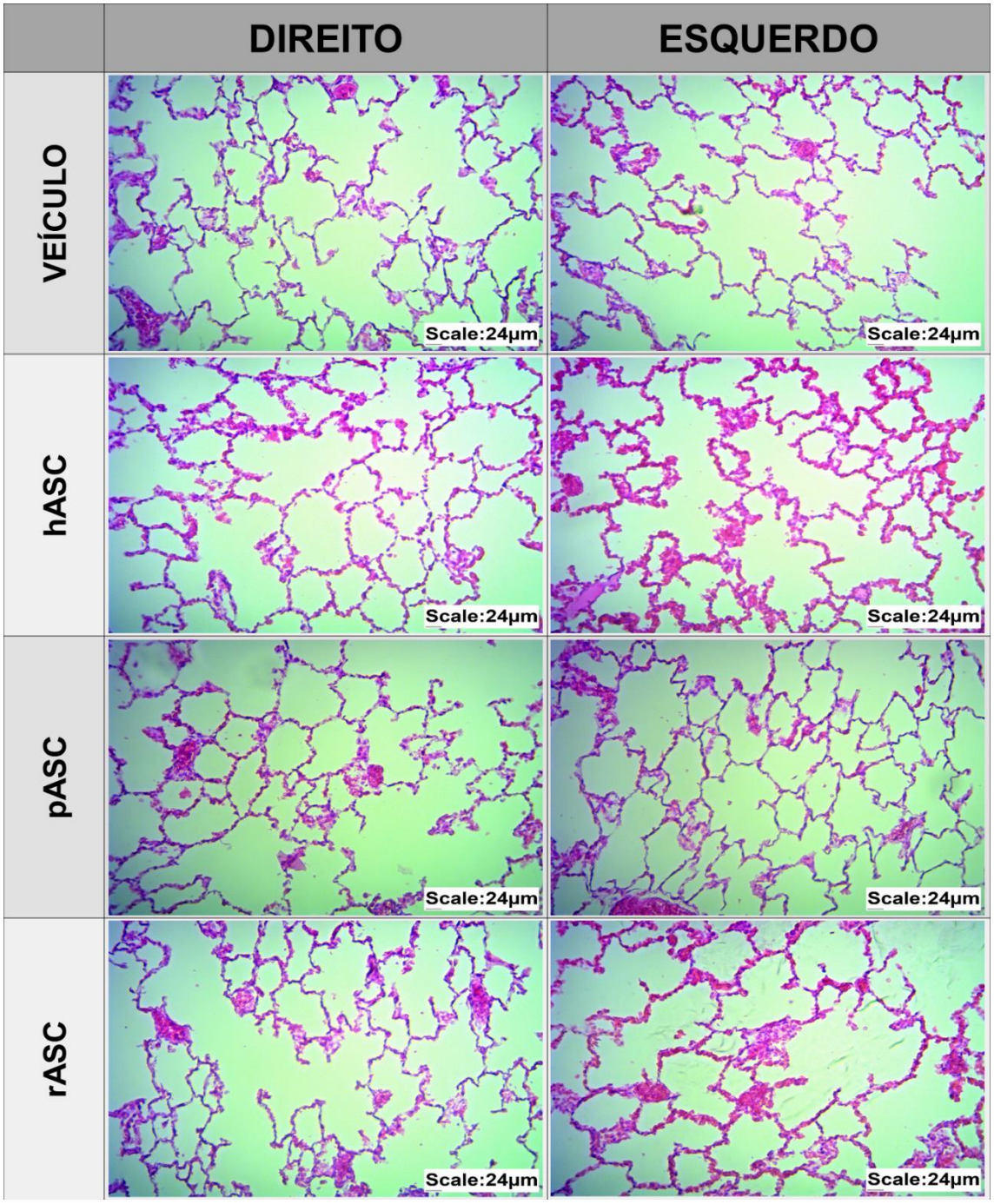
definido, dificultando a contagem e classificação das células. Devido a essas condições, não foi possível quantificar as células de interesse e, portanto, realizar as comparações entre os diferentes grupos.

4.1.3 Morfometria – medida do intercepto linear médio

A coleta dos pulmões dos animais foi realizada para verificar possíveis alterações morfológicas entre os diferentes grupos experimentais. O material biológico foi submetido à rotina histológica e as lâminas utilizadas para análise do intercepto linear médio (Lm), conforme método proposto por Weibel em 1963. O quadro enfisematoso pode ser caracterizado mediante o valor de Lm obtido, uma vez que essa medida representa o diâmetro dos espaços aéreos pulmonares. Assim, quanto maior o valor de Lm, maior a destruição dos septos alveolares e, portanto, maior alteração morfológica dos pulmões.

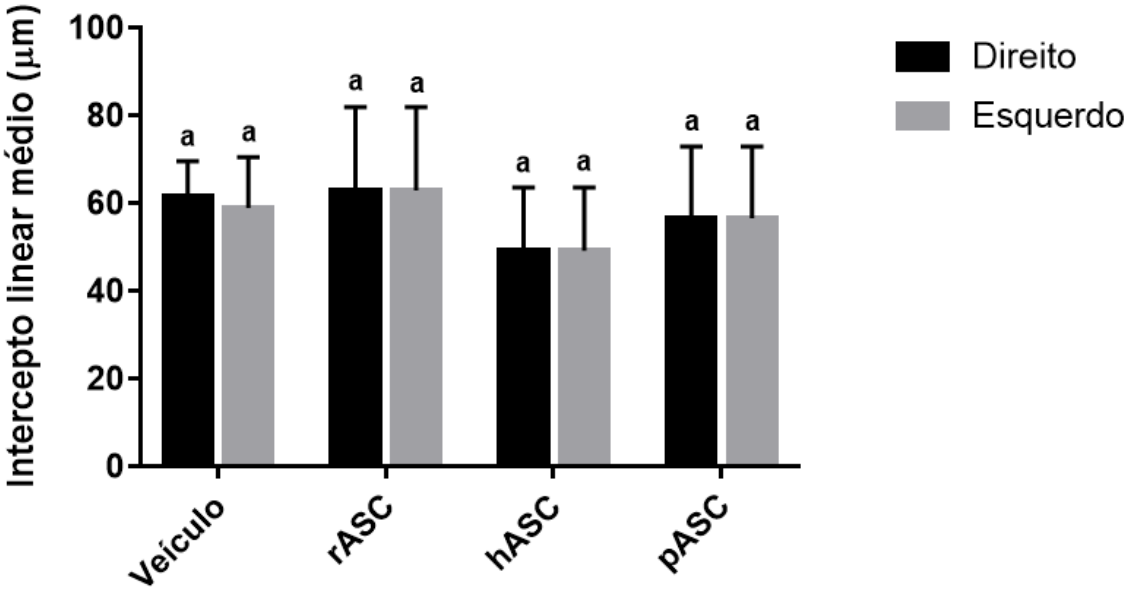
Os valores de Lm foram obtidos a partir da análise histológica e estão representados na Figura 15. A análise estatística dos resultados tanto para o pulmão direito quanto para o esquerdo revelou não haver diferença significativa entre os grupos experimentais. Dessa forma, a estrutura alveolar dos pulmões dos animais foi mantida, sem alterações, mesmo após instilação intratraqueal de elastase ou aplicação de ASC como método terapêutico.

Figura 14 - Fotomicrografias dos pulmões direito e esquerdo dos diferentes grupos experimentais (FASE 1).



Parênquima pulmonar corado com Hematoxilina & Eosina em aumento de 200x. FONTE: Próprio autor.

Figura 15 - Valores do intercepto linear médio (Lm) - FASE 1.



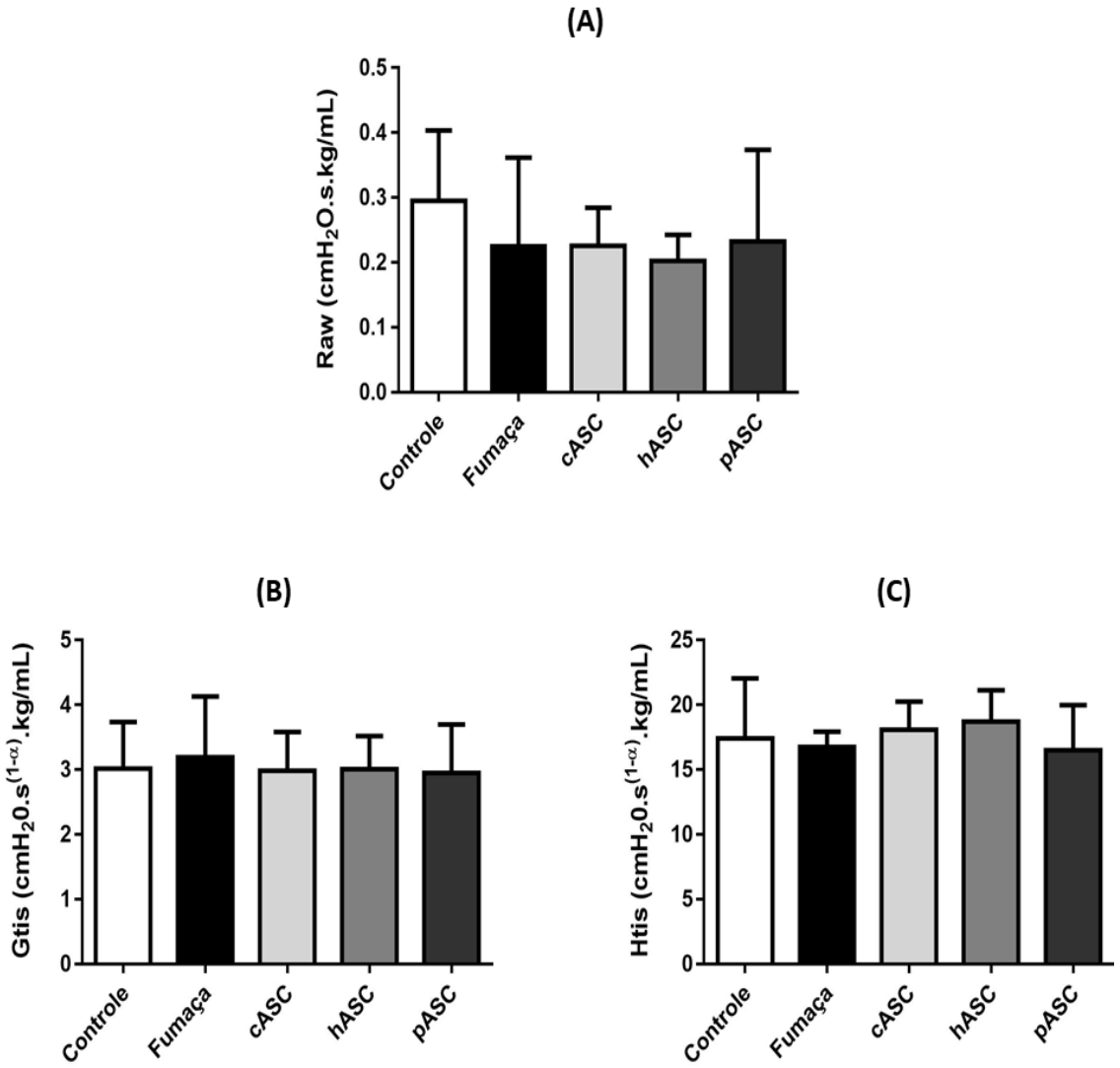
ANOVA (um fator) para dados morfométricos do pulmão direito (*p*= 0,519) e pulmão esquerdo (*p*= 0,608). *Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa. FONTE: Próprio autor.

4.2 FASE 2 – Indução do enfisema por exposição à fumaça de cigarro

4.2.1 Mecânica ventilatória dos pulmões

As características funcionais do pulmão dos animais pertencentes à FASE 1 deste projeto foram avaliadas comparativamente mediante coleta das medidas de Raw (resistência das vias aéreas), Gtis (resistência do tecido pulmonar) e Htis (elastância do tecido pulmonar), conforme apresentadas na Figura 16. A partir das análises estatísticas utilizando o teste de Kruskal-Wallis, foi verificado que não houve diferença significativa entre os diferentes grupos, dentro de cada parâmetro considerado.

