

Vinicius Luderer Dias

Avaliação inflamatória do uso de células tronco mesenquimais em modelo animal de doador de pulmão com choque hipovolêmico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular
Orientador: Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Dias, Vinicius Luderer
Avaliação inflamatória do uso de células-tronco
mesenquimais em modelo animal de doador de pulmão
com choque hipovolêmico / Vinicius Luderer Dias. --
São Paulo, 2019.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientador: Paulo Manuel Pêgo Fernandes.

Descritores: 1. Transplante de pulmão 2. Doadores
de tecidos 3. Choque hemorrágico 4. Células-tronco
5. Modelos animais 6. Inflamação 7. Meios de cultivo
condicionados

USP/FM/DBD-038/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais, Hugo Luiz e Anelise pela inspiração profissional, apoio incondicional, esforço e empenho na criação e educação, investimento, incentivo, conselhos e sobretudo pelo amor!

À minha esposa Ana Luiza, pela parceria e companheirismo, amizade, amor, incentivo, compreensão e cumplicidade!

Ao meu filho Bernardo, por me proporcionar a alegria de ser pai, pelo carinho, aprendizado constante, motivação, amor imensurável e prazer de viver!

Ao meu segundo filho, que apesar de ainda não ter nascido, se tornou uma fonte enorme de motivação para a conclusão desta tese!

Agradecimentos

Aos meus pais pela construção de quem me tornei, pelas oportunidades que me proporcionaram e por sempre acreditarem no meu potencial! O agradecimento feito aqui nunca será o bastante perto do que vocês merecem! Amo vocês!

À Ana Luiza, minha amada esposa, amiga, companheira, compreensiva, que sempre esteve ao meu lado em toda essa caminhada, pela paciência, pelo carinho, pelo cuidado, pelas opiniões, pela cumplicidade, pelo respeito, por me aturar todos os dias, inclusive nos dias difíceis e por ser a mãe dos nossos filhos! Essa Tese também é sua!

Ao meu querido filho Bernardo, pelo amadurecimento que me proporcionou, pela alegria diária, pela admiração, pela paciência e sobretudo pelo prazer de poder ser seu pai! Papai te ama!

Ao Instituto do Coração - InCor e à Universidade de São Paulo - FMUSP pela oportunidade da realização desta pós-graduação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Pêgo, pela oportunidade, inspiração, conselhos, orientação e paciência na elaboração desta tese! Obrigado!

Às "meninas" do LIM-61, Karina, Natália e Liliane, que me introduziram ao mundo da pesquisa experimental! Dra. Karina, sempre atenciosa, paciente e inspiradora com sua orientação, conselhos, discussões e incentivo. Dra. Natália com seu grande conhecimento prático e técnico, pelas muitas horas de dedicação ao projeto e pela excelente profissional que é. Liliane, pela imensa contribuição nos experimentos, pela divisão das angústias relacionadas à pós-graduação e pelo carinho e atenção sempre! Muito Obrigado! Vocês me tornaram um pesquisador! Essa tese é nossa!

Ao amigo e companheiro de trabalho Dr. Alessandro Mariani, grande incentivador e responsável direto pela minha inscrição na pós-graduação! Pela oportunidade profissional, ensinamentos, conselhos, orientação e por acreditar em mim! Muito obrigado!

Ao amigo Ari, pelas longas discussões sobre o projeto, pelas estatísticas, pela atenção e carinho, pela disponibilização do seu precioso tempo, pelas dicas, pela paciência e participação fundamental neste projeto!

À Prof. Dra. Marisa Dolhnikoff pelos ensinamentos em patologia pulmonar e importante contribuição na elaboração desta tese!

À Prof. Dra. Mayana Zatz e sua equipe do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e células-tronco (CEGH-CEL) em destaque, Eder Zuconni, Mariane Secco e Ernesto Goulart, pela preparação e fornecimento das células tronco mesenquimais e seus fatores solúveis utilizados em nosso projeto, pelo apoio técnico e científico na elaboração da tese.

Aos docentes do programa de pós graduação pelos ensinamentos preciosos e dedicação para a formação de novos pesquisadores. A elaboração desta tese seria impossível sem a ajuda de todos vocês!

Ao aluno Juan pelo empenho, dedicação e disponibilização de longas horas para execução do projeto. Sua ajuda foi fundamental!

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com Lista of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS SÍMBOLOS E SIGLAS**LISTA DE FIGURAS****LISTA DE GRÁFICOS****LISTA DE TABELAS**

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	OBJETIVO.....	05
2.1	Objetivo principal.....	06
2.2	Objetivo secundário.....	06
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	07
3.1	Transplante.....	08
3.2	Transplante pulmonar no Brasil.....	09
3.3	Fatores limitantes ao transplante pulmonar.....	10
3.4	Estratégias para ampliar o número de doadores.....	13
3.5	Choque hemorrágico.....	17
3.6	Células tronco.....	18
3.7	Células tronco mesenquimais e pulmão.....	22
4	MÉTODOS.....	28
4.1	Delineamento do estudo.....	29
4.2	Isolamento e cultivo das células tronco mesenquimais.....	30
4.3	Preparação dos fatores solúveis das MSCs.....	31
4.4	Procedimento cirúrgico.....	32
4.5	Modelo de choque hemorrágico.....	34
4.6	Extração pulmonar.....	36
4.7	Análise histológica (HE).....	38
4.8	Análise de citocinas inflamatórias no tecido pulmonar.....	39
4.9	Lavado bronco-alveolar (LBA).....	39
4.10	Análise imunoistoquímica (ELISA).....	40
4.11	Quantificação de leucócitos no sangue periférico.....	40
4.12	Análise estatística.....	40
4.12.1	Análise estatística descritiva.....	40
4.12.2	Análise estatística inferencial.....	41
5	RESULTADOS.....	42
5.1	Pressão arterial média.....	43
5.2	Quantificação de leucócitos no sangue periférico.....	45
5.3	Análise histológica,.....	47
5.3.1	Análise histológica – HE.....	47
5.3.2	Análise de citocinas inflamatórias no tecido pulmonar.....	49

5.4	Lavado bronco-alveolar- ELISA.....	50
5.4.1	Dosagem de TNF- α	50
5.4.2	Dosagem de IL-1 β	52
5.4.3	Dosagem de IL-6.....	54
5.4.4	Dosagem de IL-10.....	56
5.4.5	Dosagem de iCAM.....	57
5.4.6	Dosagem de vCAM.....	58
6	DISCUSSÃO.....	60
6.1	Limitações.....	66
7	CONCLUSÕES.....	68
8	ANEXOS.....	70
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

Listas

ABTO – Associação Brasileira de Transplante de Órgãos

CVF – Capacidade vital forçada

DP – Desvio Padrão

ELISA –Enzyme linked immuno sorbent assay

FS-MSC – Fatores solúveis das células tronco mesenquimais

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

HE – Hematoxilina e eosina

ICAM – Intercellular adhesion molecule

IFN-gama – Interferon gama

IL1- β – Interleucina 1 beta

IL6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

LBA – Lavado bronco-alveolar

LIM – Laboratório de investigação Médica

MSC – Célula tronco mesenquimal

NK – Natural Killer

PAM – Pressão Arterial Média

PE-10 – Polietileno 10

PE-50 – Polietileno 50

PGE2 – Prostaglandina E2

TNF- α – Fator alfa de necrose tumoral

VCAM – Vascular cell adhesion molecule

VEF-1 – Volume expiratório forçado no primeiro minuto

pmp - por milhão de população
mmHg - milímetro de mercúrio

Tabela 1	Comparações múltiplas relacionadas à quantificação de leucócitos no sangue periférico, coletadas no momento final do experimento.....	46
Tabela 2	Comparações múltiplas relativas à densidade de neutrófilos dos grupos do estudo.....	48
Tabela 3	Comparações múltiplas relacionadas à dosagem de TNF- α no lavado bronco-alveolar.....	51
Tabela 4	Comparações múltiplas relacionadas à dosagem de IL-1 β no lavado bronco-alveolar.....	53
Tabela 5	Comparações múltiplas relacionadas à dosagem de IL-6 no lavado bronco-alveolar.....	55
Tabela 6	Comparações múltiplas relacionadas à dosagem de IL-10 no lavado bronco-alveolar.....	57
Tabela 7	Comparações múltiplas entre grupos com relação à dosagem de vCAM no lavado bronco-alveolar.....	59
Tabela 8	Tabela com média e desvio padrão da pressão arterial média em mmHg dos animais.....	71
Tabela 9	Tabela com média e desvio padrão da leucometria em sangue periférico no momento inicial do protocolo experimental.....	72
Tabela 10	Tabela com média e desvio padrão da leucometria em sangue periférico no momento final do protocolo experimental.....	72
Tabela 11	Tabela com média e desvio padrão da quantificação de infiltrado neutrofílico nas lâminas de HE nos grupos de estudo.....	73
Tabela 12	Tabela com mediana e intervalo interquartil IQ (25-75%) referente à dosagem de TNF- α no lavado bronco-alveolar dos diferentes grupos.....	73
Tabela 13	Tabela com média e desvio padrão referente à dosagem de IL1- β no lavado bronco-alveolar dos diferentes grupos.....	74
Tabela 14	Tabela com mediana e intervalo interquartil IQ (25-75%) referente à dosagem de IL-6 no lavado bronco-alveolar dos diferentes grupos.....	74

Tabela 15	Tabela com mediana e intervalo interquartil IQ (25-75%) referente à dosagem de IL-10 no lavado bronco-alveolar dos diferentes grupos.....	75
Tabela 16	Tabela com média e desvio padrão referente à dosagem de iCAM no lavado bronco-alveolar dos diferentes grupos.....	75
Tabela 17	Tabela com média e desvio padrão referente à dosagem de vCAM no lavado bronco-alveolar dos diferentes grupos.....	76

Figura 1	Listagem de critérios de seleção para doadores de pulmão ideais.....	12
Figura 2	Listagem de critérios estendidos de seleção para doadores de pulmão.....	14
Figura 3	Diagrama esquemático ilustrando a hierarquia das células tronco	19
Figura 4	Diagrama esquemático demonstrando os potenciais mecanismos pelos quais as células tronco mesenquimais (MSC) podem modular a resposta imune.....	21
Figura 5	Isolamento da região femoral direita para canulação da artéria e veia femoral.....	33
Figura 6	Canulação com tubo de polietileno. Seta: Cateter Tygon.....	34
Figura 7	Esquematização do procedimento experimental.....	35
Figura 8	Monitoração do animal durante 115 minutos.....	36
Figura 9	Etapas do procedimento de extração pulmonar. A) perfusão pulmonar anterógrada do pulmão com Perfadex®. B) ligadura traqueal com os pulmões insuflados. C) extração do bloco cardio-pulmonar em sentido crânio-caudal.....	37
Figura 10	Corte histológico de pulmão de rato com retículo de pontos e retas para análise morfométrica.....	38

- Gráfico 1** Pressão Arterial Média *in vivo* dos animais. Observamos diferença estatística significante nos grupos submetidos ao choque hemorrágico (Choque, FS e MSC) quando comparado ao momento basal ($\ddagger p<0,001$). Durante a manutenção do choque hemorrágico há diferença estatística dos grupos Choque, FS e MSC quando comparado ao grupo Sham ($\ddagger p<0,001$). Ao término de 70 e aos 190 minutos os grupos Choque, FS e MSC apresentaram diferença estatística significante quando comparados ao grupo Sham ($\infty p<0,05$)..... 44
- Gráfico 2** Gráfico comparativo relativo à quantificação de leucócitos do sangue periférico coletadas no momento inicial do protocolo experimental e no momento final em cada grupo. Houve diferença estatística na comparação dos grupos Choque, FS e MSC, os quais apresentaram aumento do número de leucócitos no momento final. ($p<0,001$). O grupo Sham não apresentou diferença entre suas quantificações ($p=0,805$)..... 45
- Gráfico 3** Gráfico comparativo entre os momentos inicial e final da quantificação de leucócitos do sangue periférico nos grupos do estudo. Não houve diferença estatística no momento inicial entre os grupos($p=0,33$). Ao final do experimento a quantificação de leucócitos foi maior nos grupos Choque, MSC e FS ($p=0,002$), sendo a diferença encontrada nas comparações múltiplas entre Sham vs Choque ($*p=0,02$), Sham vs FS ($**p=0,006$) e Sham vs MSC ($***p=0,01$)..... 46
- Gráfico 4** Gráfico comparativo relativo ao Infiltrado neutrofílico dos grupos, medido em densidade de neutrófilos. Houve diferença estatística na comparação entre os grupos, com o grupo FS apresentando a menor densidade ($p<0,001$). Nas comparações múltiplas houve significância estatística nas comparações Sham vs Choque ($*p<0,001$), Sham vs MSC ($*p<0,001$), Choque vs FS ($*p<0,001$) e FS vs MSC ($*p<0,001$)..... 47

Gráfico 5	Comparação das dosagens de TNF- α entre os grupos no lavado bronco-alveolar realizadas através da técnica ELISA. A maior dosagem foi identificada no grupo FS, com diferença estatística entre os grupos ($p=0,014$). Nas comparações múltiplas a diferença estatística significativa foi encontrada em Sham vs FS ($*p=0,03$) e Choque vs FS ($**p=0,02$).....	50
Gráfico 6	Comparação da dosagem de IL-1 β entre os grupos no lavado bronco-alveolar realizada através da técnica ELISA. Houve diferença estatística entre os grupos, com o grupo FS apresentando a maior dosagem ($p=0,009$). Nas comparações múltiplas houve diferença estatisticamente significante entre Sham vs FS ($*p=0,015$), Choque vs FS ($**p=0,03$), FS vs MSC ($***p=0,027$).....	52
Gráfico 7	Comparação das dosagens de IL-6 entre os grupos no lavado bronco-alveolar realizados através da técnica ELISA. Houve diferença estatística entre os grupos, com o grupo FS apresentando a maior dosagem. ($p=0,042$). As comparações múltiplas indicaram diferença em Sham vs FS ($\#p=0,04$).....	54
Gráfico 8	Dosagem de IL-10 no lavado bronco-alveolar colhido dos grupos, através da técnica ELISA. A análise entre os grupos indicou maior dosagem no grupo FS, com diferença estatisticamente significante ($p=0,044$).....	56
Gráfico 9	Dosagem de iCAM no lavado bronco-alveolar colhido dos grupos, através da técnica ELISA. A análise entre os grupos não apresentou diferença estatisticamente significante ($p=0,13$).....	57

- Gráfico 10** Dosagem de vCAM no lavado bronco-alveolar colhido dos grupos, através da técnica ELISA. A análise entre os grupos indicou maior dosagem no grupo FS, com diferença estatisticamente significante ($p=0,022$). Nas comparações múltiplas foi encontrada diferença apenas entre os grupos FS e MSC (* $p=0,022$)..... 58

Resumo

Dias VL. *Avaliação inflamatória do uso de células tronco mesenquimais em modelo animal de doador de pulmão com choque hipovolêmico* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Muitos fatores são responsáveis pelo grande número de pacientes em lista de espera por transplante pulmonar. A baixa taxa de aproveitamento do pulmão nas captações de órgãos figura como questão de destaque. Como causas, listamos a rigidez nos critérios de seleção, vulnerabilidade do órgão, cuidados inadequados com os pacientes em morte encefálica, edema pulmonar neurogênico pela morte encefálica e trauma com choque hemorrágico, que leva à hipoperfusão dos pulmões, acidose metabólica e inflamação tecidual. Morte encefálica e choque representam importantes causas de deterioração pulmonar, levando à recusa do órgão na captação ou à disfunção primária do enxerto pós-transplante. Na tentativa de melhorar a condição do enxerto pulmonar para se obter maior número de pulmões viáveis para o transplante, e para reduzir os índices de rejeição, algumas estratégias foram adotadas pelas equipes transplantadoras. O uso de células tronco mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells - MSCs*) para tratamento de afecções inflamatórias é objeto de estudo de alguns grupos, dadas as propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias já conhecidas. Nossa hipótese baseia-se na realização de tratamento com *MSCs* ou seus fatores solúveis (*FS-MSCs*) em doadores com choque hemorrágico. O objetivo deste trabalho é avaliar inflamação pulmonar em ratos, após o tratamento do choque hemorrágico com reposição sanguínea, associada à infusão *in vivo* de *MSCs* ou *FS-MSCs*. Quarenta e oito ratos foram divididos em 4 grupos: Sham (Sham n=12); Choque (Choque n=12); FS (Choque + *FS-MSCs* n=12) e MSC (Choque + *MSCs* n=12). Após anestesia, os animais foram submetidos à cateterização da artéria e veia femoral para registro de pressão arterial média (PAM), indução de choque hemorrágico e infusão de *MSCs* ou *FS-MSC* nos grupos de tratamento. No grupo Sham foi realizada apenas a monitorização dos parâmetros hemodinâmicos. Nos grupos Choque, FS e MSC foi realizado o choque hemorrágico (40 mmHg), e tratamento com *FS-MSCs* (1ml de secretoma em dose única) no grupo FS ou *MSCs* humanas (1×10^7 células em dose única) no grupo MSC. Após 190 minutos, o experimento foi finalizado e o bloco pulmonar extraído. Foram analisadas: a histopatologia do tecido pulmonar e a concentração de marcadores inflamatórios (Tnf-alfa, IL1-beta, IL-6, IL-10, iCAM e vCAM) no lavado broncoalveolar e no tecido pulmonar. Na análise histológica a densidade de neutrófilos apresentou diferença estatística significante com o grupo FS apresentando a menor densidade quando comparado aos grupos Choque e MSC ($p<0,001$). A dosagem de IL-10 no grupo FS foi superior aos demais grupos ($p=0,044$). Concluímos que os pulmões de ratos submetidos ao choque hemorrágico tratados com *FS-MSCs* apresentam redução de inflamação pela redução do infiltrado neutrofílico.

Descritores: transplante de pulmão; doadores de tecidos; choque hemorrágico; células-tronco; modelos animais; inflamação; meios de cultivo condicionados.

