

Terapia celular no tratamento da bronquiolite obliterante em modelo murino

Cell therapy in the treatment of bronchiolitis obliterans in a murine model

JULIO DE OLIVEIRA ESPINEL¹; CAROLINA URIBE¹; FABIOLA SCHONS MEYER¹; RAFAEL BRINGHETTI²; JANE ULBRICHT KULCZYNSKI¹; MAURÍCIO GUIDI SAUERESSIG¹

R E S U M O

Objetivo: avaliar a importância das células-tronco derivadas de tecido adiposo na redução do processo inflamatório no enxerto em modelo murino de transplante traqueal heterotópico alogênico. **Métodos:** foi realizado alotransplante traqueal heterotópico em bolsa dorsal subcutânea e injetado 5×10^5 células-tronco mesenquimais, derivadas de tecido adiposo, sistemicamente. Os animais foram distribuídos em dois grupos, conforme o tempo de sacrifício: T7 e T21. Procedida a análise em HE e morfometria digital. **Resultados:** Os T7 tratados com terapia celular apresentaram mediana de área obstruída do enxerto de 0 contra 0,54 dos controles ($p=0,635$). Os T21 tratados apresentaram mediana de área obstruída da luz do enxerto de 0,25 nos tratados e 0 nos controles ($p=0,041$). **Conclusão:** a terapia celular injetada sistemicamente em modelo experimental murino de bronquiolite obliterante não reduziu a gravidade do processo inflamatório no aloenxerto de forma estatisticamente significativa em sete dias; de modo contrário, em 21 dias, aumentou o processo inflamatório no aloenxerto.

Descritores: Transplante Heterotópico. Bronquiolite Obliterante. Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos. Células-Tronco. Transplante de Células-Tronco Mesenquimais.

INTRODUÇÃO

O transplante pulmonar tornou-se uma alternativa viável para muitas doenças pulmonares terminais. A bronquiolite obliterante (BO) é o principal limitante à sobrevida em longo prazo no transplante pulmonar. Apresenta etiologia inflamatória. Múltiplos fatores contribuem para o desenvolvimento dessa condição: episódios repetidos de rejeição aguda, infecções pelo citomegalovírus, doença do refluxo gastroesofágico, disfunção primária do enxerto, tipo de transplante realizado, se unilateral ou bilateral, e ainda, aspectos relacionados à autoimunidade.

As alternativas terapêuticas para BO são limitadas e sem um protocolo claramente estabelecido. Entre os possíveis tratamentos, incluem-se alterar a medicação imunossupressora, fotofereze, irradiação linfóide total, azitromicina, plasmaferese e ciclosporina inalada^{1,2}. Algumas iniciativas nacionais tentaram avançar nesse tema e muitas alternativas continuam surgindo^{3,4}.

O modelo experimental mais simples para estudar BO (rejeição crônica) é do transplante traqueal heterotópico alogênico com roedores de pequeno porte⁵⁻⁷. Esse modelo mostra-se robusto para estudos sobre imunogênese, do ponto de vista genético e molecular, e para avaliação de novas terapêuticas imunossupressoras em fases iniciais.

As células-tronco (CT) são aquelas com capacidade de autorrenovação e diferenciação e há um volume crescente de estudo destas células^{5,8-13}. Tem-se testado o seu papel em diferentes doenças, criando-se um novo ramo do conhecimento – a medicina regenerativa.

Sabe-se que as células-tronco mesenquimais (CTM) têm propriedades imunomoduladoras. Tem sido proposto que sejam capazes de modular a resposta à lesão isquêmica ou mesmo atenuar os efeitos das doenças imunomediadas. As CTM já foram testadas em ensaios clínicos em humanos em cenários de doença do enxerto contra hospedeiro após transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas e na doença inflamatória intestinal^{8,9}. Em modelo experimental de transplante traqueal heterotópico, Grove *et al.* avaliaram o papel das CTM derivadas de medula óssea e detectaram expressiva redução de 60% na ocorrência da BO⁵.

Considerando-se que a BO é uma doença de natureza inflamatória, que limita a sobrevida do transplante pulmonar e que as opções terapêuticas são limitadas, elaborou-se um estudo experimental para avaliar a importância das células-tronco derivadas de tecido adiposo na redução do processo inflamatório no enxerto em modelo murino de transplante traqueal heterotópico alogênico.

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

MÉTODOS

Este trabalho experimental, randomizado, cego e controlado foi desenvolvido no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelos seguintes laboratórios: Unidade de Experimentação Animal, Centro de Terapia Gênica, Laboratório de Patologia Experimental e Laboratório de Vias Aéreas e Pulmão. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 100524.

A manipulação e o alojamento dos camundongos estiveram de acordo com a Resolução Normativa nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do *United State National Institute of Health* (NIH publicação nº 85-23, revisada em 1996).

Os camundongos foram adquiridos de centros especializados em animais de experimentação. Ao todo, utilizaram-se 90 camundongos, sendo 37 animais BALBc (receptores) e 37 animais C57BL6 (doadores). Usou-se 16 camundongos C57BL6 para extração de células-tronco mesenquimais. Todos os animais foram tratados conforme a norma vigente para animais de experimentação.

