



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

LIDIANE MARIA BOLDRINI LEITE

**PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS HUMANAS EM CAMUNDONGOS BALB/C
SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA**

CURITIBA

2017

LIDIANE MARIA BOLDRINI LEITE

**PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS HUMANAS EM CAMUNDONGOS BALB/C
SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Paulo R. S. Brofman

Coorientador: Prof. Dr. Pedro V. Michelotto Jr.

CURITIBA

2017



PUCPR

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos 28 dias do mês de junho de 2017, às 09hs e 00min., realizou-se a sessão pública de defesa de tese, "PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS EM CAMUNDONGOS BALB/C SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA" apresentado por Lidiane Maria Boldrini Leite para obtenção do título de Doutora; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman (PUCPR) Presidente	
Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho (UFPR)	
Prof. Dr. Sérgio Adriane Bezerra de Moura (UFRN)	
Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias (PUCPR)	
Prof. Dr. Luiz Guilherme Achcar Capriglione(PUCPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman

Conceito: Aprovada

Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho

Conceito: aprovado

Prof. Dr. Sérgio Adriane Bezerra de Moura

Conceito: aprovado

Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias

Conceito: aprovado

Prof. Dr. Luiz Guilherme Achcar Capriglione

Conceito: APROVADA

Parecer Final: APROVADA

Observações da Banca Examinadora:

Apresentou a defesa com entusiasmo e clareza. De acordo com os requisitos da banca

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman
Presidente da Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Escola de Medicina - PUCPR

Ao meu querido esposo Bernardo Reisdorfer Leite, por todo amor,
carinho e compreensão em todos os momentos de minha vida!

Aos meus amados pais Sueli Santos Boldrini e Antonio Domingos Boldrini,
por todo amor e dedicação, e por sempre acreditarem em mim!

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre comigo e com as pessoas que mais amo!

Ao meu esposo Bernardo o qual serei sempre grata por todo amor, paciência e companheirismo em todos os momentos de minha vida.... Agradeço por todo esforço em minhas planilhas! Sem sua ajuda, eu estaria até hoje digitando os dados deste estudo!

Aos meus pais Sueli Santos Boldrini e Antonio Domingos Boldrini pela educação que me deram, pelos valores que me ensinaram e por sempre torcerem por mim. Vocês são minha inspiração e a razão da minha vida!

À toda a minha família, em especial aos meus irmãos Marco Antonio Boldrini e Antonio Marcelo Boldrini, minha avó Adalgiza Maffei Santos (*in memorian*), meus sogros Regina Reisdorfer Leite e Carlos Adão Corrêa Leite (*in memorian*) por fazerem parte da minha história!

Ao meu orientador e coordenador Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman pela confiança e orientação. Tenho muito orgulho de fazer parte de sua equipe!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Pedro Vicente Michelotto Jr. por me ensinar sobre a asma! Agradeço pela confiança e ajuda na construção deste estudo, que continua nos trazendo resultados animadores!

À Dra. Alexandra Cristina Senegaglia por acreditar em mim! Obrigada pelo apoio, generosidade, amizade e principalmente por me ajudar em meus momentos de ansiedade!

À Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto pelo carinho, amizade e por me apresentar à esta linha de pesquisa que até então se iniciava em nosso grupo.

Ao amigo e colaborador Prof. Dr. Sérgio Adriane Bezerra de Moura que contribuiu intensamente neste estudo. Obrigada por me ensinar o “olhar de patologista”!

Aos colegas Luiz Guilherme Achcar Capriglione por operar e cuidar de meus animais; Bruna Schaidt, Amanda Caldas Pereira e Marciel Zavorski Drobniowski pelo auxílio

na histopatologia; Fernanda Cristina Mendes Barussi pela análise do diferencial de células inflamatórias; Nathália Forti Francisco pela contribuição na reta final das colorações e Felipe Yukio Ishikawa Fragoso pela ajuda sempre que preciso.

Às companheiras de laboratório Letícia Fracaro e Fabiane Barchiki pelas conversas e risadas, tornando os dias tensos mais agradáveis!

À Prof^a Dra. Marcia Olandoski pela orientação nas análises estatísticas.

Ao Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, especialmente à Ana Paula Martins, por toda a preparação das lâminas histológicas.

Aos colaboradores do Biotério da PUCPR por todo o cuidado com os animais do estudo.

À todos os colegas do Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR que acompanharam o desenvolvimento deste estudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da PUCPR pela oportunidade em fazer parte do corpo discente.

À Fundação Araucária pelo financiamento desta pesquisa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro na divulgação dos resultados deste estudo em Congressos Científicos.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma participaram desta fase tão importante de minha vida!

EPÍGRAFE

**“O cientista não é quem fornece as verdadeiras respostas;
é quem faz as verdadeiras perguntas.”**

(Adaptado de Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

Introdução: Asma é uma doença crônica, caracterizada pela inflamação e remodelamento das vias aéreas, com resposta imunológica do tipo T_H2. Pesquisas com células-tronco mesenquimais (CTMs) têm demonstrado seu potencial na modulação do processo inflamatório pulmonar e no reparo tecidual.

Objetivo: Investigar as propriedades imunomoduladoras das CTMs de medula óssea humana em camundongos Balb/c submetidos ao modelo experimental de asma alérgica.

Métodos: Noventa camundongos Balb/c machos foram distribuídos e avaliados em oito grupos: Dia 0 - C (controle) e A (asma); Sete dias - 7C (controle), 7A (asma) e 7AT (tratamento); 14 dias - 14C (controle), 14A (asma) e 14AT (tratamento). Os grupos A, 7A, 7AT, 14A e 14AT foram sensibilizados através de injeções intraperitoneais com 10 µg de ovalbumina (OVA) e provocados via intratraqueal com 20 µg de OVA. Os grupos C, 7C e 14C receberam salina nestes procedimentos. Vinte e quatro horas após o último dia de provocação alergênica, 1x10⁶ CTMs foram administradas via IT nos grupos 7AT e 14AT, enquanto os grupos 7C, 7A, 14C e 14A receberam apenas salina e os grupos C e A foram submetidos à eutanásia. No sétimo dia após o transplante de CTMs, os animais dos grupos 7C, 7A e 7AT foram eutanasiados e no décimo quarto dias após tratamento, os grupos 14C, 14A e 14AT foram submetidos à eutanásia. O lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado para a dosagem das proteínas totais e do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), avaliação citológica total e diferencial e quantificação de interleucinas (IL) pró-inflamatórias (TNF-α, IL-5, IL-13 e IL-17) e anti-inflamatória (IL-10). As IL também foram avaliadas no soro coletado nos mesmos momentos. Os pulmões foram removidos para avaliação histopatológica. Considerou-se diferença estatística resultados com $p < 0,05$.

Resultados: No dia 0, o grupo A apresentou aumento significativo no percentual de eosinófilos, proteínas, IL-13, IL-17 e TNF-α no LBA, em relação ao C. No sétimo dia após transplante de CMTs, o grupo 7AT demonstrou redução significativa de eosinófilos, proteínas, H₂O₂, IL-5, IL-13 e IL-17, e aumento da IL-10 no LBA, em comparação ao grupo 7A. Além disso, houve diminuição de IL-5 e aumento da IL-10 no soro dos mesmos animais. No décimo quarto dia após tratamento, o grupo 14AT apresentou redução significativa de células, proteínas, IL-13 e IL-17 no LBA, quando comparado ao grupo 14A. Neste momento, o percentual médio de eosinófilos no grupo 14AT foi maior que no 7AT. Na avaliação histopatológica, o grupo A apresentou escores mais elevados que o grupo C e o tratamento com CTMs reverteu as alterações do remodelamento pulmonar no grupo 7AT comparado ao 7A, e no 14AT em relação ao 14A, com diferença estatística nos critérios avaliados: infiltrado inflamatório, deposição de colágeno, espessamento epitelial, descamação do epitélio e espessamento muscular (não houve diferença estatística apenas entre o 14AT vs. 14A). Não houve diferença significativa na produção de muco entre 7AT vs. 7A e 14AT vs. 14A.