Abstract

Dias VL. *Inflammatory evaluation of the use of mesenchymal stem cells in animal model of a lung donor with hypovolemic shock* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Many factors are responsible for the large number of patients on waiting list for a lung transplant. The low rate of lung utilization in organ uptakes appears as a critical issue. As causes, we highlight the rigorous selection criteria, organ vulnerability, inadequate care for patients in brain death, neurogenic pulmonary edema due to brain death and trauma with hemorrhagic shock, that leads to hypoperfusion of the lungs, metabolic acidosis and tissue inflammation. Brain death and shock represents important causes of pulmonary deterioration, leading to organ rejection at the uptake or primary graft dysfunction in post-transplantation. To improve the pulmonary graft condition in order to obtain a larger number of viable lungs for transplantation and to reduce rejection rates, some strategies were adopted by transplantation teams. The use of mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment of inflammatory conditions is the object of study of many groups, due to the anti-inflammatory and immunomodulatory properties of these cells previously described. Our hypothesis is based on treatment with MSCs or their soluble factors (FS-MSCs) in donors with hemorrhagic shock. The aim of this work is to evaluate pulmonary inflammation in rats, after hemorrhagic shock treatment with blood replacement, associated with *in vivo* infusion of MSCs or FS-MSCs. Forty-eight rats were divided into 4 groups: Sham (Sham n = 12); Shock (Shock n = 12); FS (Shock + FS-MSCs n = 12) and MSC (Shock + MSCs n = 12). After anesthesia, animals were submitted to femoral artery and vein catheterization for monitoring of mean arterial pressure (MAP), induction of hemorrhagic shock and MSCs or FS-MSC infusion in treatment groups. At Sham group, only hemodynamic parameters were monitored. Hemorrhagic shock (40 mmHg) was performed in Shock, FS and MSC groups, and treatment with FS-MSCs (1ml secretome in single dose) were performed in the FS group or human MSCs (1×10^7 cells in single dose) in the MSC group. After 190 minutes, the experiment was terminated and the lung block was removed. The histopathology of lung tissue and the concentration of inflammatory markers (Tnf-alpha, IL-1 β , IL-6, IL-10, ICAM and vCAM) in the bronchoalveolar lavage fluid and tissue were analyzed. In histological analysis, the neutrophil density showed a statistically significant difference with FS group presenting the lowest density when compared to Shock and MSC groups ($p < 0.001$). IL-10 dosage in FS group was higher than all other groups ($p = 0.044$). We conclude that the lungs of rats submitted to hemorrhagic shock treated with FS-MSCs present reduction of inflammation by the reduction of neutrophilic infiltrate.

Descriptors: lung transplantation; tissue donors; shock, hemorrhagic; stem cells; models, animal; inflammation; culture media, conditioned.

1. Introdução

O transplante de pulmão consolidou-se como uma terapia que melhora a qualidade de vida e a sobrevida de pacientes com doença pulmonar em estágio terminal^(1, 2). Após o primeiro transplante realizado com sucesso em 1983, mais de 67 mil transplantes foram realizados em todo o mundo.^(3, 4) Com o crescente sucesso no manejo após o transplante, a meia vida do enxerto saltou de 4.7 anos na década de 90, para 5.9 anos na década seguinte.^(5, 6) Apesar do sucesso crescente no emprego da técnica, o número de receptores em lista de espera aumentou progressivamente e, atualmente excede em grande número os órgãos disponíveis para doação.^(7, 8)

O baixo índice de doadores viáveis é a maior limitação para o desenvolvimento do transplante pulmonar.^(9, 10) Isso ocorre principalmente pelos seguintes fatores: rigidez nos critérios de seleção; maior vulnerabilidade do pulmão (por ser um órgão em contato direto com meio ambiente e devido à interação fisiológica complexa entre as funções cardíaca e respiratória); eventos relacionados com a morte encefálica (desencadeamento de intensa cascata inflamatória, broncoaspiração, edema pulmonar, trauma torácico, etc); menor cuidado com o doador (hipervolemia, barotrauma, pneumonia associada à ventilação mecânica, entre outros).^(5, 9) As taxas de aproveitamento de pulmão em doadores de órgãos variam de 5 a 20% em todo o mundo e a mortalidade em lista de espera varia de 15 a 50%.^(3, 7, 9, 11)

Nas últimas décadas foram propostas várias estratégias para aumentar o número de doadores efetivos. Dentre elas, campanhas públicas pró-doença, uso de doadores após parada circulatória, melhor tratamento dos pacientes com morte encefálica nas Unidades de Terapia Intensiva, ampliação dos critérios de

seleção dos doadores (doadores marginais), uso de doadores vivos, emprego de técnicas de recondicionamento pulmonar (*ex vivo*) e terapias celulares.⁽⁵⁾

A rejeição aguda do enxerto é a complicação mais comum no transplante pulmonar, e está presente em 50 a 60% dos pacientes receptores de pulmão durante o primeiro ano pós transplante.^(12, 13) Associada à rejeição crônica, está a disfunção primária do enxerto, que é definida como o resultado final da lesão que ocorre do início da morte encefálica até a reperfusão pulmonar pós-transplante, incluindo o período de armazenamento em isquemia fria do enxerto pulmonar. Tal desordem tem como um dos principais mecanismos envolvidos, um grande processo inflamatório e edema pulmonar.^(14, 15) Apesar do declínio da mortalidade com o desenvolvimento do suporte intensivo, a mortalidade geral permanece alta. Ainda não foi encontrada nenhuma terapia farmacológica específica que melhore este desfecho clínico, o que repercute na necessidade de novas estratégias terapêuticas.⁽¹⁶⁾

Células tronco mesenquimais (MSCs) estão sendo estudadas como terapia celular para uma variedade de desordens degenerativas, imunológicas e inflamatórias.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ Estudos demonstraram que, em modelo animal, as MSCs induzem ao reparo de órgãos lesados e diminuem o processo inflamatório. Os resultados animadores neste modelo de estudo estimularam a translação da terapia com MSCs para ensaios clínicos relacionados a uma gama de desordens, incluindo doença do enxerto versus hospedeiro, doença inflamatória intestinal e infarto do miocárdio.⁽¹⁸⁾ As MSCs demonstraram reduzir a gravidade de lesões pulmonares causadas por injúrias sépticas e não sépticas.⁽²⁰⁾

Um problema com a interpretação de resultados e otimização das pesquisas com MSCs é a falta de conhecimento do mecanismo de ação destas

células.⁽¹⁸⁾ Estudos demonstraram que as MSCs possuem ação imunomodulatória e efeitos protetores sobre as células, através da liberação de fatores solúveis (FS-MSC) como citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento.⁽²¹⁾ Vários estudos com modelo animal demonstraram dados consistentes dos efeitos benéficos das MSCs na resolução de lesão pulmonar aguda induzida por endotoxinas, hiperóxia, pneumonia e sepse.⁽²²⁾ Apesar destes resultados, há controvérsias sobre a eficácia da terapia com MSCs nos humanos, e sobre a localização e persistência das MSCs no corpo após a administração. A via de administração mais empregada em humanos é a intra-venosa, e a mesma já foi comprovada ser segura e permitir a administração de grande quantidade de MSCs.⁽²³⁾ Estudos de localização identificaram que 90% das MSCs se localizam nos pulmões após a infusão intra-venosa durante as primeiras 24 horas.^(18, 24)

Não há na literatura trabalhos relacionados ao uso de MSCs em doadores de múltiplos órgãos após o choque hemorrágico. Assim torna-se bastante importante avaliar os potenciais efeitos benéficos das MSCs e dos FS-MSC produzidos por estas células. O objetivo desta terapêutica seria resgatar os órgãos limítrofes através da infusão *in vivo* pré-transplante, com o intuito de reduzir as alterações inflamatórias, na tentativa de ampliar o número de pulmões disponíveis e reduzir os índices de rejeição pós-transplante.

Desta forma, propusemos um estudo com o uso das MSCs e FS-MSC em modelo experimental de doador de múltiplos órgãos com choque hemorrágico.

2. Objetivos

2.1 Objetivo principal

Avaliar a inflamação pulmonar após infusão venosa *in vivo* de MSC e FS-MSC, em um modelo experimental de doador de pulmão submetido ao choque hemorrágico.

2.2 Objetivo secundário

Avaliar comparativamente a eficácia da ação anti-inflamatória das MSCs e FS-MSC.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Transplante

No início do século XX, a partir do desenvolvimento dos estudos experimentais com transplante de órgãos em modelos animais e novas descobertas sobre manifestações clínicas, mecanismos imunológicos da rejeição de enxertos e imunossupressão, o transplante passou a ser considerado como possibilidade terapêutica. Após o aperfeiçoamento das técnicas de anastomoses vasculares e preservação a frio pelo cirurgião francês Alexis Carrel, o mesmo realizou um dos primeiros transplantes bem sucedidos de rim em cães. Sua técnica de sutura vascular e seu trabalho sobre transplante de vasos e órgãos lhe proporcionou o Prêmio Nobel de 1912. Nos humanos, o primeiro transplante com sucesso cirúrgico e imunológico foi realizado em 1954 pelos doutores Joseph Murray e John Merrill, após transplantar um rim entre irmãos gêmeos monozigóticos. O que rendeu ao primeiro, o Prêmio Nobel em medicina de 1990.⁽²⁵⁾

Em 1963 o Dr. James Hardy realizou o primeiro transplante pulmonar unilateral com relativo sucesso. O paciente, um homem branco de 58 anos com carcinoma pulmonar no brônquio principal esquerdo, sobreviveu por 18 dias com melhora da função pulmonar, após falecer por complicações renais.⁽²⁶⁾ Com os avanços na imunossupressão, e principalmente com a descoberta da ciclosporina no final da década de 70, a sobrevida dos enxertos apresentaram um importante salto. Isso permitiu ao Dr. Joel Cooper realizar o primeiro transplante pulmonar unilateral em 1983 com sucesso, tendo o paciente sobrevivido por 6 anos. Três anos mais tarde o mesmo Dr. Cooper realizou o

primeiro transplante pulmonar duplo, adquirindo êxito excepcional neste procedimento.⁽²⁵⁾ O grupo do Dr. Cooper com participação do Dr. Michael Pasque, desenvolveu em 1989 a técnica de transplante bilateral sequencial, que não apenas melhorou a cicatrização das anastomoses brônquicas, mas também possibilitou a não realização de circulação extracorpórea para a execução do procedimento. Esta técnica permanece até os dias de hoje como a mais utilizada.⁽²⁷⁾

Desde o primeiro transplante, mais de 67 mil transplantes foram feitos em todo o mundo. Dados da *International Society of Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) mostram que em 2016 foram realizados 4.661 transplantes de pulmão.^(3, 4)

3.2 Transplante pulmonar no Brasil

O início dos transplantes pulmonares no Brasil foi bastante lento e restrito a poucos centros.⁽²⁸⁾ O primeiro foi realizado em 1989 pelo Dr. José J. P. Camargo na Santa Casa de Misericórdia em Porto Alegre⁽²⁹⁾. Em São Paulo, a equipe do Dr. Vicente Forte, fez o primeiro transplante pulmonar em 1990. A seguir e no mesmo ano, a equipe do Dr. Adib Jatene e Dr. Noedir Stolf realizou o primeiro transplante no Instituto do Coração (InCor). O número de transplantes aumentou progressivamente nos anos seguintes e também a qualidade dos resultados.⁽²⁸⁾

Dados da ABTO indicam que de Janeiro de 1997 a Dezembro de 2017 foram realizados 1192 transplantes pulmonares no total. Atualmente, o país conta com 6 equipes transplantadoras de pulmão, localizadas em 4 estados,

sendo que São Paulo e Rio Grande do Sul correspondem a aproximadamente 93% da produção dos transplantes, divididas de forma igualitária, com 2 centros para cada estado. Ceará e Bahia completam as equipes existentes. Somente no Rio Grande do Sul (4,6 pmp) a taxa de realização do transplante foi superior a 2 pmp. Neste estado o aproveitamento foi de 3,2%, muito abaixo dos 20% esperados. Isso mostra que muito deve ser feito na manutenção dos potenciais doadores, nos aspectos logísticos e nos critérios de aceitação pelas equipes, além do número irrisório de equipes de transplante.^(30, 31)

Os pacientes que recebem a indicação para a cirurgia de transplante são cadastrados em uma lista e devem aguardar a disponibilidade do órgão. A lista de espera em nosso país é ordenada de acordo com o tempo de cadastro, e não leva em consideração a gravidade ou prognóstico. A mortalidade em lista ainda é bastante alta. No estado de São Paulo esse número é próximo de 1 a cada 5 pacientes, e o tempo de espera médio em lista é de 23 meses.^(3, 32)

3.3 Fatores limitantes ao transplante pulmonar

Após a descoberta da ciclosporina, dos avanços em imunossupressão, técnica e material cirúrgico, medicina intensiva e maior experiência das equipes transplantadoras, o transplante pulmonar apresentou um salto em número e sucesso.^(1, 5, 28) A consolidação desta terapêutica como uma alternativa viável para o tratamento das pneumopatias graves, fez com que houvesse um aumento importante na procura, e consequentemente, de pacientes em listas de espera. Dados americanos mostram que de 1993 a 2003 houve um aumento de 147% de pacientes em lista de espera, ao passo que no mesmo período, houve um

aumento de apenas 51% no número de órgãos disponíveis.⁽²⁸⁾ Em 2011, a mortalidade em lista de espera no mundo foi de 15,7%.⁽⁵⁾ Frente a este problema, muitos grupos começaram a discutir os motivos desse déficit e possíveis soluções para aumentar o número de doadores.

O primeiro e principal motivo é a baixa taxa de aproveitamento de pulmões dos pacientes doadores de múltiplos órgãos com morte encefálica. Apenas 15 a 20% dos pulmões são adequados para o transplante. Mais de 30% dos pulmões que inicialmente poderiam ser captados, são descartados após a sua deterioração ocasionada pelas alterações promovidas pela morte encefálica.⁽⁵⁾ Além disso, muitos doadores de órgãos são vítimas de trauma, sofrendo choque hemorrágico. Vários mecanismos foram propostos sobre como a perda de grande volume sanguíneo altera a função pulmonar. Dentre eles podemos destacar a ativação de quimiocinas relacionadas à inflamação tecidual, liberação de espécies reativas de oxigênio e perfusão deficitária da microcirculação pulmonar.⁽³³⁾ Quando se fala em dados brasileiros, a taxa de aproveitamento ainda é mais baixa, chegando a apenas 4,9%.^(3, 32) Dentre os fatores responsáveis por esta condição, se destacam os critérios de seleção bastante rigorosos para os doadores de pulmão (Figura 1), e a falta de conhecimento e investimentos nos cuidados intensivos relacionados ao doador de órgãos. Sendo o segundo, um ponto bastante crítico no cenário brasileiro.^(1, 3, 5, 28, 32, 34) Outros fatores associados a baixa taxa de captação são recusa familiar, falta de notificação dos pacientes em morte encefálica à central de transplantes, problemas logísticos como falta de leitos em UTI e de equipamentos para constatação de morte encefálica, impossibilidade de

transporte do potencial doador e falta de infraestrutura para a realização de sorologias necessárias.⁽³⁵⁾

Figura 1 - Listagem de critérios de seleção para doadores de pulmão ideais.

Critérios de seleção para doadores de pulmão ideais
1. Idade menor que 55 anos
2. Compatibilidade ABO, Doador em morte encefálica
3. Tamanho pulmonar apropriado compatível
4. Raio X de tórax sem alterações
5. $\text{PaO}_2/\text{Fração inspirada de oxigênio (FiO}_2) > 300$ com pressão positiva expiratória final de 5cm de H_2O (PEEP)
6. Histórico de tabagismo menor que 20 maços ano
7. Ausência de trauma torácico
8. Ausência de evidência de aspiração ou sepse
9. Ausência de secreções purulentas na broncoscopia
10. Ausência de bactérias na cultura de escarro
11. Ausência de história de doença primária do pulmão ou infecção pulmonar ativa

Fonte: Snell GI e cols., 2011.

Relacionado ao manejo do doador com morte encefálica, muitos países criaram protocolos de atendimento e notificação para as unidades de terapia intensiva. As alterações fisiológicas após a morte encefálica são extremamente deletérias para os possíveis órgãos a serem doados. Após a declaração da mesma, os principais objetivos das equipes envolvidas no cuidado com o doador são diminuir a deterioração progressiva e manter ou melhorar a função de órgãos transplantáveis.^(1, 5, 7)

Com relação aos pulmões, as causas de lesão são multifatoriais. A morte encefálica muitas vezes está associada ao trauma, que pode gerar contusão pulmonar, broncoaspiração, pneumotórax e choque hemorrágico.

Além disso, a grande liberação de catecolaminas gera o edema pulmonar neurogênico. E uma resposta inflamatória sistêmica aguda gera um infiltrado neutrofílico intenso, com liberação de mediadores pró-inflamatórios, causando mais lesão no órgão.^(1, 5) A necessidade de ventilação mecânica, pode causar lesão pulmonar induzida pelo ventilador. Como medidas de prevenção e otimização dos pulmões, inclui-se estratégias de ventilação pulmonar protetoras, uso de corticosteroides em altas doses, mudanças de decúbito, aspiração frequente das vias aéreas, broncoscopia com toaleta brônquica e radiografias de tórax seriadas.⁽¹⁾

3.4 Estratégias para ampliar o número de doadores

Diversos países realizaram mudanças na legislação para facilitar a doação, notificação, captação e realização dos transplantes. Associado a isto, medidas de educação pública e campanhas foram estabelecidas para conscientizar a população sobre a doação de órgãos. Del Sorbo L et al.⁽⁵⁾, mostraram através de uma meta-análise que houve aumento de 5% em doações de órgãos após campanhas públicas que incentivavam este fim, comparadas à situação basal ou a um grupo controle.

Como medida para aumentar a captação de pulmões, diversos grupos vêm adotando a inclusão de critérios estendidos na seleção de doadores, o que inclui os denominados doadores de pulmões limítrofes, na condição de doadores viáveis.^(1, 3, 5, 7, 9, 32, 34, 36). Pêgo-Fernandes et al., apontaram possíveis critérios estendidos como idade acima de 55 anos, compatibilidade sanguínea com grupo não idêntico, raio x de tórax com anormalidade focal ou unilateral, relação

gasométrica $P/F < 300$, histórico de tabagismo maior que 20 maços-ano, ausência de trauma torácico extenso e secreção em vias aéreas superiores na broncoscopia. Com essa medida, alguns grupos conseguiram ampliar o número de doadores em até 40%, com resultados de sobrevida e mortalidade semelhantes.⁽³²⁾ (Figura 2)

Figura 2 - Listagem de critérios estendidos de seleção para doadores de pulmão.

Critérios estendidos para doadores de pulmão
1. Idade acima de 55 anos
2. Compatibilidade, grupo sanguíneo não idêntico
3. Raio X de tórax com anormalidade focal ou unilateral
4. $PaO_2/Fração inspirada de oxigênio (FiO_2) < 300$ com pressão positiva expiratória final de 5cm de H_2O (PEEP)
5. Histórico de tabagismo maior que 20 maços ano
6. Ausência de trauma torácico extenso
7. Secreção em vias aéreas superiores na broncoscopia
8. Cirurgia cardiopulmonar prévia

Fonte: Pêgo-Fernandes PM et al., 2011.