Para a obtenção de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo os camundongos C57BL6 foram mortos por deslocamento cervical na Unidade de Experimentação Animal (UEA). Retirou-se o tecido adiposo epididimal e colocado em meio de cultura constituído por *Dulbecco's Modified Eagle Medium* suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. Essa amostra foi transportada ao Centro de Terapia Gênica e colocada em ambiente estéril dentro de capela de exaustão. O tecido foi submetido à digestão mecânica com bisturi e, logo após, à digestão enzimática com colagenase tipo I (1mg/ml) durante 30 minutos a 37°C agitando a cada dez minutos. A suspensão celular retirada foi centrifugada e semeada em placa de seis poços. A cultura celular manteve-se com meio de cultivo. Após duas semanas de cultivo e sucessivas trocas de meio, as células obtidas foram chamadas células tronco mesenquimais. Quando a cultura chegou à confluência, tratou-se com tripsina e transferidas para garrafas de cultura. As células foram cultivadas até serem obtidas alíquotas de 5×10^5 células por animal a ser tratado. Cada alíquota foi diluída em 100µl de solução salina tamponada para injeção no camundongo.

Os animais doadores foram anestesiados com xilazina 10mg/kg e cetamina 100mg/kg. Após o animal não apresentar mais reflexo doloroso ao estímulo das patas traseiras, realizou-se incisão longitudinal desde o apêndice xifoide até a região cervical do animal. Foi ressecada a parede torácica anterior para facilitar o acesso e dissecação da traqueia, desde a laringe até a carina principal. Dissecou-se a traqueia, liberando-a do esôfago, e posteriormente era retirada a laringe, restos de tireoide e de tecidos linfoides adjacentes através de microdissecção com instrumental adequado. Após, a traqueia inteira era

mantida em solução salina tamponada gelada (entre 4 e 10°C) até seu implante no camundongo receptor.

O receptor era submetido à anestesia inalatória com isoflurano em dose titulada para obter analgesia com ventilação espontânea. Quando em plano anestésico adequado, era ofertado oxigênio por meio de campânula. Procedeu-se a uma incisão longitudinal de 1cm no dorso do animal, a 5mm caudal da ponta escapula na linha média dorsal. Foi confeccionada uma bolsa subcutânea cranial à incisão por meio de dissecação roma para colocar o enxerto (traqueia inteira esticada) a pelo menos 1cm cranial à incisão. A síntese cirúrgica foi realizada com fio cirúrgico de nylon 6.0 com pontos separados e nós sepultados. Foi administrado tramadol, 10mg/kg, no pós-operatório imediato e, em seguida, os animais retornavam às gaiolas e mantidos com água e ração *ad libitum*.

Os animais foram mortos no sétimo e 21º dias pós-transplante em câmara de gás CO₂. Após o sacrifício, procedeu-se nova incisão no animal receptor distando 3cm caudal da incisão prévia e era invertida a pele do dorso do animal. Após a identificação do enxerto, este era dissecado dos tecidos adjacentes e imerso em formol.

Cada doador, camundongo C57BL6, tinha sua traqueia retirada e implantada em um receptor, camundongo BALBc. No momento do implante, os animais recebiam pela veia da cauda, 100µl de terapia celular ou de solução salina tamponada.

Os grupos experimentais receberam os seguintes nomes de acordo com o tratamento e o tempo para o sacrifício: T7cel (dez animais sacrificados em sete dias, tratados com terapia celular), T7con - cinco animais sacrificados em sete dias, tratados com solução salina tamponada; T21cel - 12 animais sacrificados em 21 dias, tratados com terapia celular; e T21con - dez animais sacrificados em 21 dias, tratados com solução salina normal (Figura 1).

A terapia celular foi administrada aos animais por meio de injeção de 100µl de solução salina tamponada com 10^5 células-tronco mesenquimais na veia da cauda com agulha de 30G. A injeção da solução de terapia celular foi administrada, lentamente, durante um minuto. Caso fosse verificado extravasamento do conteúdo, avaliado pela inspeção visual da cauda, nova alíquota padrão de 5×10^5 células era administrada. Os animais que morreram após a injeção da terapia celular foram excluídos da análise.

Para a análise histológica, as traqueias, retiradas nos tempos específicos, foram imersas em formol. As traqueias foram cortadas em sua porção média. Foram obtidos cortes com 5µm de espessura. Após fixação, foram coradas pelo método da hematoxilina e eosina (HE). Avaliaram-se as lâminas semiquantitativamente quanto a: 1) obliteração intraluminal, classificada como maior ou menor de 50% (obliteração intraluminal grave se >50%); 2) grau de preservação do epitélio, classificada como perda maior ou menor de 50% da integridade do epitélio (perda epitelial grave se >50%); 3) presença de inflamação linfocítica ou plasmocítica, classificada como leve (infiltrado

esparso envolvendo vasos ou permeando tecido conjuntivo adjacente) ou grave (infiltrado difuso, com envolvimento transmural); 4) alterações circulatórias (vasculares e extravasculares), classificada como leve ou grave de acordo com presença de edema local ou infiltração de polimorfonucleares envolvendo vasculatura, classificação adaptada de Boehler¹⁴. As lâminas também foram coradas com picosirius, coloração específica para distinguir fibrilas de colágeno, a fim de identificar se a obliteração luminal dos enxertos é causada por tecido rico em colágeno ou não.