Conclusão: As CTMs de medula óssea humana apresentaram efeitos imunomoduladores em camundongos Balb/c submetidos ao modelo experimental de asma, pelo controle do processo inflamatório e do remodelamento pulmonar principalmente aos sete dias após tratamento.

Palavras-chave: Inflamação, remodelamento pulmonar, células-tronco mesenquimais, imunomodulação.

ABSTRACT

Introduction: Asthma is a chronic disease, characterized by inflammation and airway remodeling, with immune response of T_H2 type. Mesenchymal stem cells research (MSCs) has demonstrated its potential in modulating of lung inflammatory process and repair damage tissue. **Objective:** To investigate the immunomodulatory properties of MSCs from human bone marrow in Balb/c mice submitted to the experimental model of allergic asthma. **Methods:** Ninety male Balb/c mice were distributed and evaluated into eight groups: 0 day - C (control) and A (asthma); Seven days - 7C (control), 7A (asthma), and 7AT (treatment); 14 days - 14C (control), 14A (asthma), and 14AT (treatment). The A, 7A, 7AT, 14A, and 14AT groups were sensitized through intraperitoneal injections with 10 μg of ovalbumin (OVA) and provoked intratracheally with 20 μg of OVA. C, 7C, and 14C groups received saline in these procedures. Twenty-four hours after the last day of allergen provocation, 1×10^6 MSCs were administered via IT in the 7AT and 14AT groups, while 7C, 7A, 14C, and 14A groups received only saline and the C and A groups were submitted to euthanasia. On the seventh day after MSCs transplantation, animals from the 7C, 7A, and 7AT groups were euthanized and on the 14th day after treatment, the 14C, 14A and 14AT groups were submitted to euthanasia. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was collected for total protein and hydrogen peroxide (H_2O_2) dosage, total and differential cytological evaluation, and quantification of proinflammatory (TNF- α , IL-5, IL-13 and IL-17) and anti-inflammatory (IL-10) interleukins (IL). IL were also evaluated in serum collected at the same moment. The lungs were removed for histopathological evaluation. Statistical difference was considered as $p < 0.05$. **Results:** On the 0 day, the A group showed a significant increase in eosinophils percentage, proteins, IL-13, IL-17, and TNF- α in BAL fluid, in comparison to C. On the seventh day after MSCs transplantation, the 7AT group demonstrated significant reduction of eosinophils, proteins, H_2O_2 , IL-5, IL-13 and IL-17, and increased IL-10 in BAL fluid in relation to 7A group. Furthermore, there was a decrease in IL-5 and increase in IL-10 in the serum of the same animals. On the fourteenth day after treatment, the 14AT group presented significative reduction of cells, proteins, IL-13, and IL-17 in BAL fluid when compared to 14A group. At this time, the mean eosinophils percentage in the 14AT group was higher than in the 7AT. In the histopathological evaluation, the A group presented higher scores than the C group and treatment with MSCs reversed alterations in lung remodeling in the 7AT group compared to 7A, and in the 14AT in relation to 14A, with statistical difference in the evaluated criteria: inflammatory infiltrate, collagen deposition, epithelial thickening, epithelium desquamation, and muscle thickening (there was no significant difference just between 14AT vs. 14A). There was no significant difference in mucus production between 7AT vs. 7A and 14AT vs. 14A. **Conclusion:** MSCs from human bone marrow showed immunomodulatory effects in Balb/c mice submitted to the experimental model of asthma, through the control of the inflammatory process and lung remodeling mainly at seven days after treatment.

Keywords: Inflammation, lung remodeling, mesenchymal stem cells, immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resposta imunológica T _H 2 em vias aéreas de indivíduos com asma...	22
Figura 2 - Delineamento do estudo.....	32
Figura 3 - Isolamento de células mononucleares de medula óssea.....	34
Figura 4 - Etapas do modelo experimental de indução à asma e avaliação pós-tratamento de células-tronco mesenquimais humanas em camundongos.....	38
Figura 5 - Procedimentos intratraqueais.....	39
Figura 6 - Avaliação da produção de muco nos bronquíolos.....	45
Figura 7 - Células-tronco mesenquimais de medula óssea humana, cultivadas até a passagem 3.....	46
Figura 8 - Marcadores positivos de células-tronco mesenquimais humanas de uma amostra representativa de medula óssea.....	48
Figura 9 - Marcadores negativos de células-tronco mesenquimais humanas de uma amostra representativa de medula óssea.....	49
Figura 10 - Viabilidade das células-tronco mesenquimais humanas na passagem 3.....	50
Figura 11 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com hematoxilina & eosina no dia 0.....	64
Figura 12 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com tricrômio de masson no dia 0.....	65
Figura 13 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com ácido periódico-schiff no dia 0.....	66
Figura 14 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com hematoxilina & eosina aos sete dias.....	68
Figura 15 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com tricrômio de masson aos sete dias.....	69
Figura 16 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com ácido periódico-schiff aos sete dias.....	70
Figura 17 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com hematoxilina & eosina aos 14 dias.....	72
Figura 18 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com tricrômio de masson aos 14 dias.....	73

Figura 19 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com ácido periódico-schiff aos 14 dias..... 74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número total de células no LBA dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	51
Gráfico 2 - Contagem diferencial de eosinófilos no LBA dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	52
Gráfico 3 - Contagem diferencial de linfócitos no LBA dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	53
Gráfico 4 - Contagem diferencial de macrófagos no LBA dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	54
Gráfico 5 - Contagem diferencial de neutrófilos no LBA dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	55
Gráfico 6 - Contagem diferencial de mastócitos no LBA dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	55
Gráfico 7 - Quantificação de proteínas no LBA dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	56
Gráfico 8 - Detecção de H ₂ O ₂ no LBA dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	57
Gráfico 9 - Níveis da IL-5 no LBA e no soro dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	58
Gráfico 10 - Níveis da IL-13 no LBA e no soro dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	59
Gráfico 11 - Níveis da IL-17A no LBA e no soro dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	61
Gráfico 12 - Níveis de TNF- α no LBA e no soro dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	62
Gráfico 13 - Níveis da IL-10 no LBA e no soro dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	63
Gráfico 14 - Análises histopatológicas no epitélio pulmonar dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	75
Gráfico 15 - Análises histopatológicas no músculo liso e no infiltrado inflamatório pulmonar dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias.....	76

Gráfico 16 - Análises histopatológicas quanto à produção de muco e deposição de colágeno no pulmão dos animais avaliados no dia 0, aos sete dias e aos 14 dias..... 77