Outras fontes de doadores também foram buscadas na tentativa de ampliar a disponibilidade de órgãos. O uso de doadores com coração parado, provou ser uma fonte importante e segura de pulmões. Diversos trabalhos publicados mostram resultados, a curto e médio prazo, semelhantes aos de transplantes pulmonares realizados com doadores em morte encefálica. Como vantagem desta fonte de doadores, podemos destacar a não exposição dos pulmões à cascata inflamatória associada à morte cerebral. Como desvantagem, identificamos um maior período de isquemia quente e total do órgão nos casos de morte cardíaca fora do ambiente hospitalar. Independente disto, observou-se

um aumento de até 20% da disponibilidade de doadores com esta fonte, sem aumento na mortalidade pós-transplante, nos países em que a legislação permite o seu uso.^(5, 34, 36)

O transplante pulmonar lobar inter-vivos é uma técnica utilizada no Japão e em um serviço brasileiro chefiado pelo Dr. José Camargo, com resultados semelhantes ou até superiores ao transplante convencional.^(34, 37) Diversos aspectos éticos e legais estão envolvidos nesta modalidade, levando-se em conta que o doador previamente hígido estará exposto aos riscos e complicações de uma cirurgia de grande porte, além da perda funcional obtida com a ressecção do lobo pulmonar. Na literatura, as complicações em doadores vivos de lobos pulmonares para transplante, apresentam uma morbidade variável entre 19,8 e 61,3%.⁽³⁷⁾ Outra questão importante é a aceitação da população com relação a possibilidade de doar um órgão em vão, considerando que alguns receptores apresentam nível de gravidade bastante elevado. Em contrapartida, esses receptores não teriam oportunidade de sobrevida caso tivessem que esperar na fila convencional.⁽²⁸⁾ Os resultados dos principais grupos que realizam o transplante pulmonar inter-vivos, indicam uma sobrevida variável entre 63,7 e 70% no primeiro ano e de 54% em 3 anos.⁽³⁷⁾

Atualmente a maioria das estratégias de manejo de doadores visam evitar a piora dos danos já ocorridos aos pulmões, sem promover o reparo dos mesmos. Neste contexto, as técnicas de recondicionamento pulmonar ganham cada vez mais destaque e resultados promissores. O grande trunfo destas técnicas é a possibilidade de ampliar o número de doadores de pulmão, sem a necessidade de novos doadores disponíveis, mas sim, otimizando os pulmões inicialmente rejeitados pelas equipes transplantadoras.

Na técnica de Perfusão Pulmonar *ex vivo*, os pulmões são perfundidos com uma solução acelular normotérmica conhecida como perfusato, e ventilados em temperatura normotérmica para mimetizar as condições fisiológicas.⁽⁵⁾ Dentre as principais vantagens da técnica, podemos listar a minimização dos danos gerados pela isquemia fria, permite a avaliação funcional dos pulmões para definir ou não o uso para transplante, tem-se um ambiente ideal para recrutamento e re-expansão de áreas com atelectasia, permite a limpeza brônquica efetiva de secreções, a remoção de coágulos da circulação pulmonar através do uso da perfusão retrógrada no início do procedimento, permite que o volume e pressões definidos no ventilador mecânico sejam transferidos em sua totalidade aos pulmões, sem a interferência da parede torácica e do diafragma, a solução de preservação por ser hiperosmolar diminui o edema alveolar e a dextransa presente no perfusato facilita a perfusão da microvasculatura pulmonar.^(1, 5, 7, 38)

Novas pesquisas associam a infusão de medicamentos, como antibióticos, através do sistema *ex vivo*, com o intuito de otimizar o enxerto pré-transplante. As vantagens desta forma de tratamento são a maior flexibilidade de tempo para tratamento, do que o tratamento *in vivo* no doador, a possibilidade de administração de altas doses de medicamento sem lesar os demais órgãos do doador e o prolongamento da meia vida dos antibióticos dentro do sistema.⁽⁹⁾

3.5 Choque hemorrágico

O choque hemorrágico é definido por uma redução significativa do volume sanguíneo, com redução da perfusão dos tecidos e da oxigenação celular. A hipo-oxigenação tecidual gera aumento do metabolismo anaeróbico, desencadeando acidose, inflamação e aumento da permeabilidade capilar.^(39, 40)

Em resposta ao choque hemorrágico prolongado, há uma acentuada estimulação do sistema imune, que promove intensa reação inflamatória sistêmica. Tal reação desencadeia a liberação de grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias e migração de células envolvidas na promoção de inflamação para os tecidos, destacando-se os neutrófilos.⁽⁴¹⁾

No cenário do transplante pulmonar muitos doadores de órgãos são vítimas de trauma, e o choque hemorrágico gerado é um dos responsáveis pela lesão de isquemia e reperfusão dos pulmões, levando à disfunção primária do enxerto. Os mecanismos envolvidos nesse processo são inúmeros e a perda maciça de sangue promove as seguintes alterações: ativação de quimiocinas responsáveis pela interação entre o endotélio e os neutrófilos; ativação da neutrófilo NADPH-oxidase, com liberação de espécies reativas de oxigênio, que funcionam como um importante mediador para implantação de macrófagos e inflamação pulmonar; depleção de óxido nítrico que gera uma deficiência na perfusão microvascular, causada por vasoconstricção e agregação plaquetária.^(33, 42, 43)

Essas ações deletérias do choque hemorrágico promovem edema pulmonar devido ao aumento da permeabilidade capilar, com extravasamento de líquido para o interstício. Além do líquido, a migração de células inflamatórias

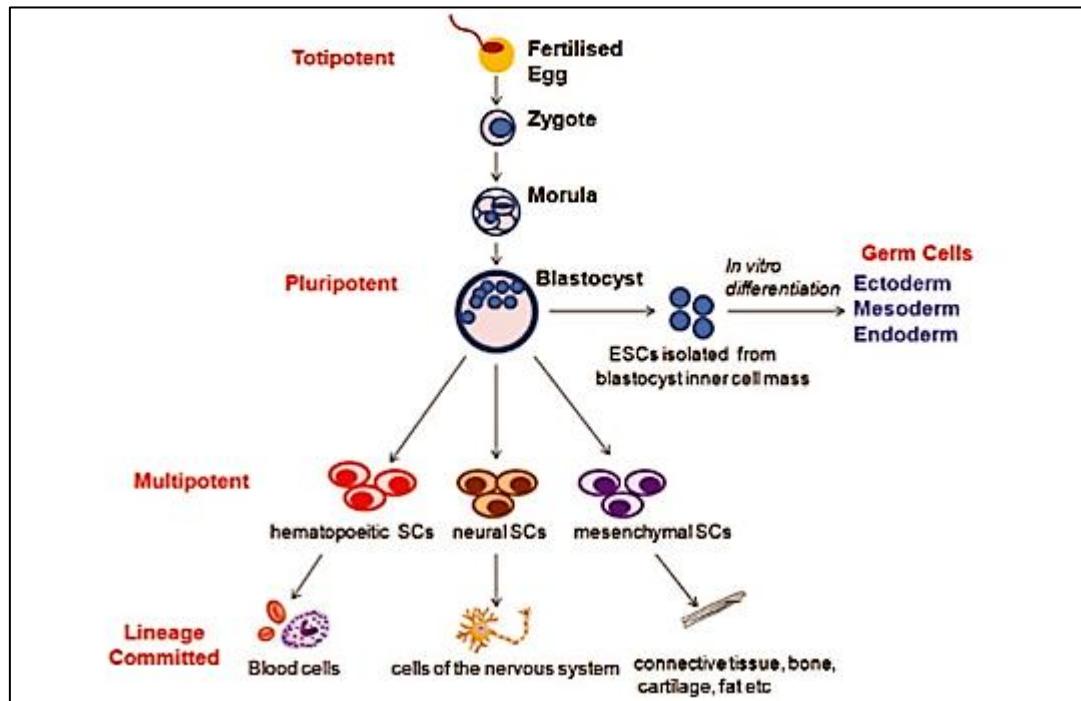
e das citocinas geram um grande processo inflamatório local, criando um ambiente desfavorável para a realização das trocas gasosas. Consequentemente, a relação $\text{PaO}_2/\text{Fração inspirada de oxigênio (FiO}_2)$ se reduz e gera instabilidade ventilatória. Tais alterações muitas vezes promovem a rejeição da captação dos pulmões pelas equipes transplantadoras.^(39, 41, 44)

3.6 Células tronco

Célula tronco é uma célula que possui a habilidade de divisão assimétrica para produzir outra célula semelhante a si, ou uma célula mais diferenciada. Estas células são classificadas com base no seu tecido de origem.⁽²⁰⁾

Células tronco embrionárias são derivadas da massa celular do blastocisto e são pluripotentes, ou seja, são capazes de se diferenciar em células de todas as linhagens. Células tronco fetais são derivadas dos tecidos extra-embriionários, incluindo o líquido amniótico, a placenta, sangue do cordão umbilical e geléia de Wharton. Essas células possuem um comportamento intermediário de diferenciação entre as células tronco embrionárias e as células tronco adultas. Estas últimas, incluem as células tronco mesenquimais, as células progenitoras endoteliais e as células tronco endógenas pulmonares. São células multipotentes, que tem o potencial de se diferenciar em uma variedade limitada de tipos celulares maduros.⁽²⁰⁾ (Figura 3)

Figura 3 – Diagrama esquemático ilustrando a hierarquia das células tronco.



Fonte: Hayes M et al., 2012.

As células tronco mesenquimais se originam do estroma e são capazes de auto renovação e diferenciação em células de origem mesodérmica incluindo condrócitos, osteócitos e adipócitos.^(20, 45) Elas foram identificadas inicialmente na medula óssea em 1976 por Friendenstein e cols., mas atualmente já foram encontradas em inúmeros tecidos, incluindo pulmão, cordão umbilical e seu sangue, tecido adiposo e trato gastro-intestinal.⁽²⁰⁾

De acordo com a *International Society for Cellular Therapy*, a sua caracterização é geralmente baseada em 3 critérios: aderência plástica quando culturada em condições padrão de cultura de tecidos; expressão de CD105, CD73 e CD90, sem a expressão de CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 ou marcadores de superfície HLA-DR; e diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*.^(46, 47)

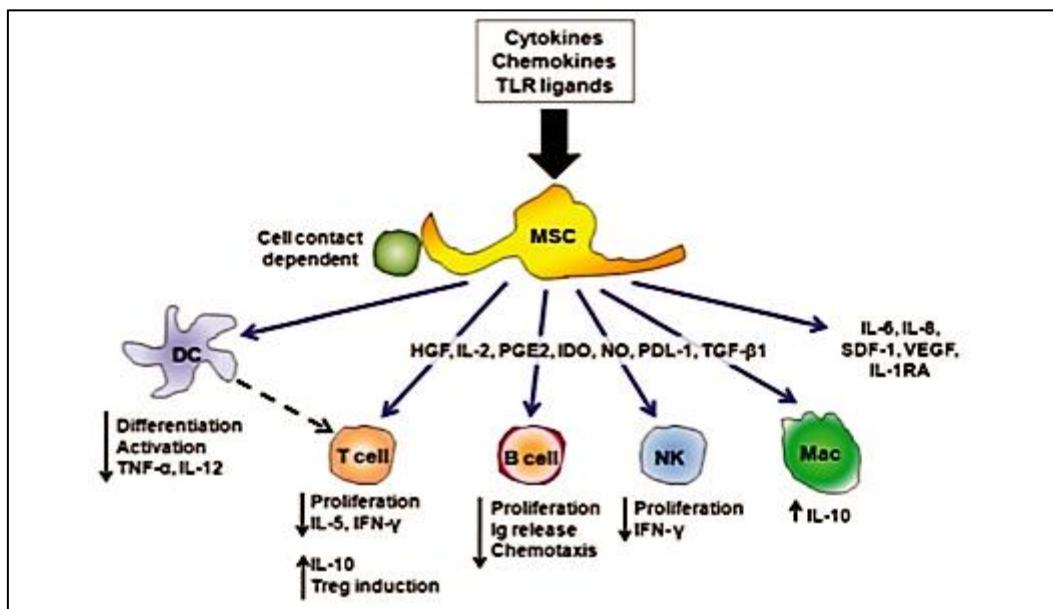
Os fatores solúveis das células mesenquimais são os produzidos liberados por essas células quando estimuladas por um meio hostil (hipóxico, isquêmico, acidótico, etc). Para a obtenção dos fatores solúveis *in vitro*, ou secretoma, é realizado um pré condicionamento das MSCs em um meio condicionado. O pré condicionamento hipóxico das MSCs já mostrou levar os fatores solúveis a altos níveis de anti-oxidantes. Sendo assim, o modo de pré condicionamento pode impactar de forma importante na concentração dos fatores solúveis. Porém o melhor protocolo de pré-condicionamento ainda é desconhecido. Até a duração ótima de privação do soro ainda é debatida na literatura, variando de 12 a 72h.⁽⁴⁶⁾

O tratamento com células tronco há muitos anos é estudado com o intuito de promover regeneração de tecidos e órgãos. Recentemente, novas aplicabilidades vêm sendo estudadas e, o uso de células tronco para recuperação e otimização de órgãos através da redução de inflamação e melhor regeneração dos tecidos por apresentar menos áreas lesadas, ganha cada vez mais atenção.

Uma série de estudos identificaram ações promovidas pelas MSCs que podem contribuir para prevenção da disfunção primária do enxerto. Elas secretam múltiplos fatores paracrinos, como fatores de crescimento, fatores que regulam a permeabilidade endotelial e epitelial, citocinas anti-inflamatórias e peptídeos anti-microbianos, que podem modular a resposta imune e facilitar o reparo e a regeneração.^(14, 16, 20, 48, 49) Por exemplo, suprimem as respostas celulares T alogênicas através da secreção de fatores solúveis como prostaglandina E-2 (PgE2), IL-10 e IL-6, modulam a função da células dendríticas, indiretamente regulam as atividades de células T e B, alteram o

fenótipo das células NK e suprimem sua proliferação, diminuem os níveis de citocinas como o TNF-alfa, IFN-gama e IL-12 e aumentam IL-10.⁽⁵⁰⁾ Essa ação parácrina, através da liberação de FS-MSC, parece exercer um papel fundamental na ação das MSCs, em detrimento da ação direta destas células nos órgãos.^(16, 51) (Figura 4)

Figura 4 – Diagrama esquemático demonstrando os potenciais mecanismos pelos quais as células tronco mesenquimais (MSC) podem modular a resposta imune.



Fonte: Hayes M et al., 2012.

As possíveis vantagens no uso das MSCs para o tratamento de doadores de órgãos são a sua derivação de tecidos adultos, sua baixa imunogenicidade, permitindo aplicação alogênica, sua relativa facilidade de isolamento e seu enorme potencial de expansão em cultura. Por outro lado, ainda existem uma série de barreiras para translação para uso clínico. A via mais

eficiente de administração ainda não está definida, a dosagem ideal também não é conhecida, não há nenhum método validado de mensuração da bioatividade das MSCs *in vivo* e há uma falta de protocolos padronizados para o isolamento e caracterização dessas células.⁽²⁰⁾

Estudos recentes mostraram resultados promissores sobre as ações imunomodulatórias e efeitos protetores das MSCs sobre as células, através da liberação de citocinas e fatores de crescimento. Dentre eles podemos destacar a redução da morte celular induzida por hipóxia e otimização da formação tubular das células endoteliais aórticas humanas; Proteção dos cardiomiócitos da morte celular induzida por hipóxia e limitação da área de infarto do miocárdio *in vivo*; Melhora na cicatrização de um modelo de ferida de parede em camundongo; Reversão da morte de hepatócitos e aumento de sobrevida em insuficiência hepática fulminante induzida quimicamente; Melhora de lesão intestinal induzida por radiação. E diversas injúrias pulmonares obtiveram melhora por redução do processo inflamatório.^(16, 17, 21, 48, 52-54)

3.7 Células tronco mesenquimais e pulmão

Após as descobertas das ações anti-inflamatórias e imunomodulatórias das MSCs, diversos grupos iniciaram pesquisas para o tratamento de desordens pulmonares de origem inflamatória e infecciosa. Ainda existe um grande número de controvérsias acerca dos mecanismos de ação, vias de administração, farmacocinética e farmacodinâmica das MSCs no tratamento de patologias pulmonares.^(16, 18)

Após a infusão venosa, Eggenhofer E et al.⁽¹⁸⁾ rastrearam a localização das MSCs, através da marcação radioativa destas células. Identificou-se que uma hora após a administração, 60% das células estavam nos pulmões e uma menor parcela no fígado. Após 24h, observou-se uma redução drástica da concentração dessas células no pulmão, enquanto houve um aumento no fígado e uma pequena quantidade no baço. Mesmo com essa não implantação das células no pulmão, muitos trabalhos indicaram excelente ação protetora e anti-inflamatória no tecido pulmonar. Fato este que corrobora com a hipótese de que as principais ações das MSC no pulmão estão associadas com sua função parácrina, através da liberação de FS-MSC.^(16, 51)

Alguns estudos demonstraram que os FS-MSC através de sua ação parácrina, apresentam um papel importante para o reparo tecidual, principalmente pelas suas propriedades anti-inflamatórias, anti-apoptóticas, angiogênicas e imunomodulatórias. Outros trabalhos sugeriram que as MSCs possuem a capacidade de transferir microvesículas para outras células, contendo mitocôndria, proteínas e microRNA, aumentando os níveis de atividade dessas células e otimizando suas funções no combate aos processos inflamatórios.^(19, 22, 55)

Os principais FS-MSC identificados até então, e que podem mediar os efeitos regenerativos das MSCs são IL-10, Antagonista do receptor IL-1, Fator de crescimento de queratinócitos e prostaglandina E2. Esses produtos da ação parácrina modulam o transporte de íons e fluidos alveolares, controlam a permeabilidade da barreira alvéolo-capilar e reduzem o processo inflamatório pulmonar, que são os pontos principais nos mecanismos de lesão pulmonar

aguda.^(16, 21, 51) Já é sabido que os fatores são liberados em quantidades diferentes de acordo com o meio a que as células mesenquimais são expostas. A matriz extra-celular composta por agentes inflamatórios (TNF-alfa, IL1-beta e óxido nítrico), condições de hipóxia ou com alterações provocadas por fármacos provou estimular as MSCs a secretarem seus fatores solúveis.^(16, 45, 48)

Em vários modelos de lesão pulmonar aguda, a secreção de fator de crescimento de queratinócitos e angiopoietina-1 pelas MSCs mostraram proteger o epitélio e o endotélio alveolar de lesão, em termos de permeabilidade de proteínas e perda do clearance de fluido alveolar. Outros FS-MSC como IL-10, PGE2 ou fator de crescimento transformador-β (TGF-β) mostraram efeitos benéficos em suprimir a inflamação.⁽⁴⁶⁾

Além da lesão pulmonar aguda, os FS-MSC também mostraram resultados promissores em asma e enfisema crônico, em termos de redução de inflamação e de dano histológico sobre a região bronco-alveolar e o parênquima pulmonar. Os efeitos benéficos dos FS-MSC foram parcialmente explicados pela superexpressão de IL-10 estimuladas pelo aumento de resposta T celular reguladora. Também por secreção adicional de IL-10 por parte dos monócitos/macrófagos.⁽⁴⁶⁾

Em suma, esses achados sugerem fortemente que os FS-MSC são capazes de recapturar os efeitos terapêuticos das MSCs em lesão pulmonar aguda e outras doenças inflamatórias pulmonares através da ativação de agentes anti-inflamatórios e anti-apoptóticos.⁽⁴⁶⁾

Muitos estudos experimentais, com o uso de MSCs e FS-MSC, foram ou estão sendo realizados relacionados ao tratamento de patologias pulmonares.