Figura 16 - Parâmetros empregados para avaliação da mecânica ventilatória dos pulmões nos diferentes grupos experimentais.

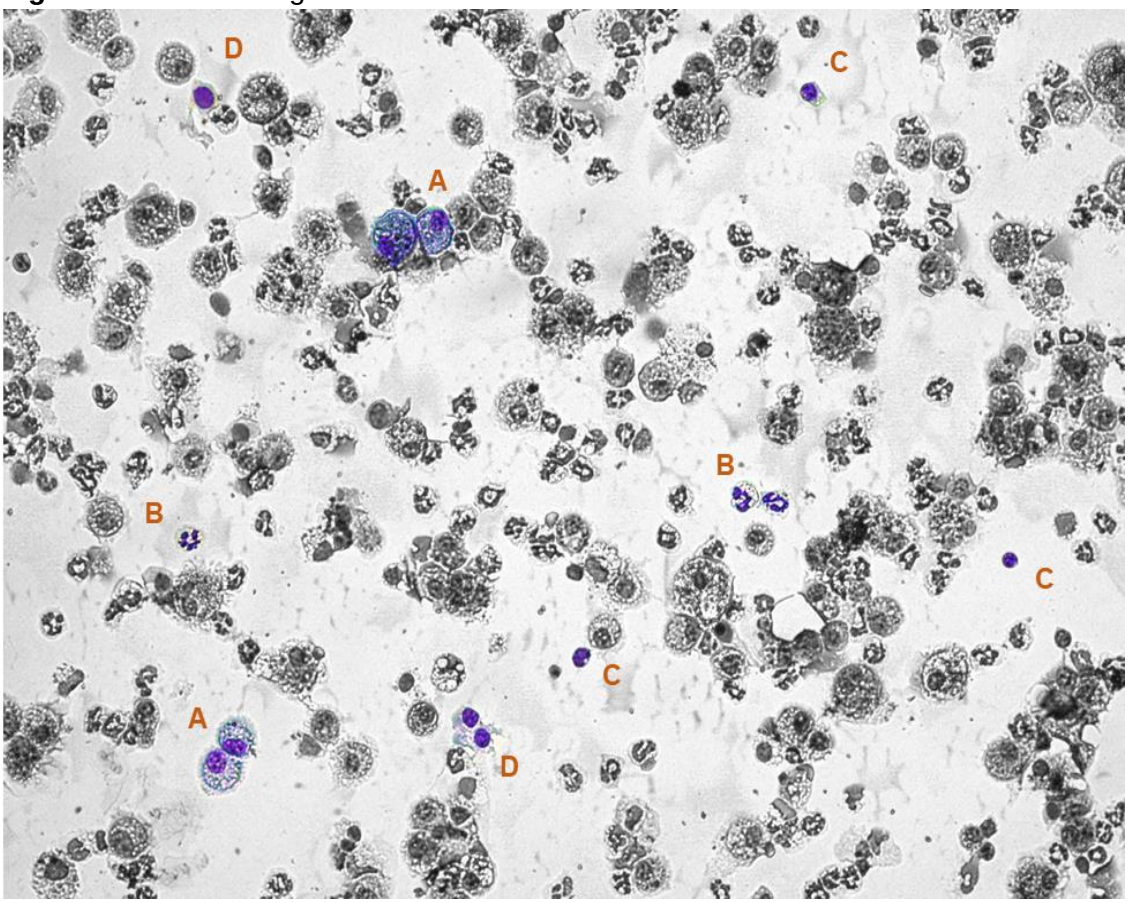


A – Valores de resistência isolada das vias aéreas (Raw) (*p*= 0.0852); **B –** Valores de resistência tecidual (Gtis) (*p*= 0.9861); **C –** Valores de elastância do tecido pulmonar (Htis) (*p*= 0.2601). FONTE: Próprio autor.

4.2.2 Lavado Broncoalveolar

A coleta do LBA foi realizada imediatamente após o término do teste de mecânica respiratória e teve a finalidade de verificar a possível influência da terapia com as ASC sobre o processo inflamatório dos animais expostos à fumaça de cigarro. A partir das fotomicrografias obtidas em microscópio convencional (Figura 17), foi possível realizar a contagem diferencial das células inflamatórias.

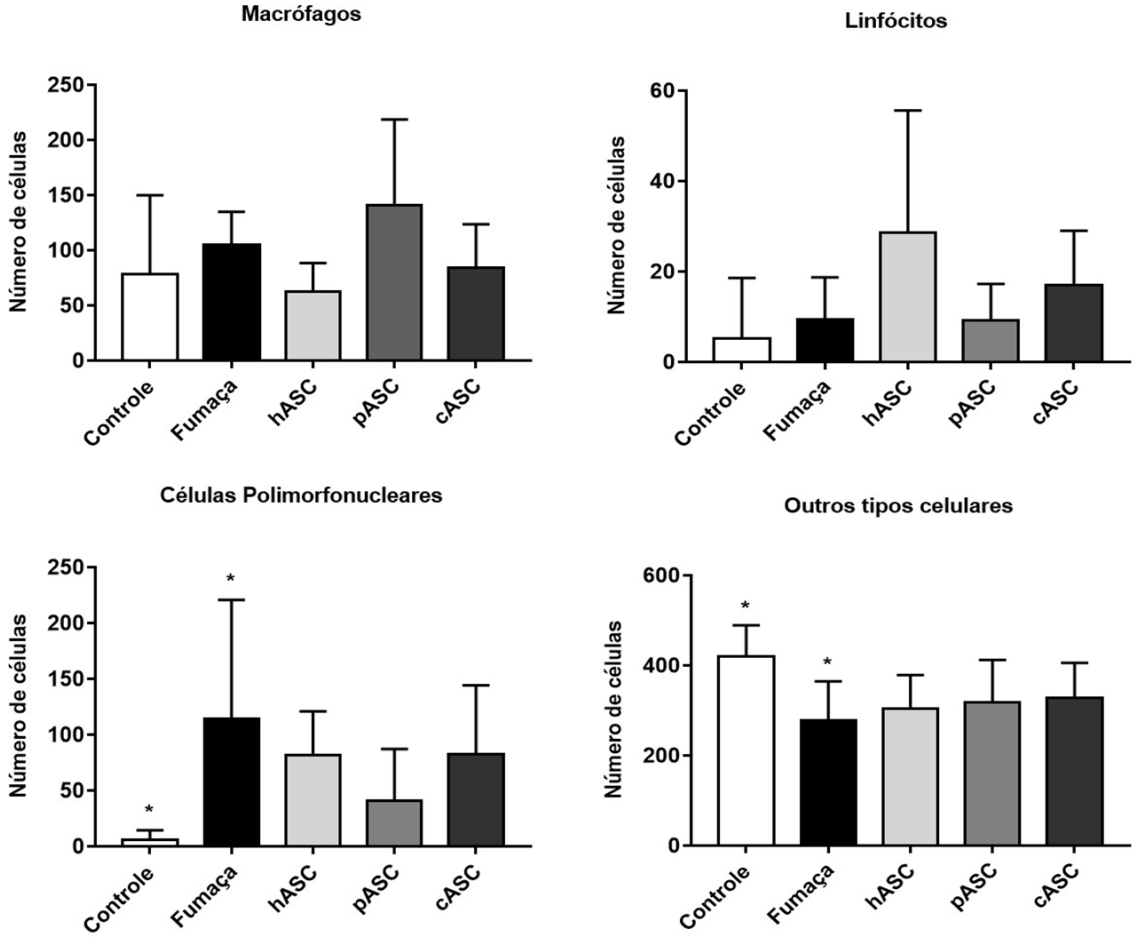
Figura 17 - Fotomicrografia de lâmina de LBA.



Lâmina de lavado broncoalveolar de animal do grupo fumaça (aumento de 200X); em destaque (coloração violeta) as células analisadas. A – macrófagos; B – células polimorfonucleares; C – linfócitos; D – outros tipos celulares. FONTE: Próprio autor.

Os valores da contagem diferencial de células presentes no LBA dos diferentes grupos experimentais foram analisados estatisticamente e estão apresentados na Figura 18. Podemos observar maior quantidade de outros tipos celulares (células epiteliais, dendríticas, NK) presentes no LBA quando comparado às demais células analisadas. Verifica-se ainda, diferença estatística entre os grupos controle e fumaça para as células polimorfonucleares e outros tipos celulares. Entretanto, nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais foi encontrada para a contagem de macrófagos e linfócitos.

Figura 18 - Comparação dos diferentes tipos celulares presentes no LBA dos grupos experimentais.

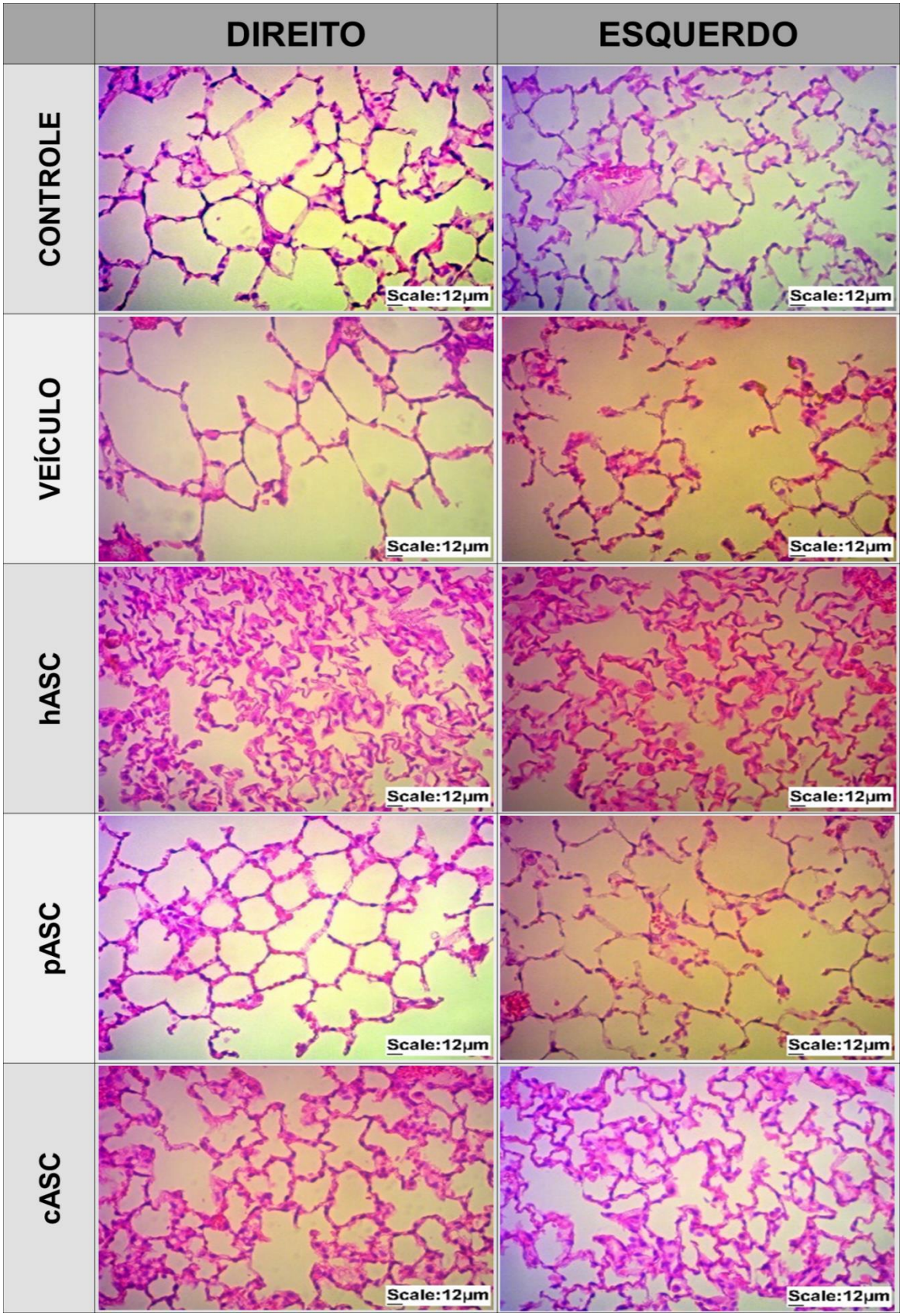


O * representa diferença estatística significativa entre os grupos. Para os dados referentes à macrófagos, linfócitos e células polimorfonucleares foi aplicado teste de Kruskal-Wallis e ANOVA (um fator) para outros tipos celulares, ambos seguidos do post-hoc de Bonferroni ($p \leq 0,05$). FONTE: Próprio autor.

