

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE MEDICINA  
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**MINEIA ALESSANDRA SCARANELLO MALAQUIAS**

**O PAPEL DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS HUMANAS NA  
DIFERENCIAÇÃO MACROFÁGICA DE MODELO MURINO DE ASMA ALÉRGICA**

**CURITIBA**

**2018**

**MINEIA ALESSANDRA SCARANELLO MALAQUIAS**

**O PAPEL DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS HUMANAS NA  
DIFERENCIAÇÃO MACROFÁGICA DE MODELO MURINO DE ASMA ALÉRGICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Escola de Medicina, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia de Noronha

**CURITIBA  
JUNHO - 2018**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB – 9/1118

M237p  
2018

Malaquias, Mineia Alessandra Scaranello  
O papel das células mesenquimais estromais humanas na diferenciação  
macrofágica de modelo murinho de asma alérgica / Mineia Alessandra  
Scaranello Malaquias ; orientadora: Lúcia de Noronha. 2018.  
38 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,  
2018  
Inclui bibliografias

1. Asma. 2. Células mesenquimais estromais. 3. Macrófagos. 4. Estresse  
oxidativo. I. Noronha, Lúcia. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 22. ed. – 616.238



*Dedico este trabalho aos meus filhos,*

*Emily e Eros*

## **AGRADECIMENTOS**

Deixo aqui expresso o meu reconhecimento aos colaboradores deste trabalho, Ana Paula Martins, Letícia Akazaki Oyama, Lúcia de Noronha, Márcia Olandoski, Marina Louise Viola Azevedo, Patrícia de Carvalho Jericó e Seigo Nagashima. E ainda, o meu sincero agradecimento ao carinho e ao tempo por vocês disponibilizado na construção desta tese.

*“O princípio da Sabedoria  
é o mais sincero desejo da instrução;  
a preocupação pela instrução é o amor;  
o amor é a observância de suas leis;  
a observância das leis  
é garantia de incorruptibilidade,  
e a incorruptibilidade  
faz estar junto de Deus.  
Assim, o desejo da Sabedoria  
conduz ao Reino.”*

*(Sabedoria 6, 17-20).*

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A asma é uma doença caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, onde os macrófagos desempenham importante papel, participando na geração de espécies reativas de oxigênio, substâncias responsáveis pelo estresse oxidativo, principal causador da hiperresponsividade das vias aéreas. **OBJETIVO:** Avaliar a participação das células mesenquimais estromais humanas (hMSC) na expressão tecidual de citocinas, na modulação da diferenciação macrofágica e na manutenção do equilíbrio oxidativo, em modelo murino de asma alérgica. **MÉTODO:** No grupo ASTHMA os animais foram sensibilizados com ovalbumina e hidróxido de alumínio como adjuvante, sendo depois desafiados com solução contendo ovalbumina. No grupo CTRL os animais receberam somente solução salina. Vinte e quatro horas depois os animais de cada grupo receberam solução salina (SAL) ou hMSC como tratamento. Sete dias após, ocorreram as análises. Após comprovação fisiológica e histopatológica da asma no modelo experimental, tiras de parênquima pulmonar foram submetidas a estudo imuno-histoquímico com os seguintes marcadores: anti-nitrotirosina, anti-F4-80, anti-óxido nítrico sintase induzida (iNOS), anti-arginase 1 (ARG1), anti-esfingosina Kinase 1 (SPHK1), anti-TGF- $\beta$ , anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IL-13 e anti-IL-17. As lâminas imunocoradas foram fotografadas utilizando o Digitalizador Axion Scan.Z1, reforçada por análise de imagem pelo programa Image Pro Plus 4. **RESULTADOS:** A administração terapêutica de hMSC melhorou os parâmetros fisiológicos e histopatológicos de asma, além de reduzir os níveis de nitrotirosina no grupo ASTHMA-hMSC em comparação com os do grupo ASTHMA-SAL. Além disso, ocorreu uma diminuição da produção de mediadores inflamatórios (IL-4, IL-13, IL-17 e TNF- $\alpha$ ) e redução significativa de F4-80, de iNOS e de ARG1 no grupo ASTHMA-hMSC em comparação ao grupo ASTHMA-SAL. **CONCLUSÃO:** Em nosso modelo de asma alérgica, os efeitos benéficos do tratamento com hMSC estão associados com diminuição da produção de mediadores pró-inflamatórios, com a melhora dos parâmetros fisiológicos e morfológicos e com a participação na modulação de macrófagos alveolares para um fenótipo com menos remodelamento e menor estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** Asma, células mesenquimais, estresse oxidativo, macrófagos

## **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Asthma is a disease characterized by chronic inflammation of the airways, where macrophages play an important role, participating in the generation of reactive oxygen species, substances responsible for oxidative stress, the main cause of airway hyperresponsiveness. **OBJECTIVE:** To evaluate the participation of human stromal mesenchymal cells (hMSC) on cytokine tissue expression, modulation of macrophagic differentiation and maintenance of oxidative balance, in a murine model of allergic asthma. **METHODS:** In the ASTHMA group the animals were sensitized with ovalbumin and aluminum hydroxide as an adjuvant and then challenged with ovalbumin containing solution. In the CTRL group the animals received only saline solution. Twenty-four hours later the animals in each group received saline (SAL) or hMSC as treatment. After seven days, the analyses took place. Following the physiological and histopathological examination of asthma in the experimental model, pulmonary parenchymal strips were submitted to an immunohistochemical study with the following markers: anti-nitrotyrosine, anti-F4-80, anti-nitric oxide synthase (iNOS), anti-arginase 1 (ARG1), anti-sphingosine kinase 1 (SPHK1), anti-TGF- $\beta$ , anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IL-13 and anti-IL-17. The immunostained slides were photographed using the Axion Scan.Z1 Scanner, enhanced by image analysis by the Image Pro Plus 4 program. **RESULTS:** Therapeutic administration of hMSC improved the physiological and histopathological parameters of asthma, as well as reducing levels of nitrotyrosine in the ASTHMA-hMSC group compared to those in the ASTHMA-SAL group. In addition, there was a decrease in the production of inflammatory mediators (IL-4, IL-13, IL-17 and TNF- $\alpha$ ) and a significant reduction of F4-80, iNOS and ARG1 in the ASTHMA-hMSC group compared to the group ASTHMA-SAL. **CONCLUSION:** In our model of allergic asthma, the beneficial effects of hMSC treatment are associated with decreased proinflammatory mediator production, improved physiological and morphological parameters, and participation in alveolar macrophage modulation for a phenotype with less remodeling and lower oxidative stress.

**Keywords:** Asthma, mesenchymal cells, oxidative stress, macrophages

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação esquemática dos fatores desencadeadores do processo inflamatório agudo na asma (A) e dos sinais verificados durante a crise asmática (B).....	12
Figura 2	Representação esquemática das alterações estruturais ocasionadas pelo processo de remodelamento das vias aéreas.....	13

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC = Células apresentadoras de antígenos