Asma, Fibrose pulmonar, hipertensão pulmonar, DPOC, lesão por reperfusão, Doença do enxerto versus hospedeiro, lesão pulmonar aguda e Displasia bronco-pulmonar estão entre as principais patologias pesquisadas. Gupta, N et al.⁽⁵⁶⁾, demonstraram em um modelo de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeos em camundongos que, a administração intravenosa ou endotraqueal de MSCs reduziram significativamente a inflamação e lesão alveolar, melhoraram o clearance de fluido alveolar e reduziram a mortalidade. Liu et al.⁽⁵²⁾, em um modelo de hipertensão pulmonar induzida em ratos, mostraram que o uso de FS-MSC foi capaz de reduzir significativamente a inflamação através da supressão de TNF-alfa, e consequentemente diminuindo a hiperproliferação das células musculares lisas da artéria pulmonar, se tornando então uma nova possibilidade terapêutica no tratamento desta patologia. Ionescu L et al.⁽²¹⁾, utilizaram os FS-MSC por via intratraqueal para o tratamento da lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo derivado da bactéria E.coli em ratos, e obtiveram redução importante do processo inflamatório através do aumento da atividade macrofágica. Tian-Shun Lai et al.⁽⁵³⁾, promoveram lesão pulmonar induzida pelo ventilador mecânico em ratos, e identificaram melhora dos parâmetros inflamatórios nos animais tratados antes da indução de lesão com MSC por via venosa. Em um modelo de choque hemorrágico em ratos, Pati S. et al.⁽⁵⁷⁾, obtiveram redução de inflamação após a infusão venosa de MSC. Esse tratamento promoveu inibição de TNF-alfa e reduziu o número de leucócitos e linfócitos locais, comparados à grupos controle.

Relacionados a estudos clínicos, a grande maioria das pesquisas estão em estágios iniciais. Muita cautela está sendo adotada visto que na grande maioria das vezes as células utilizadas são de indivíduos com抗ígenos

leucocitários incompatíveis.⁽⁵⁸⁾ Um estudo piloto realizado na Rússia com 11 pacientes portadores de lesão pulmonar induzida por radioterapia, realizou tratamento com MSC autóloga e obtiveram resultados satisfatórios.⁽⁵⁹⁾ A Universidade de Columbia realizou um estudo fase 1 com MSC em pacientes com infarto agudo do miocárdio e identificaram melhora do volume expiratório final no primeiro segundo (VEF1) e na capacidade vital forçada (CVF) dos pacientes tratados.⁽⁶⁰⁾ Tais resultados motivaram um estudo de fase 2 com MSC e pacientes com DPOC moderado a severo, porém não houve melhora clínica satisfatória ou redução de exacerbações da doença com o tratamento realizado, apenas redução da proteína C reativa dos pacientes.^(20, 61)

Especificamente sobre transplante pulmonar e tratamento com MSC há poucos trabalhos publicados. Wittwer T et al.⁽⁶²⁾, da Universidade de Colônia na Alemanha, publicaram em 2014 um trabalho experimental em porcos, com um modelo de doador de órgãos em morte cardíaca e realizaram um pré tratamento com MSC por via venosa e endobrônquica em grupos distintos. No grupo tratado por via venosa observou-se um aumento da resistência vascular periférica e uma redução da oxigenação comparado ao grupo controle. Já o grupo tratado por via endobrônquica, apresentou melhora importante da complacência pulmonar também comparado ao grupo controle. Um estudo translacional publicado em 2013, utilizou pulmões humanos rejeitados por equipes de transplante da Califórnia, e infundiram MSC via perfusão pulmonar ex-vivo. Após 4 horas de perfusão, foi identificada restauração do clearance de fluido alveolar nos órgãos tratados. Tais resultados sugerem que o uso de MSCs podem se tornar uma grande alternativa para o controle do edema pulmonar nos doadores de órgãos,

e consequentemente aumentar a disponibilidade de órgãos viáveis para o transplante.⁽¹⁴⁾

Porém, algumas preocupações e cautela devem ser incluídas ao se planejar os estudos em humanos. A melhor via de administração ainda não está estabelecida. A posologia e a dose mínima efetiva também não estão definidas. As MSCs não possuem um marcador específico e os seus marcadores não são expressos apenas por elas. Além disso, há uma deficiência de protocolos padronizados para o isolamento e caracterização das mesmas. Complementando, não há nenhum método validado para a medição da bioatividade das MSCs *in vivo*.^(20, 63, 64)

Outro ponto importante é que as MSCs possuem algumas características semelhantes às de células tumorais, como meia vida longa, resistência relativa a apoptose e a habilidade de se replicar em longos períodos de tempo. Tais aspectos poderiam favorecer a uma transformação maligna dessas células a longo prazo. Sendo assim, mais pesquisas e testes devem ser realizados para evitar riscos e complicações com uso das MSCs em humanos.^(20, 63, 64)

4. Métodos

O presente estudo teve a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) e da Diretoria Clínica do HCFMUSP (Protocolo de pesquisa nº 188/14).

Os animais utilizados durante o experimento foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP. Os animais foram mantidos no Biotério da Divisão de Experimentação do Instituto do Coração, em ambiente convencional, água e ração balanceada *ad libitum*. Todo protocolo experimental foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica (LIM 61) localizado na Divisão de Experimentação Animal do Instituto do Coração.

As MSCs e os FS-MSC foram fornecidos pelo Centro de Pesquisa do Genoma Humano e Células Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

4.1 Delineamento do estudo

Foram utilizados 48 ratos machos adultos, *Sprague Dawley* com peso médio de 250 a 350 gramas. O protocolo foi baseado nos princípios éticos segundo as normas vigentes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA que regem sua utilização na pesquisa científica.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente através de sorteio nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo MSC (Choque + MSC): 12 animais submetidos à cateterização vascular, induzidos ao choque hemorrágico, e tratados com reposição de 25% do volume de sangue retirado, seguida da infusão de célula tronco

mesenquimal via veia femoral.

- Grupo FS (Choque + Fatores solúveis produzidos pelas MSCs): 12 animais submetidos à cateterização vascular, induzidos ao choque hemorrágico, e tratados com reposição de 25% do volume de sangue retirado, seguida da infusão de FS-MSC via veia femoral.
- Grupo Choque: 12 animais submetidos à cateterização vascular, induzidos ao choque hemorrágico, e tratados com reposição de 25% do volume de sangue retirado.
- Grupo Sham: 12 animais submetidos à cateterização vascular.

4.2 Isolamento e cultivo das células tronco mesenquimais humanas

O isolamento e o cultivo de MSCs do tecido adiposo humano foram realizados de acordo com protocolos já descritos na literatura⁽⁶⁵⁾.

O processo se iniciou pela obtenção de amostra de tecido adiposo (lipoaspirado ou biópsia). A amostra foi coletada em tubos de 50 ml contendo meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e 2% de antibiótico e anti-micótico. A amostra pôde ser processada imediatamente após a coleta ou armazenada em refrigerador a 4 ° C no tubo com DMEM e antibiótico, até o processamento.

A seguir foi realizada a lavagem da amostra com PBS (solução salina tamponada com fosfato), com 2% de antibiótico e anti-micótico. O volume de PBS foi o dobro do volume da amostra. Esse passo foi repetido duas vezes (passo importante para remover as células sanguíneas). Após o passo de lavagem, foi preparada a solução de digestão: 0,075% de colagenase. A

colagenase foi diluída com PBS; O volume utilizado desta solução foi aproximadamente metade do volume da amostra de tecido. A digestão da amostra foi realizada durante 30 min a 37 ° C.

Procedeu-se com a neutralização da atividade enzimática com DMEM contendo FBS a 10% (soro bovino fetal) e 1% de antibiótico e anti-micótico, a seguir o material foi centrifugado a 1200 RPM durante 10 min para se obter o sedimento. O mesmo foi ressuspenso em DMEM contendo 10% de FBS e 1% de antibiótico e anti-micótico, plaqueado e incubado durante a noite à 37 ° C e 5% de CO₂ (Concentração: 5000 células / cm²).

Após essa incubação, as placas foram lavadas extensivamente com PBS contendo 2% antibiótico e anti-micótico para remover os detritos, e as células foram incubadas com meio de crescimento.

As células foram armazenadas na concentração 1x10⁷ células em 1ml do próprio meio de cultivo para serem aplicadas em dose única. Estudos pilotos realizados pelo Centro de Pesquisa do Genoma Humano e Células Tronco verificaram que a solução não é tóxica e as células se mantém viáveis neste meio.⁽⁶⁶⁾

4.3 Preparação dos fatores solúveis das MSCs

Para obter os FS-MSC, as MSCs foram cultivadas em meio isento de soro (T225 com 80% de confluência). A seguir foram enxaguadas três vezes com 36ml de PBS e adicionado 36ml do meio de cultivo DMEM/f12 sem soro + antibióticos. Incubado por oito horas e novamente enxaguado por três vezes com 36ml de PBS, com posterior acréscimo de 36ml de DMEM/f12 sem soro +

antibióticos. Nova incubação por 20 horas. A seguir o meio foi coletado e as células contadas, seguido de centrifugação de 300g por 5 minutos para remoção dos debríss. O sobrenadante foi coletado e o meio condicionado armazenado para uso.

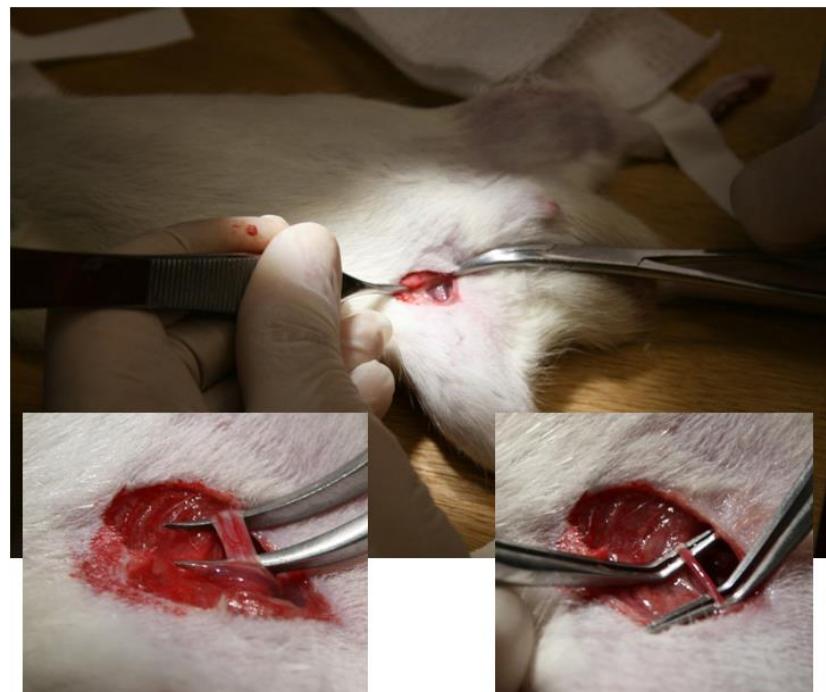
Os FS-MSC foram armazenados no próprio meio em volume de 1ml para serem aplicados em dose única em cada animal do grupo indicado. Não houve quantificação nem identificação de quais fatores estavam presentes no meio condicionado pois tais análises já haviam sido realizadas em estudos prévios pelo Centro de Pesquisa do Genoma Humano e Células Tronco.⁽⁶⁷⁾

4.4 Procedimento cirúrgico

Os animais foram sedados em câmara de acrílico com isoflorano a 5%, pesados e fixados em prancha de preparação. Procedeu-se com intubação por via oro-traqueal com cânula adequada para pequenos animais e início da ventilação mecânica em ventilador para pequenos animais (Harvard Apparatus, modelo 683), com volume corrente de 10 ml/kg e frequência de 80 ciclos por minuto.

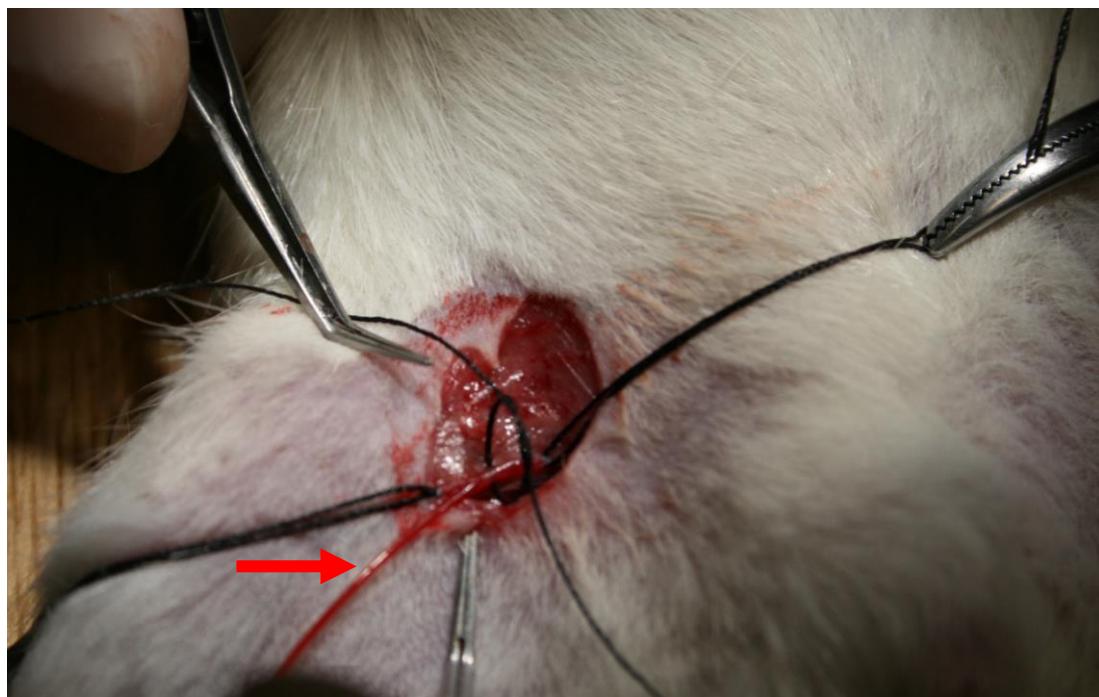
Com o animal posicionado na prancha realizou-se a assepsia e tricotomia da região femoral direita, procedendo com a dissecção da região para o isolamento e canulação da artéria e veia femoral (Figura 5). O cateter foi confeccionado com tubos tipo Tygon (Critchley, Austrália) 4 cm de Polietileno (PE-10) unido com auxílio de uma haste metálica, à 13 cm de Polietileno (PE-50) e preenchido com solução salina e heparina (Figura 5).

Figura 5 - Isolamento da região femoral direita para canulação da artéria e veia femoral.



Para a inserção do cateter na artéria e veia femorais utilizamos um microscópio estereoscópico binocular com aumento de 4.5X (Olympus, modelo SZ6145). O catéter da artéria femoral direita foi conectado a um monitor (Dixtal, DX2021, Brasil) para registro da pressão arterial média (PAM). O cateter da veia femoral direita foi utilizado para a indução e manutenção do choque hemorrágico, através da retirada de sangue, assim como para reposição sanguínea e administração das MSCs e FS-MSC (Figura 6).

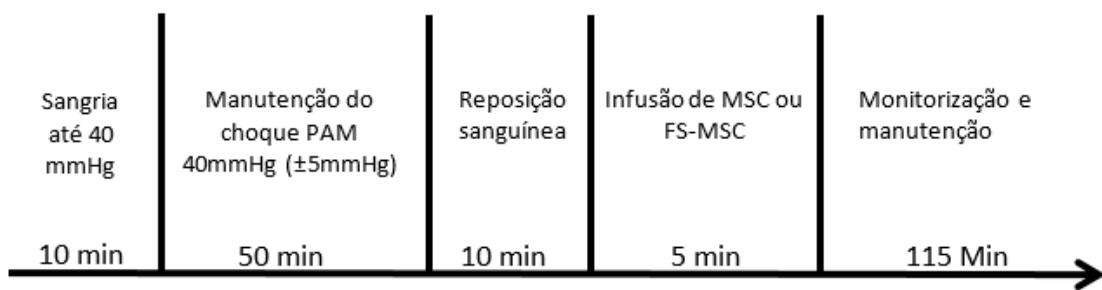
Figura 6 - Canulação com tubo de polietileno. Seta: Cateter Tygon.



4.5 Modelo de choque hemorrágico

O Choque hemorrágico foi induzido pela retirada de sangue em alíquotas sucessivas através do catéter posicionado na veia femoral direita, utilizando seringas previamente heparinizadas. A retirada de sangue foi realizada até que a PAM atingisse 40 mmHg, nos primeiros 10 minutos do experimento. A seguir os ratos foram mantidos chocados por 50 minutos com este nível pressórico, através da retirada ou reinfusão do sangue em casos de alteração da PAM (± 5 mmHg). Nossa modelo de choque hemorrágico foi baseado na publicação de Vincenzi et al.⁽⁴⁴⁾ e seguido conforme publicação de nosso grupo.⁽⁶⁸⁾ (Figura 7)

Figura 7- Esquematização do procedimento experimental.