LISTA DE QUADROS E TABELA

Quadro 1 - Marcadores de células-tronco mesenquimais humanas.....	36
Quadro 2 - Interleucinas anti e pró-inflamatórias avaliadas no LBA e no soro dos animais.....	41
Quadro 3 - Avaliação da presença e intensidade da inflamação pulmonar em cortes histológicos corados com hematoxilina & eosina e tricrômio de Masson, utilizando um sistema de score.....	44
Tabela 1 - Expressão dos marcadores de membrana das células tronco mesenquimais de medula óssea humana.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
7A	Grupo Asma avaliado aos sete dias
7-AAD	7-Amino-Actinomicina D
7AT	Grupo Tratamento avaliado aos sete dias
7C	Grupo Controle avaliado aos sete dias
14A	Grupo Asma avaliado aos 14 dias
14AT	Grupo Tratamento avaliado aos 14 dias
14C	Grupo Controle avaliado aos 14 dias
A	Grupo Asma avaliado no dia 0
APC	Conjugado de Aloficocianina, do inglês: <i>Allophycocyanin</i>
AT	Grupo Tratamento avaliado no dia 0
C	Grupo Controle avaliado no dia 0
CAT	Catálogo
CD	Grupos de diferenciação, do inglês: <i>Cluster of differentiation</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
CO₂	Dióxido de carbono
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CTMs	Células-tronco mesenquimais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
FITC	Conjugado de Isotiocianato de Fluoresceína, do inglês: <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
g	Grama

G-CSF	Fator Estimulante de Colônia de Granulócito, do inglês: <i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
h	Horas
H&E	Hematoxilina & Eosina, do inglês: <i>Hematoxylin and Eosin</i>
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócito, do inglês: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HLA	Antígenos leucocitários humanos, do inglês: <i>Human leukocyte antigens</i>
IDO	Indoleamina-2,3-dioxigenase
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IH	Inalatória
IL	Interleucina
IMDM	Meio Dulbecco Modificado por Iscove, do inglês: <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IN	Intranasal
IP	Intraperitoneal
IT	Intratraqueal
kg	Quilograma
LBA	Lavado broncoalveolar
mg	Miligrama
MHC	Complexo de Principal de Histocompatibilidade: do inglês: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
Min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NKs	<i>Natural Killers</i>
nm	Nanômetro
Nº	Número
°C	Graus celsius
OS	Oncostatina, do inglês: <i>Oncostatin</i>

OVA	Ovalbumina
P	Passagem
PAF	Fator de Ativação de Plaquetária, do inglês: <i>Platelet Activating Factor</i>
PAS	ácido Periódico-Schiff, do inglês: <i>Periodic acid-Schiff</i>
PBS	Tampão Fosfato Salina, do inglês: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular, do inglês: <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PE	Conjugado de Ficoeritrina, do inglês: <i>Phycoerythrin</i>
PE-Cy5	Conjugado com Ficoeritrina e Cianina, do inglês: <i>Phycoerythrin and the Cyanine Dye Cy5</i>
pg	Picograma
PG	Prostaglandina
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
SUS	Sistema Único de Saúde
T.A.	Temperatura Ambiente
TGF	Fator de Crescimento Transformador, do inglês: <i>Transforming Growth Factor</i>
T_H	Célula T auxiliadora, do inglês: <i>T helper</i>
TJ	Junções Justapostas, do inglês: <i>Tight Junctions</i>
TM	Tricrômio de Masson
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRegs	Linfócitos T Regulatórios
VCAM	Molécula de Adesão da Célula Vascular, do inglês: <i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VSR	Vírus Sincicial Respiratório

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 DEFINIÇÃO, PREVALÊNCIA E GRAVIDADE DA ASMA	19
1.2 FATORES DE RISCO DA ASMA	19
1.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA ASMA	21
1.3.1 Fisiopatologia da asma.....	21
1.3.2 Mediadores inflamatórios na asma.....	22
1.3.3 Remodelamento das vias aéreas	24
1.4 TERAPIA CELULAR	26
1.4.1 Modelo experimental de asma	28
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	32
3.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA HUMANA	33
3.2.1 Obtenção da medula óssea humana.....	33
3.2.2 Isolamento e cultivo das CTMs humanas.....	33
3.2.3 Imunofenotipagem das CTMs e viabilidade celular	35
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
3.4 MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO À ASMA E TERAPIA CELULAR	37
3.5 LBA E SORO: COLETA E PROCESSAMENTO	39
3.5.1 Avaliação citológica total e diferencial do LBA	40
3.5.2 Concentração de proteínas totais no LBA	40
3.5.3 Detecção de H ₂ O ₂ no LBA	40
3.5.4 Quantificação de interleucinas no LBA e no soro.....	40
3.6 PULMÕES: COLETA E AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	41

3.6.1 Avaliação do músculo liso, epitélio de revestimento e infiltrado inflamatório....	41
3.6.2 Avaliação da distribuição de células caliciformes e produção de muco	42
3.6.3 Avaliação da deposição de colágeno	42
3.6.4 Análise histopatológica.....	43
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4 RESULTADOS.....	46
4.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CTMS DA MEDULA ÓSSEA HUMANA	46
4.2 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CTMs	47
4.3 VIABILIDADE CELULAR.....	50
4.4 SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS	51
4.5 NÚMERO DE CÉLULAS TOTAIS DO LBA	51
4.6 DIFERENCIAL DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS.....	52
4.7 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NO LBA	56
4.8 DETECÇÃO DE H ₂ O ₂ NO LBA	56
4.9 QUANTIFICAÇÃO DE INTERLEUCINAS NO LBA E NO SORO	57
4.10 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	63
5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÃO	83
7 REFERÊNCIAS.....	84
8 ANEXOS	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO, PREVALÊNCIA E GRAVIDADE DA ASMA

Asma é uma doença intermitente ou persistente das vias aéreas, caracterizada por episódios recorrentes de obstrução de fluxo de ar e dificuldades respiratórias reversíveis (VIJVERBERG et al., 2013). Provoca sintomas como sibilo, dispneia, aperto no peito e tosse, associada à inflamação e hiperreatividade das vias aéreas a vários agentes broncoconstritores, como alérgenos de fungos anemófilos e epitélio de animais (DENNING et al., 2014; MULLANE; WILLIAMS, 2014).

A asma é considerada uma doença preocupante para a saúde pública, pois tem um impacto significativo sobre os indivíduos, suas famílias e a sociedade como um todo. Representa uma das principais causas de incapacidade física, afetando 300 milhões de pessoas em todo o mundo (*GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA*, 2017) e estima-se que este número aumentará para 400 milhões em 2025, em decorrência do desenvolvimento urbano (TO et al., 2012).

No Brasil, a estimativa de prevalência corresponde a 10% da população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Apesar do melhor acesso dos pacientes a medicamentos fornecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e pela atuação dos profissionais que promovem ações preventivas, a asma gera gastos crescentes para a rede pública de saúde. Em 2014, as internações hospitalares registraram um custo de R\$ 57,2 milhões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A gravidade da doença pode variar entre os pacientes, desde o quadro leve, com sintomas menos frequentes, até formas graves onde os sintomas são persistentes e interferem na qualidade de vida (TAYLOR et al., 2008). Entretanto, mesmo os pacientes com a doença leve eventualmente sofrem ataques agudos graves, com um rápido comprometimento da função pulmonar, que podem não responder a um tratamento regular (MULLANE; WILLIAMS, 2014).

1.2 FATORES DE RISCO DA ASMA

A asma é influenciada por múltiplos fatores, incluindo ambientais, ocupacionais, genéticos e alimentares (*GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA*, 2015). O controle dos

sintomas e a redução dos riscos são importantes para o controle da asma (HOLLOWAY et al., 2010).