ASTHMA= Grupo asmático

ASTHMA-hMSC = Grupo asmático tratado com células mesenquimais humanas

ASTHMA-SAL = Grupo asmático tratado com solução salina

CTRL = Grupo controle

CTRL-hMSC = Grupo controle tratado com células mesenquimais humanas

CTRL-SAL = Grupo controle tratado com salina

DMEM = Meio Eagle modificado por Dulbecco

GM-CSF = Fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos

HGF = Fator de crescimento de hepatócitos

HLA = Antígeno leucocitário humano

hMSC = Células mesenquimais estromais humanas

HSC = Células-tronco hematopoiéticas

IDO = Indoleamina 2,3 – dioxigenase pirrole

IL = Interleucina

IMDM = Meio Dulbecco modificado por Iscove

IFN- $\gamma$  = Interferon-gama

LPS = Lipopolissacarídeo

MHC = Complexo principal de histocompatibilidade

MSC = Células mesenquimais estromais

NK = Células exterminadoras naturais

NO = óxido nítrico

PGE2 = Prostaglandina E2

RNA = ácido ribonucleico

RNS = espécies reativas de nitrogênio

ROS = espécies reativas de oxigênio

SPHK1 = Esfingosina-quinase 1

TGF- $\beta$  = Fator transformador de crescimento- $\beta$

Th1 = Células T helper 1

TLR4 = Receptor do tipo toll 4

TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral- $\alpha$

Treg = Linfócitos T reguladores

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>ASMA .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2</b>	<b>REMODELAMENTO .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3</b>	<b>ESTRESSE OXIDATIVO E ASMA .....</b>	<b>14</b>
<b>1.4</b>	<b>MACRÓFAGOS .....</b>	<b>16</b>
<b>1.4.1</b>	<b>População M1 .....</b>	<b>17</b>
<b>1.4.2</b>	<b>População M2.....</b>	<b>17</b>
<i>1.4.2.1</i>	<i>M2a.....</i>	<i>18</i>
<i>1.4.2.2</i>	<i>M2b.....</i>	<i>19</i>
<i>1.4.2.3</i>	<i>M2c.....</i>	<i>20</i>
<b>1.5</b>	<b>CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS.....</b>	<b>21</b>
<b>1.6</b>	<b>JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>PREFÁCIO .....</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGOS .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>ARTIGO 1.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>ORIENTAÇÕES NO PERÍODO.....</b>	<b>28</b>
	<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>

# 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 ASMA

A asma é uma enfermidade heterogênea, geralmente caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas (GINA, 2017), onde várias células, tanto inflamatórias como estruturais, desempenham importante papel (BATEMAN *et al.*, 2008). A asma é uma doença multifatorial decorrente da interação de fatores genéticos e ambientais, envolvendo o desequilíbrio de agentes oxidativos e antioxidativos, que apresenta alta prevalência e recorrência, afetando 1 a 18% da população em diferentes países (GINA, 2017).

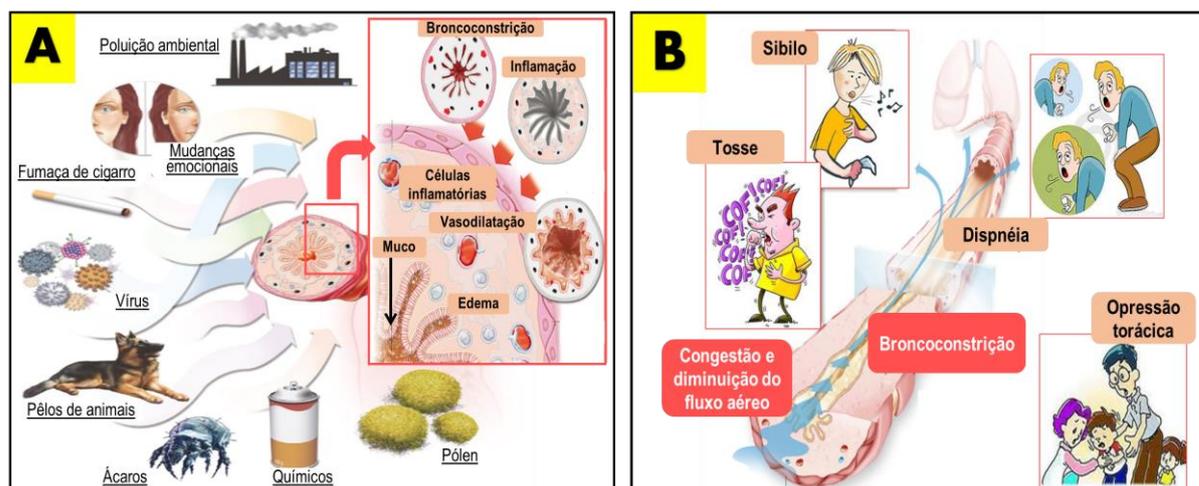
No Brasil, esta doença acarreta o óbito de aproximadamente oito pessoas ao dia, e é responsável por dois mil e quinhentos óbitos ao ano. Dados do Sistema Único de Saúde (SUS) revelam que a cada ano mais de 367 mil brasileiros dão entrada nos hospitais com diagnóstico de asma. Cerca de 12% de todas autorizações de internação hospitalar do SUS acontecem por diagnósticos de asma, pneumonia e DPOC, o que representa gastos superiores a R\$ 600 milhões de reais por ano (MALAQUIAS, 2013).

Desta forma, a asma representa um grave problema de saúde pública que acomete a população em diferentes faixas etárias, com uma estimativa de 300 milhões de indivíduos afetados em todo o mundo (BUSSE, 2000; HACKETT, 2012; GINA, 2016), sendo 5 a 10% desta estimativa, relacionada a pessoas que não respondem aos tratamentos convencionais existentes, tendo, desta forma, uma qualidade de vida reduzida (BUSSE *et al.*, 2000; AGBETILE; GREEN, 2011; LAMBRECHT, 2014). Sua prevalência vem aumentando, especialmente entre a faixa etária pediátrica (BATEMAN *et al.*, 2008) e parece estar associada ao estilo de vida contemporâneo (GARN; RENZ, 2007).

Os fatores de riscos mais comuns desencadeadores do processo inflamatório agudo incluem a exposição a alérgenos ou irritantes, alterações climáticas ou infecções respiratórias virais (Figura 1). Com isso as vias aéreas se tornam hiperresponsivas, obstruídas pela hipersecreção de muco e ocorre aumento da inflamação, resultando nos sintomas de sibilos, falta de ar, sensação de aperto torácico e tosse, que variam na intensidade e ao longo do tempo (GINA, 2017) (Figura

1). Entre as manifestações clínicas, a dispneia é o sintoma mais incapacitante. A tosse seca é bastante comum e é, na maioria das vezes, refratária a agentes antitussígenos.

A inflamação brônquica constitui o fator mais importante relacionado à patogenia da asma. Tal processo inflamatório resulta de complexas interações entre diversas células e mediadores inflamatórios. Dentre as células estruturais, os macrófagos apresentam caráter determinante na imunidade inata, envolvidos principalmente com a defesa e reparação tecidual, além do direcionamento da resposta inflamatória pelo organismo. Adicionalmente, esses macrófagos encontram-se em números aumentados nos pulmões, em casos de asma alérgica, e o montante observado tem sido associado à gravidade da doença (ROBBE, 2014).



**Figura 1.** Representação esquemática dos fatores desencadeadores do processo inflamatório agudo na asma (A) e dos sinais verificados durante a crise asmática (B).

## 1.2 REMODELAMENTO

A inflamação persistente que ocorre em pacientes asmáticos leva ao remodelamento das vias aéreas. O remodelamento consiste na mudança da composição e organização celular dos epitélios das vias aéreas, e esta alteração estrutural do pulmão pode se tornar irreversível, levando a perda progressiva da função pulmonar.

Os eosinófilos contribuem de maneira significativa para o remodelamento através da secreção de diversos mediadores profibróticos (TRIVEDI; LLOYD, 2007), além de interações com mastócitos e células epiteliais que promovem as alterações no parênquima. Adicionalmente, ocorre multiplicação de células musculares lisas do pulmão quando estas entram em contato com eosinófilos, por uma ação induzida por leucotrienos (SHIFREN *et al.*, 2012).

Dentre as diversas alterações estruturais de vias aéreas e de parênquima pulmonar observadas no processo de remodelamento, podemos citar: fibrose subepitelial, hipertrofia e hiperplasia de células musculares lisas, hipertrofia de glândulas mucosas, infiltração de células inflamatórias, metaplasia epitelial, angiogênese (HOLGATE *et al.*, 2004) (Figura 2) e principalmente, hiperplasia de miofibroblastos, os quais são efetores na fibrose subepitelial. Esse tipo celular apresenta fenótipo similar à fibroblastos e miócitos, expressam  $\alpha$ -actina, liberam mediadores inflamatórios e produzem matriz extracelular necessária no processo de remodelamento (SHIFREN *et al.*, 2012).