O grupo Sham e o grupo Choque foram monitorados durante todo o período do experimento. Os grupos MSC e FS foram submetidos ao tratamento com reposição sanguínea após o choque hemorrágico. O grupo MSC recebeu a infusão de células tronco mesenquimais na concentração de 1×10^7 em 1ml do próprio meio no período de 5 minutos. O grupo FS recebeu a infusão do meio condicionado contendo os fatores solúveis das MSCs no volume de 1ml no período de 5 minutos.

Nos animais submetidos ao choque hemorrágico (grupos MSC, FS e Choque), após o término do período de manutenção do choque, realizou-se a reinfusão de 25% do sangue retirado. A Pressão arterial média (PAM) foi observada durante os 115 minutos (Figura 8).

Figura 8 - Monitoração do animal durante 115 minutos.



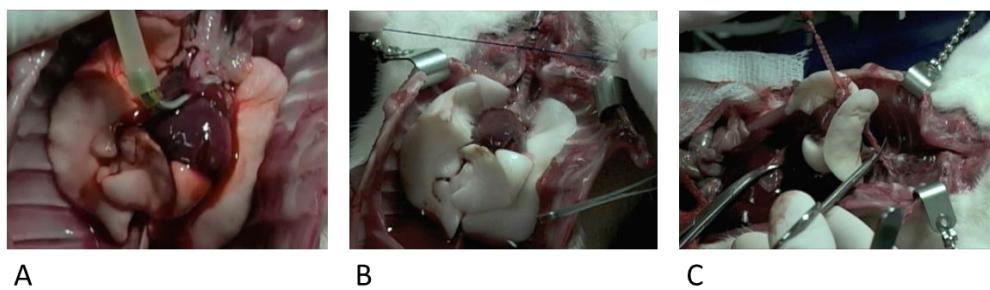
Ao término da observação de 115 minutos, procedeu-se com a extração do bloco cardiopulmonar do animal doador.

4.6 Extração pulmonar

Uma laparotomia com ressecção do esterno foi realizada e o diafragma foi aberto radialmente com cautela para não lesionar o pulmão. Por meio da timectomia o coração foi exposto, procedendo com ventriculotomia direita adjacente à artéria pulmonar, secção da veia cava inferior e ventrículo esquerdo longitudinalmente na ponta. A perfusão pulmonar anterógrada foi realizada com a solução de preservação (Perfadex®, Vitrolife Göteborg, Suécia), através de uma cânula introduzida na artéria pulmonar pela ventriculotomia direita. A

solução de preservação foi administrada por gravidade a partir de um reservatório posicionado 20 cm acima do coração, com drenagem espontânea do efluente pela ventriculotomia esquerda. Ao término da perfusão, a traquéia foi ligada com um fio abaixo da cânula e a extração pulmonar foi realizada em sentido craniocaudal a partir do estreito cervicomediastinal superior, por tração anterior e inferior da traquéia com dissecção do mediastino posterior. (Figura 9)

Figura 9 - Etapas do procedimento de extração pulmonar. A) perfusão pulmonar anterógrada do pulmão com Perfadex®. B) ligadura traqueal com os pulmões insuflados. C) extração do bloco cardio-pulmonar em sentido crânio-caudal.

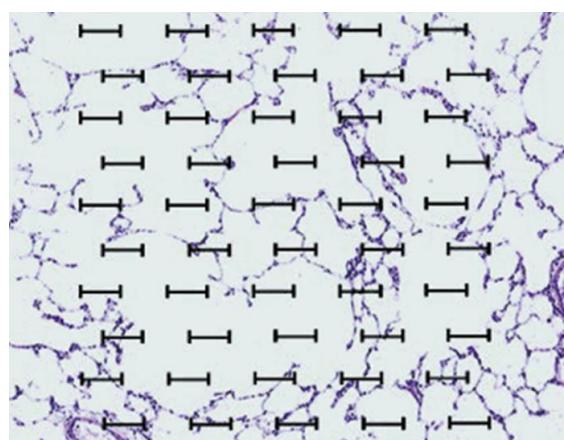


Do total de 48 animais, 24 foram destinados para análise histopatológica em lâminas de hematoxilina e eosina (HE) e análise de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL1- β , IL-10) através da técnica multiplex. Utilizou-se o lobo superior direito para esta análise. Os outros 24 animais foram submetidos a coleta de lavado bronco-alveolar (LBA), sendo este material utilizado para análises, por meio da dosagem de TNF- α , IL-6, IL1- β , IL-10, iCAM e vCAM através da técnica de ELISA.

4.7 Análise histológica (HE)

Os lobos superiores direito dos pulmões foram imersos em formalina tamponada a 10% para fixação. Após 24 horas, foram confeccionados blocos de parafina com os fragmentos, os quais foram seccionados em cortes de 5 μ m e corados com hematoxilina-eosina. As análises foram realizadas em duplicita por indivíduos diferentes capacitados e totalmente cegados quanto aos grupos do estudo aos quais pertenciam as lâminas. Estas lâminas foram analisadas em microscópio Olympus CX22LED com um retículo de pontos e retas. Em cada lâmina foram avaliados 15 campos de maior aumento do retículo, com contagem dos pontos que tocavam as áreas de parênquima pulmonar, e contagem do total de neutrófilos. Através da área do retículo pré-determinada, foi possível estimar a área de parênquima pulmonar de cada animal analisado, e a relação da contagem de neutrófilos com a área de parênquima nos forneceu a densidade de neutrófilos por micrômetro quadrado (μm^2) de tecido pulmonar. A seguir os valores foram convertidos para centímetros quadrados (cm^2) para facilitar os cálculos. (Figura 10)

Figura 10 - Corte histológico de pulmão de rato com retículo de pontos e retas para análise morfométrica.



4.8 Análise de citocinas inflamatórias no tecido pulmonar

A proteína total dos tecidos dos animais foi preparada através da adição do tampão RIPA (RIPA Lysis Biffer, 10x – MERK#20-188) a uma proporção de 0,4ml para cada 0,1g de tecido. Cada 1ml do tampão RIPA diluído foi adicionado 10uL de coquetel inibidor de proteases (Protease Inhibitor Cocktail Set I (MERK#53131). A seguir a mistura foi homogeneizada no gelo com auxílio do homogeneizador (FisherbrandTM Pellet PestlesTM) e o homogenato foi transferido para um tubo eppendorf de 2ml. O material foi incubado em gelo por 10min e centrifugado a 10.000g a 4° C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo eppendorf. As proteínas totais de cada amostra foram quantificadas para normatização do valor encontrado no ensaio (Kit BCA PROTEIN ASSAY MERK#71285).

Este material foi então encaminhado para análise multiplex das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6, IL1- β , IL-10 pela metodologia xMap (LuminexTM xMAP - kit Cat. # RECYTMAG-65K-04(IL1b, IL6, IL10 e TNFa) Millipore (St. Charles-Missouri-USA).

4.9 Lavado bronco-alveolar (LBA)

Após a extração do bloco cárdio-pulmonar, a traquéia foi isolada. O LBA foi obtido com a locação de um cateter de 20fr na traquéia, através do qual foi infundido 3ml de solução fisiológica a 0,9% e a seguir aspirado de volta no maior volume possível retrogradamente. O volume coletado foi centrifugado a 2500rpm a 4° por 10 min, e a seguir despejado em eppendorfs, sendo armazenado em freezer a -80°C.

4.10 Análise imunoistoquímica no LBA (ELISA)

Para determinação dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, iCAM e vCAM, no lavado bronco alveolar, utilizamos kits comercialmente disponíveis para imunoensaio enzimático, específico para a análise das substâncias citadas em ratos (Quantikine Rat IL-6, Quantikine Rat IL-1 β e Quantikine Rat TNF- α , Quantikine Rat IL-10, Quantikine Rat iCAM, Quantikine Rat vCAM, R&D Systems Inc, Minneapolis MN- USA). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

4.11 Quantificação de leucócitos no sangue periférico

Foram colhidas amostras de sangue periférico (20 μ L), extraídas da cauda dos ratos em dois momentos do protocolo experimental do estudo: No início do protocolo, imediatamente antes da indução do choque hemorrágico; E ao final do protocolo, antes da extração pulmonar. Essas amostras foram analisadas através da contagem total de neutrófilos em Câmara de Neubauer.

4.12 Análise estatística

4.12.1 Análise estatística descritiva

As análises descritivas para os dados quantitativos foram realizadas, apresentando as médias acompanhadas dos respectivos desvios padrão (DP). Os dados sem distribuição normal foram apresentados com mediana e intervalos interquartil IQ (25-75%). Os pressupostos da distribuição normal em cada grupo

e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliados respectivamente, com o teste de Shapiro-Wilk e com o teste de Levene.

4.12.2 Análise estatística inferencial

Para análise de dois fatores (Grupo e Tempo), foi utilizada ANOVA de duplo fator de medidas repetidas para um único fator (Tempo). O Teste Anova de um único fator foi utilizado para avaliar as variáveis de distribuição normal (Densidade de neutrófilos, IL-1 β , iCAM e vCAM). Quando foi necessário realizar comparações múltiplas de médias, nós utilizamos o teste de Bonferroni.

As interleucinas TNF- α , IL-6 e IL-10 não apresentaram distribuição normal. Para estas, utilizamos o teste de Kruskall Wallis. Quando foi necessário realizar comparações múltiplas, foi utilizado o teste de Dunn.

Foi considerado um α de 0,05 em todas as análises inferenciais. As análises estatísticas descritivas e inferenciais foram executadas com o software SPSS versão 21 (SPSS 21.0 for Windows).

5. Resultados

Os resultados estão representados em gráficos de média e desvio padrão.

5.1 Pressão arterial média

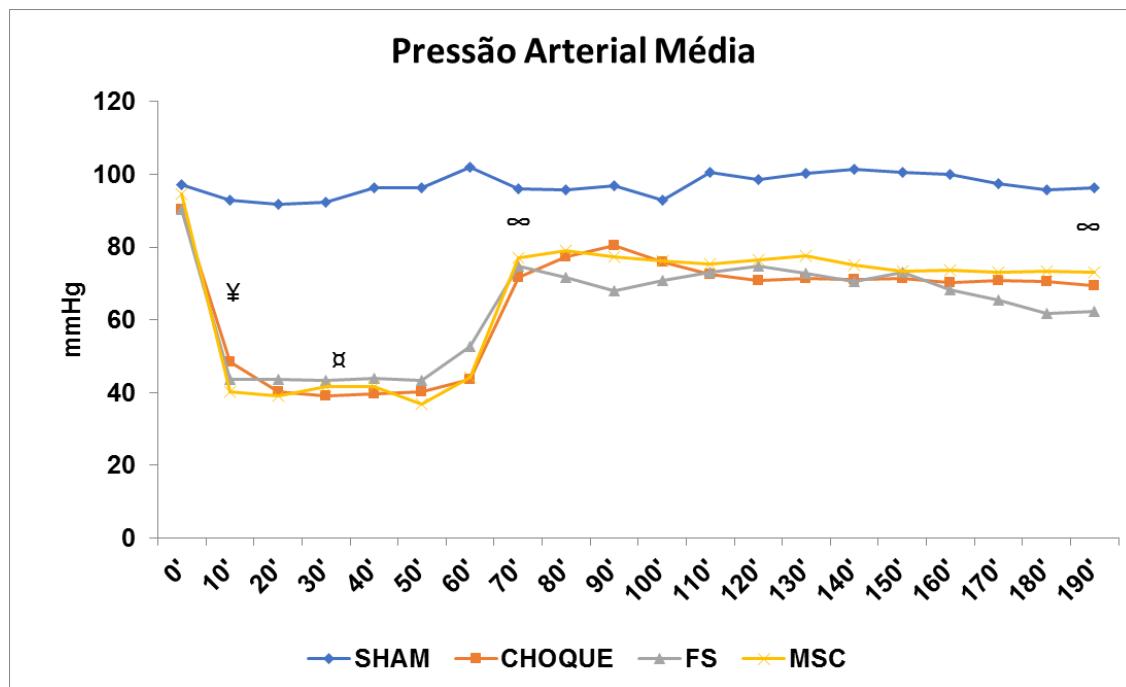
No início do experimento, não houve diferença estatística significante entre os grupos relacionado aos valores da pressão arterial média (PAM), mostrando homogeneidade entre os grupos ($p>0,05$).

No grupo Sham a PAM permaneceu constante durante todo o período de monitoração, com pequenas oscilações ao longo do experimento durante 190 minutos.

Os grupos Choque, FS e MSC foram induzidos ao choque hemorrágico do período inicial até o décimo minuto, com queda dos valores de PAM conforme previsto. A comparação das médias de PAM no tempo 10 minutos com o momento basal apresentou diferença estatística significante ($p<0,001$). No período de manutenção do choque hemorrágico (10 a 60 minutos), a PAM destes grupos apresentou diferença estatística quando comparada à do grupo Sham ($p<0,001$).

Após a reposição sanguínea e término do choque hemorrágico (70 minutos), os grupos Choque, FS e MSC apresentaram diferença estatística significante quando comparados ao grupo Sham ($p<0,05$), mas não apresentaram diferença entre si. ($p>0,10$). Ao término do experimento, as médias pressóricas se mantiveram em proporções semelhantes às do momento descrito anteriormente, permanecendo com os mesmos valores de p . Esses resultados nos permitem concluir que nosso modelo de choque aplicado é efetivo no que tange às alterações dos níveis pressóricos. (Gráfico 1)

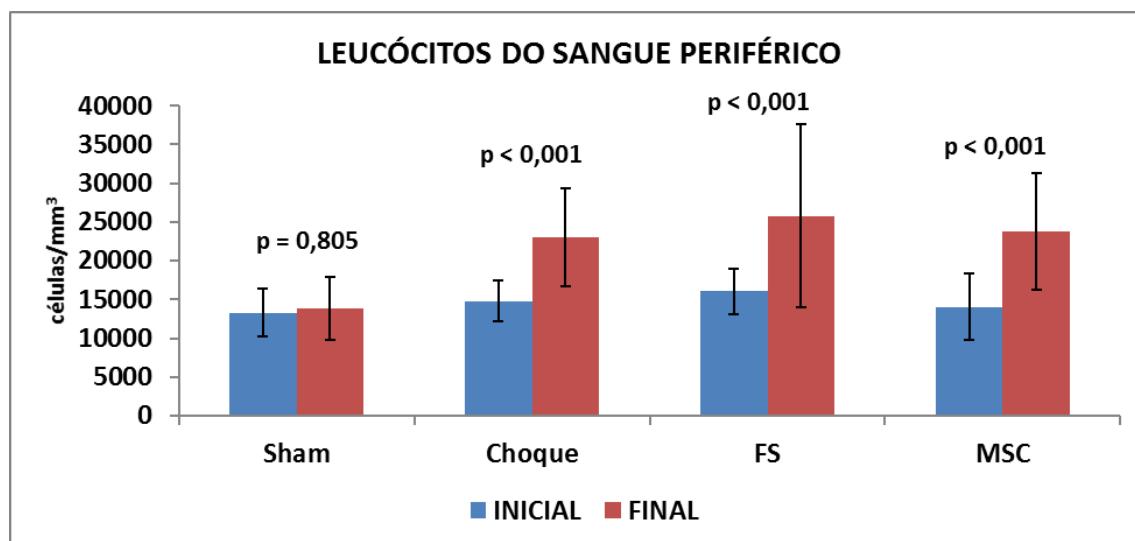
Gráfico 1- Pressão Arterial Média *in vivo* dos animais. Observamos diferença estatística significante nos grupos submetidos ao choque hemorrágico (Choque, FS e MSC) quando comparado ao momento basal ($\text{¥ } p<0,001$). Durante a manutenção do choque hemorrágico há diferença estatística dos grupos Choque, FS e MSC quando comparado ao grupo Sham ($\boxtimes p<0,001$). Ao término de 70 e aos 190 minutos os grupos Choque, FS e MSC apresentaram diferença estatística significante quando comparados ao grupo Sham ($\infty p<0,05$).



5.2 Quantificação de leucócitos no sangue periférico

Quando realizada a comparação em cada grupo entre as dosagens de leucócitos do sangue periférico no momento inicial do protocolo experimental e no momento final, o grupo Sham não apresentou diferença estatisticamente significante entre seus dois momentos ($p = 0,805$), porém, os demais grupos apresentaram aumento do número de leucócitos ao final do experimento. ($p < 0,001$).(Gráfico 2)

Gráfico 2- Gráfico comparativo relativo à quantificação de leucócitos do sangue periférico coletadas no momento inicial do protocolo experimental e no momento final em cada grupo. Houve diferença estatística na comparação dos grupos Choque, FS e MSC, os quais apresentaram aumento do número de leucócitos no momento final. ($p < 0,001$). O grupo Sham não apresentou diferença entre suas quantificações ($p=0,805$).



No momento inicial não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p=0,33$). No momento final os grupos Choque, FS e MSC apresentaram quantificação de leucócitos elevada (23.071, 25.769, 23.783) em relação ao grupo Sham (13.788), com diferença estatística entre os grupos

($p=0,002$), e nas comparações múltiplas foi identificada diferença relacionada apenas ao grupo Sham quando comparado aos grupos Choque, FS e MSC. (Gráfico 3) (Tabela 1)

Gráfico 3- Gráfico comparativo entre os momentos inicial e final da quantificação de leucócitos do sangue periférico nos grupos do estudo. Não houve diferença estatística no momento inicial entre os grupos ($p=0,33$). Ao final do experimento a quantificação de leucócitos foi maior nos grupos Choque, MSC e FS ($p=0,002$), sendo a diferença encontrada nas comparações múltiplas entre Sham vs Choque ($*p=0,02$), Sham vs FS ($**p=0,006$) e Sham vs MSC ($***p=0,01$).