Os principais fatores externos são os alérgenos inaláveis, advindos comumente de: Partículas fecais de ácaros de poeira doméstica e baratas, antígenos de fungos anemófilos (DENNING et al., 2014) e do epitélio de gatos e cães (BAXI; PHIPATANAKUL, 2010); Vírus respiratórios, como as infecções causadas pelo vírus sincicial respiratório (VSR) nos primeiros anos de vida (BUSSE et al., 2010); Poluentes ambientais, como a fumaça de cigarro, e atmosféricos, como o dióxido de nitrogênio e o ozônio, podem provocar lesões oxidativas nas vias aéreas que ocasionam a inflamação e o remodelamento e aumentam o risco de sensibilização (GUARNIERI; BALMES, 2014).

Diversas substâncias utilizadas no local de trabalho podem provocar o desenvolvimento da asma ocupacional. Já foram descritos em torno de 360 agentes, com uma média de 12 novos potenciais causadores identificados anualmente. No entanto, apenas alguns, como a farinha, látex, sais de persulfato, aldeídos e metais representam de 50 a 90% dos casos relatados (VANDENPLAS, 2011).

No contexto genético, a interação de múltiplos genes tem sido associada a diferentes fenótipos da asma em populações de diferentes etnias. Acredita-se que a estimativa de herdabilidade da asma varia entre 40 e 60% (BONFIELD; ROSS, 2012). Atualmente há uma crescente lista de genes implicados na susceptibilidade da doença e sua patogênese, como por exemplo, o ADAM33 que pode estar associado ao remodelamento das vias aéreas, devido à sua alta expressão em fibroblastos, miofibroblastos e em células musculares lisas. Além disso, estimula a proliferação celular e contribui com a angiogênese (TRIPATHI et al., 2014).

Em outro aspecto estão as alergias alimentares, que podem preceder o desenvolvimento de asma e são consideradas fatores de risco para a condição persistente. A sensibilização alimentar em lactentes, principalmente ao ovo, está associada ao desenvolvimento futuro da asma (CAFFARELLI et al., 2016). As crianças com asma e alergia alimentar apresentam risco aumentado de morbidade e a manifestação grave da doença, especialmente durante a reação anafilática (FOONG et al., 2017).

1.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA ASMA

Pesquisas dos últimos 30 anos sugerem que a inflamação das vias aéreas exerce um papel central na fisiopatologia da asma, orquestrada principalmente pela resposta imunológica do tipo T *helper* (T_H) 2 que favorece a produção de Imunoglobulina (Ig) E e o recrutamento de eosinófilos. A inflamação está presente em várias intensidades desde os pacientes assintomáticos até os que manifestam a forma leve ou grave da doença (MULLANE, 2011).

A hipótese da higiene, que surgiu na década de 80, infere a importância do ambiente microbiano no início da vida para o desenvolvimento imunológico adequado. Strachan (1989) sugeriu que as infecções virais no início da vida podem inibir o desenvolvimento ou patogênese da resposta alérgica, como a asma, pois mudam o equilíbrio do sistema imunológico amadurecido em relação a resposta T_H1. Esta hipótese se propagou como a explicação para o desenvolvimento da alergia e asma (FIGUEIREDO et al., 2013). No entanto, a combinação de fatores incluindo o parto natural, amamentação, aumento de atividades ao ar livre, dieta e uso correto de antibióticos, pode restabelecer o microbioma e reduzir os riscos de doenças alérgicas, principalmente no início da vida (BLOOMFIELD et al., 2016).

1.3.1 Fisiopatologia da asma

Os alérgenos quando inalados são capturados pelas células dendríticas, as quais se localizam logo abaixo do epitélio das vias aéreas onde estão em constante vigilância imunológica aos patógenos inalatórios. Estas células processam o antígeno e apresentam em sua superfície os fragmentos peptídicos ligados ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex* - MHC) de classe I e II aos receptores de linfócitos T. A sensibilização alérgica e posteriores provocações resultam na ativação de células T e transformação para o fenótipo T_H2, com a produção de interleucinas (IL) como a IL-4, IL-5 e IL-13, responsáveis pela amplificação do processo inflamatório (MULLANE, 2011).

Na reexposição ao antígeno, a reação imediata é desencadeada pela ligação cruzada entre antígenos a receptores de IgE presentes na superfície dos mastócitos, que sofrem ativação e degranulação e liberam a histamina, Fator de Ativação de

Plaquetas (do inglês, *Platelet Activating Factor* - PAF), prostaglandinas e leucotrienos. Os mediadores inflamatórios promovem a vasodilatação, permeabilidade vascular, produção de muco e broncoconstrição, responsáveis pelas manifestações clínicas em períodos de exacerbação da asma (SILVA, 2008; KUMAR et al., 2010).

O início da fase tardia começa aproximadamente de quatro a seis horas após a exposição ao alérgeno, com a chegada dos leucócitos recrutados (eosinófilos, basófilos, neutrófilos, linfócitos e monócitos) através de fatores quimiotáticos e por citocinas advindas de mastócitos da fase aguda. A produção de mediadores pode ocorrer também por células do endotélio vascular, inflamatórias e epiteliais das vias aéreas. Dessa forma, a fase tardia da doença contém mediadores da fase imediata, porém com uma inflamação persistente e remodelamento pulmonar incontrolado (KUMAR et al., 2010; MURDOCH; LLOYD, 2010) (figura 1).

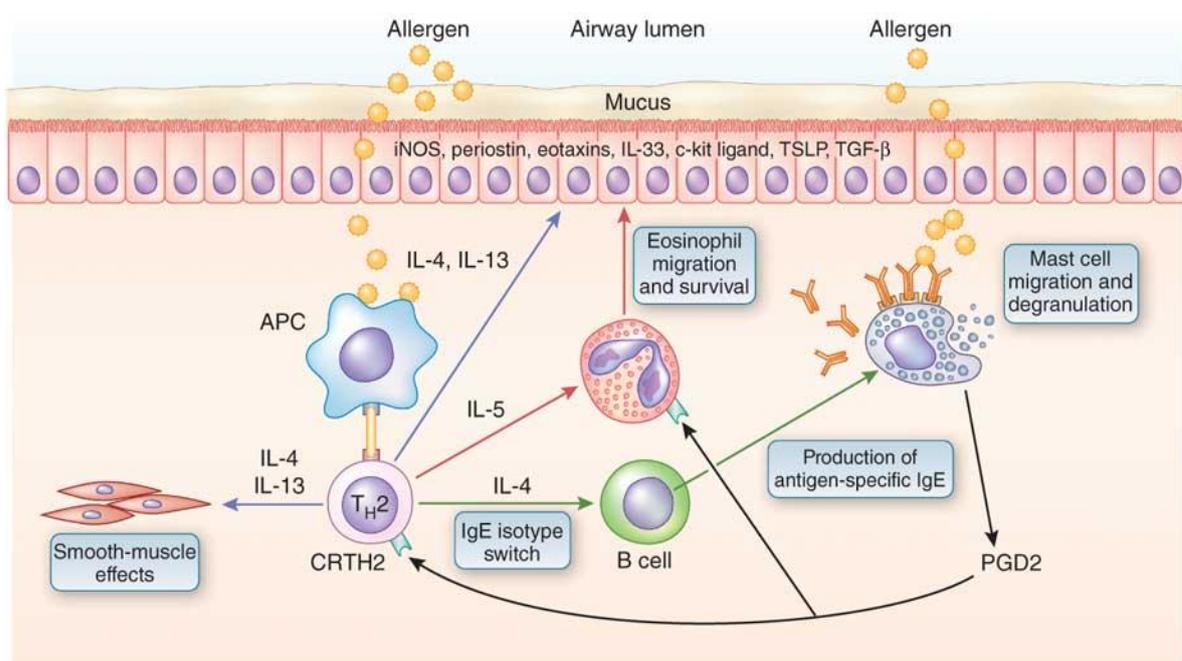


Figura 1 - Resposta imunológica T_H2 em vias aéreas de indivíduos com asma. Neste processo ocorre a produção de células T_H2 e de algumas interleucinas, como a IL-4, IL-5 e IL-13. Estas, estimulam a inflamação alérgica e eosinofílica e promovem diversas alterações no epitélio e no músculo liso que contribuem para a fisiopatologia da asma (WENZEL, 2012).