A avaliação morfométrica digital (Image J – versão 1.45s) foi aplicada aos cortes histológicos dos enxertos corados por picosirius e HE e digitalizados por software de captura de imagens (Image-Pro Express). Manualmente, definiu-se a área de obstrução luminal (A2) e a área de luz original do enxerto (A1). Calculou-se a razão de A2/A1 que resultou na área obstruída do enxerto.

Foi realizado cálculo do tamanho da amostra com base no desfecho primário – avaliação do processo inflamatório através da obstrução luminal, com base em um estudo piloto. Obteve-se uma amostra necessária de cinco animais por grupo.

Foi realizado teste de normalidade para a variável contínua “área obstruída do enxerto”. Verificou-se que o desvio padrão excedia a metade da média da amostra; tinha uma distribuição assimétrica positiva. Logo, os dados serão apresentados como mediana e intervalo interquartil. Foi utilizado, para análise estatística, teste de Fisher, para

as variáveis que foram consideradas categóricas. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para variáveis contínuas, pois não apresentaram distribuição normal e exigiram tratamento não paramétrico. Foram utilizados na análise estatística os animais que sobreviveram até o dia programado para a morte. Os animais mortos antes desse período foram excluídos da análise.

RESULTADOS

A análise da obliteração intraluminal dos enxertos heterotópicos de animais sacrificados em sete dias demonstrou obliteração grave (para um ponto de corte de 50% de obliteração) em 40% dos animais tratados com terapia celular e em 50% dos animais controle (p=1) (Tabela 1). A análise da integridade do epitélio dos enxertos heterotópicos demonstrou que em 50% dos animais dos grupos T7cel e T7con apresentaram perda da integridade epitelial grave, perda >50% de integridade epitelial, (p=1). Analisando o processo inflamatório linfoplasmocitário, verificou-se que o processo inflamatório grave ocorreu apenas no grupo T7con (em 16,67% dos animais) (p=0,38). Em relação às alterações circulatórias (vasculares e extravasculares), obteve-se o seguinte: 60% de alterações circulatórias graves no T7cel e 100% no T7con (p=0,23) (Tabela 1, Figura 2).

Aos 21 dias, a obliteração intraluminal grave foi 41,67% no grupo T21cel contra 20% no T21con (p=0,38).

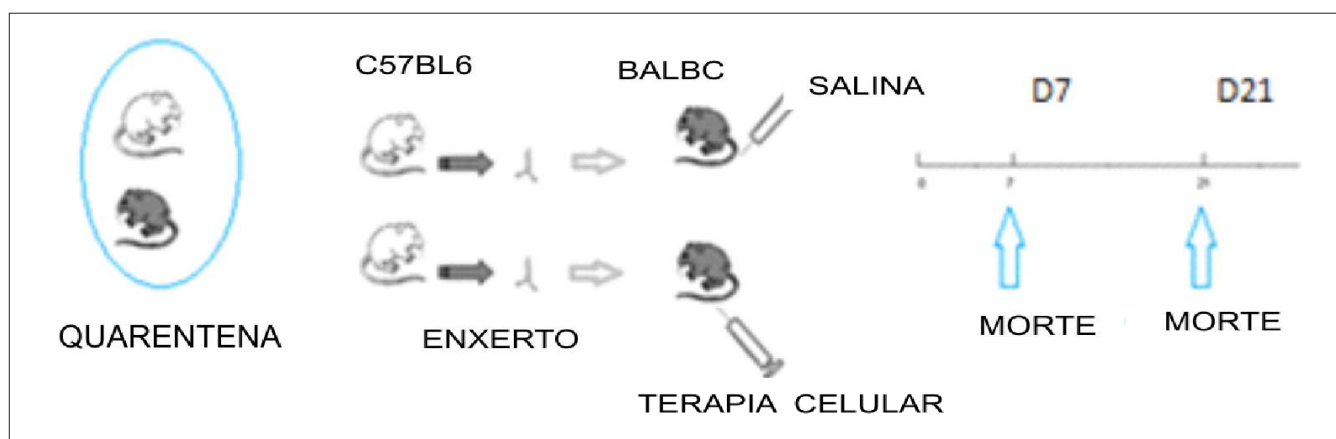


Figura 1 – Desenho do experimento.

Tabela 1 - Análise histológica dos animais mortos em sete dias.