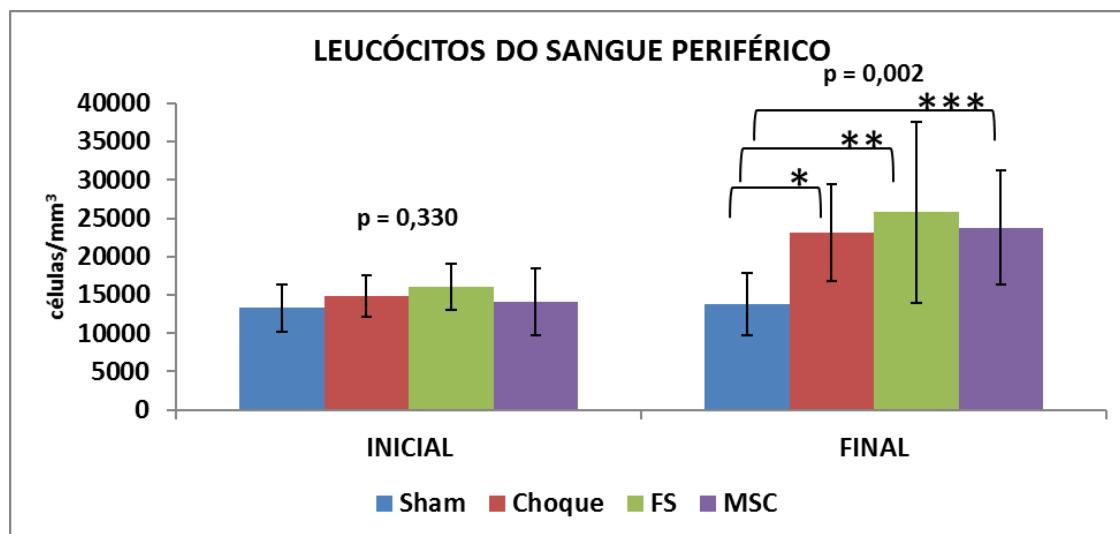


Tabela 1- Comparações múltiplas relacionadas à quantificação de leucócitos do sangue periférico, coletadas no momento final do experimento.

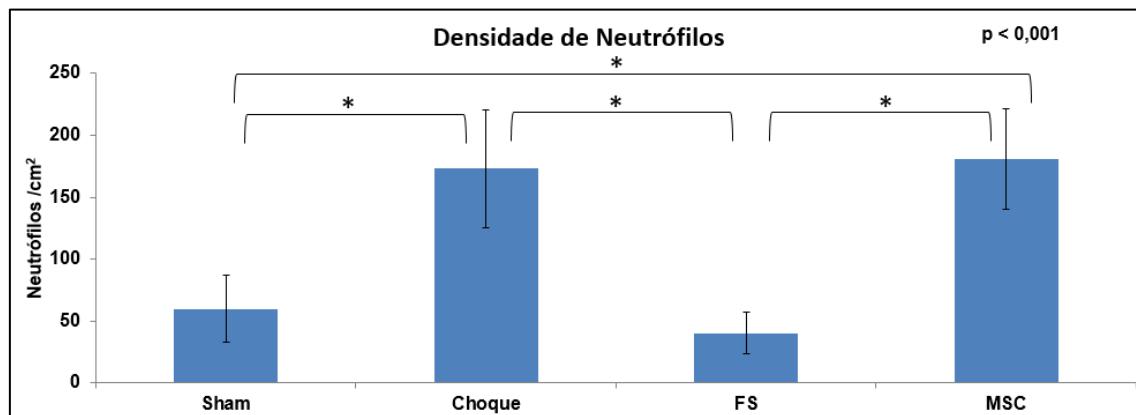
Grupos	p
Sham x Choque	0,02
Sham x FS	0,006
Sham x MSC	0,01
FS x MSC	>0,05
Choque x FS	>0,05
Choque x MSC	>0,05

5.3 Análise histológica

5.3.1 Análise histológica – HE

Em relação a densidade de neutrófilos houve diferença estatística significante entre os grupos ($p<0,001$). O grupo MSC apresentou maior densidade de neutrófilos com 180,77 neutrófilos/cm² quando comparado com os demais grupos e o grupo FS apresentou a menor densidade de células com 40,38 neutrófilos/cm² (Gráfico 4).

Gráfico 4- Gráfico comparativo relativo ao Infiltrado neutrofílico dos grupos, medido em densidade de neutrófilos. Houve diferença estatística na comparação entre os grupos, com o grupo FS apresentando a menor densidade ($p<0,001$). Nas comparações múltiplas houve significância estatística nas comparações Sham vs Choque (* $p<0,001$), Sham vs MSC (* $p<0,001$), Choque vs FS (* $p<0,001$) e FS vs MSC (* $p<0,001$).



Ao realizarmos as comparações múltiplas, os grupos Sham e Choque apresentaram significância estatística em sua relação ($p<0,001$), sendo a densidade de neutrófilos do grupo Sham de 60,11 neutrófilos/cm², enquanto o

grupo Choque apresentou 172,52 neutrófilos/cm². Tais valores sugerem a eficácia do modelo de choque hemorrágico em gerar aumento do infiltrado inflamatório.

Ao compararmos os grupos Choque e FS, verificamos significância estatística (p<0,001), com densidades de neutrófilos de 172,52 neutrófilos/cm² e 40,38 neutrófilos/cm² respectivamente, dados que sugerem uma eficácia da ação dos FS-MSC para redução do infiltrado neutrofílico. Já a comparação entre Choque e MSC não apresentou diferença entre os grupos (p>0,05), o que sugere ausência de ação das MSCs após infusão venosa, ou de tempo hábil para sua ação anti-inflamatória.

Isoladamente, FS versus MSC apresentou significância estatística (p<0,001), sendo a densidade de neutrófilos do primeiro bastante inferior a do segundo (40,38 vs 180,77 neutrófilos/cm²). (Tabela 2)

Tabela 2- Comparações múltiplas relativas à densidade de neutrófilos dos grupos do estudo.

Grupos	p
Sham x Choque	<0,001
Sham x FS	>0,999
Sham x MSC	<0,001
FS x MSC	<0,001
Choque x FS	<0,001
Choque x MSC	>0,999

5.3.2 Análise de citocinas inflamatórias no tecido pulmonar

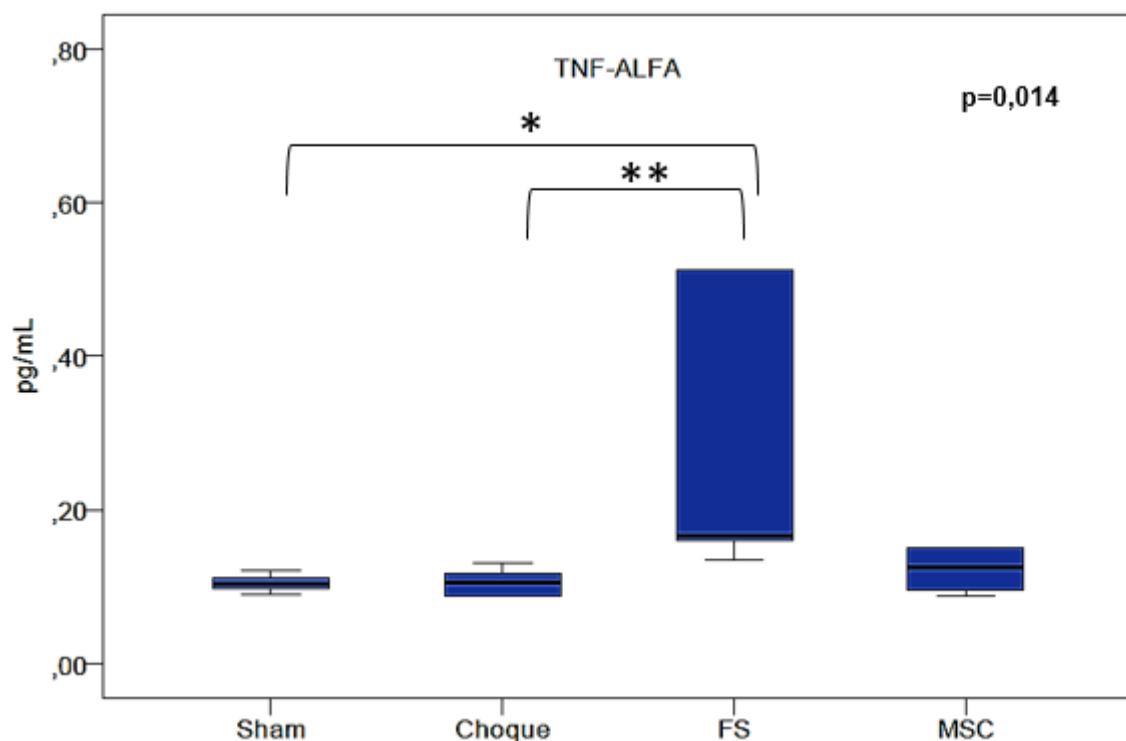
As dosagens das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6, IL1- β , IL-10 no tecido pulmonar não apresentaram significância estatística em nenhuma das comparações. Os valores de p encontrados foram respectivamente 0,21; 0,21; 0,58 e 0,08.

5.4 Lavado bronco-alveolar – ELISA

5.4.1 Dosagem de TNF- α

Houve diferença estatística entre os grupos com $p=0,014$ relacionada à dosagem da interleucina no lavado bronco-alveolar. O grupo FS apresentou maiores níveis de TNF- α quando comparado com os demais grupos. O grupo com os menores níveis apresentados foi o grupo Sham. (Gráfico 5)

Gráfico 5 - Comparação das dosagens de TNF- α entre os grupos no lavado bronco-alveolar realizadas através da técnica ELISA. A maior dosagem foi identificada no grupo FS, com diferença estatística entre os grupos ($p=0,014$). Nas comparações múltiplas a diferença estatística significativa foi encontrada em Sham vs FS ($*p=0,03$) e Choque vs FS ($** p=0,02$).



Nas comparações múltiplas encontramos diferença estatística significante entre Sham vs FS ($p=0,03$) e Choque e FS ($p=0,02$), com o grupo FS apresentando maior dosagem em ambas as comparações. (Tabela 3)

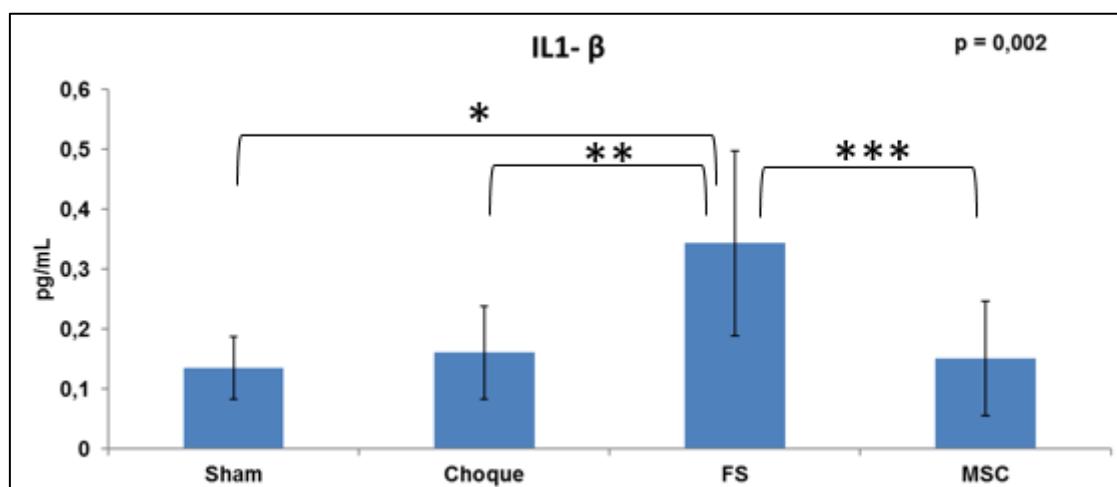
Tabela 3- Comparações múltiplas relacionadas à dosagem de TNF- α no lavado bronco-alveolar.

Grupos	p
Sham x Choque	1,00
Sham x FS	0,03
Sham x MSC	1,00
FS x MSC	0,44
Choque x FS	0,02
Choque x MSC	1,00

5.4.2 Dosagem de IL-1 β

Em relação a quantificação dos níveis de IL-1 β no lavado bronco-alveolar dos grupos houve diferença estatisticamente significante ($p=0,009$). O grupo FS apresentou a maior dosagem da interleucina quando comparado aos demais grupos, com valor de 0,34 pg/mL. (Gráfico 6)

Gráfico 6- Comparação da dosagem de IL-1 β entre os grupos no lavado bronco-alveolar realizada através da técnica ELISA. Houve diferença estatística entre os grupos, com o grupo FS apresentando a maior dosagem ($p=0,009$). Nas comparações múltiplas houve diferença estatisticamente significante entre Sham vs FS ($*p=0,015$), Choque vs FS ($**p=0,03$), FS vs MSC ($***p=0,027$).



Quando comparados de forma isolada, os grupos Sham e Choque não apresentaram diferença ($p>0,05$). O grupos FS e MSC apresentaram diferença estatística ($p=0,027$) com valores de IL-1 β de 0,34 e 0,15 pg/mL respectivamente. Entre os grupos Choque e MSC não houve diferença ($p>0,05$). Porém, entre Choque e FS houve diferença estatística ($p=0,03$) com valores respectivos de IL-1 β de 0,16 e 0,34 pg/mL, indicando um maior nível de inflamação para o grupo tratado com fatores solúveis das MSC. (Tabela 4)

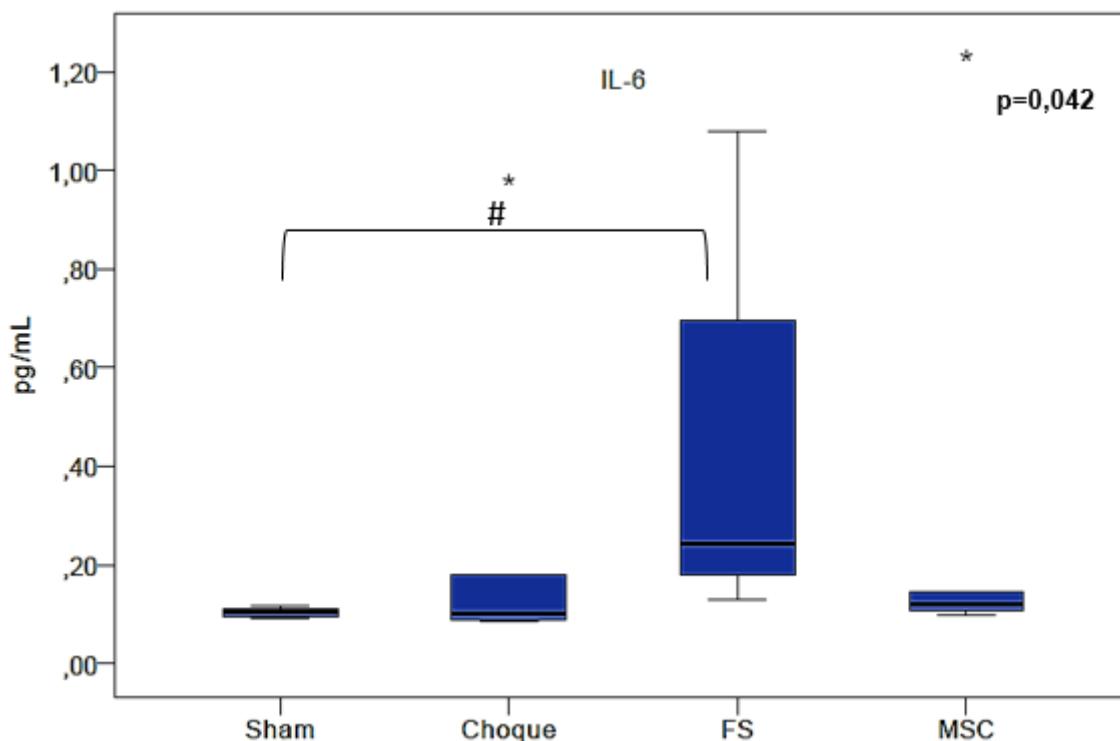
Tabela 4- Comparações múltiplas relacionadas à dosagem de IL-1 β no lavado bronco-alveolar.

Grupos	p
Sham x Choque	> 0,05
Sham x FS	0,015
Sham x MSC	> 0,05
FS x MSC	0,027
Choque x FS	0,03
Choque x MSC	>0,05

5.4.3 Dosagem de IL-6

A dosagem da citocina IL-6 no lavado bronco-alveolar apresentou diferença estatística entre os grupos com $p=0,042$, tendo o grupo FS apresentando a maior dosagem.(Gráfico 7)

Gráfico 7- Comparação das dosagens de IL-6 entre os grupos no lavado bronco-alveolar realizados através da técnica ELISA. Houve diferença estatística entre os grupos, com o grupo FS apresentando a maior dosagem. ($p=0,042$). As comparações múltiplas indicaram diferença em Sham vs FS (# $p=0,04$)



Nas comparações múltiplas foi encontrada diferença em Sham vs FS, com $p=0,04$. (Tabela 5)

Tabela 5- Comparações múltiplas relacionadas à dosagem de IL-6 no lavado bronco-alveolar.

Grupos	p
Sham x Choque	1,00
Sham x FS	0,04
Sham x MSC	0,92
FS x MSC	1,00
Choque x FS	0,15
Choque x MSC	1,00

5.4.4 Dosagem de IL-10

A dosagem da citocina IL-10 no lavado bronco-alveolar apresentou diferença estatisticamente significante entre os grupos com $p=0,044$. O Teste Dunn de comparações múltiplas não teve força suficiente para identificar quais comparações apresentaram diferença. (Gráfico 8) (Tabela 6)

Gráfico 8- Dosagem de IL-10 no lavado bronco-alveolar colhido dos grupos, através da técnica ELISA. A análise entre os grupos indicou maior dosagem no grupo FS, com diferença estatisticamente significante ($p=0,044$).