1.3.2 Mediadores inflamatórios na asma

Diversos mediadores pró-inflamatórios participam do desenvolvimento da asma, incluindo a IL-4, IL-5 e IL-13. Além destas, existem outros mediadores inflamatórios, como a IL-1, IL-2, IL-3, IL-9, IL-10, IL-17, IL-25, IL-33 e Fator de Necrose

Tumoral (do inglês, *Tumor Necrosis Factor* - TNF- α), que também participam dos eventos da cascata imunológica da asma (MULLANE, 2011).

A IL-4 atua na diferenciação de linfócitos T_{H0} em T_{H2}, estimula a produção de IgE pelos plasmócitos e potencializa a resposta imunológica. A ativação de mastócitos dependentes de IgE é induzida pela IL-4 que atua no desenvolvimento de reações alérgicas imediatas. Níveis de mediadores de leucotrieno e seus receptores também aumentam pela exposição à esta interleucina (STEINKE, 2004). A IL-4 promove a inflamação celular no pulmão pela indução da Molécula de Adesão da Célula Vascular (do inglês, *Vascular Cell Adhesion Molecule* - VCAM) - 1 no endotélio vascular. Por meio da interação com VCAM-1, a IL-4 recruta eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos para o local da lesão. Além disso, a IL-4 promove a inflamação eosinofílica pela indução da quimiotaxia de eosinófilos (BRUSSELLE et al., 1994).

A IL-5 desempenha um papel importante na inflamação das vias aéreas. Estimula a maturação, proliferação, diferenciação, recrutamento e sobrevivência de eosinófilos, retardando a apoptose deste no local da inflamação (GARCIA et al., 2013). Promove o aumento do número de eosinófilos na medula óssea (MUKHERJEE; ZHANG, 2011). É produzida principalmente por linfócitos T_{H2}, mastócitos e eosinófilos. Uma vez recrutados, os eosinófilos degranulam e liberam suas proteínas catiônicas para a proteção do hospedeiro contra os alérgenos. Estes produtos são tóxicos para o microambiente pulmonar e, além da produção de superóxido, causam danos ao microambiente circundante. A eosinofilia tecidual está presente em pacientes com asma e é correlacionada com a gravidade da doença (MURDOCH; LLOYD, 2010; PATTERSON et al., 2015).

A produção de IL-13 está associada à sobrevivência e migração de eosinófilos e ativação de macrófagos nas vias aéreas (MARTINEZ-NUNEZ et al., 2011; CORREN, 2013). Induz a metaplasia das células caliciformes a partir das células do epitélio ciliado, e a produção e secreção de muco por essas células (KONDO et al., 2006, ERLE; SHEPPARD, 2014). A IL-13 está associada à hiperresponsividade das vias aéreas. Na reparação tecidual, a IL-13 estimula fibroblastos e macrófagos a sintetizarem colágeno e contribui para o desenvolvimento da fibrose subepitelial, presente em indivíduos com asma em várias intensidades (CORREN, 2013).

A IL-17 ou IL-17A é uma interleucina pró-inflamatória secretada por linfócitos T_{H17} e está correlacionada à gravidade da asma. Pode ser encontrada em

concentração aumentada no pulmão e no sangue de pacientes com asma alérgica. A elevada expressão da IL-17 no epitélio pulmonar provoca a produção de quimiocinas e infiltração de leucócitos *in vivo* (SCHNYDER-CANDRIAN et al., 2006). A IL-17 promove o recrutamento e expansão de neutrófilos nas vias aéreas alérgicas e pode ter um efeito negativo sobre a asma alérgica estabelecida (MURDOCH; LLOYD, 2010).

O TNF- α , é uma citocina pró-inflamatória T_H1, que pode ser secretado por diversas células incluindo macrófagos e principalmente mastócitos. Encontra-se em níveis elevados no lavado broncoalveolar (LBA) e no escarro de pacientes com asma. Atua diretamente no músculo liso das vias aéreas para aumentar a resposta contrátil aos espasmógenos (BARNES, 2008). Em indivíduos saudáveis, o TNF- α leva ao desenvolvimento da hiperresponsividade e neutrofilia das vias aéreas. Em modelo murino, esta citocina pode aumentar significativamente a metaplasia de células do muco (BUSSE et al., 2005; BUSSE et al., 2009).

A IL-10 possui ação anti-inflamatória. Na resposta alérgica, reduz a expressão de eosinófilos e a produção de citocinas e inibe a ativação de mastócitos mediada por IgE. Além disso, a IL-10 prejudica a maturação de células dendríticas, e reduz assim sua capacidade estimuladora para a indução de células T_H1 e T_H2 (COUPER et al., 2008). Vários tipos celulares secretam IL-10, incluindo macrófagos, monócitos, células dendríticas e células T. A capacidade de induzir a produção de IL-10 pelas células T pode ser desencadeada no momento e no local da exposição ao alérgeno, ou seja, quando e onde é necessário, o que torna a indução de IL-10 derivada de células T uma terapêutica atrativa (URRY et al., 2006).

1.3.3 Remodelamento das vias aéreas

O processo inflamatório instalado nas vias aéreas de indivíduos com asma promove alterações estruturais significativas na arquitetura respiratória, induzidas por processos repetidos de lesões e reparos (MULLANE, 2011).

O remodelamento das vias aéreas representa uma resposta tardia e permanente à lesão tecidual, provocada principalmente por irritantes primários. É caracterizado por modificações teciduais e celulares na região dos bronquíolos, como maior deposição de colágeno, hiperplasia e hipertrofia do músculo liso, aumento da

vascularização, espessamento da membrana basal e da camada epitelial e descamação do epitélio, metaplasia de células caliciformes, produção e hipersecreção de muco (HIROTA; MARTIN, 2013). Participam de todo este processo células inflamatórias que podem estar presentes em diferentes intensidades (CHO et al., 2014).

Na via aérea normal, a distribuição de colágeno e outros componentes da matriz extracelular está em equilíbrio devido a regulação da síntese e degradação. Na asma, a interrupção da homeostase resulta no aumento da deposição de matriz extracelular, principalmente na lâmina reticular, lâmina própria e submucosa (ROYCE et al., 2012). Dentre os reguladores que participam deste processo, destaca-se o Fator de Crescimento Transformador (do inglês, *Transforming Growth Factor* - TGF) - β , que promove a proliferação celular do músculo liso, a apoptose das células epiteliais e suas ações pró-fibróticas, como a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno e fibronectina (MOIR et al., 2008). A expressão aumentada de Smad2, proteína de sinalização de TGF- β , provoca o espessamento da camada muscular lisa e deposição de colágeno após a provocação alérgica (GREGORY et al., 2010).