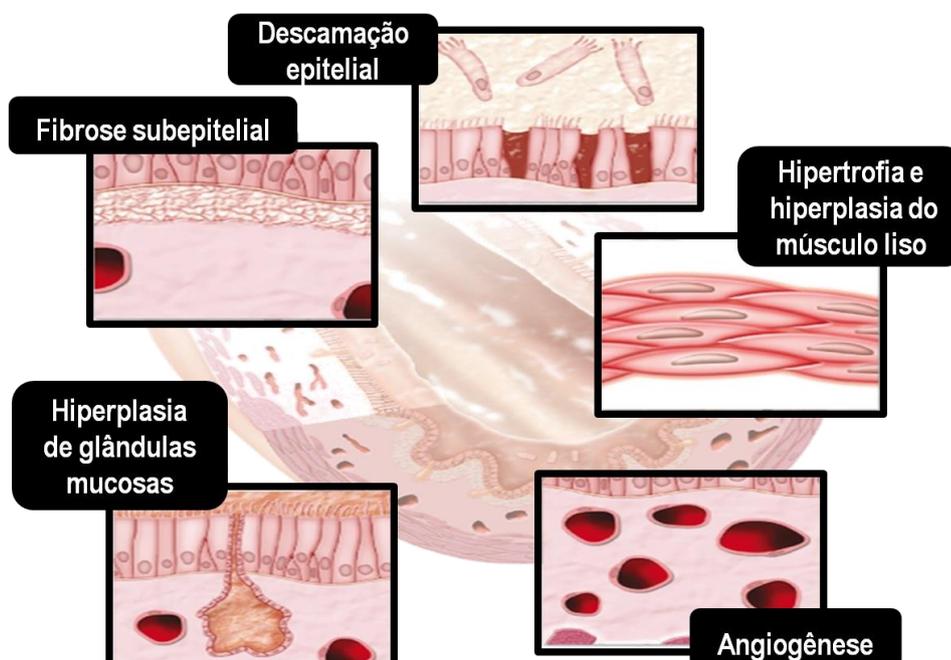


Figura 2. Representação esquemática das alterações estruturais ocasionadas pelo processo de remodelamento das vias aéreas.

O remodelamento pode ainda contribuir para a hiperresponsividade brônquica, diminuição do fluxo das vias aéreas ao longo do tempo e causar resistência à terapia medicamentosa com corticosteroides (HOLGATE, 2011, 2012). Alguns autores defendem a hipótese de que a inflamação alérgica por si só não desenvolve asma, mas que o remodelamento desempenha importante papel (HACKETT, 2012). Assim, focar na prevenção do remodelamento é um fator importante no controle da doença.

Apesar dos sinais de remodelamento serem mais óbvios em pacientes mais velhos ou com maior gravidade, sabe-se que o remodelamento ocorre já nos primeiros estágios da doença (SAETTA; TURATO, 2001; FIRINCI *et al.*, 2011; SHIFREN *et al.*, 2012). Em recente revisão sobre o papel do epitélio das vias aéreas na patogênese da asma, a autora aponta que o espessamento da membrana basal ocorre na lâmina reticular e isto acontece pela deposição de matriz extracelular, principalmente colágeno I, III e V; este estudo inclusive indicou que a fibrose subepitelial ocorre também na asma infantil e que é similar àquela vista em adultos, sugerindo ser uma descoberta precoce de remodelamento das vias respiratórias asmáticas (HACKETT, 2012).

### 1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E ASMA

Durante o funcionamento fisiológico normal do corpo humano ocorre a produção de espécies reativas, e para contrabalançar essa produção e seus potenciais efeitos negativos, o organismo dispõe de um sistema antioxidante. Nas situações em que ocorre desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, surge o estresse oxidativo (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

No entanto, quando as vias aéreas de pacientes asmáticos são expostas a este estresse oxidativo, desencadeado muitas vezes pelo contato com poluentes, infecções, respostas inflamatórias exacerbadas ou mesmo em situações nas quais os sistemas antioxidantes do organismo estão diminuídos, podem ocorrer diversas alterações. Dentre elas, cabe ressaltar a lesão de DNA, estímulo à degradação de lipídeos, proteínas e carboidratos, as quais podem alterar as funções celulares e potencializar as respostas inflamatórias.

Assim, há fortes evidências de que o estado mais oxidativo presente na asma seja favorecido pelo desequilíbrio acentuado entre os sistemas antioxidantes e oxidantes dos pacientes asmáticos.

Desta forma, a alta concentração de oxigênio no ambiente pulmonar torna-o susceptível a reações de estresse oxidativo, gerando como produto as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), as quais desempenham um papel importante na inflamação das vias respiratórias e são determinantes na gravidade da doença (SAHINER *et al.*, 2011).

As ROS são formadas por reações metabólicas, como por exemplo, pelo transporte de elétrons que ocorre nas mitocôndrias durante o processo de respiração celular (KIM; HONG, 2012), sendo produzidas tanto por células inflamatórias (eosinófilos, neutrófilos, monócitos e macrófagos) quanto por células residentes (epiteliais e do músculo liso) (BARNES, 1990; DWORSKI *et al.*, 2001).

Dentre as principais ROS e RNS destacam-se: ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, ácido perclórico, óxido nítrico (NO) e principalmente o peroxinitrito, uma molécula altamente citotóxica formada na combinação do superóxido ( $O_2^-$ ) e NO, produzida durante o processo inflamatório e imunológico em especial (HADDAD *et al.*, 1993; ISCHIROPOULOS *et al.*, 1995). Trata-se de um potente agente oxidante que parece ser o grande responsável pelos efeitos adversos da excessiva produção de NO, causando injúria tecidual, peroxidação de lipídeos e nitrosilação de resíduos de tirosina (HADDAD *et al.*, 1993; SALEH *et al.*, 1998; DUSSE *et al.*, 2003; VORAPHANI *et al.*, 2013; 2014). Além de induzir hiperresponsividade nas vias aéreas, inibir a produção do surfactante pulmonar, aumentar a permeabilidade vascular e provocar danos às células epiteliais pulmonares (GROVES, 1999; ZHANG *et al.* 2000). Assim, a maior parte dos efeitos de altas concentrações de NO é mediada pelo peroxinitrito.

Além disso, defesas antioxidantes são necessárias para conter os danos causados pelo excesso de ROS, mas alterações também são esperadas nos antioxidantes, quer devido ao esgotamento ou inativação, resultando em proteção insuficiente e levando a inflamação pulmonar e sistêmica nos asmáticos (NADEEM *et al.*, 2014).

Assim, na asma ocorre perda dos mecanismos de defesa antioxidantes presentes tanto no sangue quanto nos pulmões. Os principais responsáveis pela defesa antioxidante do organismo tanto à nível enzimático quanto não enzimático são:

glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), carotenoides e vitaminas A, D e E (COMHAIR; ERZURUM, 2010).

O aumento de ROS e RNS pode induzir a produção de citocinas e quimiocinas via aumento da transcrição do fator nuclear NF-KB em células epiteliais brônquicas (BIAGIOLI *et al.*, 1999). Além disso, este acréscimo de espécies reativas leva a modificações proteicas estruturais e funcionais que desencadeiam e mantêm o processo inflamatório. Essas modificações incluem redução na atividade de GPx, SOD e CAT. Conseqüentemente, ROS e RNS são produzidas em altas concentrações capazes de se sobreporem aos mecanismos antioxidantes do organismo, levando às alterações, como: a hiperresponsividade das vias aéreas, hipersecreção de muco, aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa das vias aéreas, lesão epitelial, secreção de neuropeptídios e prejuízo na capacidade de resposta dos receptores beta-adrenérgicos (NADEEM *et al.*, 2014).

#### 1.4 MACRÓFAGOS

Os macrófagos alveolares encontram-se entre as células mais abundantes do trato respiratório, sendo células da imunidade inata que desempenham papéis críticos na homeostase pulmonar, na coordenação da resposta imune adaptativa, na defesa do hospedeiro contra patógenos e na resolução da inflamação (ROBBE, 2014). De uma maneira geral, os macrófagos são componentes essenciais da imunidade inata, desempenhando um papel fundamental na inflamação e defesa do organismo (MANTOVANI, 2012).