4.2.3 Morfometria – medida do intercepto linear médio

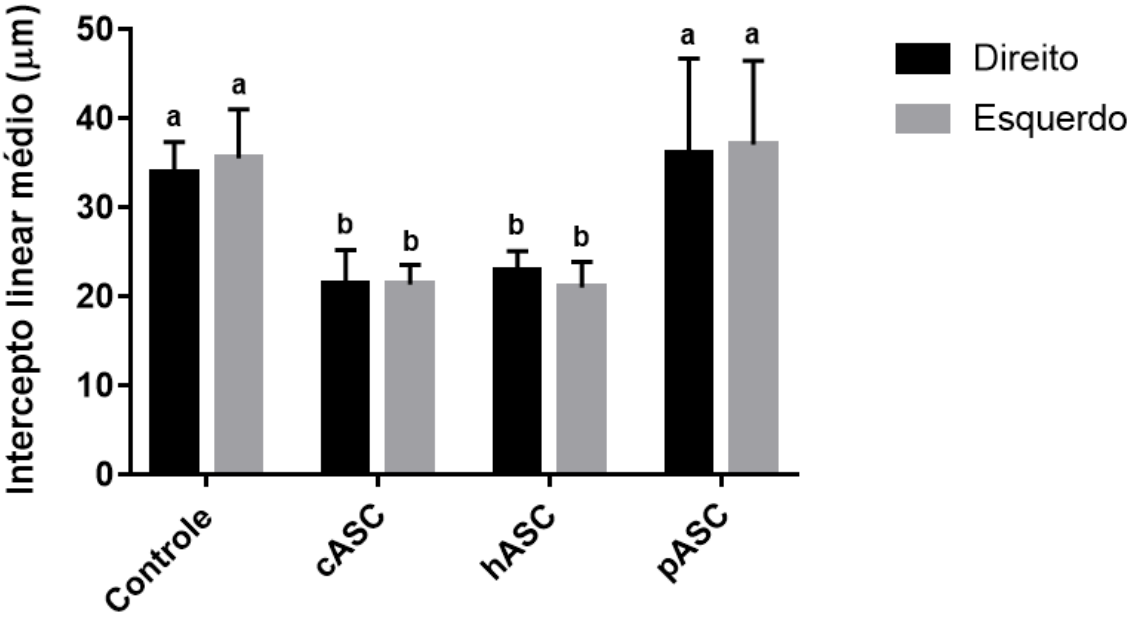
Os pulmões coletados dos animais foram submetidos à rotina histológica e as lâminas (Figura 19) utilizadas para obtenção dos valores do intercepto linear médio (Lm). A analise estatisticamente dos resultados revelou que houve diferença significativa entre os valores do pulmão direito e esquerdo dos grupos cASC e hASC quando comparados com controle e pASC (Figura 20). A partir destes resultados, conclui-se que houve melhora morfológica no grupo de animais que recebeu tratamento de ASC isoladas do tecido adiposo de suínos.

Figura 19 - Fotomicrografias das lâminas histológicas dos pulmões direito e esquerdo dos diferentes grupos experimentais (FASE 2).



Parênquima pulmonar corado com Hematoxilina & Eosina em aumento de 400x. FONTE: Próprio autor.

Figura 20 - Valores do intercepto linear médio (Lm) - FASE 2.

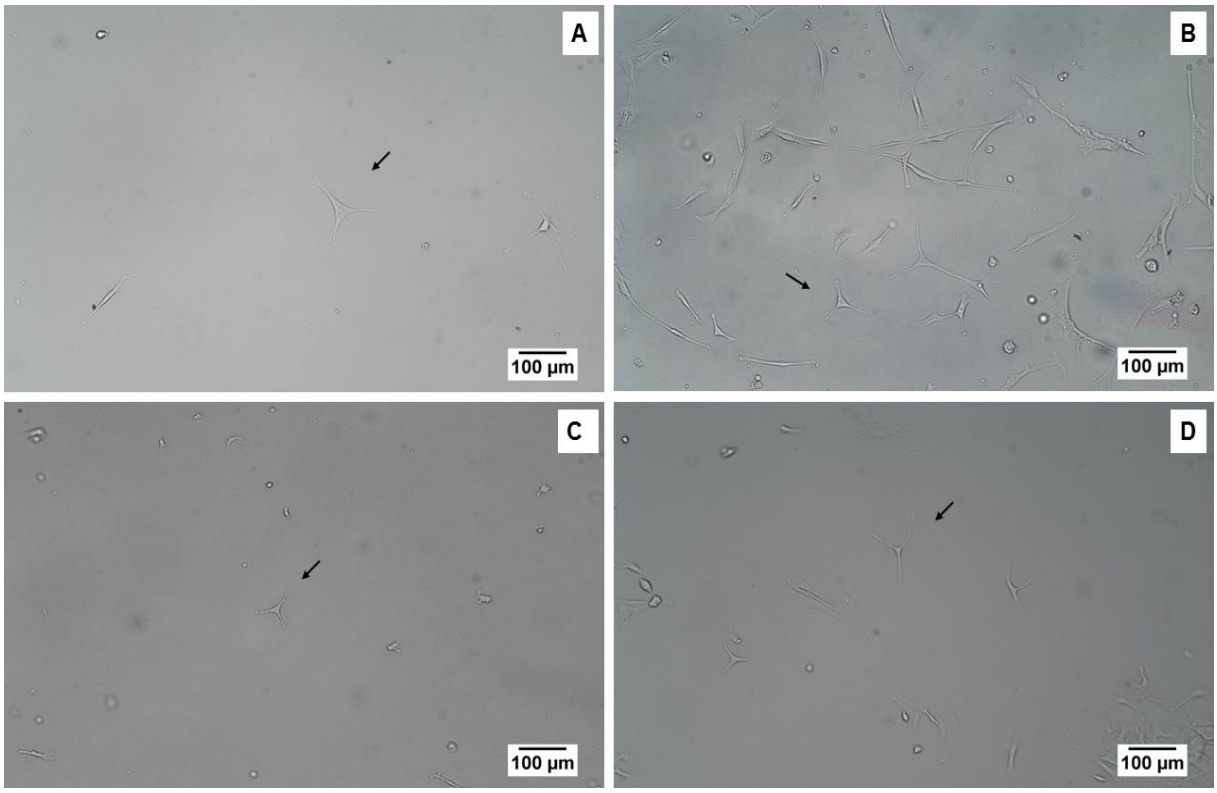


Kruskal-Wallis para dados morfométricos do pulmão direito (*p*= 0,000) e pulmão esquerdo (*p*= 0,000). *Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa. FONTE: Próprio autor.

4. 3 Isolamento, cultivo e proliferação das células estromais mesenquimais do tecido adiposo

As células isoladas do tecido adiposo de humanos, porcos, ratos e camundongos foram semeadas a uma densidade de 1 x 10^5 células e cultivadas em frascos de cultura para posterior transplante nos animais expostos à fumaça de cigarro ou para aplicação nos testes de caracterização celular. Em todos os frascos de cultivo foi possível observar a adesão celular após 2 dias de incubação e a presença de hemácias e adipócitos. Estas células (hemácias e adipócitos) foram progressivamente eliminadas ao longo do cultivo celular, durante as trocas de meio de cultura, de forma que a partir do 5° dia de cultivo todas as culturas apresentavam proliferação em aderência à superfície, de células com morfologia fibroblastóide característica do tipo mesenquimal. Essa característica morfológica foi verificada nas células provenientes das diferentes fontes de tecido adiposo e foi mantida durante todo o cultivo (Figura 21).

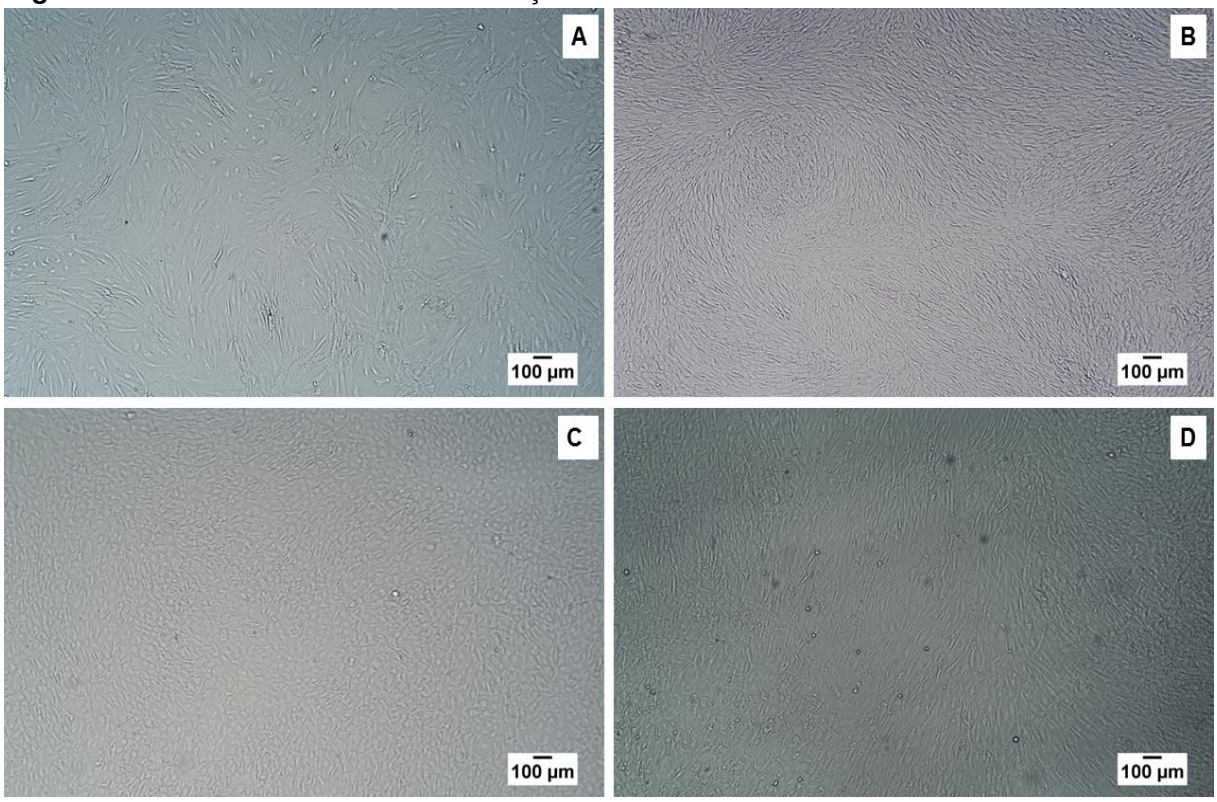
Figura 21 - Fotomicrografia de culturas primárias das ASC obtidas de diferentes fontes.



A – Cultura de hASC; **B –** Cultura de pASC; **C –** Cultura de rASC; **D –** Cultura de cASC; aumento de 100X. As setas destacam a morfologia celular similar encontrada em todas as culturas. FONTE: Próprio autor.

Foi possível observar também a constituição de uma monocamada homogênea de células (confluência de 80-90%) nos frascos de cultura a partir do 8° dia de cultivo (Figura 22). Então as células foram dissociadas com Tripsina-EDTA 0,25% e replicadas (passagem) em novos frascos, sendo mantidas em cultura até a 2ª passagem. Posteriormente, as células foram congeladas e estocadas em nitrogênio líquido ou mantidas em cultivo para proliferação e aplicação nos testes propostos.