	T7 com	T7cel	P
Obliteração intraluminal grave	50%	40%	1
Perda da integridade epitelial grave	50%	50%	1
Inflamação linfoplasmocitária grave	16,67%	0%	0,38
Alterações circulatórias graves	100%	60%	0,23

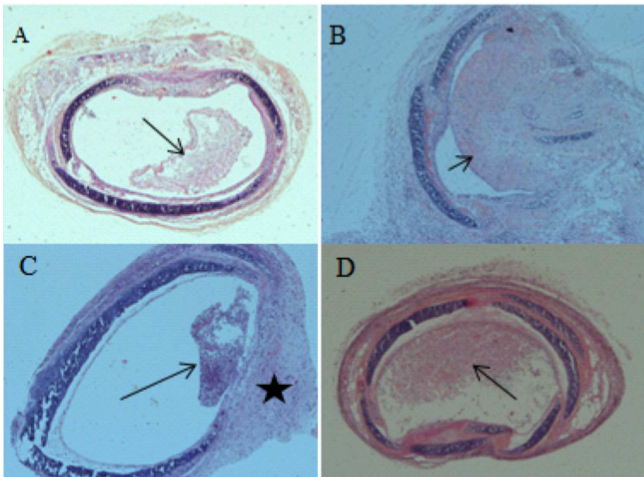


Figura 2 - (A) fotomicrografia 40x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T7cel em HE. Luz parcialmente obstruída (seta). (B) fotomicrografia 100x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T7con em HE. Enxerto com obliteração luminal grave (>50%) (seta). (C) fotomicrografia 100x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T21cel em HE. Enxerto sem obliteração luminal grave (<50%) (seta); infiltrado linfoplasmocitário (estrela). (D) fotomicrografia 40x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T21con em HE. Enxerto com obliteração luminal grave (<50%) (seta).

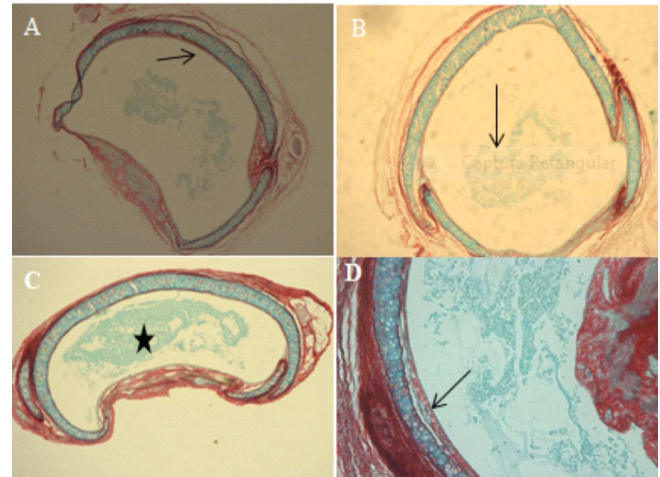


Figura 3 - (A) fotomicrografia 100x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T7cel em picrossírius. Enxerto sem obliteração luminal grave (<50%). Setas demonstram epitélio preservado. (B) fotomicrografia 100x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T7con em picrossírius. Enxerto sem obliteração luminal grave (<50%) (seta). (C) fotomicrografia 100x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T21cel em picrossírius. Enxerto sem obliteração luminal grave (<50%) (seta). (D) fotomicrografia 200x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T21con em picrossírius. Epitélio íntegro (seta).

A análise da resposta inflamatória em 21 dias revelou o seguinte: 75% de perda da integridade epitelial grave no T21cel e 90% no T21con ($p=0,59$). Ao examinar-se processo inflamatório linfoplasmocitário, obteve-se 75% de inflamação grave no T21cel contra 50% no T21con ($p=0,38$). Quanto às alterações circulatórias, constatou-se 25% de alterações circulatórias graves no T21cel contra 40% T21con. ($p=0,65$) (Tabela 2, Figura 3).

A avaliação morfométrica digital, aplicando *Image J* nos cortes histológicos digitalizados, revelou que, nos enxertos de sete dias, a mediana (percentil 25 – percentil 75) da razão A2/A1 (área obstruída do enxerto) no T7con foi 0,54 (0 – 0,71); já no T7cel, a mediana foi 0 (0 – 0,65) ($p=0,635$) (Figura 4).

Nos animais sacrificados em 21 dias, a mediana (percentil 25 – percentil 75) das áreas obstruídas no T21con foi 0 (0 – 0,09) e no T21cel, de 0,25 (0,05 – 1) ($p=0,041$) (Figura 5).

Tabela 2 - Análise histológica dos animais mortos em 21 dias.

	T21 com	T21cel	P
Obliteração intraluminal grave	20%	41,67%	0,38
Perda da integridade epitelial grave	90%	75%	0,59
Inflamação linfoplasmocitária grave	50%	75%	0,38
Alterações circulatórias graves	40%	25%	0,65

DISCUSSÃO

A terapia celular com células-tronco mesenquimais (CTM) demonstra propriedades imunomoduladoras em diversos estudos^{5,6,10-12,15-18}. A bronquiolite obliterante (BO), que é a expressão patológica da rejeição crônica do transplante pulmonar, tem tratamentos com eficácia limitada. A BO tem natureza inflamatória, e para testar a eficácia das CTM nesse cenário, emprega-se o modelo experimental murino de transplante traqueal heterotópico, que é simples e rápido para se estudar novas terapias.

Nosso estudo não demonstrou diminuição do processo inflamatório nos enxertos heterotópicos dos animais tratados com terapia celular e sacrificados em sete ou 21 dias. Observamos uma discreta tendência à diminuição do processo inflamatório em sete dias, mas não foi estatisticamente significativa.