Imediatamente após uma lesão, são gerados diversos estímulos pelas células da imunidade inata, que podem exercer efeitos sobre a fisiologia dos macrófagos, mesmo que transitório. Porém, quando os macrófagos respondem a estímulos produzidos por células antígeno-específicas, geralmente esses sinais dão origem a alterações de longo prazo nos macrófagos. Além disso, os macrófagos podem produzir uma impressionante variedade de substâncias capazes de influenciar na sua própria fisiologia (MOSSER, 2008). Enfim, todos esses estímulos serão reconhecidos através de receptores capazes de originar programas específicos de ativação durante as respostas imunes específicas dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, Th1 ou Th2.

Desta forma, o incidente da polarização de macrófagos envolve a interação de diferentes estímulos, genes e vias peculiares, com intensa regulação de receptores de membrana e de proteínas extracelulares (MARTINEZ, 2006) que direcionam o resultado para um caminho específico que levará à determinação do perfil de ativação.

#### **1.4.1 População M1**

A população de macrófagos M1 surge em resposta ao interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), que pode ser produzido durante uma resposta imune adaptativa por células T auxiliares 1 (Th1) ou T CD8<sup>+</sup>, ou durante uma resposta imune inata pelas células Natural Killer (NK) (MOSSER, 2008); ou ainda pode surgir pela combinação de sinais do IFN- $\gamma$  com produtos bacterianos, tal como lipopolissacarídeo (LPS) ou citocinas como TNF e fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (MARTINEZ, 2006).

O episódio conhecido como “ativação clássica”, resulta na população M1, os quais apresentam a capacidade de liberar altos níveis de mediadores pró-inflamatórios, tais como interleucina (IL) 1 $\beta$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-12 e IL-23, elevada produção de ROS e RNS, maior expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II e de moléculas co-estimuladoras, eficiente apresentação de antígenos e forte atividade microbicida ou tumoricida (BISWAS & MANTOVANI, 2010), sendo extremamente importantes na defesa do hospedeiro contra os agentes patogênicos intracelulares (ROBBE, 2014).

Esta população de macrófagos, através de sua expressão de citocinas e quimiocinas, conduz a polarização e o recrutamento de células NK e Th1, amplificando assim, as respostas do tipo 1 (MANTOVANI, 2004; BISWAS & MANTOVANI, 2010). Além disso, células M1 ativam iNOS para produzir NO a partir de L-arginina. E ainda, estão envolvidos no início e prolongamento da inflamação (MANTOVANI, 2012).

#### **1.4.2 População M2**

A via alternativa M2 pode ser ativada por IL-4 ou IL-13, complexos imunes, IL-10, glicocorticoides e vitamina D-3, levando a polarização M2, que conduz a diferentes fenótipos, envolvidos na contenção de parasitas e no ajuste das respostas

inflamatórias e da imunidade adaptativa tipo I, os macrófagos desta via eliminam detritos e promovem a angiogênese, a remodelação e o reparo tecidual, ainda, exercem atividades imunorregulatórias e pró-tumorais (MANTOVANI, 2004).

Desta forma, os macrófagos alternativamente ativados ou M2 representam um grupo heterogêneo de células, fenotípica e funcionalmente relacionadas, com um importante papel nas respostas imunes do tipo 2 e na fase de resolução da inflamação (BLANC & DAVIES, 2015). Dependendo do estímulo, os macrófagos M2 podem se diferenciar em três subpopulações a serem vistas a seguir: M2a, M2b e M2c (MANTOVANI, 2004; BENOIT *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2008; OHLSSON *et al.*, 2014)

#### 1.4.2.1 M2a

Os macrófagos M2a correspondem aos macrófagos M2 por excelência e foram os primeiros a serem caracterizados (GORDON, 2003; FILARDY, 2010). A ativação M2a é obtida pelo estímulo de macrófagos com IL-4 ou IL-13, citocinas produzidas por células Th2, mastócitos e basófilos. As respostas imunes do tipo Th2 são primariamente induzidas em resposta a desordens na superfície da mucosa, e elas são particularmente importantes no pulmão e no intestino (MARTINEZ & GORDON, 2014).

Curiosamente, um dos primeiros sinais da imunidade inata a ser liberado na lesão tecidual parece ser a IL-4, a qual por sua vez converte rapidamente os macrófagos residentes em uma população de células que estão programadas para promover a reparação do tecido, e por este motivo, alguns autores se referem aos macrófagos M2a como “macrófagos de cicatrização” (MOSSER, 2008; RÖSZER, 2015).

Respostas imunes adaptativas também podem levar à produção de IL-4, e pensa-se que esta é a via principal para o desenvolvimento e manutenção dessa população de macrófagos (MOSSER, 2008).

Os macrófagos M2a, são aqueles envolvidos nas respostas alérgicas (ZHU *et al.*, 2004; OHLSSON *et al.*, 2014), na resolução da inflamação e na recuperação do tecido, além de contribuírem para a produção de matriz extracelular (ALBINA *et al.*, 1990). São funcionais e fenotipicamente distintos das subpopulações M2b e M2c; sob condições inflamatórias, produzem elevadas concentrações de IL-10 e quantidades

mínimas de citocinas pró-inflamatórias, além de expressarem altos níveis de quimiocinas que coordenam o recrutamento de eosinófilos, basófilos e algumas células Th2 polarizadas (MANTOVANI *et al.*, 2004). Além disso, macrófagos M2a não são eficientes como células apresentadoras de antígenos (APC) e em muitos casos, inibem a proliferação de células T, pois expressam baixos níveis de MHC-II e moléculas co-estimulatórias (EDWARDS *et al.*, 2006). Diferentemente das células M1, as células M2a não expressam iNOS, mas sim altos níveis de arginase 1, enzima que converte a L-arginina em ureia e ornitina (MANTOVANI, 2004, MARTINEZ, 2008; ARIKAN-AYYILDIZ, 2013). Consequentemente, essas células falham em produzir NO e são significativamente comprometidas em sua capacidade microbicida; mas ao mesmo tempo elas sintetizam poliamina e prolina que estimulam o crescimento celular, a formação de colágeno e o reparo tecidual (HESSE *et al.*, 2001; MANTOVANI, 2004; MARTINEZ, 2008; LUCAS *et al.*, 2013).

#### 1.4.2.2 M2b

Da mesma forma que as populações de macrófagos descritas anteriormente, os macrófagos M2b, também chamados de reguladores (MOSSER, 2008), poderão surgir após sinais da resposta imune inata ou adaptativa.

Assim, a ativação M2b acontece através de estímulos com LPS ou IL-1 $\beta$ , pelo receptor do tipo toll 4 (TLR4) ou pelo receptor de IL-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ R), e, ainda, por complexos imunes reconhecidos por receptores da porção Fc da imunoglobulina G (MARTINEZ, 2008). Os macrófagos M2b exibem um fenótipo claramente distinto das demais células M2, este subtipo é caracterizado pela baixa expressão de IL-12 e produção de grandes quantidades de IL-10 em comparação às demais subpopulações (GERBER & MOSSER, 2001; EDWARDS *et al.*, 2006). Estas células apresentam ainda, a particularidade de somente elas expressarem a enzima esfingosina-quinase 1 (SPHK1) (MARTINEZ *et al.*, 2008), permitindo desta maneira que os macrófagos M2b possam ser identificados no tecido a se estudar.

Os macrófagos M2b também são capazes de secretar quantidades significantes de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e NO, e não oferecem atividade arginase e nem estão envolvidos no reparo tecidual, como as células M2a. Ao invés disso, apresentam atividade regulatória, expressam altos níveis de MHC-II e moléculas co-estimulatórias

(CD80 e CD86), sendo eficientes APC às células T (MOSSER, 2008). Essas células também promovem a diferenciação de Th2 e a produção de anticorpos.

Ainda, pela capacidade da IL-10 em inibir a produção e a atividade de várias citocinas pró-inflamatórias, os macrófagos reguladores se mostram potentes inibidores da inflamação (MOSSER, 2008).