Figura 22 - Culturas de ASC com formação de monocamada.



A – Cultura de hASC; **B –** Cultura de pASC; **C –** Cultura de rASC; **D –** Cultura de cASC; aumento de 40X. FONTE: Próprio autor.

4.4 Caracterização das células estromais mesenquimais do tecido adiposo

A validação das ASC tem por objetivo verificar se as células obtidas das diferentes fontes podem ser definidas e caracterizadas como células mesenquimais. Empregou-se, para caracterização, análise por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais positivos e negativos, como também análise do potencial de diferenciação celular in vitro. A partir desses dois critérios, podemos validar experimentalmente a origem mesenquimal das células, conforme proposto pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) (DOMINICI et al., 2006).

4.4.1 Citometria de fluxo

Os marcadores de superfície listados na Tabela 1 foram analisados por citometria de fluxo em culturas de ASC oriundas de humanos, porcos, ratos e camundongos em terceira passagem. Todas as análises foram realizadas comparando as células incubadas com os anticorpos de interesse (curvas em

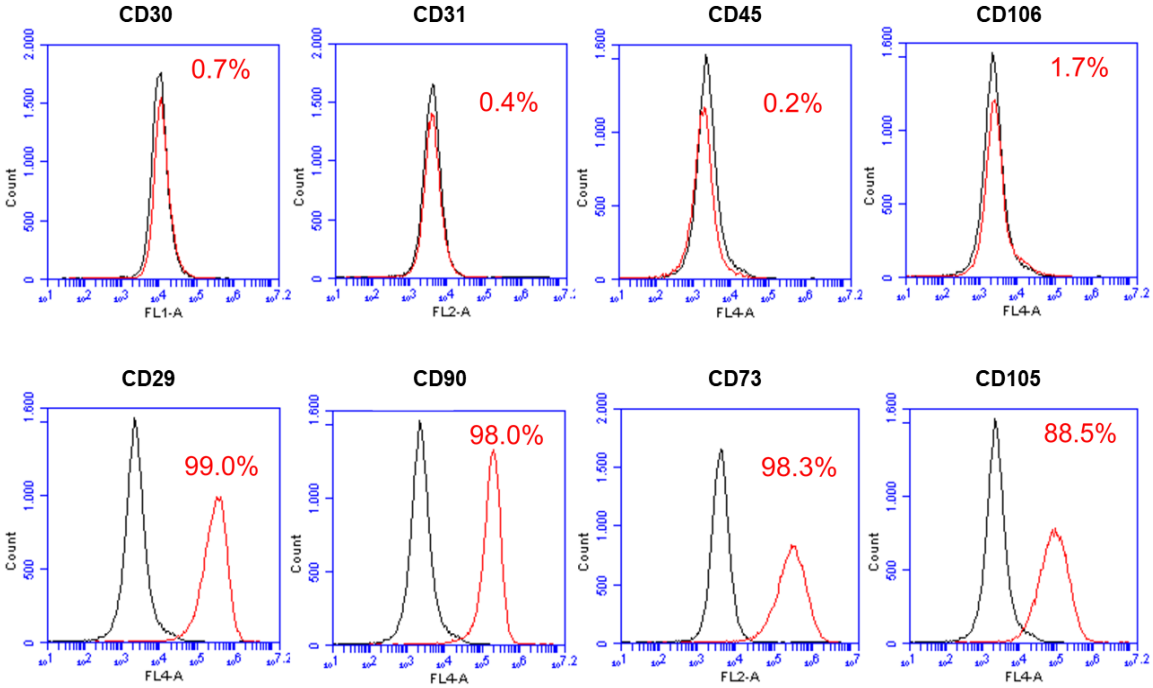
vermelho) contra células da mesma população (separadas imediatamente antes de serem submetidas a incubação), porém não incubadas com os anticorpos (curvas em preto); (Figuras 23 – 26). Podemos observar nos gráficos que, no eixo y estão representados o número de eventos (neste caso número de células que apresentam determinada intensidade de fluorescência), enquanto no eixo x se encontram as intensidades de fluorescência para cada evento (célula analisada). As porcentagens de células marcadas para cada anticorpo testado foram sintetizadas na Tabela 2. De modo geral, foram obtidos valores próximos àqueles preconizados pela ISCT, permitindo desta forma, caracterizar e definir as MSC isoladas do tecido adiposo de humanos, porcos, ratos e camundongos como do tipo mesenquimal.

Tabela 2 - Porcentagem de anticorpos marcados para as ASC isoladas das diferentes fontes.

	ANTICORPOS NEGATIVOS (≤ 2%)					**ANTICORPOS POSITIVOS (≥ 70%)**			
TIPOS CELULARES	**CD30**	**CD31**	**CD45**	**CD106**	**CD102**	**CD29**	**CD90**	**CD73**	**CD105**
hASC	0.7%	0.4%	0.2%	1.7%	-	99%	98%	98.3%	88.5%
pASC	0.5%	0.3%	0.1%	-	-	98.9%	95.1%	-	-
rASC	-	2.2%	2.7%	18%	-	99.7%	99.9%	-	-
cASC	-	2.5%	12%	-	4.2%	83.5%	-	-	-

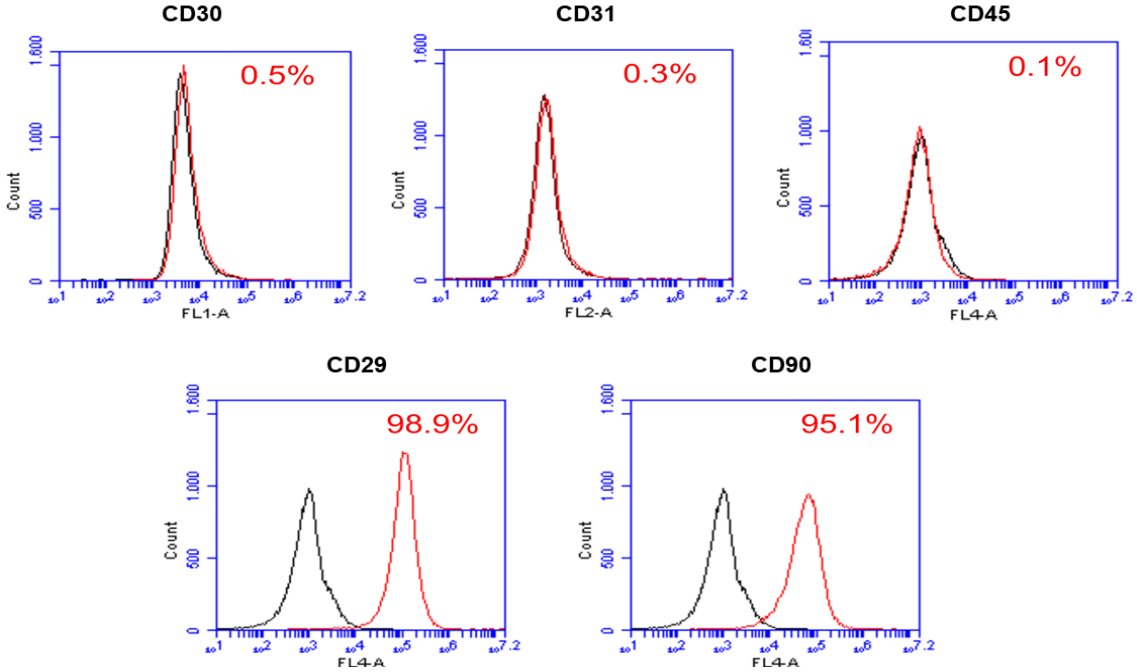
Os anticorpos foram testados contra células estromais mesenquimais (MSC) derivadas de tecido adiposo humano (**hASC**); MSC derivadas de tecido adiposo de porcos (**pASC**); MSC derivadas de tecido adiposo de ratos (**rASC**); MSC derivadas de tecido adiposo de camundongos (**cASC**). A porcentagem esperada de anticorpos negativos marcados nas células é igual ou menor que 2%, enquanto que para os anticorpos positivos a porcentagem de células marcadas é igual ou superior à 70%. FONTE: Próprio autor.

Figura 23 - Histograma representativo para marcadores de hASC avaliados por citometria de fluxo.



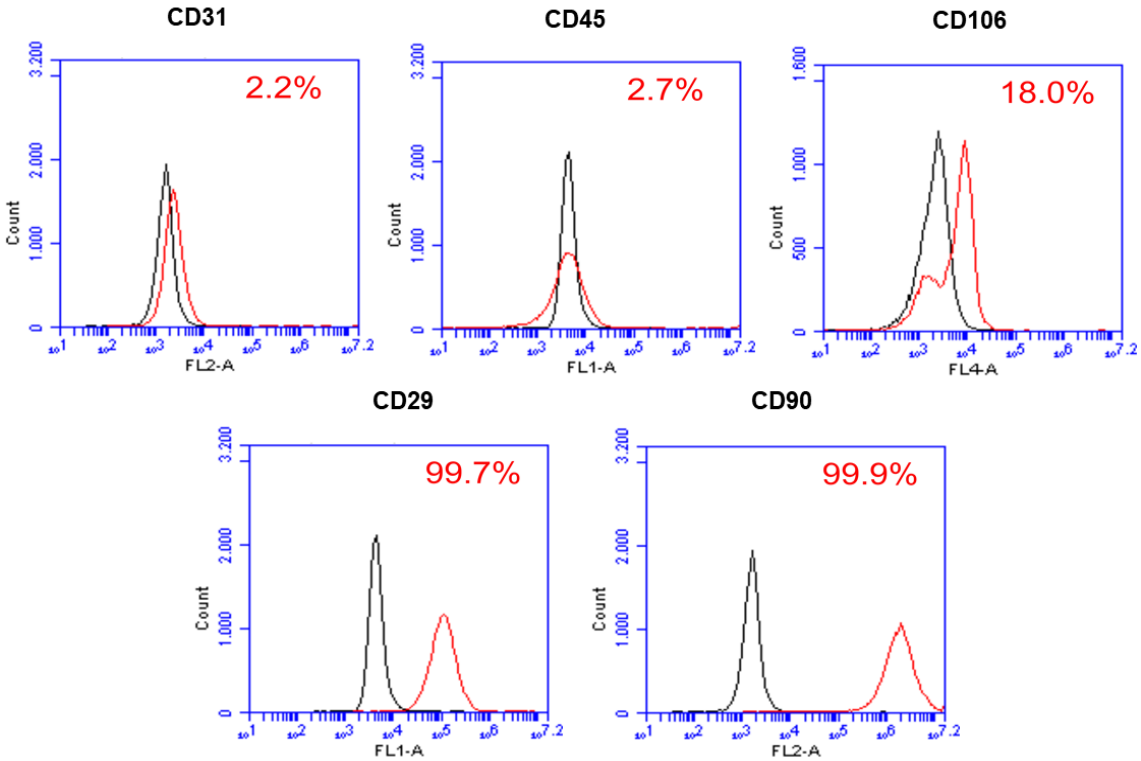
Os valores destacados em vermelho indicam a porcentagem de células positivas para cada marcador testado. FONTE: Próprio autor.

Figura 24 - Histograma representativo para marcadores de pASC avaliados por citometria de fluxo.