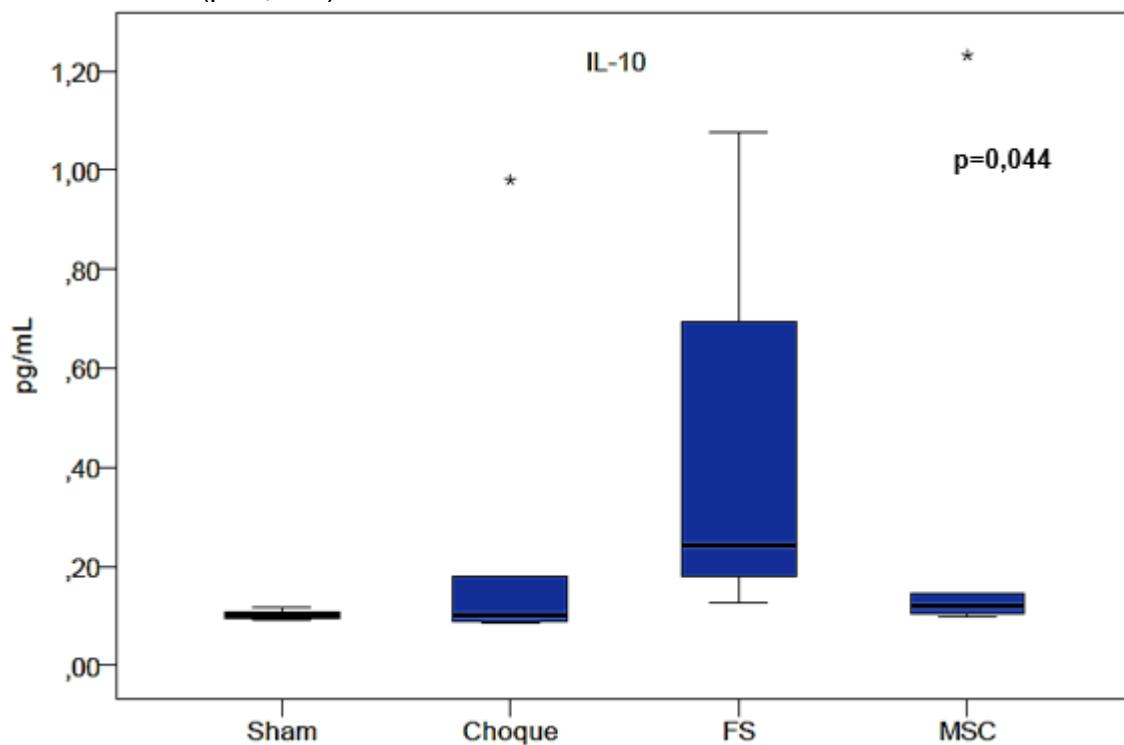


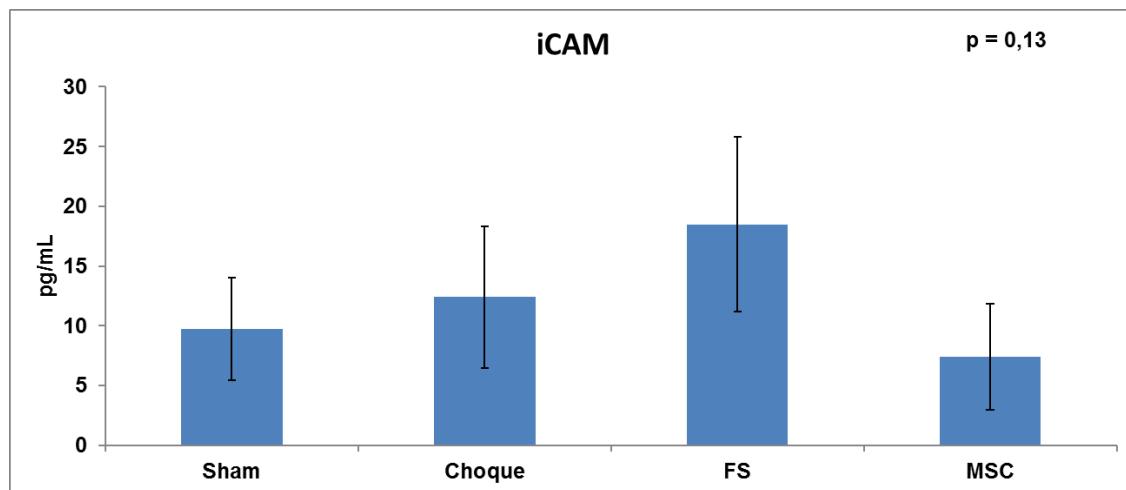
Tabela 6- Comparações múltiplas relacionadas à dosagem de IL-10 no lavado bronco-alveolar.

Grupos	p
Sham x Choque	1,00
Sham x FS	0,18
Sham x MSC	0,15
FS x MSC	1,00
Choque x FS	0,49
Choque x MSC	0,43

5.4.5 Dosagem de iCAM

A dosagem de iCAM no lavado bronco-alveolar não apresentou significância estatística em nenhuma das comparações entre os grupos. O valor de p encontrado foi de 0,13. (Gráfico 9)

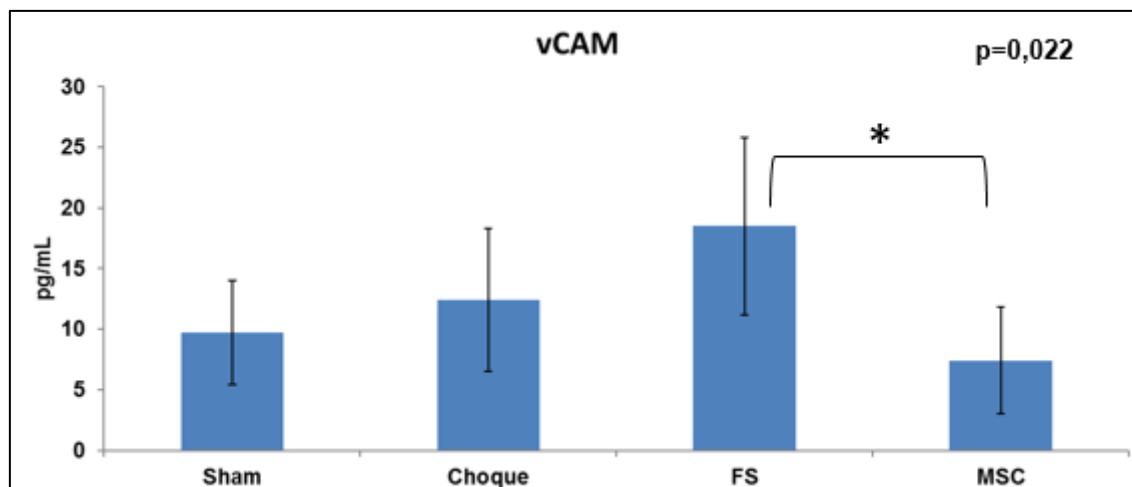
Gráfico 9- Dosagem de iCAM no lavado bronco-alveolar colhido dos grupos, através da técnica ELISA. A análise entre os grupos não apresentou diferença estatisticamente significante ($p=0,13$).



5.4.6 Dosagem de vCAM

A dosagem de vCAM no lavado bronco-alveolar apresentou significância estatística nas comparações entre os grupos com valor de $p=0,022$, com o grupo FS apresentando as maiores dosagens. (Gráfico 10)

Gráfico 10- Dosagem de vCAM no lavado bronco-alveolar colhido dos grupos, através da técnica ELISA. A análise entre os grupos indicou maior dosagem no grupo FS, com diferença estatisticamente significante ($p=0,022$). Nas comparações múltiplas foi encontrada diferença apenas entre os grupos FS e MSC ($*p=0,022$).



Quando realizadas as comparações múltiplas, encontramos significância estatística apenas entre os grupos FS e MSC ($p=0,022$), com valores encontrados para FS de 18,49 pg/mL e para MSC de 7,42 pg/mL. (Tabela 7)

Tabela 7- Comparações múltiplas entre grupos com relação à dosagem de vCAM no lavado bronco-alveolar.

Grupos	p
Sham x Choque	> 0,999
Sham x FS	0,09
Sham x MSC	> 0,999
FS x MSC	0,022
Choque x FS	0,5
Choque x MSC	0,804

6. Discussão

A grande motivação deste trabalho foi a necessidade de se encontrar novas terapêuticas que possam auxiliar na otimização do transplante pulmonar. O maior problema no desenvolvimento do transplante de pulmão reside no número insuficiente de pulmões disponíveis para os pacientes que necessitam desta terapêutica, e isto acarreta em um número crescente de pacientes em filas de espera.

A contínua busca por formas de aumentar a disponibilidade de pulmões nos fez chegar ao novo campo das terapias celulares. Uma vantagem deste modelo é que não há necessidade de se ampliar o número de doadores de órgãos, apenas melhorar as condições dos doadores disponíveis para tornar os não elegíveis para transplante pulmonar, em elegíveis. Dentro deste contexto, o tratamento com células-tronco se mostra bastante promissor. Ainda são poucos os estudos relacionados ao uso de células-tronco e transplante pulmonar. Portanto, há a necessidade de mais estudos para que possamos avaliar a real aplicabilidade deste tratamento em humanos.

O modelo de choque hemorrágico foi escolhido pois este tipo de choque é bastante frequente nos doadores de órgãos. Além disso, em nossa linha de pesquisa tal modelo já foi utilizado, com achados inflamatórios importantes no tecido pulmonar.⁽⁶⁸⁾

No presente estudo nosso modelo de choque se mostrou efetivo no que tange aos níveis pressóricos e geração de inflamação. O monitoramento da PAM indicou que os valores médios no início do protocolo experimental não apresentaram diferença entre os grupos. Após a indução do choque os grupos Choque, FS e MSC apresentaram queda importante da PAM com diferença estatisticamente significante quando comparadas ao grupo Sham.

A leucometria no sangue periférico do nosso estudo também corrobora com a eficácia do modelo de choque pois todos os grupos submetidos ao choque apresentaram aumento do número de leucócitos entre o momento inicial e final do protocolo experimental, com diferença estatística significante. E nas dosagens realizadas no momento final, o grupo Sham apresentou dosagem bastante inferior aos demais grupos, também com diferença estatisticamente significativa.

Os modelos experimentais de choque hemorrágico controlado consistem na retirada do volume sanguíneo durante determinado período de tempo, monitorando constantemente a pressão arterial média. Utilizamos em nosso estudo um modelo de choque hemorrágico controlado descrito previamente na literatura.^(44, 69) Gore et al.⁽⁷⁰⁾ realizaram um estudo com tratamento de ratos submetidos ao choque hemorrágico utilizando células tronco mesenquimais e utilizaram um protocolo de choque hemorrágico semelhante.

Em nosso estudo optamos pela infusão de 25% do sangue retirado após a indução e manutenção do choque hemorrágico. Apesar de Vincenzi et al.⁽⁴⁴⁾ demonstrarem que a reposição de metade do volume retirado seria suficiente para manter os níveis de hemoglobina em 10g/dL, em um estudo piloto avaliando choque hemorrágico em ratos, optamos por menor volume com intenção de mimetizar ações deletérias de um possível doador em morte encefálica, no qual a hipotensão e atividade pró inflamatória ocorre de forma contínua, independente de medidas clínicas para controle. No estudo citado previamente neste texto, Gore et al.⁽⁷⁰⁾ realizaram a infusão de 100% do sangue retirado após o período de manutenção do choque.

Em nosso protocolo de estudo após a reposição sanguínea e intervenção nos grupos de tratamento, os ratos foram mantidos vivos e em monitorização por um período de 115 minutos, sendo submetidos à extração do bloco cardio-pulmonar e sacrificados a seguir. Tal período foi definido com o intuito de simular um paciente doador de múltiplos órgãos, que após a notificação da morte encefálica, apresenta apenas algumas horas até que seja submetido ao processo de captação dos órgãos. Além disso De Oliveira et al.⁽⁷¹⁾ relatam em seu artigo de revisão, que a meia vida das citocinas inflamatórias analisadas em nosso estudo, variam de 6 minutos a 4 horas. Pati S et al.⁽⁵⁷⁾ em um estudo com modelo de choque hemorrágico em ratos, também definiram coleta de amostra para avaliar citocinas inflamatórias em duas horas. Segundo os autores, através de estudos prévios os mesmos puderam identificar que as maiores mudanças nas citocinas inflamatórias ocorreram entre uma a quatro horas após o choque.⁽⁷²⁾

Os nossos animais foram tratados com a infusão venosa de MSC humana. Este tipo celular foi definido após levantamento da literatura.^(65, 66) Diversos trabalhos também fizeram uso dessa fonte para tratamento dos animais.^(54, 57, 73) Durante e elaboração do projeto de pesquisa questionamos se não deveríamos inserir marcadores radioativos nas células mesenquimais humanas, para definir sua localização após a infusão. Porém após discussão com o grupo do Genoma Humano, foi definido pela não marcação das células mesenquimais migrar para o pulmão após infusão venosa.⁽¹⁸⁾ Outros grupos fizeram uso de MSC de origem murina, com a justificativa de utilizarem células da própria espécie estudada, e portanto com menor potencial imunogênico.^(18, 23)

Segundo Hayes et al.⁽²⁰⁾ estudos recentes sugeriram que as MSCs humanas podem gerar uma resposta de células T em camundongos. Relacionado a este tema Nauta et al.^(64, 74) identificaram que, em determinadas situações, as MSCs podem funcionar como células apresentadoras de抗ígenos e ativar o sistema imune.

A concentração de MSC aplicada em nosso estudo foi de 1×10^7 células, em dose única. Tal dosagem foi definida por estudos prévios obtidos na literatura.⁽⁶⁶⁾ Watanabe et al.⁽⁷³⁾ em seu estudo para tratamento de lesão por isquemia e reperfusão em ratos em modelo de transplante pulmonar, utilizaram a concentração de 5×10^6 células. Outros autores também utilizaram esta mesma concentração de células.^(14, 23)

A densidade de neutrófilos apresentou diferença estatisticamente significante entre os grupos. O grupo MSC apresentou o maior valor com 180,77 cel/cm², valor bastante semelhante ao do grupo choque. Porém o grupo FS apresentou o menor valor. A aparente não resposta ao tratamento com MSC pode ser explicada pelo período de observação dos animais ter sido provavelmente curto para que as células mesenquimais pudessem se instalar no pulmão e liberar os fatores solúveis para a ação anti-inflamatória ocorrer. Como já dito anteriormente, não se tem o pleno conhecimento dos mecanismos de ação das MSCs e sua atuação imunomodulatória. Pati S et al.⁽⁵⁷⁾ utilizaram um modelo de choque hemorrágico semelhante ao de nosso estudo e trataram os animais com ringer lactato associado a MSC. No entanto, o período pós tratamento foi bem superior ao do presente estudo, sendo que os animais foram avaliados 96 horas pós tratamento. Os autores observaram que o tratamento

com MSC reduziu a expressão de CD8+, que é um marcador específico para neutrófilos.

Além disso, Sudres M et al.⁽⁷⁵⁾ identificaram que para o tratamento de doença do enxerto em camundongos, uma única dose de MSCs não afeta a incidência e a severidade da doença. Foi hipotetizado pelos autores que repetidas infusões seriam necessárias para se manter uma concentração suficiente para se ter o efeito desejado.

Com relação à dosagem dos níveis de citocinas TNF- α , IL-6 e IL1- β no lavado bronco-alveolar, nossos resultados mostraram que o grupo FS apresentou as maiores concentrações dessas citocinas quando comparadas aos demais grupos. Esse resultado nos surpreendeu, pois contradiz a contagem neutrofílica, na qual observamos redução desta célula inflamatória no tecido pulmonar justamente no grupo FS. Watanabe et al.⁽⁷³⁾ em seu estudo de tratamento de lesão por isquemia e reperfusão, após isquemia fria prolongada, com MSC, também dosou citocinas inflamatórias no lavado bronco-alveolar e não conseguiu encontrar valores detectáveis das mesmas.

A dosagem de IL-10 em nosso estudo mostrou o grupo FS com o maior valor quando comparado aos demais grupos. O aumento desta citocina anti-inflamatória indica que os FS-MSC são eficazes na estimulação para liberação da mesma, dado compatível com a menor densidade de neutrófilos identificada nas lâminas de HE deste grupo. Pati S et al.⁽⁵⁷⁾ observaram maiores níveis de IL-10 no grupo tratado com MSC quando comparado aos demais grupos submetidos ao choque hemorrágico em seu estudo, com diferença estatística. Porém a dosagem dessa citocina foi realizada em amostra de sangue periférico. Huang ZW et al.⁽⁵⁴⁾ também encontraram aumento dos níveis de IL-10 na

dosagem sistêmica desta interleucina, porém não identificaram significância estatística.

As dosagens de citocinas inflamatórias no tecido pulmonar de nosso estudo não apresentaram diferença estatisticamente significante. Assim como nosso resultado Pati S et al.⁽⁵⁷⁾ também não encontraram resultados significativos com esse tipo de análise.

Com base em nossos resultados podemos inferir através do valor da densidade de neutrófilos encontradas nas lâminas de HE que os FS-MSC são capazes de reduzir os níveis de inflamação local dos pulmões de ratos com choque hemorrágico. Isso ocorreu através da diminuição da infiltração de neutrófilos para o tecido pulmonar. Mais trabalhos são necessários para se entender a ação, cinética e a dinâmica das MSCs, para que possamos ter mais informações sobre a melhor forma de utilizá-las. O tempo de exposição à essas células pode ser um fator determinante deste resultado.

Ficamos animados com a metodologia utilizada em nosso estudo. Outrossim, acreditamos que a terapia celular com MSC e FS-MSC é um campo promissor no transplante pulmonar, podendo contribuir para melhora dos resultados e redução dos índices de rejeição pós transplante.

6.1 Limitações

Como limitações do nosso estudo podemos indicar a escassez da literatura relacionada ao uso de MSCs em transplante pulmonar, que dificultou a elaboração do protocolo experimental. Além disso, a ausência de conhecimento aprofundado sobre às dosagens ideais, inexistência de protocolos previamente

estabelecidos e padronização de isolamento e cultura das células foram outros fatores que poderiam influenciar diretamente nos resultados.

O tempo de observação dos animais após a infusão das MSCs e FS-MSC também nos gerou dúvidas pelos resultados observados no grupo MSC, que caso os animais permanecessem em monitoramento por maior período, poderiam apresentar alterações relacionadas a redução de inflamação. Acreditamos que talvez não houve tempo hábil para estimulação e liberação dos fatores solúveis por estas células.

O lavado bronco-alveolar como método para mensuração das citocinas inflamatórias também pode ser contestado. Apesar da técnica já ser bem estabelecida, a obtenção das amostras não é homogênea. Os volumes aspirados foram variados e as concentrações de citocinas poderiam ser diferentes entre as amostras, se tornando um fator de confusão.

7. Conclusões

A infusão venosa *in vivo* de MSCs em ratos submetidos ao choque hemorrágico não foi capaz de promover alterações significativas na contagem de neutrófilos locais na análise histológica, e nas concentrações de citocinas inflamatórias no lavado bronco-alveolar. A infusão venosa de FS-MSC promoveu redução significativa do número de neutrófilos locais na análise histológica, e aumento da concentração de interleucinas no lavado bronco-alveolar.

No protocolo de estudo adotado os FS-MSC apresentaram maior eficácia anti-inflamatória quando comparados às MSCs, pois apresentaram redução significativa do infiltrado neutrofílico pulmonar.

8. Anexos

Tabela 8- Tabela com média e desvio padrão da pressão arterial média em mmHg dos animais.