#### 1.4.2.3 M2c

Os macrófagos adquirem fenótipos particulares, dependendo dos sinais de ativação e citocinas no ambiente ao qual estão expostos, assim, a categoria M2c surge na presença das citocinas anti-inflamatórias IL-10 ou fator transformador de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), e de hormônios como os glicocorticoides (MANTOVANI, 2004, MOSSER, 2008, BOORSMA, 2013). Os linfócitos T reguladores (Treg) constituem a principal fonte de tais citocinas (VALLEDOR & RICOTE, 2004), enquanto que os glicocorticoides são liberados no organismo em resposta às situações de estresse.

A IL-10 e o TGF- $\beta$  têm papel crítico em limitar a duração e intensidade das reações imunes e inflamatórias, através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-18 e reduzir a apresentação de antígenos por macrófagos, através da diminuição da expressão de moléculas de MHC-II e co-estimulatórias (EDWARDS, 2006; MARTINEZ, 2008). Por outro lado, o TGF- $\beta$  é uma citocina pleiotrópica que medeia uma grande quantidade de efeitos na diferenciação, ativação e proliferação celular. Logo, devido aos glicocorticoides, esta categoria se torna deficiente na função microbicida, pois a ação dos glicocorticoides nessas células, suprime fortemente a transcrição de genes pró-inflamatórios como o de iNOS (VALLEDOR & RICOTE, 2004).

Assim, os macrófagos M2c são caracterizados por uma baixa expressão de mediadores inflamatórios, tais como IL-12 ou TNF- $\alpha$ , fraca capacidade para a apresentação de antígenos e fagocitose, e elevada expressão de IL-10 e TGF- $\beta$  (VALLEDOR & RICOTE, 2004; MARTINEZ, 2008). Essas células também são capazes de inibir a proliferação de células T, além de promover o desenvolvimento de células Treg (FRANCHIMONT, 2004). Além disso, os M2c são considerados células desativadas (MARTINEZ, 2008; GENSEL & ZHANG, 2015; RÖSZER, 2015) e possuem menor expressão de citocinas pró-inflamatórias, grande atividade *scavenger*

e carregam um programa funcional de pró-reparo (MARTINEZ, 2008). Desta forma, o fenótipo M2c, além de apresentar funções imunossupressoras, ainda participa da imunorregulação, atua na deposição de matriz e na remodelação de tecido.

## 1.5 CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS

As células mesenquimais estromais (MSC) são células multipotentes com capacidade de diferenciação a vários tipos celulares e são importantes na manutenção da integridade dos tecidos e órgãos (LAW; CHAUDHURI, 2013). As MSC auxiliam as células-tronco hematopoiéticas (HSC) fornecendo-lhes suporte estrutural e influenciando na modulação da quiescência, auto renovação, comprometimento das HSC com determinada linhagem celular, bem como na proliferação, maturação e apoptose dessas células maduras (DENNIS *et al.*, 2002). Esse tipo celular possui propriedades como a plasticidade celular, que é a capacidade de tais células de adotarem o fenótipo funcional de células específicas de um determinado tecido com o qual inicialmente não estariam comprometidas. Além disso, possuem a clonogenicidade, que é a habilidade de perceber a baixa densidade celular, ativando assim a capacidade de duplicação celular, multipotencialidade e capacidade de se auto renovar (ZAMPROGNO, 2007).

Sua alta capacidade regenerativa é baseada em sua baixa imunogenicidade e sua habilidade de evadir o reconhecimento feito pelo organismo. Para tanto, as MSC expressam baixos níveis de antígeno leucocitário humano (HLA) classe I e II, baixos níveis de moléculas co-estimulatórias (HACKETT *et al.*, 2010; MATHIAS, 2013) e baixa expressão do MHC classe I e II (ANVERSA *et al.*, 2012; SINCLAIR, 2013, MATHIAS, 2013), o que torna possível seu uso em transplantes alogênicos e xenogênicos.

Ademais, tais células podem suprimir a atividade citotóxica das células T CD8, bem como das células NK, além de mediar diferentes funções de células T *naive* e dendríticas (GAO *et al.*, 2016), podendo ainda, interferir na maturação das células B e na produção de anticorpos (WANG, 2016), atividades que contribuem para a modulação das respostas imune e inflamatória.

Vários estudos demonstram avanços significativos na compreensão da dinâmica imunomodulatória das MSC, incluindo interações com populações

leucocitárias específicas (UCCELLI A, 2008) bem como, a descoberta de fatores envolvidos na inibição da proliferação de células T, como o TGF- $\beta$  (NEMETH, 2010; SONG, 2014), a prostaglandina E2 (PGE2) (Németh K, 2009; WANG, 2016); o NO (SATO, 2007; WANG, 2014), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), indoleamina-2,3-dioxigenase pirrole (IDO), e a IL-10. (GAO, 2016). Além disso, as MSC podem direcionar o destino dos linfócitos T, polarizando células CD4 *naive* para um fenótipo de células Treg e ainda, deslocar o perfil de citocinas Th1 para Th2 (WANG, 2016; GAO *et al.*, 2016; BRAZA, 2016; BRUNEL, 2016).

Quanto às propriedades terapêuticas das MSC, fundamentalmente baseiam-se nos efeitos parácrinos pela secreção de fatores mediadores; embora novas teorias indiquem que as MSC podem promover o reparo tecidual através de modelos alternativos de reparação, os quais, aumentam a viabilidade e proliferação celular, além de reduzir a apoptose. Essas hipóteses incluem: 1) interação célula-célula (SATO, 2007, HAN, 2011; BRUNEL, 2016; GAO, 2016); 2) transferência de organelas e/ou moléculas por meio de nanotubos de tunelamento; 3) liberação de exossomos ou microvesículas contendo ácido ribonucleico - *ribonucleic acid* (RNA) e outras moléculas (SPEES, 2016).

## 1.6 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A despeito do crescente avanço na compreensão da fisiopatologia da asma nas últimas décadas, o papel de mediadores e citocinas envolvidos neste processo tem constantemente sido descritos. Estas descobertas vêm abrindo novas frentes de investigação de tratamentos que possam atuar nestes mediadores relacionados ao quadro asmático, como por exemplo, o desequilíbrio oxidativo e o direcionamento da diferenciação macrofágica.

Neste sentido, a terapia celular surge como uma possível terapia inovadora para a asma, com expectativas de melhora em diversos aspectos da doença. Logo, considerando-se os efeitos benéficos das MSC, tais células foram objeto de aplicação e estudo na presente pesquisa.

Por outro lado, desenvolver modelos animais que se aproximem mais das características exibidas na asma humana é desejável, bem como, protocolos mais práticos e rápidos e com características mais abrangentes, que possibilitem um

entendimento melhor dos mecanismos de doença e promovam assim, testes pré-clínicos mais eficazes. Além disso, as MSC, quando isoladas de diferentes tecidos, demonstram diferenças no potencial proliferativo, na capacidade de diferenciação e imunomodulação, e essas diferenças indicam a necessidade de modelos experimentais específicos. Sendo assim, o modelo de asma alérgica, proposto neste estudo, foi destinado a analisar as MSC derivadas da medula óssea humana.

O desenvolvimento desses modelos murinos de asma poderá, também, propiciar a identificação de diversos biomarcadores teciduais do processo inflamatório envolvido nesta doença. Biomarcadores como a nitrotirosina podem, ao serem identificados no tecido através de anticorpos monoclonais, revelar indiretamente a capacidade do peroxinitrito em produzir NO, ou seja, estaremos marcando o estresse oxidativo, principal responsável pela manutenção do processo inflamatório na asma.

Sabe-se também, que os macrófagos e as citocinas inflamatórias são peças-chaves na indução e manutenção da inflamação alérgica pulmonar. Desta forma, entender a participação destas citocinas e de diferentes populações de macrófagos dentro do quadro asmático, bem como compreender as possíveis alterações desencadeadas após o tratamento com MSC, é de fundamental importância para melhor compreender o mecanismo de ação deste tipo de tratamento.