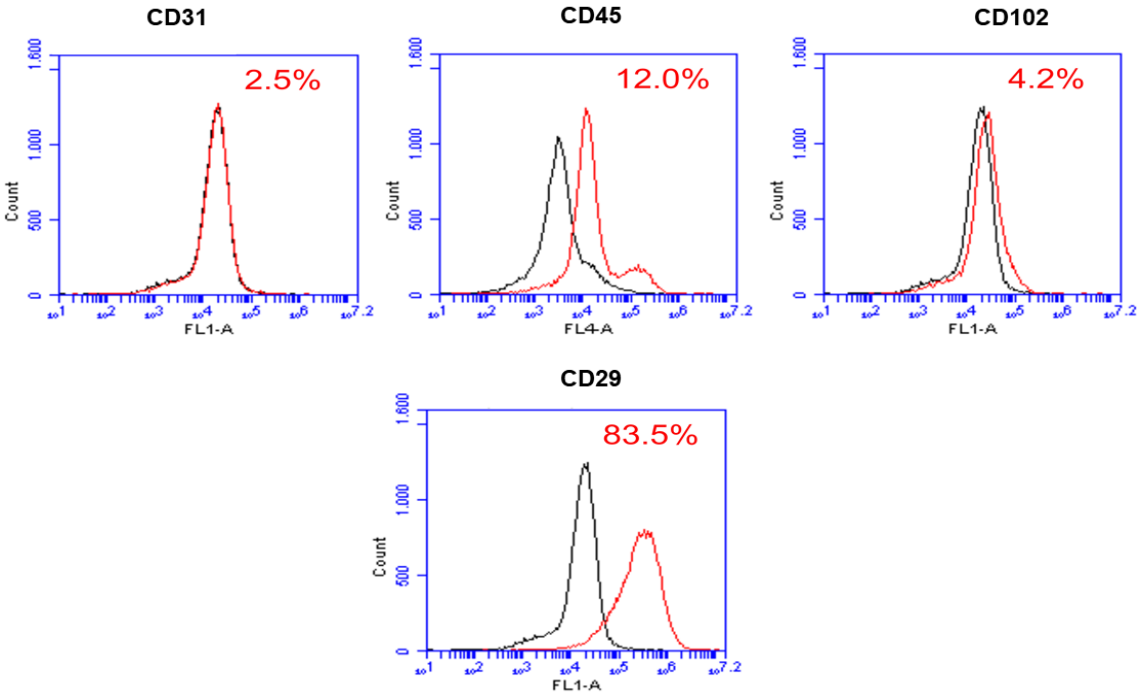
Os valores destacados em vermelho indicam a porcentagem de células positivas para cada marcador testado. FONTE: Próprio autor.

Figura 25 - Histograma representativo para marcadores de rASC avaliados por citometria de fluxo.



Os valores destacados em vermelho indicam a porcentagem de células positivas para cada marcador testado. FONTE: Próprio autor.

Figura 26 - Histograma representativo para marcadores de cASC avaliados por citometria de fluxo.



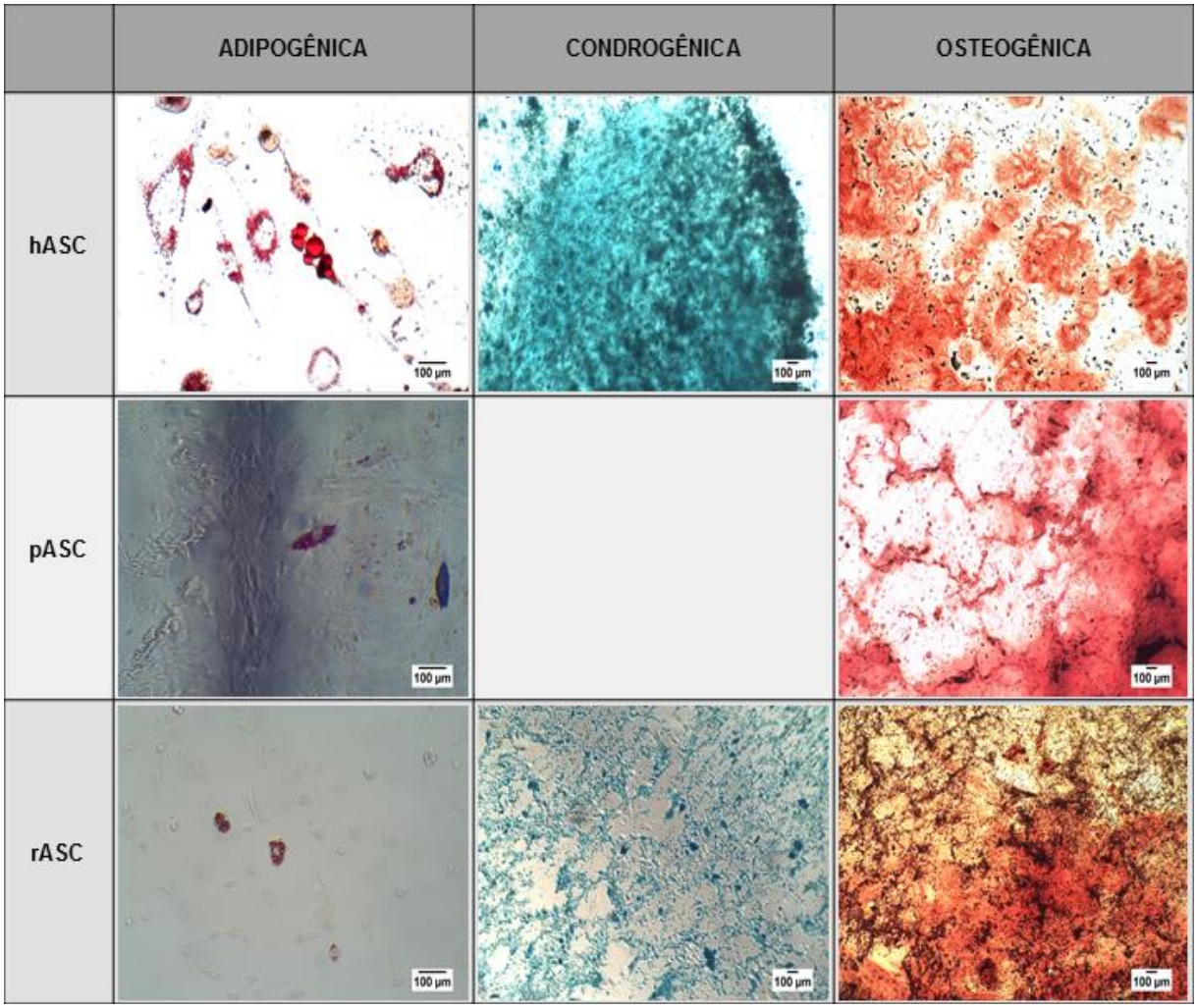
Os valores destacados em vermelho indicam a porcentagem de células positivas para cada marcador testado. FONTE: Próprio autor.

4.4.2 Diferenciações condrogênica, osteogênica e adipogênica das ASC

O potencial de diferenciação das ASC tem por finalidade verificar se as células isoladas a partir do tecido adiposo humano, de porcos, camundongos e ratos apresentam os requisitos básicos para que possam ser definidas e caracterizadas como células-tronco tipo mesenquimal. As diferenciações adipogênicas foram confirmadas por meio da presença de vacúolos lipídicos no citoplasma das células, indicado pela coloração em vermelho com Oil Red. As diferenciações osteogênicas foram confirmadas mediante coloração da matriz óssea celular em tom laranja-avermelhado com o uso de Alizarin Red. As diferenciações condrogênicas foram confirmadas pela coloração Alcian Blue, sendo o azul a indicação da síntese de proteoglicanos pelos condrócitos (Figura 27).

Conforme apresentado na Figura 27, houve diferenciação nas 3 linhagens (osteogênica, condrogênica e adipogênica) para as células isoladas de tecido adiposo humano. Resultados semelhantes de diferenciação foram obtidos para as células de tecido adiposo de ratos. Embora as células de tecido adiposo de suínos tenham se diferenciado em osteócitos e adipócitos, não houve diferenciação para a linhagem condrogênica, em função de repetidas contaminações durante os experimentos de indução desta linhagem. Novos experimentos serão realizados com os estoques de ASC de suínos congeladas, no sentido de completar da melhor forma possível os experimentos de diferenciação. As diferenciações das células cultivadas de tecido adiposo de camundongos apresentaram repetidas contaminações e, da mesma forma, não se obteve resultados positivos para a diferenciação nas linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica. Novos experimentos de diferenciação com células congeladas de tecido adiposo de camundongos serão realizados, buscando a obtenção de resultados que, associados às análises de citometria de fluxo, permitam a caracterização das ASC como sendo do tipo mesenquimal.

Figura 27 - Diferenciações das ASC em adipócitos, condrócitos e osteócitos dos diferentes grupos experimentais.



Diferenciações adipogênicas fotografadas em aumento de 100x enquanto as demais em aumento de 40x. FONTE: Próprio autor.

5 DISCUSSÃO

5.1 FASE 1 – Indução do enfisema por instilação de elastase

O enfisema pulmonar, dentro do espectro da DPOC, representa uma condição patológica caracterizada por inflamação das vias aéreas e destruição dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, sem fibrose aparente (GOLD, 2017). Apesar dos avanços significativos no que se refere ao tratamento farmacológico, não se logrou até o presente momento um método eficaz de terapia curativa para a DPOC/enfisema pulmonar.

A terapia celular com células-tronco adultas e, particularmente, com células estromais mesenquimais (MSC) têm sido relatada em diferentes tipos de patologias crônico-degenerativas como Alzheimer, doença de Parkinson, cirrose hepática, diabetes tipo 1 e 2, entre outras (BROEKMAN et al., 2018; CHENG et al., 2017; KOKTURK et al., 2018; KRUK et al., 2018).

As células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ASC) apresentam características similares às MSC quanto aos critérios de validação propostos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006). Vários trabalhos associam o mecanismo de ação das ASC em processos regenerativos teciduais à liberação de citocinas e fatores de crescimento que estimulam a angiogênese, respostas anti-inflamatórias e anti-apoptóticas (DA SILVA MEIRELLES et al., 2009; FUOCO, 2014; KRUK et al., 2018).

Considerando os aspectos relativos ao potencial terapêutico das ASC, bem como a necessidade de novas alternativas terapêuticas em DPOC que possam, se não resultarem em cura, modificar o curso natural da doença, buscou-se com este projeto, realizar um estudo experimental quanto ao emprego alogênico e xenogênico de ASC em DPOC/enfisema pulmonar. Para tanto, ratos *Wistar* foram submetidos a procedimento de indução de enfisema pulmonar por instilação intratraqueal de elastase e posteriormente receberam infusão de ASC provenientes do tecido adiposo de humanos, porcos ou ratos, afim de avaliar comparativamente o possível efeito terapêutico das ASC, em termos de capacidade regenerativa morfológica e recuperação funcional.

O protocolo de corrida do teste de esforço em esteira motorizada foi adaptado da publicação prévia de Ferreira et al. (2007) e foi aplicado com o intuito de avaliar e comparar a performance em atividade física dos animais, assim como os possíveis efeitos da intervenção terapêutica, em três momentos cruciais do protocolo experimental (AZEVEDO, 2013).

As análises estatísticas dos dados da distância (metros) percorrida nas corridas realizadas pelos animais mostraram que não houve diferença significativa entre as três corridas. Conforme observado nos resultados apresentados na Figura 12, os animais dos grupos VEH, hASC e pASC obtiveram melhor desempenho durante a Corrida 2, quando comparada com as demais corridas. Tendo em vista que a Corrida 2 corresponde ao momento em que, teoricamente, os animais estariam com o enfisema estabelecido, seria esperado um desempenho inferior em relação à Corrida 1. Para a performance dos animais durante a Corrida 3, realizada 14 dias após a infusão de ASC, também era esperado um desempenho superior em relação à Corrida 2. O grupo de animais tratados com células de ratos (rASC) foi o único que obteve melhor performance.

Quando avaliado o desempenho dos grupos experimentais em cada corrida individualmente, foi verificada que somente para a Corrida 2 houve diferença significativa. Estes dados corroboram os resultados obtidos nas análises de medidas repetidas. Em uma avaliação mais apurada, verificou-se diferença entre os grupos hASC e pASC quando comparados com o grupo VEH ou rASC (Figura 13). Estes resultados não apresentam uma coerência e são contraditórios às expectativas teóricas, visto que todos os grupos foram submetidos ao mesmo protocolo de indução do enfisema e, portanto, deveriam apresentar o mesmo desempenho nesta corrida.