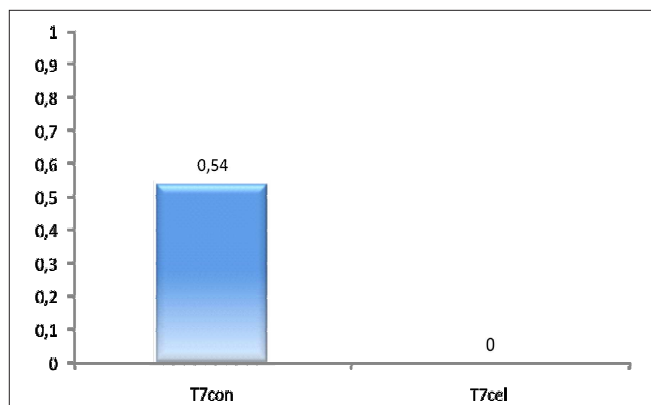


Figura 4 - Medianas das áreas obstruídas em enxertos (A2/A1) de sete dias; $p=0,635$.

A1: área da luz original do enxerto; A2: área de obstrução luminal do enxerto. A2/A1: área obstruída do enxerto.

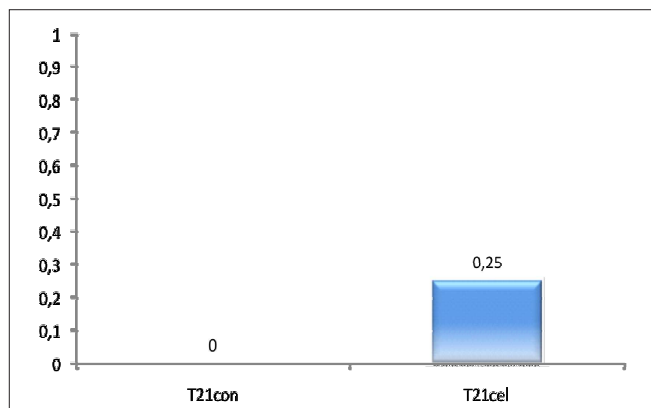


Figura 5 - Medianas das áreas obstruídas em enxertos (A2/A1) de 21 dias; $p = 0,041$.

A1: área da luz original do enxerto; A2: área de obstrução luminal do enxerto. A2/A1: área obstruída do enxerto.

Na análise morfométrica digital em 21 dias, percebe-se que os camundongos tratados desenvolveram maior obliteração luminal que o grupo controle, de forma estatisticamente significativa. De outra parte, em 21 dias, a análise demonstrou resultados conflitantes quanto à avaliação semiquantitativa do processo inflamatório. Houve menor perda grave da integridade epitelial e menos alterações vasculares e extravasculares no grupo tratado, porém maior obliteração luminal grave e maior infiltrado linfoplasmocitário. Devem-se considerar as limitações próprias de uma análise semiquantitativa e o fato dessas diferenças não terem atingido significância estatística.

É importante ressaltar que se verificaram reduzidas taxas de inflamação da parede traqueal nos controles em 21 dias. A taxa de obliteração luminal em 21 dias nos aloenxertos controles foi baixa, quando comparada à literatura. Houve 20% de obliteração grave (>50% de obstrução da luz do enxerto) observado em nosso estudo contra até 75-90% referido na literatura^{7,19}. Apesar de seguirmos todos os passos cirúrgicos estabelecidos na literatura¹⁴ e

aumentarmos o número de camundongos do experimento (dobramos a amostra calculada inicialmente), a intensidade da obliteração luminal foi consistentemente menor do que o descrito na literatura. Cabe destacar que o modelo de alotransplante traqueal murino demonstra variabilidade na obliteração luminal entre experimentos, de 30% a 100% de obliteração luminal. Isso pode justificar os dados divergentes entre diferentes grupos de pesquisa²⁰, principalmente no que tange a obliteração luminal em 21 dias⁷.

A explicação para a escolha dos tempos para análise histológica dos aloenxertos deriva de estudos prévios, onde fica claro que o sétimo dia após o transplante heterotópico é o ápice do infiltrado linfocítico na superfície epitelial (intraepitelial e subepitelial), análogo à bronquite ou bronquiolite linfocítica vista em humanos transplantados. Esse tempo constitui uma das fases mais precoces do processo de rejeição pulmonar, a fase linfocítica¹⁴. No sétimo dia, também nota-se vasculite linfocítica, que é uma manifestação de rejeição direcionada ao endotélio. A análise no 21º dia pós-transplante foi escolhida por representar a fase obliterativa da rejeição, ou seja, a fase terminal⁵.

Até 2011, não havia na literatura nenhum dado de CTM aplicadas em modelo murino de BO, que fosse do nosso conhecimento. Um estudo, publicado em 2011 por Grove *et al.*⁵, testou uma nova forma de imunomodulação com CTM derivadas de medula óssea. Injetou-se 5×10^5 células por via retro ocular em camundongos alogênicos. Observou-se diminuição de 60% da obstrução intraluminal, quando compararam animais tratados e controles, em grupos sacrificados em sete e 14 dias. Isso sugere que a terapia celular pode ser efetiva em evitar obstrução da via aérea heterotópica.