Neste contexto, acredita-se que as MSC desempenham um papel considerável na redução do estresse oxidativo e na modulação da expressão de citocinas e diferenciação macrofágica em asmáticos. Sendo assim, a proposta da presente pesquisa foi procurar entender a participação das MSC no equilíbrio oxidativo e na modulação da expressão de citocinas e diferenciação macrofágica, identificando e quantificando no tecido pulmonar de modelo murino de asma alérgica, as alterações de estresse oxidativo, a expressão tecidual de citocinas e os diversos tipos de macrófagos envolvidos na fisiopatologia da asma, antes e após o tratamento com MSC humanas (hMSC). Tudo isto baseado na hipótese que hMSC teriam a capacidade de modular o estresse oxidativo e o processo inflamatório.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a modulação: do estresse oxidativo, da expressão de citocinas e da diferenciação macrofágica, em um modelo murino de asma alérgica tratado com MSC humanas (hMSC), através de biomarcadores teciduais, pela técnica de imuno-histoquímica em material parafinado.

#### **2.1.1 Objetivos específicos**

- 1) Confirmar, através de parâmetros fisiológicos e anatomopatológicos, a presença de asma no modelo murino de asma alérgica;
- 2) Validação, através de parâmetros fisiológicos e anatomopatológicos, da eficácia do tratamento com hMSC no modelo murino de asma alérgica;
- 3) Avaliar a presença de estresse oxidativo através da quantificação de Nitrotirosina no tecido pulmonar e, avaliar papel dos hMSC na restauração do equilíbrio oxidativo;
- 4) Avaliar a expressão das citocinas TNF $\alpha$ ; IL-4; IL-10; IL-13 e IL-17 no tecido pulmonar, em camundongos com asma e tratados com hMSC;
- 5) Avaliar a diferenciação macrofágica através da quantificação de F4-80; iNOS; Arginase; Esfingosina Kinase 1; TGF $\beta$ , no tecido pulmonar, em camundongos com asma e tratados com hMSC.

### 3      **PREFÁCIO**

Esta tese foi desenvolvida na forma de dois artigos científicos que serão complementares.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a participação das hMSC na restauração do equilíbrio oxidativo, na modulação da expressão de citocinas inflamatórias e na diferenciação macrofágica em um modelo de asma alérgica.

Para atingirmos este fim, primeiro foi desenvolvido junto com o Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, um modelo murino agudo de asma alérgica.

Depois do modelo estabelecido, procedemos a confirmação, por parâmetros fisiológicos e anatomopatológicos, da presença de asma nestes animais.

Assim que esta etapa foi concluída, iniciamos o tratamento dos animais asmáticos com hMSC.

Ao concluirmos esta última fase, continuamos a investigação, a fim de confirmar a melhora dos mesmos parâmetros fisiológicos e anatomopatológicos de asma, nos animais tratados com hMSC.

Somente depois de pronta esta investigação acima e, de confirmada a eficácia do tratamento com hMSC, no modelo experimental de asma, começamos a pesquisar a presença de alterações do equilíbrio oxidativo dos grupos asmáticos e sua respectiva melhora nos grupos tratados com células tronco.

Todos estes resultados preliminares estão relatados no artigo 1.

Uma vez comprovada a funcionalidade do modelo, a eficácia do tratamento e a melhora das alterações no equilíbrio oxidativo, passamos a investigar o papel das hMSC na modulação da expressão de citocinas e na diferenciação macrofágica, através da imunomarcagem tecidual pulmonar dos subtipos de macrófagos e produção de citocinas, em ambos os grupos, asmáticos e tratados.

Todos estes resultados referentes a avaliação das citocinas pró e anti-inflamatórias e da diferenciação macrofágica, suas vantagens e desvantagens estão expressas no artigo 2 desta tese.

## 4 ARTIGOS

## 4.1 ARTIGO 1



**Allergologia et immunopathologia**

Sociedad Española de Inmunología Clínica,  
Alergología y Asma Pediátrica

[www.elsevier.es/ai](http://www.elsevier.es/ai)



## ORIGINAL ARTICLE

## Effects of mesenchymal stromal cells play a role the oxidant/antioxidant balance in a murine model of asthma

M.A.S. Malaquias<sup>a,\*</sup>, L.A. Oyama<sup>a</sup>, P.C. Jericó<sup>a</sup>, I. Costa<sup>b</sup>, G. Padilha<sup>b</sup>, S. Nagashima<sup>a</sup>, M. Lopes-Pacheco<sup>b</sup>, C.L.K. Rebelatto<sup>c</sup>, P.V. Michelotto<sup>c</sup>, D.G. Xisto<sup>b</sup>, P.R.S. Brofman<sup>c</sup>, P.R.M. Rocco<sup>b</sup>, L. de Noronha<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pathology Experimental Laboratory, School of Medicine, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Pulmonary Investigation, Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup> Experimental Laboratory for Cell Culture, School of Medicine, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

Received 14 March 2017; accepted 21 June 2017

## 4.2 ARTIGO 2



**RESPIRATORY RESEARCH**

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW  
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Editorial Manager®

Role: Author Username: mi.mv@hotmail.com

Submissions Being Processed for Author Mineia Alessandra Scaranello Malaquias, Ph.D.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>	RERE-D-18-00325	ROLE OF TISSUE MACROPHAGE DIFFERENTIATION IN A MOUSE MODEL OF ALLERGIC ASTHMA AFTER THEPAPY WITH HUMAN MESENCHYMAL STROMAL CELLS	30 May 2018	05 Jun 2018	Reviewers Assigned

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

## 5 CONCLUSÃO

- 1) O método de indução de asma alérgica em modelo murino se mostrou adequado, sendo confirmado por provas de função pulmonar e características histopatológicas;
- 2) O tratamento com hMSC foi efetivo em melhorar as provas de função pulmonar e os parâmetros histopatológicos no modelo murino de asma alérgica;
- 3) A administração terapêutica de hMSC, no presente modelo de asma alérgica, reduziu os níveis de nitrotirosina no grupo ASTHMA-hMSC em comparação com o grupo ASTHMA-SAL;
- 4) As hMSC também foram eficazes em minimizar o processo inflamatório através da redução das citocinas pró-inflamatórias;
- 5) Os animais asmáticos tratados com hMSC apresentaram um efeito benéfico modulador sobre a diferenciação macrofágica, para um fenótipo com menos remodelamento.