Os resultados obtidos por meio do teste de esforço em esteira podem ter sido diretamente influenciados pelo protocolo de corrida utilizado. Seguindo o protocolo adaptado a partir do trabalho citado previamente (FERREIRA et al., 2007), os animais receberam treinamento de 3 dias para familiarização com a esteira. Entretanto, diferentes autores relataram um período de ambientação em esteiras similares de no mínimo 5 dias e com valores de velocidade inicial e aumento gradativo de velocidades superiores àqueles utilizados neste estudo (BRANDÃO et al., 2013; DRUMMOND et al., 2016; SANTOS, 2014; VICENTINI, 2006). Além disso,

o baixo número amostral de cada grupo não permitiu realizar a seleção dos animais que respondiam positivamente ao teste de caminhada e exclusão daqueles que demonstravam resistência.

Fatores de estresse também podem ter influenciado no desempenho dos animais durante as corridas. A esteira utilizada possui uma grade de choque no final de cada baia (contrária ao sentido de rolamento), que possui a função de forçar o animal a realizar a caminhada, como também de permitir mensurar a exaustão do animal quando este se deixa encostar na grade por não caminhar ou por esgotamento físico. Durante os testes, os animais adquiriram um comportamento estratégico de caminhada para evitar o contato com a grade de choque. Este comportamento era desencorajado com um toque suave de uma espátula de madeira. Conner, Wolden-Hanson e Quinn (2014) verificaram que o uso da grade de choque em exercício forçado pode gerar efeitos de confusão devido ao estresse psicológico e comportamento de esquiva, além de influenciar em medições pós-exercício.

O modelo de indução do enfisema por instilação de elastase também pode ser relacionado com os desempenhos verificados nas corridas durante os testes de esforço em esteira. O protocolo utilizado neste trabalho foi o mesmo descrito por Manchini (2010) e Jacobsen (2009), para indução do enfisema pulmonar em ratos *Wistar* via instilação intratraqueal de elastase tipo IV. Entretanto, a concentração de enzima utilizada por estes autores é muito inferior àquelas descritas em diversos trabalhos na literatura (ALMEIDA, 2012; FELICETTI, 2011; FONSECA, 2015; PETTA, 2008). Portanto, pode-se questionar se o protocolo adotado, em termos de concentração de elastase utilizada, foi adequado para a indução de quadro enfisematoso nos animais tratados, passível de detecção funcional.

A partir das análises do lavado broncoalveolar (LBA) não se detectou a ocorrência de células inflamatórias e, portanto, a análise da contagem diferencial dos tipos celulares foi prejudicada. A ausência dessas células deve ser decorrente do procedimento adotado. A coleta do LBA foi realizada 20 minutos após a fixação dos pulmões com paraformaldeído 4%, por meio de um aparato desenvolvido em nosso laboratório. Este novo procedimento permitiu a remoção dos pulmões sem que houvesse colabamentos, decorrentes das alterações pressóricas causadas pela abertura da caixa torácica para a retirada do bloco coração-pulmão (BARBOSA-DE-

OLIVEIRA et al., 2011). Dessa forma, as análises dos tipos celulares presentes no LBA deverão ser processadas a partir de um outro grupo de animais, que não tenham sido tratados com paraformaldeído para a fixação do tecido pulmonar.

A análise morfométrica, realizada por meio do cálculo do intercepto linear médio, revelou não haver diferença morfológica entre os pulmões dos animais, considerando tanto o pulmão direito quanto esquerdo. Estes resultados podem ser decorrentes da concentração de elastase utilizada (ALMEIDA, 2012; FELICETTI, 2011; FONSECA, 2015; PEREIRA, 2016; PETTA, 2008). Dessa forma, faz-se necessário a padronização de uma quantidade mínima da enzima a ser instilada para indução do enfisema pulmonar em ratos *Wistar,* visto que este animal possui menor suscetibilidade à ação da elastase quando comparado à outras espécies (KRUK et al., 2018).

Como proposta terapêutica para o tratamento do enfisema pulmonar, os animais receberam infusão intravenosa de MSC isoladas do tecido adiposo de humanos, porcos ou ratos. As células estromais mesenquimais tem sido amplamente aplicado em protocolos de terapia celular (ANTUNES; SILVA; ROCCO, 2017; BROEKMAN et al., 2018; GEIGER; HIRSCH; HERMANN, 2017; KRUK et al., 2018). O possível efeito regenerativo dessas células no parênquima pulmonar dos ratos foi avaliado mediante microscopia óptica das lâminas histológicas e análise do diâmetro alveolar (Lm), método clássico proposto por Weibel em 1963. Entretanto, conforme discutido anteriormente, não foi observado diferença significativa dos valores morfométricos entre os grupos experimentais.

5. 2 FASE 2 – Indução do enfisema por exposição à fumaça de cigarro

A segunda fase deste projeto foi desenvolvida com o intuito de avaliar o potencial terapêutico das ASC no tratamento do enfisema pulmonar em modelo animal, após exposição crônica à fumaça de cigarro. Assim, camundongos *Swiss* foram submetidos a protocolo de indução do enfisema por exposição à fumaça de cigarro em um aparato desenvolvido pela equipe do Laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTe Cel), realizando adaptações pertinentes para esta pesquisa. Ao final do protocolo de exposição, cada grupo experimental recebeu infusão de

ASC isoladas de humanos, porcos ou camundongos, sendo que o grupo controle recebeu infusão do veículo sem células.

Devido à ausência de protocolos de indução do enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro para camundongos *Swiss* (espécie utilizada na FASE 2 desta pesquisa) descritos na literatura, um grupo de animais foi iniciado ao protocolo de fumaça uma semana antes dos grupos experimentais. Este grupo foi criado no intuito de poder verificar a presença do enfisema nos animais e assim, determinar o término do protocolo de indução. Foram confeccionadas lâminas histológicas dos pulmões destes animais e o enfisema pulmonar pode ser observado 4 meses após o início das exposições (dados não apresentados).

Entretanto, os parâmetros avaliados no teste de mecânica respiratória não revelaram diferença significativa entre os grupos experimentais. Lourenço (2016) e Santos (2014) observaram os mesmos resultados para este teste ao avaliar camundongos C57BL/6 após 3 meses de exposição à fumaça de cigarro. Dessa forma, o grau de lesão do parênquima pulmonar encontrado nos animais deste estudo após 4 meses de exposição não deve ter sido suficiente para detecção na avaliação da mecânica respiratória (HE et al., 2015). Além disso, estudos sugerem que as espécies murinas apresentam diferentes respostas antioxidante à fumaça de cigarro e, desta forma, a suscetibilidade à doença e o grau do enfisema pulmonar, quando induzido, pode variar (BISELLI et al., 2011; KOZMA et al., 2014; RAHMAN et al., 2017; RIBEIRO-PAES et al., 2009; WRIGHT; CHURG, 2010).

Na conceituação de DPOC está implícita o processo inflamatório crônico causado por exposição a agentes tóxicos do ambiente, como a poluição e fumaça de cigarro (ALVES et al., 2010; ARANTES, 2015; COSTA et al., 2009; RODRIGUES, 2013; RODRIGUES, 2015; RUFINO; COSTA, 2013; RUFINO; LAPA-E-SILVA, 2006). A exposição prolongada a agentes nocivos leva a uma estimulação de células inflamatórias, como macrófagos, leucócitos e neutrófilos, que podem migrar em grande quantidade para o pulmão. Estes eventos promovem reação inflamatória que, ao longo dos anos, pode acarretar em alterações na estrutura e funcionalidade pulmonar (ALVES et al., 2010; COSTA et al., 2009; RUFINO; COSTA, 2013). Segundo a hipótese de desequilíbrio entre proteases e antiproteases, o surgimento do enfisema pulmonar é resultado da lesão proteolítica dos septos alveolares, causada pela liberação esporádica ou contínua de proteinases pelas células

inflamatórias (ARANTES, 2015; COSTA et al., 2013; RODRIGUES, 2015; RUFINO; COSTA, 2013; RUFINO; LAPA-E-SILVA, 2006). Diversos estudos evidenciaram o aumento da concentração destes tipos celulares presentes no LBA de fumantes e pacientes enfisematosos quando comparados com pessoas não fumantes. Em modelos animais, as células inflamatórias têm sido associadas ao subsequente desenvolvimento da DPOC (ARANTES, 2015; COSTA; RUFINO; LAPA-E-SILVA, 2006; RODRIGUES, 2013; RODRIGUES, 2015).

Quando analisamos os gráficos referentes à presença dos diferentes tipos celulares encontrados no LBA (Figura 18), verifica-se número maior de outros tipos celulares em relação aos diferentes tipos de células inflamatórias. As células estruturais e do sistema imune, em conjunto com os neutrófilos, realizam o recrutamento das demais células inflamatórias para desencadear a resposta inflamatória ampliada e anormal. Essa resposta necessariamente depende da ocorrência de macrófagos e linfócitos interagindo com os demais tipos celulares (COSTA et al., 2009). Levando em consideração os aspectos discutidos, pode-se questionar que o quadro inflamatório nos animais deste estudo não atingiu um nível de exacerbação suficiente para provocar alterações morfológicas e funcionais, passíveis de detecção pela metodologia empregada.

A exposição à fumaça de cigarro para indução do enfisema pulmonar é considerado o modelo de estudo mais apropriado para essa doença. Na literatura é possível encontrar protocolos descrevendo o surgimento das alterações morfológicas típicas do enfisema logo após curtos períodos de exposição (BISELLI et al., 2011; HE et al., 2015; RINALDI et al., 2012). Valença e colaboradores (2004), relataram o surgimento de enfisema em camundongos C57/BL6 após 2 meses de exposição à fumaça de cigarro, utilizando protocolo de indução semelhante ao aplicado para o presente estudo.

Devido à inexistência de protocolos para indução do enfisema pulmonar em camundongos *Swiss*, diversos fatores foram considerados para determinar o término do período de exposição, como a avaliação histológica dos pulmões dos animais pertencentes ao grupo iniciado ao protocolo com uma semana de antecedência. Assim, após o período de 4 meses de exposição contínua à fumaça de cigarro, o protocolo foi finalizado e os animais receberam infusão intravenosa de células

estromais mesenquimais isoladas do tecido adiposo de humanos, porcos e camundongos, como proposta terapêutica para o enfisema pulmonar.

A análise do intercepto linear médio (Lm) foi realizada para os pulmões direito e esquerdo dos animais, com o propósito de comparar a possível ação terapêutica regenerativa das ASC sobre o parênquima pulmonar enfisematoso, decorrente da exposição à fumaça de cigarro. Os animais tratados com ASC isoladas de porcos foi o único grupo com valores de Lm similares aos do grupo controle. Dessa forma, dentro do contexto experimental deste estudo, este resultado pode ser decorrente do efeito terapêutico das ASC.

Alguns autores afirmam que para este tipo de estudo utilizando modelos animais, é necessário tempo mínimo de 6 meses de exposição à fumaça de cigarro para verificar as diferenças na análise do Lm (RODRIGUES, 2015). Arantes, em 2015, submeteu camundongos C57/BL6 à fumaça de cigarro durante 1, 3 e 6 meses, e ao final, avaliou morfometricamente o dano causado nos pulmões dos animais. Os valores médios aumentados significativamente de Lm só foram observados aos 6 meses de exposição. Embora o tempo mínimo preconizado de exposição à fumaça, estudos demonstram que a lesão tecidual causada após esse período ainda é considerada de grau leve (RAHMAN et al., 2017; RODRIGUES, 2015). Os resultados obtidos indicam que o tempo de 4 meses, nas condições experimentais adotadas neste estudo, não foram adequadas e suficientes para gerar um padrão de resposta inflamatória, bem como alterações morfológicas e funcionais compatíveis com um quadro patológico compatível com enfisema pulmonar.

5.3 Isolamento, cultivo e caracterização celular

Para o isolamento das células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo de humanos, porcos, ratos e camundongos, foi tomado como base protocolos descritos na literatura e adaptados para cada fonte de obtenção (DARIOLLI, 2011; FUOCO, 2012; ZUK et al., 2013). Durante todo o processo as ASC das diferentes fontes apresentaram característica morfológica mesenquimal típica além de capacidade de adesão à superfície plástica.