As CTM demonstraram propriedades imunomoduladoras importantes, inclusive em doenças pulmonares, como doença pulmonar obstrutiva crônica, hipertensão pulmonar, asma e fibrose pulmonar²¹. Os mecanismos de imunomodulação ainda não foram completamente compreendidos, mas envolvem a inibição da proliferação de células T e a modulação da função das células B²². Já foi demonstrado, também, que não há necessidade das CTM integrarem-se aos tecidos lesados para produzir efeito; efeitos parácrinos explicam esse fenômeno²³. Ainda sobre a forma de ação das CTM, foi demonstrado que CTM injetadas sistemicamente, além de migrarem para os tecidos lesados através de um efeito "homing", permanecem viáveis e mescladas com as células nativas por alguns meses²⁴.

Apesar de a maior parte dos dados da literatura apontar para um efeito imunomodulador das CTM, há autores que demonstraram um efeito pró-fibrótico da terapia celular com CTM^{25,26}. A realidade é que há um papel duplo das CTM: elas podem exercer uma função imunossupressora, protegendo contra a BO através de IL-8 e IL-10; ou podem ter um efeito pró-fibrótico, mediado por endotelina-1, TGF- β e IL-13²⁷. O microambiente local onde

as CTM estão expostas determina o perfil predominante da sua ação. Em nosso estudo, nos animais dos grupos T21con e T21cel, houve uma obliteração luminal do enxerto inferior à da literatura; possivelmente, a dosagem das citocinas envolvidas no processo inflamatório poderia auxiliar no entendimento dos nossos resultados, o que não foi realizado. Isso poderá ser explorado nos próximos trabalhos do nosso grupo.

Devemos ainda considerar que a forma de obtenção das CTM pode modificar suas propriedades imunomoduladoras. Nosso estudo obteve as células tronco mesenquimais a partir de tecido adiposo epididimal, ao contrário de Grove *et al.*⁵, que as obtiveram de medula óssea. Esse fato, muito provavelmente, influenciou os nossos resultados. Sabe-se que células obtidas de fontes distintas têm potência imunomoduladora diferentes, provavelmente, devido ao padrão de produção de interleucina e fatores de crescimento. O perfil de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias pode auxiliar a desvendar os efeitos verificados em nosso estudo²⁸.

As CTM podem ser obtidas de diversos tecidos: osso trabecular, periósteo, membrana sinovial, músculo esquelético, pele, pericitos, sangue periférico, dente, ligamento periodontal, cordão umbilical⁸. As CTM derivadas de tecido adiposo são muito estudadas, pois esse tecido é abundante e passível de ser acessado com baixa morbidade. Há relatos de que CTMA tem características diferentes entre si dependendo do local de onde foram extraídas⁸. Nosso estudo obteve CTM de tecido adiposo epididimal. A escolha baseou-se na experiência do grupo de terapia gênica e na facilidade de acesso a esse tecido. Outro ponto relevante para administração de CTM é a fonte de obtenção das células: autóloga *versus* alogênica; de uma única fonte ou de várias fontes. Isso parece influir nos efeitos da terapia celular⁹. Grove *et al.*⁵ obtiveram as CTM de forma alogênica de animais de três raças diferentes, fato que pode ter influenciado os resultados. Há ensaio clínico demonstrando, em alguns cenários, que um número menor de células pode produzir efeitos mais consistentes em termos de recuperação de tecidos lesados²⁹. Optamos por utilizar 5×10^5 células, pois a maior parte dos estudos em camundongos usa essa dose, embora também possa ser usada a dose 10^6 células.

A fim de analisar nossos resultados, questionamos se uma única injeção no tempo escolhido (no momento do transplante) é o mais adequado. O uso de terapia celular implica testes de momento de infusão e de número de injeções. Nesse contexto, talvez, se possa obter resultados diferentes aplicando de forma repetida o tratamento – o que não foi testado até o presente momento nesse modelo, que seja do nosso conhecimento. Sabe-se, ainda, que a administração tardia de terapia celular, quando o processo fibrótico já está estabelecido, não agrega benefícios⁹. Todavia, já se relatou a reversão do processo fibrótico inicial⁹ após terapia celular, em modelo de fibrose pulmonar.

A idade da cultura das CTM, bem como o número de expansões das células, determinam mudanças em sua morfologia, capacidade de diferenciação, viabilidade, eficiência de migração e competência para produzir citocinas³⁰. Em nosso experimento, tomamos o cuidado de usar cultura de células de mesma idade e expandidas o mesmo número de vezes (quatro vezes). Assim, não nos parece que essa tenha sido a causa determinante da divergência entre os nossos resultados e a literatura.

A via de infusão utilizada na terapia celular em modelos murinos é variável. São utilizadas injeções intraperitoneais, locorreionais e sistêmicas através da veia da cauda, do plexo venoso retro-ocular e por dissecação da veia jugular interna⁷. Essas diferentes formas podem ditar resultados diversos, como o obtido pelo presente estudo. Alguns estudos demonstram que a metabolização de primeira passagem pelos sinusoides hepáticos podem alterar a morfologia e fisiologia das células injetadas, o que não parece ter afetado esse estudo, já que a veia da cauda drena para o sistema cava e não portal. Além disso, alguns grupos advogam a via intra-arterial como opção para terapia celular. Dessa forma, uma maior quantidade de células pode chegar ao tecido alvo, diminuindo os efeitos sistêmicos¹³.