## 6 ORIENTAÇÕES NO PERÍODO DE DOUTORAMENTO

ANO	ALUNO	CURSO/ PERÍODO	TIPO	TÍTULO DO TRABALHO
2014	Leticia A. Oyama	Medicina 4º e 5º	PIBIC	Avaliação imuno-histoquímica da nitrotirosina no tecido pulmonar de modelo experimental de asma alérgica tratado com células mesenquimais estromais derivadas da medula óssea humana.
	Patrícia de C. Jericó	Medicina 4º e 5º		Avaliação imuno-histoquímica de arginase 1 no tecido pulmonar de modelo experimental de asma alérgica tratado com células mesenquimais estromais derivadas da medula óssea humana.
2015	Leticia A. Oyama	Medicina 6º e 7º	PIBIC e TCC	Avaliação imuno-histoquímica do óxido nítrico sintase induzível no tecido pulmonar de modelo experimental de asma alérgica tratado com células mesenquimais estromais derivadas da medula óssea humana.
	Patrícia de C. Jericó	Medicina 6º e 7º		Avaliação imuno-histoquímica de esfingosina quinase 1 no tecido pulmonar de modelo experimental de asma alérgica tratado com células mesenquimais estromais derivadas da medula óssea humana.
2016	Bruna P. Trindade	Medicina 6º e 7º	TCC	Análise imuno-histoquímica de biomarcadores inflamatórios em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por pneumonia viral grave pandêmica letal (H1N1)
	Bruna R. Cremonese			
	Marina A. M. Ribeiro			
	Vitória L. L. Winkler		PIBIC	
	Joaquim S. Picanço			
	Mirian Su Mi Kim			
	Vinicius da S. Moreira			
2017/2018	Amanda Prokopenko	Medicina 6º e 7º	PIBIC e TCC	Expressão tecidual de interleucinas (6 e 10) em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por pneumonia viral grave pandêmica letal (Influenza A H1N1).
	Leticia Panini	Medicina 7º e 8º		Expressão tecidual de moléculas de adesão (adam 28 e 33) em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por pneumopatia grave pandêmica (Influenza A H1N1).
	Maria H. S. Ferreira	Medicina 4º e 5º	PIBIC	Expressão tecidual de citocinas em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por pneumopatia grave pandêmica (Influenza A H1N1).
	Theo D. Goldenberg	Biologia 6º		Análise das possíveis rotas de entrada do zika vírus no cérebro humano.
	Kauana O. Gouveia	Medicina 5º	TCC	Fração tecidual de polimorfonucleares em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por pneumopatia grave pandêmica (Influenza A H1N1).
	Larissa C. Biscaro			
	Ana L. Garcia			
	Thaís Kondo			
	Gabrielle T. Gonçalves			
	Eduardo Storti	Ciências da Saúde	Mest.	Expressão tecidual de moléculas de adesão (adam 28 e adam 33), de interleucinas (6, 8, 10, 17) e de cd3, cd20, cd4 e cd8 em amostras pulmonares de pacientes com anemia de Fanconi que realizaram transplante de medula óssea e foram a óbito.
Marina Luise V. de Azevedo	Microbiol., Parasitol. e Patologia	Dout.	Expressão tecidual de moléculas de adesão (Adam 28 e 33) e de interleucinas (4, 13 e 17), em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por pneumopatia grave pandêmica (Influenza A H1N1).	

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ABREU, S. *et al.* **Bone marrow mononuclear cell therapy in experimental allergic asthma: Intratracheal versus intravenous administration.** *Respiratory Physiology & Neurobiology*, v. 185, n. 3, p. 615–624, 2013.

AGBETILE, J. e GREEN, R. **New therapies and management strategies in the treatment of asthma: patient-focused developments.** *Journal of asthma and allergy*, v. 4, p. 1–12, 2011.

ALBINA, J. *et al.* **Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds.** *Journal of Immunology*, v. 144, n. 10, p. 3877–3880, 1990.

ANVERSA, P. *et al.* **Regenerative pulmonary medicine: potential and promise, pitfalls and challenges.** *European journal of clinical investigation*, p. 1–14, 2012.

ARIKAN-AYYILDIZ, Z *et al.* **Beneficial effects of arginase inhibition and inhaled L-arginine administration on airway histology in a murine model of chronic asthma.** *Allergologia et immunopathologia*, n. xx, p. 1–8, 2013.

BARNES, P. **Reactive oxygen species and airway inflammation.** *Free Radic Biol Med*, v. 9, n. 3, p. 235–243, 1990.

BATEMAN, E. *et al.* **Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary.** *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, v. 31, n. 1, p. 143–78, 2008.

BENOIT, M. *et al.* **The uptake of apoptotic cells drives *Coxiella burnetii* replication and macrophage polarization: A model for Q fever endocarditis.** *PLoS Pathogens*, v. 4, n. 5, 2008.

BIAGIOLI, M. *et al.* **The role of oxidative stress in rhinovirus induced elaboration of IL-8 by respiratory epithelial cells.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, n. 3–4, p. 454–462, 1999.

BISWAS, S. e MANTOVANI, A. **Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets : cancer as a paradigm.** *Nature immunology*, v. 11, n. 10, p. 889–896, 2010.

BOORSMA, C. e DRAIJER, C. e MELGERT, B. **Macrophage heterogeneity in respiratory diseases.** *Mediators of Inflammation*, 2013

BRAZA, F. *et al.* **Mesenchymal Stem Cells Induce Suppressive Macrophages Through Phagocytosis in a Mouse Model of Asthma.** *Stem cells (Dayton, Ohio)*, v. 34, n. 7, p. 1836–45, 2016.

BRUNEL, M. e HERR, F. e DURRBACH, A. **Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells.** *Current Transplantation Reports*, v. 3, n. 4, p. 348–357, 2016.

BUSSE, W. e BANKS-SCHLEGEL, S. e WENZEL, S. **Pathophysiology of severe asthma.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 106, n. Table I, p. 1033–1042, 2000.

COMHAIR, S. e ERZURUM, S. **Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities.** *Antioxidants & redox signaling*, v. 12, n. 1, p. 93–124, 2010.

DENNIS, J. *et al.* **The STRO-1+marrow cell population is multipotential.** *Cells Tissues Organs*, v. 170, p. 73–82, 2002.

DWORSKI, R. *et al.* **Assessment of oxidant stress in allergic asthma by measurement of the major urinary metabolite of F2-isoprostane, 15-F2t-IsoP (8-iso-PGF2??).** *Clinical and Experimental Allergy*, v. 31, n. 3, p. 387–390, 2001.

EDWARDS, J. *et al.* **Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations.** *Journal of leukocyte biology*, v. 80, n. 6, p. 1298–1307, 2006.

FILARDY, A. *et al.* **Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages.** *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 185, n. 22, p. 2044–2050, 2010.

FINKEL, T. e HOLBROOK, N. **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.** *Nature*, v. 408, n. 6809, p. 239–247, 2000.

FIRINCI, F. *et al.* **Mesenchymal stem cells ameliorate the histopathological changes in a murine model of chronic asthma.** *International Immunopharmacology*, v. 11, n. 8, p. 1120–1126, 2011.

FRANCHIMONT, D. **Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: A good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1024, n. 1, p. 124-137, 2006.

GAO, F. *et al.* **Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects.** *Cell Death and Disease*, v. 7, n. 1, p. e2062, 2016.

GARN, H. e RENZ, H. **Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis.** *Immunobiology*, v. 212, p. 441–452, 2007.

GENSEL, J. e ZHANG, B. **Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury.** *Brain Research*, p. 1–11, 2015.

GERBER, J. e MOSSER, D. **Ligating the Macrophage Fc Reversing Lipopolysaccharide Toxicity by Reversing Lipopolysaccharide Toxicity by Ligating the Macrophage Fc Receptors.** *J Immunol References*, v. 166116861, p. 6861–6868, 2001.

GINA. Global Initiative for Asthma. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention**, 2017. Available from: [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org).

GROVES, J. **Peroxynitrite: Reactive, invasive and enigmatic**. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 3, n. 2, p. 226-35, 1999.

GUPTA, N. *et al.* **Intrapulmonary Delivery of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Survival and Attenuates Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Mice**. *The Journal of Immunology*, v. 179, n. 3, p. 1855–1863, 2007.

HACKETT, T. **Epithelial-mesenchymal transition in the pathophysiology of airway remodelling in asthma**. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, v. 12, n. 1, p. 53–9, 2012.

HACKETT, T. e KNIGHT, D. e SIN, D. **Potential role of stem cells in management of COPD**. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, v. 5, p. 81–88, 2010.

HADDAD, I. *et al.* **Mechanisms of peroxy-nitrite-induced injury to pulmonary surfactants**. *The American journal of physiology*, v. 265, p. L555–L564, 1993.

HAN, K. *et al.* **Immunosuppressive mechanisms of embryonic stem cells and mesenchymal stem cells in alloimmune response**. *Transplant Immunology*, v. 25, n. 1, p. 7–15, 2011.

HESSE, M. *et al.* **Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of L-Arginine Metabolism**. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 11, p. 6533–6544, 2001.

HOLGATE, S. **Epithelial-Mesenchymal Communication in the Pathogenesis of Chronic Asthma**. *Proceedings of the American Thoracic Society*, v. 1, n. 2, p. 93–98, 2004.

HOLGATE, S. **Innate and adaptive immune responses in asthma.** Nat. Med., v. 18, n. 5, p. 673–683, 2012.

HOLGATE, S. **Pathophysiology of asthma: what has our current understanding taught us about new therapeutic approaches?** The Journal of allergy and clinical immunology, v. 128, n. 3, p. 495–505, 2011.