A citometria de fluxo foi realizada para as ASC como critério de validação, no intuito de verificar se as células isoladas do tecido adiposo das diferentes fontes e

infundidas nos animais que receberam instilação de elastase ou expostos à fumaça de cigarro, poderiam ser caracterizadas como tipo mesenquimal e, desta forma, garantir o possível potencial terapêutico para o tratamento do enfisema pulmonar. Para isso, as ASC foram testadas contra anticorpos de superfície para humanos, porcos, ratos e camundongos (BADIMON; ONATE; VILAHUR, 2015; CHEN et al., 2016; LI et al., 2017). Os resultados obtidos, apresentados na Tabela 2, evidenciam que os marcadores de superfície estão coerentes com as proposições da ISCT (DOMINIC et al., 2006), além de apresentar baixos níveis de contaminação por outros tipos celulares.

Além disso, as ASC isoladas das diferentes fontes apresentaram capacidade de diferenciação in vitro nas linhagens adipogênica, condrogência e osteogênica, confirmando, desta forma, mais um dos critérios de validação proposto para as MSC (DOMINIC et al., 2006).

Os resultados negativos para a diferenciação condrogênica das ASC de porcos, assim como para as diferenciações das ASC de camundongos podem ser decorrentes de contaminações de reagentes específicos, como o kit de diferenciação. Novos experimentos serão realizados, no sentido de completar da melhor forma possível os dados de caracterização celular. A incorporação destes novos resultados permitirá a sustentação e validação teórica, quanto à origem mesenquimal das células isoladas, sobretudo quando associadas aos resultados da análise de citometria de fluxo.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que o protocolo de indução do enfisema pulmonar por instilação intratraqueal de elastase não foi passível de reprodutibilidade, assim como o protocolo de indução por exposição à fumaça de cigarro não foi suficiente para promover alterações morfológicas e funcionais típicas de enfisema pulmonar. A proposta terapêutica xenogênica foi eficaz quando se empregou infusão de ASC do tecido adiposo de porcos em camundongos expostos à fumaça de cigarro. A padronização de protocolos eficientes no estabelecimento do enfisema pulmonar, seja por instilação de protease ou por exposição à fumaça de cigarro, é de fundamental importância para a investigação de novas abordagens terapêuticas em DPOC/enfisema e, particularmente, quanto ao potencial terapêutico das células estromais mesenquimais em transplantes alogênicas e xenogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, FM. **Estudo do crescimento pulmonar compensatório após bilobectomia em ratos com enfisema induzido por elastase.** 2012. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ALVES, WS; et al. Terapia com laser 670nm no tratamento da DPOC experimental em ratos. **ConScientiae Saúde**, v. 9, n. 4, 2010.

ANTUNES, MA.; SILVA, JRL; ROCCO, PRM. Mesenchymal stromal cell therapy in COPD: from bench to bedside. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, v. 12, p. 3017, 2017.

ANTUNES, MA; ROCCO, PRM. Elastase-induced pulmonar emphysema: insights from experimental models. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 83, n. 4, p. 1385-95, 2011.

ARANTES, Petra de Mello Motta. **Efeitos pulmonares da fumaça de cigarro associada ao particulado de diesel exaurido (DEP) em camundongos**. 2015. 130 p. Tese (Doutorado em Educação e Saúde) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ASSONI, Amanda Faria. **Caracterização do secretoma de células multipotentes mesenquimais estromais de diferentes fontes**. 2015. 103 p. Tese (Doutorado em Biologia/Genética) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

AZEVEDO, KRS. Avaliação funcional pulmonar na DPOC. **Pulmão RJ**, v. 22, n. 2, p. 24-29, 2013.

BADIMON, L; ONATE, B; VILAHUR, G. Adipose-derived mesenchymal stem cells and their reparative potential in ischemic heart disease. **Revista Española de Cardiologia (EnglishEdition)**, v. 68, n. 7, p. 599-611, 2015.

BARBOSA-DE-OLIVEIRA, VA; et al. Estudo comparativo de dois procedimentos de fixação histológica para análise de enfisema pulmonar induzido experimentalmente. **Ciência Pesquisa e Consciência**, v. 3, p. 7-11, 2011.

BARBOZA, CAG; et al. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. **Einstein**, v. 12, n. 1, p. 75-81, 2014.

BARNES, PJ; SHAPIRO, SD; PAUWELS, RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and celular mechanisms. **EurResp J**., v. 22, n. 4, p. 672-688, 2003.

BASSI, D. **Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica: considerações sobre deglutição e qualidade de vida**. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado Multidisciplinar em Saúde) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

BRACKE, KR; et al. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema are attenuated in CCR6-deficient mice. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 7, p. 4350-4359, 2006.

BRANDÃO, BB; et al. Double effort test for evaluation of aerobic capacity of diet-induced obese rats. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 19, n. 3, p. 214-218, 2013.

BROEKMAN, W; et al. Mesenchymal stromal cells: a novel therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonar disease?. **Thorax**, v. 73, n. 6, p. 565-574, 2018.

CALIARI-OLIVEIRA, C; et al. Xenogeneic mesenchymal stromal cells improve wound healing and modulate the immune response in an extensive burn model. **Cell transplantation**, v. 25, n. 2, p. 201-215, 2016.

CAVAILLÈS, A; et al. Comorbidities of COPD. **European Respiratory Review**, v. 22, n. 130, p. 454-475, 2013

CENDON, S; et al. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 30, n. 10, p. 1241-1247, 1997.

CHAPMAN, KR; et al. Long-term safety and efficacy of indacaterol, a long-acting β2-agonist, in subjects with COPD: a randomized, placebo-controlled study. **CHEST Journal**, v. 140, n. 1, p. 68-75, 2011.

CHEN, Y; et al. Isolation and differentiation of adipose-derived stem cells from porcine subcutaneous adipose tissues. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 109, 2016.

CHENG, S-L; et al. Mesenchymal stem cell administration in patients with chronic obstructive pulmonary disease: state of the science. **Stem cells international**, v. 2017, 2017.

CONNER, JD; WOLDEN-HANSON, T; QUINN, LS. Assessment of murine exercise endurance without the use of a shock grid: an alternative to forced exercise. **Journalofvisualizedexperiments: JoVE**, n. 90, 2014

COSTA, CH; et al. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC. **Rev Assoc Med Bras**, v. 55, n. 3, p. 347-354, 2009.

DARIOLLI, R. **Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de porcos criopreservadas e sua responsividade ao *Shear stress*.** 2011. 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DA SILVA MEIRELLES, L; et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 20, n. 5, p. 419-427, 2009.

DOMINICI, M; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DRUMMOND, LR; et al. NITRIC OXIDE AND CA2+ DYNAMICS IN CARDIOMYOCYTES: INFLUENCE OF EXERCISE CAPACITY. **RevistaBrasileira de Medicina do Esporte**, v. 22, n. 1, p. 31-34, 2016.

FARIA, CA; et al. Experimental basis and new insights for cell therapy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **StemCellReviewsandReports**, v. 8, n. 4, p. 1236-1244, 2012.

FELICETTI, JC. **Controle do escape de ar em modelo experimental de aerostasia pulmonar pela aplicação de enxerto autólogo de gordura livre.** 2011. 83 p. Tese (Programa de Pós-graduação em Ciências Pneumológicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

FERREIRA, JCB; et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760-765, 2007.

FERREIRA, MAP. **Escore de cálcio coronariano, índice tornozelobraquial e proteína C reativa em tabagistas pesados com doença pulmonar obstrutiva crônica e com espirometria normal.** 2014. 64 f. Tese (Doutorado em Ciências Pneumológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

FONSECA, LMC. **Lesão pulmonar aguda induzida por injeção intraperitoneal de lipopolissacáride em ratos Wistar com ou sem enfisema induzido por elastase.** 2015. 75 p. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

FREITAS, PM. **Aplicação da terapia celular em modelo experimental de enfisema pulmonar**. 2009. 51 f. Dissertação (Mestrado em Gerontologia Biomédica) - Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

FUJITA, M; NAKANISHI, Y. The pathogenesis of COPD: lessons learned from in vivo animal models. **Medical Science Monitor**, v. 3, p. 19-24, 2007.

GEIGER, S; HIRSCH, D; HERMANN, FG. Cell therapy for lung disease. **European Respiratory Review**, v. 26, n. 144, p. 170044, 2017.

GINANI, F; SOARES, DM; BARBOZA, CAG. Rendimento de células mesenquimais do tecido adiposo submetidas a diferentes protocolos de extração. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 17, n. 1, p. 65-70, 2013.

GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE - GOLD. **Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease – 2017 Report.** Disponível em: <http://goldcopd.org/gold-2017-global-strategy-diagnosis-management-prevention-copd/ >. Acessoem: 14 fev. 2017.

GROSS, P; PFITZER, E; TOLKER, M. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. **Arch. Environ. Health**, v. 11, p. 50-8, 1965.

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, M; et al. Comparison between xenogeneic and allogeneic adipose mesenchymal stem cells in the treatment of acute cerebral infarct: proof of concept in rats. **Journal of translational medicine**, v. 13, n. 1, p. 46, 2015.

HE, ZH; et al. Comparison between cigarette smoke-induced emphysema and cigarette smoke extract-induced emphysema. **Tobacco induced diseases**, v. 13, n. 1, p. 6, 2015.

HUBER, GL; et al. A morphologic an physiologic bioassay for quantifying alterations in the lung following experimental chronic inhalantion of tobacco smoke. **Bulletin europeen de physiopathologierespiratoire**, v. 17, n. 2, p. 269-327, 1980.

HUH, JM; et al. Bone marrow cells repair cigarette smoke-induced emphysema in rats. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 301, n. 3, p. 255-66, 2011.

JACOBSEN, O. **Ação da sinvastatina sobre o diâmetro alveolar e a leucometria no líquido broncoalveolar de ratos em modelo de enfisema elastase-induzido.** 2009. 68 p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação) – Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2009.

JARDIM, JR; OLIVEIRA, JA; NASCIMENTO, O. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). **J. Bras. Pneumol.**, v. 30, n. 5, 2007.

JARDIM, JR; et al. Modelo de câmara inaladora para los estúdios controlados sobre la toxicidade del humo del tabaco em los roedores. **Arch. Bronconeumol.**, v. 46, n. 9, p. 455-8, 2010.

KAKUDO, N; et al. Potential of adipose-derived stem cells for regeneration medicine: clinical application and usefulness of fat grafting. **J Stem Cell Res Ther**, v. 4, n. 204, p. 2, 2014.

KATSHA, AM; et al. Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model. **Molecular Therapy**, v. 19, n. 1, p. 196-203, 2011.

KAWAKAMI, M; et al. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, p. 1434-38, 2008.

KEIL, M; et al. A scanning electron microscopic investigation of genetic emphysema in tight-skin, pallid, and beige mice, three different C57BL/6J mutants. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 74, n. 2, p. 353-362, 1996.

KIELTY, C; et al. The tight skin mouse: demonstration of mutant. Brillin-1 production and assembly into abnormal microfibrils. **The Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 5, p. 1159-1166, 1998.

KIM, Y; et al. The therapeutic effects of optimal dose of mesenchymal stem cells in a murine model of an elastase induced-emphysema. **Tuberculosis and respiratory diseases**, v. 78, n. 3, p. 239-245, 2015.

KLOOSTER, K; et al. Endobronchial valves for emphysema without interlobar collateral ventilation. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 24, p. 2325-2335, 2015.

KOKTURK, Nurdan et al. Stem cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease. How far is it to the clinic?. **American journal of stem cells**, v. 7, n. 3, p. 56, 2018.

KOTTON, DN; et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. **Development**, v. 128, n. 24, p. 5181-5188, 2001.

KOZMA, RDLH. **Modelo experimental de indução de enfisema pulmonar por exposição à fumaça de cigarro**. 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KOZMA, RDLH; et al. A new experimental model of cigarette smoke-induced emphysema in Wistar rats. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 40, n. 1, p. 46-54, 2014.

KRUK, DMLW; et al. Mesenchymal Stromal Cells to Regenerate Emphysema: On the Horizon?. **Respiration**, p. 1-11, 2018.

LE BLANC, K; et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **The Lancet**, v. 371, n. 9624, p. 1579-1586, 2008.