Pressão Arterial Média (mmHg)				
Grupo / Tempo (min)	Sham	Choque	FS	MSC
Basal	97,25 ± 8,29	90,25 ± 13,37	90,27 ± 11,43	94,58 ± 8,67
10	92,83 ± 10,14	48,41 ± 23,66	43,72 ± 1,84	40,16 ± 2,65
20	91,83 ± 12,94	40,16 ± 2,79	43,72 ± 2,28	39,00 ± 3,56
30	92,33 ± 14,16	39,16 ± 3,37	43,36 ± 3,27	41,50 ± 4,07
40	96,33 ± 16,78	39,50 ± 3,32	43,81 ± 2,48	41,66 ± 4,16
50	96,14 ± 19,21	40,25 ± 1,91	43,18 ± 2,13	36,83 ± 4,15
60	101,9 ± 16,90	43,66 ± 4,24	52,54 ± 15,03	44,16 ± 12,00
70	95,91 ± 18,10	71,58 ± 13,91	74,81 ± 6,67	105,6 ± 3,40
80	95,75 ± 18,01	77,33 ± 12,01	71,54 ± 8,11	77,08 ± 16,12
90	96,91 ± 18,60	80,33 ± 11,88	67,90 ± 10,16	77,41 ± 17,77
100	92,91 ± 21,14	76,00 ± 13,63	70,90 ± 11,15	76,16 ± 17,89
110	100,5 ± 16,58	72,41 ± 12,81	73,09 ± 13,56	75,25 ± 15,33
120	98,58 ± 15,74	70,66 ± 11,99	74,81 ± 16,44	76,58 ± 16,40
130	100,1 ± 20,18	71,50 ± 8,52	72,81 ± 20,16	77,66 ± 15,23
140	101,4 ± 19,24	71,00 ± 8,96	70,63 ± 23,08	74,91 ± 16,05
150	100,6 ± 19,50	71,50 ± 8,72	73,00 ± 21,65	73,33 ± 16,96
160	100,0 ± 18,58	70,25 ± 12,42	68,36 ± 18,91	73,66 ± 16,19
170	97,33 ± 18,90	70,91 ± 9,54	65,27 ± 21,07	73,08 ± 12,92
180	95,75 ± 16,49	70,41 ± 11,53	61,63 ± 18,21	73,25 ± 14,97
190	96,41 ± 16,68	69,33 ± 12,22	62,18 ± 18,01	73,16 ± 16,96

Tabela 9- Tabela com média e desvio padrão da leucometria em sangue periférico no momento inicial do protocolo experimental.

Leucometria inicial (células/mm³)

Grupos	Média	DP ±
Sham	13275	3110,35
Choque	14796	2682,72
FS	16044	2942,23
MSC	14054	4347,69

Tabela 10- Tabela com média e desvio padrão da leucometria em sangue periférico no momento final do protocolo experimental.

Leucometria final (células/mm³)

Grupos	Média	DP ±
Sham	13788	4077,21
Choque	23071	6296,11
FS	25769	11813,54
MSC	23783	7467,81

Tabela 11- Tabela com média e desvio padrão da quantificação de infiltrado neutrofílico nas lâminas de HE nos grupos de estudo.

Infiltrado Neutrofílico (Neutrófilos/cm²)

Grupos	Média	DP ±
Sham	60,11	27,08
Choque	172,52	47,65
FS	40,38	16,80
MSC	180,77	40,89

Tabela 12- Tabela com mediana e intervalo interquartil IQ (25-75%) referente à dosagem de TNF- α no lavado bronco-alveolar dos diferentes grupos.

TNF- α (pg/mL)

Grupos	Mediana	IQ (25 -75%)
Sham	0,1035	0,09-0,11
Choque	0,1050	0,08-0,11
FS	0,1670	0,16-0,51
MSC	0,1260	0,09-0,15

Tabela 13- Tabela com média e desvio padrão referente à dosagem de IL1- β no lavado bronco-alveolar dos diferentes grupos.

IL1- β (pg/mL)

Grupos	Média	DP \pm
Sham	0,13	0,05
Choque	0,16	0,07
FS	0,34	0,15
MSC	0,15	0,09

Tabela 14- Tabela com mediana e intervalo interquartil IQ (25-75%) referente à dosagem de IL-6 no lavado bronco-alveolar dos diferentes grupos.

IL-6 (pg/mL)

Grupos	Mediana	IQ (25 -75%)
Sham	0,1030	0,09-0,10
Choque	0,1025	0,08-0,18
FS	0,2420	0,18-0,69
MSC	0,1210	0,10-0,14

Tabela 15- Tabela com mediana e intervalo interquartil IQ (25-75%) referente à dosagem de IL-10 no lavado bronco-alveolar dos diferentes grupos.

IL-10 (pg/mL)

Grupos	Mediana	IQ (25 -75%)
Sham	0,1460	0,14-0,15
Choque	0,1500	0,14-0,15
FS	0,1550	0,15-0,22
MSC	0,1645	0,15-0,19

Tabela 16- Tabela com média e desvio padrão referente à dosagem de iCAM no lavado bronco-alveolar dos diferentes grupos.

iCAM (pg/mL)

Grupos	Média	DP ±
Sham	37,56	5,81
Choque	26,54	11,65
FS	32,69	7,50
MSC	38,96	9,73

Tabela 17- Tabela com média e desvio padrão referente à dosagem de vCAM no lavado bronco-alveolar dos diferentes grupos.

vCAM (pg/mL)

Grupos	Média	DP ±
Sham	9,71	4,27
Choque	12,43	5,90
FS	18,49	7,30
MSC	7,42	4,42

9. Referências Bibliográficas

1. Yeung JC, Cypel M, Waddell TK, van Raemdonck D, Keshavjee S. Update on donor assessment, resuscitation, and acceptance criteria, including novel techniques--non-heart-beating donor lung retrieval and ex vivo donor lung perfusion. *Thorac Surg Clin.* 2009;19(2):261-74.
2. Yusen RD, Edwards LB, Dipchand AI, Goldfarb SB, Kucheryavaya AY, Levvey BJ, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-third Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report-2016; Focus Theme: Primary Diagnostic Indications for Transplant. *J Heart Lung Transplant.* 2016;35(10):1170-84.
3. Afonso Júnior JE, Werebe EeC, Carraro RM, Teixeira RH, Fernandes LM, Abdalla LG, et al. Lung transplantation. *Einstein (Sao Paulo).* 2015;13(2):297-304.
4. Chambers DC, Cherikh WS, Goldfarb SB, Hayes D, Kucheryavaya AY, Toll AE, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fifth adult lung and heart-lung transplant report-2018; Focus theme: Multiorgan Transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2018;37(10):1169-83.
5. Del Sorbo L, Parotto M, Slutsky AS. Increasing the number of lungs available for transplantation. *Minerva Anestesiol.* 2014;80(8):942-53.
6. Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th adult lung and heart-lung transplant report-2012. *J Heart Lung Transplant.* 2012;31(10):1073-86.
7. de Perrot M, Snell GI, Babcock WD, Meyers BF, Patterson G, Hodges TN, et al. Strategies to optimize the use of currently available lung donors. *J Heart Lung Transplant.* 2004;23(10):1127-34.
8. Skogeland U, de Monestrol I, Godskesen TE. Experiences of Individuals Awaiting Lung Transplantation. *Respir Care.* 2018;63(12):1535-40.
9. Mariani AW, Pêgo-Fernandes PM, Abdalla LG, Jatene FB. Ex vivo lung reconditioning: a new era for lung transplantation. *J Bras Pneumol.* 2012;38(6):776-85.
10. Costa da Silva F, Afonso JE, Pêgo-Fernandes PM, Caramori ML, Jatene FB. São Paulo lung transplantation waiting list: patient characteristics and predictors of death. *Transplant Proc.* 2009;41(3):927-31.
11. Fernandes PM, Samano MN, Junqueira JJ, Waisberg DR, Noleto GS, Jatene FB. [Lung donor profile in the State of São Paulo, Brazil, in 2006]. *J Bras Pneumol.* 2008;34(7):497-505.
12. Jarvinen L, Badri L, Wettlaufer S, Ohtsuka T, Standiford TJ, Toews GB, et al. Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator. *J Immunol.* 2008;181(6):4389-96.
13. Royer PJ, Olivera-Botello G, Koutsokera A, Aubert JD, Bernasconi E, Tissot A, et al. Chronic Lung Allograft Dysfunction: A Systematic Review of Mechanisms. *Transplantation.* 2016;100(9):1803-14.
14. McAuley DF, Curley GF, Hamid UI, Laffey JG, Abbott J, McKenna DH, et al. Clinical grade allogeneic human mesenchymal stem cells restore alveolar fluid clearance in human lungs rejected for transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;306(9):L809-15.

15. Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HI, Litzky L, Blumenthal NP, Kaiser LR, et al. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest*. 1998;114(1):51-60.
16. Goolaerts A, Pellan-Randrianarison N, Larghero J, Vanneaux V, Uzunhan Y, Gille T, et al. Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial permeability in an in vitro model of acute alveolar injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;306(11):L975-85.
17. Li J, Li D, Liu X, Tang S, Wei F. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce systemic inflammation and attenuate LPS-induced acute lung injury in rats. *J Inflamm (Lond)*. 2012;9(1):33.
18. 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.
19. Lee CY, Kang JY, Lim S, Ham O, Chang W, Jang DH. Hypoxic conditioned medium from mesenchymal stem cells promotes lymphangiogenesis by regulation of mitochondrial-related proteins. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:38.
20. Hayes M, Curley G, Ansari B, Laffey JG. Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome - hope or hype? *Crit Care*. 2012;16(2):205.
21. Ionescu L, Byrne RN, van Haaften T, Vadivel A, Alphonse RS, Rey-Parra GJ, et al. Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: in vivo evidence for stem cell paracrine action. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303(11):L967-77.
22. Akram KM, Patel N, Spiteri MA, Forsyth NR. Lung Regeneration: Endogenous and Exogenous Stem Cell Mediated Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1).
23. Chambers DC, Enever D, Lawrence S, Sturm MJ, Herrmann R, Yerkovich S, et al. Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Chronic Lung Allograft Dysfunction: Results of a First-in-Man Study. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(4):1152-7.
24. Elman JS, Murray RC, Murray RM, Wang F, Shen K, Gao S, et al. Pharmacokinetics of natural and engineered secreted factors delivered by mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 2014;9(2):e89882.
25. Linden PK. History of solid organ transplantation and organ donation. *Crit Care Clin*. 2009;25(1):165-84, ix.
26. Hardy JD. The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplant Proc*. 1999;31(1-2):25-9.
27. Yeung JC, Keshavjee S. Overview of clinical lung transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(1):a015628.
28. Jatene FB, Pêgo-Fernandes PM. Challenges in lung transplantation. *J Bras Pneumol*. 2008;34(5):249-50.
29. JJ C, MG R, ME O, DV G. Transplante isolado de pulmão: relato de caso realizado na América do Sul. 1990.
30. Registro Brasileiro de Transplantes. *Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2008- 2015)*. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos - ABTO; 2015.

31. Registro Brasileiro de Transplantes - Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2010-2017). RBT. São Paulo-SP: ABTO; 2017.
32. Pêgo-Fernandes PM, Samano MN, Fiorelli AI, Fernandes LM, Camargo SM, Xavier AM, et al. Recommendations for the use of extended criteria donors in lung transplantation. *Transplant Proc.* 2011;43(1):216-9.
33. Preissler G, Löhe F, Ebersberger U, Huff I, Bittmann I, Messmer K, et al. Recipient treatment with L-arginine attenuates donor lung injury associated with hemorrhagic shock. *Transplantation.* 2009;87(11):1602-8.
34. Snell GI, Westall GP. Selection and management of the lung donor. *Clin Chest Med.* 2011;32(2):223-32.
35. Diretrizes Básicas para Captação e Retirada de Múltiplos Órgão e Tecidos da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. São Paulo: Associação Brasileira de Transplante de Órgãos - ABTO; 2009.
36. Schiavon M, Falcoz PE, Santelmo N, Massard G. Does the use of extended criteria donors influence early and long-term results of lung transplantation? *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2012;14(2):183-7.
37. Camargo SM, Camargo JeJ, Schio SM, Sánchez LB, Felicetti JC, Moreira JaS, et al. Complications related to lobectomy in living lobar lung transplant donors. *J Bras Pneumol.* 2008;34(5):256-63.
38. Cypel M, Yeung JC, Keshavjee S. Novel approaches to expanding the lung donor pool: donation after cardiac death and ex vivo conditioning. *Clin Chest Med.* 2011;32(2):233-44.
39. Roch A, Blayac D, Ramiara P, Chetaille B, Marin V, Michelet P, et al. Comparison of lung injury after normal or small volume optimized resuscitation in a model of hemorrhagic shock. *Intensive Care Med.* 2007;33(9):1645-54.
40. Abraham E, Arcaroli J, Shenkar R. Activation of extracellular signal-regulated kinases, NF-kappa B, and cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding protein in lung neutrophils occurs by differing mechanisms after hemorrhage or endotoxemia. *J Immunol.* 2001;166(1):522-30.
41. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury.* 2005;36(6):691-709.
42. Fan J, Li Y, Levy RM, Fan JJ, Hackam DJ, Vodovotz Y, et al. Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase activation in neutrophils: role of HMGB1-TLR4 signaling. *J Immunol.* 2007;178(10):6573-80.
43. Eppinger MJ, Jones ML, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Pattern of injury and the role of neutrophils in reperfusion injury of rat lung. *J Surg Res.* 1995;58(6):713-8.
44. Vincenzi R, Cepeda LA, Pirani WM, Sannomyia P, Rocha-E-Silva M, Cruz RJ. Small volume resuscitation with 3% hypertonic saline solution decrease inflammatory response and attenuates end organ damage after controlled hemorrhagic shock. *Am J Surg.* 2009;198(3):407-14.
45. Abdeen AA, Weiss JB, Lee J, Kilian KA. Matrix composition and mechanics direct proangiogenic signaling from mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(19-20):2737-45.

46. Monsel A, Zhu YG, Gudapati V, Lim H, Lee JW. Mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for acute lung injury and other inflammatory lung diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2016;16(7):859-71.
47. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
48. Chen H, Min XH, Wang QY, Leung FW, Shi L, Zhou Y, et al. Pre-activation of mesenchymal stem cells with TNF- α , IL-1 β and nitric oxide enhances its paracrine effects on radiation-induced intestinal injury. *Sci Rep.* 2015;5:8718.
49. Faiella W, Atoui R. Immunotolerant Properties of Mesenchymal Stem Cells: Updated Review. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1859567.
50. Guo K, Ikehara S, Meng X. Mesenchymal stem cells for inducing tolerance in organ transplantation. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:8.
51. Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A, Howard JP, Matthay MA. Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors. *Stem Cells.* 2011;29(6):913-9.
52. Liu J, Han Z, He Z. Mesenchymal stem cell-conditioned media suppresses inflammation-associated overproliferation of pulmonary artery smooth muscle cells in a rat model of pulmonary hypertension. *Exp Ther Med.* 2016;11(2):467-75.
53. Lai TS, Wang ZH, Cai SX. Mesenchymal stem cell attenuates neutrophil-predominant inflammation and acute lung injury in an in vivo rat model of ventilator-induced lung injury. *Chin Med J (Engl).* 2015;128(3):361-7.
54. Huang ZW, Liu N, Li D, Zhang HY, Wang Y, Liu Y, et al. Angiopoietin-1 Modified Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Therapy for Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Rats. *Yonsei Med J.* 2017;58(1):206-16.
55. Boomsma RA, Geenen DL. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS One.* 2012;7(4):e35685.
56. Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol.* 2007;179(3):1855-63.
57. Pati S, Gerber MH, Menge TD, Wataha KA, Zhao Y, Baumgartner JA, et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells inhibit inflammation and preserve vascular endothelial integrity in the lungs after hemorrhagic shock. *PLoS One.* 2011;6(9):e25171.
58. Moodley Y, Thompson P. Reflection of stem cell therapy: an epilogue to the 'Stem cells and the lung' review series. *Respirology.* 2014;19(1):5-8.
59. Kursova LV, Konoplyannikov AG, Pasov VV, Ivanova IN, Poluektova MV, Konoplyannikova OA. Possibilities for the use of autologous mesenchymal stem cells in the therapy of radiation-induced lung injuries. *Bull Exp Biol Med.* 2009;147(4):542-6.
60. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of

- intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(24):2277-86.
61. Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, LeRoux-Williams M, Tashkin DP. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. *Chest.* 2013;143(6):1590-8.
62. Wittwer T, Rahaman P, Choi YH, Zeriouh M, Karavidic S, Neef K, et al. Mesenchymal stem cell pretreatment of non-heart-beating-donors in experimental lung transplantation. *J Cardiothorac Surg.* 2014;9:151.
63. El-Badrawy MK, Shalabi NM, Mohamed MA, Ragab A, Abdelwahab HW. Stem Cells and Lung Regeneration. *Int J Stem Cells.* 2016;9(1):31-5.
64. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007;110(10):3499-506.
65. Assoni AF, Coatti GC, Gomes JPA, Pelatti MV, Zatz M. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells. In: Ulrich H NP, editor. *Working with Stem Cells.* 1 ed. Switzerland: Springer International Publishing; 2016. p. 37-55.
66. Zucconi E, Vieira NM, Bueno CR, Secco M, Jazedje T, Costa Valadares M, et al. Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:715251.
67. Assoni A, Coatti G, Valadares MC, Beccari M, Gomes J, Pelatti M, et al. Different Donors Mesenchymal Stromal Cells Secretomes Reveal Heterogeneous Profile of Relevance for Therapeutic Use. *Stem Cells Dev.* 2017;26(3):206-14.
68. Nepomuceno NA, de Oliveira-Braga KA, Ruiz LM, Correia AT, Silva Pato EZ, da Silva LF, et al. Effect of hypertonic saline in the pretreatment of lung donors with hemorrhagic shock. *J Surg Res.* 2018;225:181-8.
69. Hirano ES, Mantovani M, Morandin RC, Fontelles MJP. Modelo experimental de choque hemorrágico. *Acta Cirúrgica Brasileira;* 2003. p. 465-9.
70. Gore AV, Bible LE, Livingston DH, Mohr AM, Sifri ZC. Mesenchymal stem cells enhance lung recovery after injury, shock, and chronic stress. *Surgery.* 2016;159(5):1430-5.
71. de Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, R S. Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia;* 2011. p. 260-5.
72. Pati S, Khakoo AY, Zhao J, Jimenez F, Gerber MH, Harting M, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit vascular permeability by modulating vascular endothelial cadherin/β-catenin signaling. *Stem Cells Dev.* 2011;20(1):89-101.
73. Watanabe T, Hoshikawa Y, Ishibashi N, Suzuki H, Notsuda H, Watanabe Y, et al. Mesenchymal stem cells attenuate ischemia-reperfusion injury after prolonged cold ischemia in a mouse model of lung transplantation: a preliminary study. *Surg Today.* 2017;47(4):425-31.
74. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood.* 2006;108(6):2114-20.
75. Sudres M, Norol F, Trenado A, Grégoire S, Charlotte F, Levacher B, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in

vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol.* 2006;176(12):7761-7.