ISCHIROPOULOS, H. *et al.* **Detection of peroxynitrite.** Methods. [S.l.: s.n.]. 1995

ISHIZAWA, K. *et al.* **Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema.** FEBS Letters, v. 556, n. 1–3, p. 249–252, 2004.

KAY, A. *et al.* **A role for eosinophils in airway remodelling in asthma.** Trends in Immunology, v. 25, n. 9, p. 477–82, 2004.

KIM, B. e HONG, S. **Ambient air pollution and allergic diseases in children.** Korean journal of pediatrics, v. 55, n. 6, p. 185–92, 2012.

LAMBRECHT, B. e HAMMAD, H. **The immunology of asthma.** Nature Immunology, v. 16, n. 1, p. 45–56, 2014.

LAW, S. e CHAUDHURI, S. **Mesenchymal stem cell and regenerative medicine: regeneration versus immunomodulatory challenges.** American journal of stem cells, v. 2, n. 1, p. 22–38, 2013.

LE BLANC, K. e DAVIES, L. **Mesenchymal stromal cells and the innate immune response.** Immunology Letters, v. 168, n. 2, p. 140–146, 2015.

LEE, S. *et al.* **Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis.** Respiratory research, v. 11, p. 16, 2010.

LUCAS, R. *et al.* **Arginase 1: an unexpected mediator of pulmonary capillary barrier dysfunction in models of acute lung injury.** *Frontiers in immunology*, v. 4, n. August, p. 228, 2013.

MALAQUIAS, M. **O papel das células mesenquimais estromais derivadas da medula óssea humana na inflamação e remodelamento pulmonar de modelo experimental inédito de asma alérgica.** Curitiba, 2013. 99p. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde. Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

MANTOVANI, A. *et al.* **The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.** *Trends in Immunology*, v. 25, n. 12, p. 677–686, 2004.

MARTINEZ, F. *et al.* **Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression.** *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 10, p. 7303–7311, 2006.

MARTINEZ, F. *et al.* **Macrophage activation and polarization.** *Frontiers in Bioscience*, v. 13, n. 4, p. 453–461, 2008.

MARTINEZ, F. e GORDON, S. **The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment.** *F1000prime reports*, v. 6, n. 3, p. 13, 2014.

MATHIAS, L. *et al.* **Alveolar macrophages are critical for the inhibition of allergic asthma by mesenchymal stromal cells.** *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 191, n. 12, p. 5914–5924, 2013.

MOODLEY, Y. *et al.* **Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Reduce Fibrosis of Bleomycin-Induced Lung Injury.** *The American Journal of Pathology*, v. 175, n. 1, p. 303–313, 2009.

MOSSER, D. M. **The many faces of macrophage activation.** *Journal of Leukocyte Biology*, v. 73, n. 2, p. 209–212, 2003.

MOSSER, D. e EDWARDS, J. **Exploring the full spectrum of macrophage activation.** Nature reviews. Immunology, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.

NADEEM, A. *et al.* **Airway and systemic oxidant-antioxidant dysregulation in asthma: A possible scenario of oxidants spill over from lung into blood.** Pulmonary Pharmacology and Therapeutics, v. 29, n. 1, p. 31–40, 2014.

NEMETH, K. *et al.* **Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, n. 12, p. 5652–5657, 2010.

NEMETH, K. *et al.* **Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production.** Nature medicine, v. 15, n. 1, p. 42–9, 2009.

OHLSSON, S. *et al.* **Serum from patients with systemic vasculitis induces alternatively activated macrophage M2c polarization.** Clinical Immunology, v. 152, n. 1–2, p. 10–19, 2014.

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

ORTIZ, L. *et al.* **Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury.** Proc Natl Acad Sci USA, v. 104, n. 26, p. 11002–11007, 2007.

ROBBE, P. *et al.* **Distinct macrophage phenotypes in allergic and nonallergic lung inflammation.** American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, v. 308, n. 4, p. L358–L367, 2015.

ROJAS, M. *et al.* **Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung.** American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, v. 33, n. 2, p. 145–152, 2005.

SAETTA, M. e TURATO, G. **Airway pathology in asthma.** European Respiratory Journal, v. 18, n. 1, p. 18–23, 2001.

SAHINER, U. *et al.* **Oxidative stress in asthma.** The World Allergy Organization journal, v. 4, n. 10, p. 151–8, 2011.

SALEH, D. *et al.* **Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid.** FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 12, n. 11, p. 929–37, 1998.

SANT'ANA DUSSE, L. e VIEIRA, L. e CARVALHO, M. **Revisão sobre óxido nítrico Nitric oxide revision.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 39, n. 4, p. 343–350, 2003.

SATO, K. *et al.* **Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells.** Immunobiology, v. 109, n. 1, p. 228–235, 2007.

SHIFREN, A. *et al.* **Mechanisms of remodeling in asthmatic airways.** Journal of Allergy, v. 2012, p. 15–17, 2012.

SICA, A. e MANTOVANI, A. **Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas.** v. 122, n. 3, p. 787–795, 2012.

SINCLAIR, K. e YERKOVICH, S. e CHAMBERS, D. **Mesenchymal stem cells and the lung.** Respirology (Carlton, Vic.), v. 18, n. 3, p. 397–411, 2013.

SONG, X. *et al.* **Mesenchymal Stem Cells Alleviate Experimental Asthma by Inducing Polarization of Alveolar Macrophages.** *Inflammation*, v. 38, n. 2, p. 485–492, 2014.

SPEES, J. e LEE, R. e GREGORY, C. **Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function.** *Stem cell research & therapy*, v. 7, n. 1, p. 125, 2016.

SUEBLINVONG, V. e WEISS, D. **Cell therapy approaches for lung diseases: current status.** *Current Opinion in Pharmacology*, v. 9, p. 268–273, 2009.

SUN, T. *et al.* **Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates oxidative stress and restores intestinal mucosal permeability in chemically induced colitis in mice.** *Am J Transl Res*, v. 7, n. 5, p. 891–901, 2015.

TAMÁS, R. **Understanding th Mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanism.** *Mediators of Inflammation*, v. 2015, p. 16, 2015.

TRIVEDI, S. e LLOYD, C. **Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 64, n. 10, p. 1269–1289, 2007.

UCCELLI, A. e MORETTA, L. e PISTOIA, V. **Mesenchymal stem cells in health and disease.** *Nature reviews. Immunology*, v. 8, n. SepTeMbeR, p. 726–736, 2008.

VALLEDOR, A. e RICOTE, M. **Nuclear receptor signaling in macrophages.** *Biochemical Pharmacology*, v. 67, n. 2, p. 201–212, 2004.

VORAPHANI, N. *et al.* **An airway epithelial iNOS-DUOX2-thyroid peroxidase metabolome drives Th1/Th2 nitrative stress in human severe asthma.** *Mucosal immunology*, v. 7, n. 5, p. 1175–85, 2014.

VORAPHANI, N. *et al.* **Th1/Th2 Cytokines promote Nitrite/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated tyrosine nitration in airway epithelial cells: Potential role in severe asthma.** *Nitric Oxide*, v. 31, Supple, n. 0, p. S15–S16, 2013.

WANG, L. *et al.* **Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials.** *Journal of Biomedical Science*, v. 23, n. 1, p. 76, 2016.

WANG, Y. *et al.* **Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications.** *Nature immunology*, v. 15, n. 11, p. 1009–16, 2014.

XU, J. *et al.* **Role of the SDF-1/CXCR4 axis in the pathogenesis of lung injury and fibrosis.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 37, n. 3, p. 291–299, 2007.

ZAMPROGNO, H. **Células tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas Skeletal stem cells for the treatment of nonunion fractures in dogs.** v. d, n. Supl 2, p. 289–290, 2007.

ZHANG, P. *et al.* **Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 29, p. 22479–22486, 2000.

ZHEN, G. *et al.* **Mesenchymal stem cells transplantation protects against rat pulmonary emphysema.** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, v. 13, p. 3415–22, 2008.

ZHU, Z. *et al.* **Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation.** *Science*, v. 304, n. 5677, p. 1678–1682, 2004.