LEE, J; SANDFORD, A; MAN, P. Is the aging process accelerated in chronic obstructive pulmonary disease?.**Current opinion in pulmonary medicine**, v. 17, n. 2, p. 90-97, 2011.

LI, JN; et al. Effect of pregnancy on the proliferation of rat adipose-derived stem cells. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 1, 2017.

LIU, X; et al. Preclinical studies of mesenchymal stem cell (MSC) administration in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157099, 2016.

LONGHINI-DOS-SANTOS, N; et al. Cell Therapy Decreases Inflammation and Improves the Morphology of the Lung Parenchyma in a Murine Model of Cigarette Smoke-Induced Emphysema. **International Journal of New Technology and Research**, v. 4, n. 1, 2018.

LONGHINI-DOS-SANTOS, N; et al. Cell Therapy with Bone Marrow Mononuclear Cells in Elastase-Induced Pulmonary Emphysema. **StemCellReviewsandReports**, v. 9, n. 2, p. 210-218, 2013.

LONGHINI-DOS-SANTOS, N. **Terapia celular em modelo experimental do enfisema pulmonar induzido por meio de fumaça de cigarro**. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

LOURENÇO, JD. **Avaliação do tratamento com um inibidor para serinoprotease em modelo experimental de enfisema induzido por exposição à fumaça de cigarro**. 2016. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

MAGNUSSEN, H; et al. Withdrawal of inhaled glucocorticoids and exacerbations of COPD. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 14, p. 1285-1294, 2014

MANCHINI, MT. **Efeito da prednisolona sobre o processo inflamatório em diâmetro alveolar em enfisema elastase induzido em ratos**. 2010. 66 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação) – Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2010.

MARCELINO, MY; et al. Animal models in chronic obstructive pulmonary disease—an overview. **Experimental lung research**, v. 40, n. 6, p. 259-271, 2014.

MARCELINO, MY; et al. Cell therapy in experimental model of inflammatory bowel disease. J **Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)**, v. 35, n. 1, p. 20-27, 2015

MARCH, T; et al. Animal models of emphysema and their relevance to studies of particle-induced disease. **Inhalation Toxicology**, v. 12, n. sup4, p. 155-187, 2000.

MARIA, ATJ; et al. Human adipose mesenchymal stem cells as potent anti-fibrosis therapy for systemic sclerosis. **Journal of autoimmunity**, v. 70, p. 31-39, 2016.

MARTORANA, PA; et al. A 16-month study of development of genetic emphysema in tight-skin mice. **Am Rev Respir Dis**, v. 139, n. 1, p. 226-232, 1989.

MATTOS, WLLD; et al. Accuracy of clinical examination findings in the diagnosis of COPD. **JornalBrasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 5, p. 404-408, 2009.

MURRAY, CJL; LOPEZ, AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 349, n. 9061, p. 1269-1276, 1997.

OLIVEIRA, LA; et al. Relação do trabalho desenvolvido em testes máximo e submáximo de capacidade de exercício com o grau de obstrução ao fluxo aéreo em indivíduos com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.**Fisioterapia e Pesquisa**, v. 21, n. 1, p. 81-86, 2014.

OLIVEIRA, VAB. **Emprego de células mononucleares da medula óssea em terapia experimental do enfisema pulmonar**. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ORTIZ, LA; et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8407-8411, 2003.

PEREIRA, DL. **Terapia celular com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo e "pool" de células mononucleares da medula óssea em modelo experimental de fibrose pulmonar.** 2016. 57 p. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2016.

PEREIRA, RF; et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 92, n. 11, p. 4857-4861, 1995.

PETTA, AD. **Influência do diabetes mellitus na evolução do enfisema pulmonar induzido por elastase em ratos.** 2008. 75 p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Experimental) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PIGOTT, JH; et al. Investigation of the immune response to autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 156, n. 1-2, p. 99-106, 2013.

RAHMAN, I; et al. Vulnerability and genetic susceptibility to cigarette smoke–induced emphysema in mice. 2017.

REINDERS, MEJ; FIBBE, WE; RABELINK, TJ. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation. **NephrologyDialysisTransplantation**, v. 25, p. 17-24, 2010.

RIBEIRO-PAES, JT; et al. Terapia celular em doenças pulmonares: existem perspectivas?.**Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 1, p. 140-148, 2009.

RIBEIRO-PAES, JT; et al. Unicentric study of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease/pulmonary emphysema. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, p. 63-71, 2011.

RIBEIRO-PAES, JT; STESSUK, T; KOZMA, RDLH. Cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease: state of the art and perspectives. **INTECH Open Access Publisher,** 2012.

RIBEIRO-PAES, JT; et al. A protocol proposition of cell therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. **Revista Portuguesa de Pneumologia (EnglishEdition)**, v. 20, n. 2, p. 84-91, 2014.

RINALDI, M; et al. Long-term nose-only cigarette smoke exposure induces emphysema and mild skeletal muscle dysfunction in mice. **Disease models & mechanisms**, v. 5, n. 3, p. 333-341, 2012.

RODRIGUES, KKDC. **Estudo dos efeitos oxidantes sobre a resposta inflamatória pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro**. 2013. 87 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Metabólica e Fisiológica) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2013.

RODRIGUES, R. **Estudo de um modelo experimental para o desenvolvimento de enfisema pulmonar induzido por elastase e fumo em camundongos**. 2015. 77 p.Tese (Doutorado em Fisiopatologia Experimental) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ROJAS, M; et al. Bone marrow- derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 33, n. 2, p. 145-152, 2005.

RUFINO, R; COSTA, CH. Etiopatogenia da DPOC. **Pulmão RJ**, v. 22, n. 2, p. 9-14, 2013.

RUFINO, R; LAPA-E-SILVA, JR. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. **J Bras Pneumol**, v. 32, n. 3, p. 241-8, 2006.

SAETTA, M; et al. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 163, n. 6, p. 1304-1309, 2001.

SANTOS, ACC. **Resposta funcional e transcricional do nervo isquiático de ratos submetidos ao exercício aeróbico de baixa intensidade.** 2014. 71 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Instituto Superior em Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2014.

SCHWEITZER, KS; et al. Adipose stem cell treatment in mice attenuates lung and systemic injury induced by cigarette smoking. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 183, n. 2, p. 215-225, 2011.

SHAPIRO, S. Animal models for COPD. **Chest.**, v. 117, p. 223-7, 2000.

SILVA, LHA; et al. Strategies to improve the therapeutic effects of mesenchymal stromal cells in respiratory diseases. **Stem cell research & therapy**, v. 9, n. 1, p. 45, 2018.

STESSUK, T; et al. Phase I clinical trial of cell therapy in patients with advanced chronic obstructive pulmonary disease: follow-up of up to 3 years. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 35, n. 5, p. 352-357, 2013.

SURATT, BT; et al. Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 168, n. 3, p. 318-322, 2003.

TOLEDO, AC; et al. Aerobic exercise attenuate pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. **European Respiratory Journal**, v. 39, n. 2, p. 254-264, 2012.

VICENTINI, CR. **Análise densitométrica, histomorfométrica e biomecânica em fêmures de ratos submetidos à ausência de carga e atividade física em esteira**. 2006. 62 p. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica) – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2006.

WEIBEL E. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 12, p. 131, 1963.

WEISS, DJ. et al. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. **Chest**, v. 143, n. 6, p. 1590-1598, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases (GARD) General Meeting Report**. Istambul, Turkey; 2008. p. 30-31.

WRIGHT, JL; COSIO, M; CHURG, A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Physiol. Cell Mol. Physiol.**, v. 295, n. 1, p. L1-L15, 2008.

WRIGHT, JL; CHURG, A. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. **Expert. Rev. Respir. Med.**, v. 4, n. 6, p. 723-34, 2010.

YAMADA, M; et al. Bone marrow- derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 2, p. 1266-1272, 2004.

ZHANG, X; et al. Infliximab protects against pulmonary emphysema in smoking rats. **Chinese Medical Journal-Beijing**, v. 124, n. 16, p. 2502, 2011.

ZHENG, H; et al. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke. **Toxicology letters**, v. 189, n. 3, p. 225-234, 2009.

ZUK, PA; et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

ZUK, P. Adipose-derived stem cells in tissue regeneration: a review. **ISRN Stem Cells**, v. 2013, 2013

APÊNDICE(S)

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) para coleta de tecido adiposo

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

O(a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa "Terapia celular com células estromais mesenquimais alogênicas e xenogênicas em modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase ou fumaça de cigarro", sob a responsabilidade dos pesquisadores Dr. João Tadeu Ribeiro Paes, RG nº 709035-0 e Rafael Guilen de Oliveira, RG nº 47126188-9.

Este termo deverá ser elaborado em duas vias. Depois de lido, rubricado e assinado, uma via ficará em poder do sujeito ou de seu representante legal e a outra via em poder do pesquisador responsável.

A pesquisa será realizada com células-tronco retiradas do tecido adiposo (gordura). Será utilizado apenas uma parte do material retirado da região abdominal (50 mg). O restante, conforme o procedimento que o(a) Senhor(a) conversou com seu médico, será descartado.

A gordura coletada será levada para o nosso laboratório, que está qualificado para a separação das células-tronco. As células obtidas serão cultivadas e depois aplicadas em animais de laboratório (ratos) que apresentam quadro clínico de enfisema pulmonar. A hipótese é que as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano atuem promovendo a regressão da doença, constituindo, assim, uma nova opção de terapia para o enfisema pulmonar. Os resultados obtidos com este estudo são importantes, pois se significativos, permitirão a proposição de uma nova abordagem terapêutica para os casos de fibrose pulmonar em humanos.

O seu médico já esclareceu ao Senhor(a) os riscos e benefícios do procedimento de retirada da gordura. Nós não participaremos desta etapa, apenas utilizaremos parte do

material coletado pelo médico cirurgião. Se o(a) Senhor(a) concordar em doar parte da gordura retirada da barriga, não haverá risco nenhum para a sua saúde e integridade física, pois todo o estudo será feito em laboratório, após o procedimento cirúrgico.

Sua identidade será mantida em sigilo pelos pesquisadores, sendo utilizados apenas os dados necessários para esta pesquisa, como a faixa etária do doador. Informamos ainda que os resultados deste estudo serão publicados em uma revista científica, mas, repetindo, sua identidade será mantida em sigilo.

O(a) Senhor(a) pode a qualquer momento desistir da doação do material, mesmo depois de ter assinado este termo de consentimento.

O(a) Senhor(a) deve estar à vontade para fazer qualquer pergunta sobre este estudo, podendo entrar em contato, a qualquer momento, com os pesquisadores responsáveis ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), cujo nome, telefone e endereço seguem abaixo:

PESQUISADORES

Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

E-mail: jtrpaes@yahoo.com.br

Telefone (18) 3302-5848

Rafael Guilen de Oliveira

E-mail: rafa.oguilen@gmail.com

Telefone: (18) 99720-7375

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100 - Assis/ SP

Cep: 19806900 Bairro: Vila Tênis Clube

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

E-mail: cep@assis.unesp.br

Telefone: (18) 3302-5607 Fax: (18) 3302-5804

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100 – Assis/SP

Cep: 19 806 900

CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG: _____, abaixo assinado, concordo em participar, como sujeito, da pesquisa "Terapia celular com células estromais mesenquimais alogênicas e xenogênicas em modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por elastase ou fumaça de cigarro".

Fui devidamente informado(a) e esclarecido sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido, ainda, que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Declaro, ainda, que ( ) concordo / ( ) não concordo com a publicação dos resultados desta pesquisa, ciente da garantia quanto ao sigilo das minhas informações pessoais e ao meu anonimato.

Local e data _____, ____ de _____ de _____.

_____

Assinatura

Nós, Dr. João Tadeu Ribeiro Paes e Rafael Guilen de Oliveira, pesquisadores responsáveis pelo estudo, obtivemos de forma voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do sujeito/representante legal para a participação na pesquisa.

_____

Assinatura dos Pesquisadores

João Tadeu Ribeiro Paes – CPF 76148726815

Rafael Guilen de Oliveira – CPF 39886712821