O espessamento do músculo liso é o principal responsável pela broncoconstrição das vias aéreas e obstrução persistente do fluxo de ar. O espessamento da camada muscular pode ser causado por hiperplasia (aumento do número de células), hipertrofia (aumento do tamanho da célula) ou migração e diferenciação de progenitores como os miofibroblastos (BERAIR et al., 2013). A hipertrofia das células do músculo liso foi identificada nas grandes vias aéreas, em casos não fatais e fatais de asma, enquanto a hiperplasia estava presente nas grandes e pequenas vias aéreas apenas em casos fatais de asma (JAMES et al., 2012).

Adicionalmente, em resposta à provocação alérgica, pode ocorrer o aumento na taxa proliferativa das células musculares lisas das vias aéreas, que apresentam alterações na expressão de alguns marcadores como o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (do inglês, *Proliferating Cell Nuclear Antigen* - PCNA) (IJPMA et al., 2017) e o Ki67 (HASSAN et al., 2010).

Mais ao centro do bronquíolo está localizado o epitélio, que é considerado uma barreira física que protege o organismo contra as influências do ambiente. Sua função é dependente da integridade celular e interação das proteínas nos complexos juncionais intercelulares, especialmente as Junções Adesivas (do inglês, *Tight*

Junctions - TJ). A falha neste complexo torna o epitélio permeável aos alérgenos e a outros agentes para o tecido da via aérea (XIAO et al., 2011).

Uma característica do epitélio que reveste as vias respiratórias humanas é a presença de células que apresentam cílios móveis, revestidos por uma camada de muco que possui ação antimicrobiana. A presença do muco é importante para o trato respiratório, pois impede que microrganismos se instalem no epitélio (MURPHY et al., 2010). No caso da asma, devido à metaplasia e hiperplasia das células caliciformes, a hipersecreção de muco tem contribuído intensamente para a morbidade e mortalidade por esta doença, pois diante de um processo inflamatório, a produção aumentada de muco provoca o estreitamento das vias aéreas e asfixia que pode resultar em óbito (KONDO et al., 2012).

Por fim, outro aspecto importante que contribui com a gravidade da asma é o estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio são derivadas de oxidantes endógenos (compostos de mitocôndrias, NADPH e o sistema xantina/xantina oxidase) (QU et al. 2017) ou exógenos (gases oxidantes, como o ozônio, dióxido de enxofre, dióxido de nitrogênio e partículas em suspensão (SAHINER et al., 2011). A grande quantidade de espécies reativas do oxigênio (por ex.: como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio - H_2O_2) e do nitrogênio (por ex.: óxido nítrico e o nitrito) gera um desequilíbrio oxidativo, que potencializa a resposta inflamatória e pode danificar o Ácido Desoxirribonucleico (DNA), carboidratos, proteínas e lipídios além de promover a apoptose das células epiteliais e a inativação de enzimas antioxidantes (WEDES et al., 2009; QU et al. 2017).

1.4 TERAPIA CELULAR

Os medicamentos disponíveis para o tratamento da asma são responsáveis principalmente pela inibição das reações inflamatórias e promovem diferentes graus de alívio dos sintomas. Entretanto, não revertem as alterações decorrentes do remodelamento das vias aéreas e, além disso, o uso prolongado pode causar efeitos adversos ou tornar os pacientes refratários ao tratamento (TAYLOR et al., 2008). Diante desse cenário, torna-se importante a busca por novas estratégias terapêuticas que controlem os eventos fisiopatológicos envolvidos na asma (HIROTA; MARTIN, 2013).

Neste contexto, as células-tronco mesenquimais (CTMs) têm despertado grande interesse na medicina regenerativa, por suas propriedades biológicas e atividades imunomodulatórias (SHARMA et al., 2014). São células adultas, multipotentes e apresentam efeitos imunossupressores reconhecidos. Podem migrar para o local de lesão tecidual e atuar na modulação da resposta inflamatória (UCCELLI et al. 2006; HAN et al., 2011). Podem ser encontradas em diversas fontes como sangue de cordão umbilical (BIEBACK et al., 2004), tecido adiposo (ZUK et al., 2001), polpa dental (GRONTHOS et al., 2002) e medula óssea (HORWITZ et al., 1999), onde participam da homeostase tecidual, formando novas células em resposta ao repovoamento celular fisiológico ou a uma lesão (AMORIN et al., 2012; GOLDENBERG; CARVALHO, 2012).

As CTMs humanas são definidas de acordo com três critérios mínimos estabelecidos pela *International Society for Cellular Therapy* (DOMINICI et al., 2006): Aderência ao plástico quando mantidas em cultura; expressão dos marcadores de superfície dos Grupos de Diferenciação (do inglês, *Cluster of Differentiation* - CD)105, CD73 e CD90 e ausência de CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR quantificados por citometria de fluxo; e capacidade de se diferenciar nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica *in vitro*.

As CTMs são consideradas pouco imunogênicas, devido à baixa expressão de MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias na superfície celular e podem ser administradas de forma autóloga, alogênica ou xenogênica (HAN et al., 2011). Além disso, as CTMs secretam diversos fatores bioativos que suprimem o sistema imunológico local e interferem em processos importantes envolvidos na reparação tecidual (CAPLAN; DENNIS, 2006).

As CTMs podem participar de diversas vias da resposta imunológica inata e adaptativa. Afetam a proliferação de linfócitos T e a secreção de interferon (IFN) - γ por estas células (SPAGGIARI et al., 2008). Inibem a proliferação, diferenciação e quimiotaxia de células B (CORCIONE et al., 2006) e promovem o aumento na proliferação de linfócitos T Regulatórios (TRegs). Interferem na maturação de células dendríticas e impedem que células *natural killers* (NKs) se tornem citotóxicas e liberem IFN- γ e TNF- α , produzindo efeitos citotóxicos (DE MIGUEL et al., 2012).

O efeito imunossupressor das CTMs é mediado pela interação célula-a-célula e pela secreção de fatores solúveis, dentre eles: Prostaglandina (PG) E2 (HSU et al.,

2013), Fator de Crescimento de Hepatócito (do inglês, *Hepatocyte Growth Factor - HGF*) (BAI et al., 2012), indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) (HE et al., 2015), TGF- β (XU et al., 2014), Oncostatina (do inglês, *Oncostatin - OS*) M (LAN et al., 2017), IL-1, IL-8, IL-11, IL-12 e IL-15 (GLENN; WHARTENBY, 2014; ZHAO et al., 2016), Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos (do inglês, *Granulocyte-Colony Stimulating Factor - G-CSF*) (TANG et al., 2015). Os fatores bioativos suprimem o sistema imunológico local, promovem o aumento da angiogênese e da mitose, inibição da fibrose e estimulam a diferenciação, processos importantes na reparação tecidual (CAPLAN; DENNIS, 2006; HAN et al., 2011).

1.4.1 Modelo experimental de asma

Os modelos pré-clínicos têm sido amplamente empregados na busca da compreensão dos eventos fisiopatológicos responsáveis pelo desenvolvimento da asma (GUALDI et al., 2010). Vários aspectos dessa doença complexa têm sido investigados de forma experimental, e com isso espera-se que um maior avanço nesta área facilite o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas efetivas.

Diferentes espécies animais são utilizadas na avaliação do processo inflamatório das vias aéreas, incluindo camundongos (BONFIELD et al., 2010), ratos (LIN et al., 2013), coelhos (KAMARUZAMAN et al., 2013) e cavalos (BARUSSI et al., 2016). Dentre elas, destacam-se os camundongos da linhagem Balb/c. São animais isogênicos que desenvolvem uma forte resposta imunológica T_H2 com níveis aumentados de IgE após exposição à ovalbumina (OVA), padrão-ouro em animais de laboratório (SHIN et al., 2009; MULLANE; WILLIAMS, 2014).