Em uma fase preliminar em nosso estudo, testamos diferentes vias de infusão: injeção sistêmica através da veia da cauda, do plexo venoso retro-ocular e da jugular interna. Os resultados não foram diferentes em nosso estudo piloto. Optamos pela injeção através da veia da cauda por praticidade em realizar uma injeção lenta, tecnicamente mais fácil. Ainda na fase piloto, um dos limitantes para o desenvolvimento do experimento foi a alta mortalidade dos animais durante a fase de injeção da terapia celular. Testamos diferentes diluições de terapia celular (as mesmas 5×10^5 células) diluídas em 50µl, 100µl e 200µl de solução salina tamponada. Não encontramos diferenças na mortalidade entre os grupos. Optamos por usar 100µl, pois é o volume mais usado na literatura. Por outro lado, quando injetávamos rapidamente as CTM, elas desencadeavam um quadro de insuficiência respiratória grave nos animais, que era seguido, em alguns casos, por hemiplegias e até mesmo parada cardiorrespiratória – algumas vezes reversível. Verificamos isso em nosso estudo, quando, em alguns experimentos com injeção de CTM, a mortalidade variou de 50 a 100%, quando injetamos as CTM em *bolus* (entre 10 e 20 segundos). Considera-se que isso seja decorrente de embolização das células injetadas no coração direito e nas artérias cerebrais. Essa constatação não se mantém quando a terapia celular é injetada lentamente – 100µl ao longo de um a dois minutos – método desenvolvido pelo nosso grupo. Plock *et al.*⁶ fizeram um comentário de dados não publicados de seu grupo, enfatizando a importância de administrar lentamente a terapia celular.

O modelo aplicado nesse experimento tem muitas semelhanças com o transplante pulmonar humano, porém, alguns aspectos devem sempre ser considerados: o

aloenxerto transplantado não é funcional, portanto, não mimetiza o real ambiente do tecido transplantado por estar desconectado da via aérea do receptor; o aloenxerto não tem suprimento vascular primário próprio, o que pode impactar na dinâmica da resposta imune⁵.

As associações de desfecho patológico com desfechos de biologia molecular podem determinar um melhor entendimento da dinâmica do processo inflamatório e do impacto da terapia. Deve-se considerar a análise das citocinas já implicadas na imunogênese da bronquiolite obliterante, bem como, tentar associar a expressão gênica com a histopatologia³¹.

Observa-se grande número de publicações^{5,7,12,14,20,25,31} envolvendo o modelo de transplante traqueal heterotópico alogênico murino. Diversos passos da imunogênese foram desvendados por esse modelo. Ao avançar na imunogênese, alternativas terapêuticas também foram testadas ao longo dos últimos 20 anos, sendo algumas delas implementadas clinicamente, como ciclosporina, tacrolimus entre outros³².

Este estudo, nesse contexto, aumenta as informações acerca da terapia celular com CTM nesse modelo, sendo até o presente momento, que seja do nosso conhecimento, o primeiro experimento a empregar CTM derivadas de tecido adiposo com esse objetivo.

Como perspectivas, poder-se-ia testar injeções seriadas de terapia celular nos animais, a fim de verificar se uma exposição repetitiva poderia resultar em efeitos maximizados em termos de diminuição do processo inflamatório.

Muitos alvos terapêuticos foram identificados na última década, o que aumenta a importância de realizarem-se testes de imunomoduladores associados à aferição do processo inflamatório, dosando citocinas envolvidas no processo, bem como, utilizar painéis de expressão gênica.

Em conclusão, a terapia celular injetada sistemicamente em modelo experimental murino de bronquiolite obliterante não reduziu a gravidade do processo inflamatório no aloenxerto de forma estatisticamente significativa em sete dias; de modo contrário, em 21 dias, aumentou o processo inflamatório no aloenxerto.

A B S T R A C T

Objective: To evaluate the importance of stem cells derived from adipose tissue in reducing graft inflammation in a murine model of allogeneic heterotopic tracheal transplant. **Methods:** We performed a heterotopic tracheal allografting in dorsal subcutaneous pouch and systemically injected 5×10^5 mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. The animals were divided into two groups according to the time of sacrifice: T7 and T21. We also carried out histological analysis and digital morphometry. **Results:** The T7 animals treated with cell therapy had median obstructed graft area of 0 versus 0.54 of controls ($p = 0.635$). The treated T21 subjects had median obstructed graft area of 0.25 versus 0 in controls ($p = 0.041$). **Conclusion:** The systemically injected cell therapy in experimental murine model of bronchiolitis obliterans did not reduce the severity of the allograft inflammation in a statistically significant way in seven days; Conversely, in 21 days, it increased the allograft inflammatory process.

Key words: Transplantation, Heterotopic. Bronchiolitis Obliterans. Cell- and Tissue-Based Therapy. Stem Cells. Mesenchymal Stem Cell Transplantation.

REFERÊNCIAS

- Morrell MR, Despotis GJ, Lublin DM, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR. The efficacy of photopheresis for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29(4):424-31.
- Fisher AJ, Rutherford RM, Bozzino J, Parry G, Dark JH, Corris PA. The safety and efficacy of total lymphoid irradiation in progressive bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Am J Transplant.* 2005;5(3):537-43.
- Mayer E, Cardoso PF, Puskas JD, De Campos K, Oka T, Dardick I, et al. The effect of basic fibroblast growth factor and omentopexy on revascularisation and epithelial regeneration of heterotopic rat tracheal isograft. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992;104(1):180-8.
- Maksoud-Filho JG, Rodrigues CJ, Tannuri U, Maksoud JG. The effects of early and delayed immunosuppression in experimental tracheal transplantation with omentopexy. *J Pediatr Surg.* 1999;34(8):1223-8.
- Grove DA, Xu J, Joodi R, Torres-Gonzales E, Neujahr D, Mora AL, et al. Attenuation of early airway obstruction by mesenchymal stem cells in a murine model of heterotopic tracheal transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(3):341-50.
- Plock JA, Schnider JT, Schweizer R, Gorantla VS. Are cultured mesenchymal stromal cells an option for immunomodulation in transplantation? *Front Immunol.* 2013;4:41.
- Hele DJ, Yacoub MH, Belvisi MG. The heterotopic tracheal allograft as an animal model of obliterative bronchiolitis. *Respir Res.* 2001;2(3):169-83.
- Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells.* 2012;30(5):804-10.
- Weiss DJ, Ortiz LA. Cell therapy trials for lung diseases: progress and cautions. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(2):123-5.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):726-36.
- Burt RK, Loh Y, Pearce W, Beohar N, Barr WG, Craig R, et al. Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. *JAMA.* 2008;299(8):925-36.
- Guo Z, Zhou X, Li J, Meng Q, Cao H, Kang L, et al. Mesenchymal stem cells reprogram host macrophages to attenuate obliterative bronchiolitis in murine orthotopic tracheal transplantation. *Int Immunopharmacol.* 2013;15(4):726-34.
- Zonta S, De Martino M, Bedino G, Piotti G, Rampino T, Gregorini M, et al. Which is the most suitable and effective route of administration for mesenchymal stem cell-based immunomodulation therapy in experimental kidney transplantation: endovenous or arterial? *Transplant Proc.* 2010;42(4):1336-40.
- Boehler A, Chamberlain D, Kesten S, Slutsky A, Liu M, Keshavjee S. Lymphocytic airway infiltration as a precursor to fibrous obliteration in a rat model of bronchiolitis obliterans. *Transplantation.* 1997;64(2):311-7.

15. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896-902.
16. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol*. 2013;91(1):19-26.
17. English K, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(5):a015560.
18. English K, Mahon BP, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells; role in tissue repair, drug discovery and immune modulation. *Curr Drug Deliv*. 2014;11(5):561-71.
19. Lau CL, Zhao Y, Kron IL, Stoler MH, Laubach VE, Ailawadi G, et al. The role of adenosine A2A receptor signaling in bronchiolitis obliterans. *Ann Thorac Surg*. 2009;88(4):1071-8.
20. Neuringer IP, Aris RM, Burns KA, Bartolotta TL, Chalermkulrat W, Randell SH. Epithelial kinetics in mouse heterotopic tracheal allografts. *Am J Transplant*. 2002;2(5):410-9.
21. Iyer SS, Co C, Rojas M. Mesenchymal stem cells and inflammatory lung diseases. *Panminerva Med*. 2009;51(1):5-16.
22. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009;15(1):42-9.
23. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol*. 2012;3:297.
24. Kuo YR, Goto S, Shih HS, Wang FS, Lin CC, Wang CT, et al. Mesenchymal stem cells prolong composite tissue allotransplant survival in a swine model. *Transplantation*. 2009;87(12):1769-77.
25. Salama M, Andrukhova O, Jaksch P, Taghavi S, Kelpetko W, Dekan G, et al. Endothelin-1 governs proliferation and migration of bronchoalveolar lavage-derived lung mesenchymal stem cells in bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation*. 2011;92(2):155-62.
26. Walker N, Badri L, Wettlaufer S, Flint A, Sajjan U, Krebsbach PH, et al. Resident tissue-specific mesenchymal progenitor cells contribute to fibrogenesis in human lung allografts. *Am J Pathol*. 2011;178(6):2461-9.
27. Hardy JD, Webb WR, Dalton ML Jr, Walker GR Jr. Lung homotransplantation in man. *JAMA*. 1963;186:1065-74.
28. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol*. 2013;4:201.
29. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transcatheter injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*. 2012;308(22):2369-79.
30. Hematti P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? *Cytotherapy*. 2012;14(5):516-21.
31. Lemaître PH, Vokaer B, Charbonnier LM, Iwakura Y, Field KA, Estenne M, et al. Cyclosporine A drives a Th17- and Th2-mediated posttransplant obliterative airway disease. *Am J Transplant*. 2013;13(3):611-20.
32. Baughman RP, Meyer KC, Nathanson I, Angel L, Bhorade SM, Chan KM, et al. Executive summary: monitoring of nonsteroidal immunosuppressive drugs in patients with lung disease and lung transplant recipients: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2012;142(5):1284-8.

Recebido em 08/07/2014

Aceito para publicação em 10/10/2014

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: FIPE-HCPA.

Endereço para correspondência:

Julio de Oliveira Espinel

E-mail: julioespinel@gmail.com