Os modelos experimentais de asma em camundongos não reproduzem exatamente a doença humana, pois os sinais clínicos não são passíveis de investigação. Os modelos animais auxiliam no entendimento dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes à asma e na identificação de novos alvos para intervenções terapêuticas e tratamentos potenciais (KUMAR et al., 2016).

O tratamento da asma experimental com CTMs tem demonstrado a participação destas no reparo tecidual. Entende-se que os efeitos imunomodulatórios parácrinos sejam responsáveis pela melhora do processo inflamatório e do

remodelamento pulmonar (KNIGHT et al., 2010; GAO et al., 2016). Diversos estudos publicados revelam resultados que contribuem para este entendimento.

No estudo de Kang et al. (2017), os camundongos Balb/c foram sensibilizados via intraperitoneal (IP) com 75 microgramas (μg) de OVA + 2 miligramas (mg) de hidróxido de alumínio. O transplante de 5×10^5 CTMs derivadas de sangue de cordão umbilical humano ocorreu pela veia lateral da cauda dos animais, antes do início da provocação alergênica. As vias aéreas foram provocadas pela via intranasal (IN) com 50 μg de OVA. A avaliação da hiperresponsividade aconteceu no dia 32 e as demais análises ocorreram no dia 33. As CTMs atenuaram significativamente a hiperresponsividade das vias aéreas e o infiltrado eosinofílico no LBA, reduziram os níveis séricos de IgE e IgG1 e as interleucinas T_H2 no tecido pulmonar e no baço. Entretanto, houve aumento da porcentagem de células T reg. Estes resultados sugerem que o tratamento com CTMs xenogênicas reduziu a inflamação induzida por OVA e que esta pode ser mediada por células T reg.

Chan et al. (2016) sensibilizaram camundongos Balb/c via IP com 50 μg de OVA + 0,8 mg de hidróxido de alumínio. A provocação alergênica foi realizada via inalatória (IH) com 2% de OVA. A infusão de 1×10^6 CTMs obtidas da Geleia de Wharton de cordão umbilical humano ocorreu pela veia lateral da cauda. A avaliação da hiperresponsividade das vias respiratórias aconteceu no dia 29 e as demais análises no dia 30 (9 dias após transplante). No grupo tratado houve diminuição significativa do infiltrado de eosinófilos e linfócitos no LBA e concentração de IL-5 em sobrenadante de culturas de esplenócitos. Houve redução relativa da hiperresponsividade das vias aéreas. Esses dados sugerem que as CTMs xenogênicas suprimiram os sintomas da asma e o efeito imunomodulador resultou da supressão da resposta T_H2 .

A pesquisa realizada por Ogulur et al. (2014) utilizou camundongos Balb/c. Os animais foram sensibilizados via IP com 10 μg de OVA + hidróxido de alumínio e provocados por exposição a aerossol com 1% de OVA. O tratamento foi realizado com $2,5 \times 10^5$ CTMs de medula óssea de camundongo pela veia lateral da cauda. As avaliações ocorreram 14 dias após transplante. Os resultados demonstraram redução significativa das alterações histopatológicas incluindo membrana basal, epitélio, músculo liso e hiperplasia de células caliciformes nas vias aéreas e migração de CTMs para tecidos pulmonares. Além disso, as CTMs aumentaram significativamente

a resposta de TReg em animais tratados. Os dados deste estudo revelaram que as CTMs alogênicas migraram para o tecido pulmonar e suprimiram as alterações histopatológicas da asma.

O presente estudo foi realizado em camundongos Balb/c, o qual utilizou a OVA livre de adjuvante para o desenvolvimento do modelo experimental de asma e as avaliações ocorreram em três momentos diferentes: Dia 0, 7 ou 14 após o tratamento com CTMs de medula óssea humana. Nesse cenário, levantou-se a hipótese de que as CTMs poderiam controlar a resposta inflamatória e reverter o remodelamento das vias aéreas dos animais, através de suas propriedades imunomoduladoras.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as propriedades imunomoduladoras das CTMs de medula óssea humana em camundongos Balb/c submetidos ao modelo experimental de asma alérgica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar um modelo experimental de inflamação pulmonar compatível com a asma alérgica em camundongos Balb/c;
- Avaliar o remodelamento das vias aéreas;
- Caracterizar as subpopulações de células inflamatórias no LBA;
- Avaliar a participação de mediadores da inflamação na asma alérgica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório Experimental de Cultivo Celular e no Laboratório de Diagnóstico e Cirurgia Experimental do Núcleo de Tecnologia Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) e obteve financiamento pela Fundação Araucária na Chamada Universal nº 05/2011, parecer nº 22701. Os experimentos iniciaram após aprovação pelos Comitês de Ética da PUCPR: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - nº 04425212.6.0000.0020 e Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) - nº 724.

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo experimental controlado e randomizado, que consistiu das etapas apresentadas na figura 2:

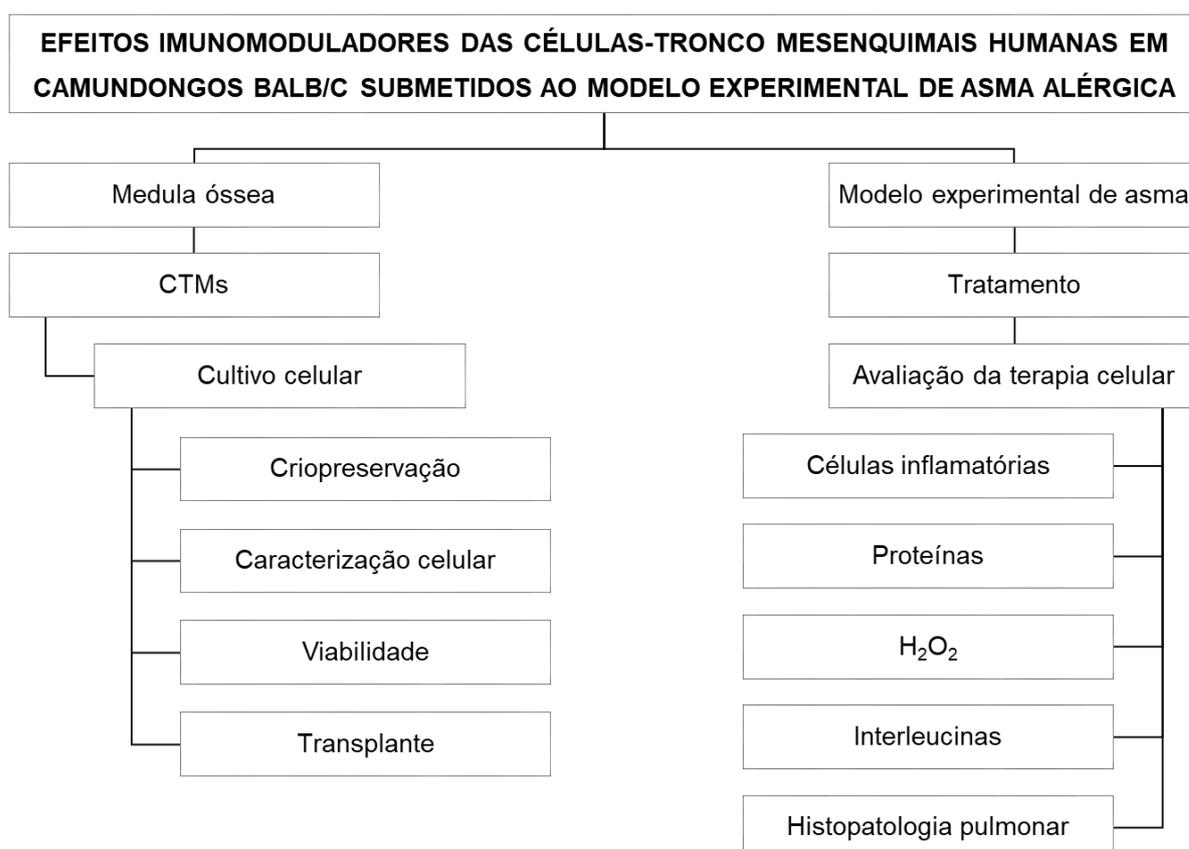


Figura 2 - Delineamento do estudo: Obtenção e caracterização das células-tronco mesenquimais de medula óssea humana e avaliação da terapia celular em modelo experimental de asma. CTMs: Células-tronco mesenquimais; LBA: Lavado broncoalveolar; H₂O₂: Peróxido de hidrogênio.

3.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA HUMANA

3.2.1 Obtenção da medula óssea humana

Foram utilizadas células mononucleares isoladas a partir de 5 mL de medula óssea humana, obtidas de quatro pacientes portadores de cardiomiopatia dilatada, envolvidos na pesquisa clínica “Tratamento autólogo de células mesenquimais cultivadas e expandidas no tratamento da cardiomiopatia isquêmica grave e refratária” - CEP: nº 0005710/12 e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP): nº 0378.0.084.000-09. Não foram incluídas medulas de pacientes portadores de doenças infecciosas e/ou neoplásicas malignas ou em tratamento de radioterapia e/ou quimioterapia, e ainda, aqueles que não consentissem livremente em participar da pesquisa.

3.2.2 Isolamento e cultivo das CTMs humanas

O material medular coletado na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Curitiba foi transportado para o Laboratório Experimental de Cultivo Celular da PUCPR, onde foi realizado o isolamento das células mononucleares da medula óssea humana, bem como o cultivo e caracterização das CTMs, conforme descrito por Rebelatto et al. (2008).

O volume de medula óssea coletado foi diluído em meio Dulbecco modificado por Iscove (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium* - IMDM) (catálogo:12200-036, Gibco Invitrogen, Carlsbad, USA), na proporção de 1:2, e colocado sob o gradiente de densidade Histopaque (cat.: 10771, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) a 1,077 g/mL. Após centrifugação a 400 *g* por 30 min, o anel de mononucleares foi coletado e transferido para outro tubo onde foi lavado em meio IMDM (figura 3). As hemácias foram lisadas com 5 mL de tampão hemolítico por 5 min a 37°C e novamente centrifugadas.

Após contagem em câmara de Neubauer (Boeco Germany, Hamburg, Alemanha), 1×10^7 células mononucleares foram transferidas para frascos de 75 cm² (TPP, Trasadingen, Suíça), armazenados em incubadora (Thermo Forma, São Paulo, Brasil) aquecida a 37°C, com 5% de tensão de dióxido de carbono (CO₂) e 95% de ar

umidificado. O meio IMDM utilizado nos frascos foi suplementado com 15% de soro bovino fetal (cat:12657-029, Gibco Invitrogen, Carlsbad, USA) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (cat: 15140-122, Gibco Invitrogen, Carlsbad, USA). As culturas foram monitoradas em microscópio invertido CK40 (Olympus, São Paulo, Brasil), três vezes por semana, permitindo assim o acompanhamento visual do processo de adesão e proliferação celular.

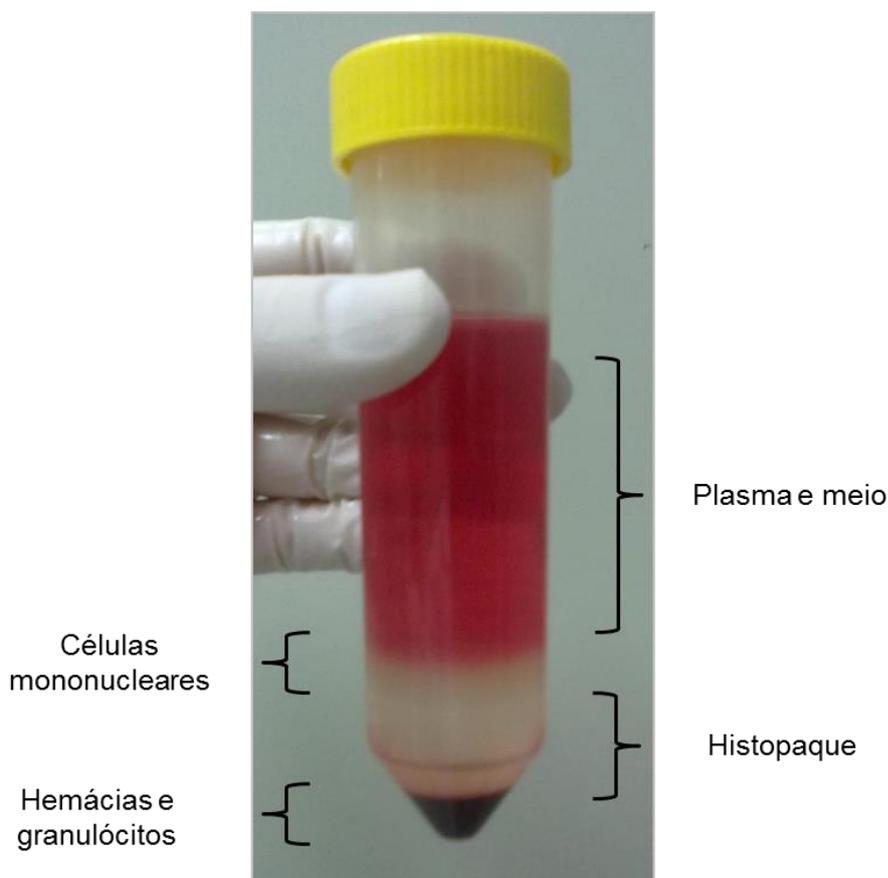


Figura 3 - Isolamento de células mononucleares de medula óssea humana. Após centrifugação com o gradiente Histopaque, ocorreu a separação da amostra pela densidade: Plasma e meio, células mononucleares, histopaque, e hemácias e granulócitos.

Aproximadamente no quinto dia após o isolamento ocorreu a primeira troca do meio de cultura. As demais trocas de meio de cultura ocorreram a cada 48 a 72 horas. Quando atingiram aproximadamente 90% de confluência, as células foram dissociadas pela ação da tripsina-EDTA 0,25% (cat: 25200-072, Gibco Invitrogen, Carlsbad, USA) e expandidas para o dobro ou triplo do número de frascos de 75 cm².

As CTMs permaneceram em cultivo até a obtenção do número de células para o transplante, que ocorreu entre as passagens (P) 3 e 5. Neste momento foi realizada a caracterização celular por citometria de fluxo. O excedente de CTMs foi submetido

à criopreservação caso houvesse a necessidade de repetir algum experimento deste estudo.

3.2.3 Imunofenotipagem das CTMs e viabilidade celular

No dia do transplante, as CTMs foram caracterizadas de acordo com os marcadores definidos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006) e a viabilidade das amostras também foi determinada.

Para cada amostra foram preparados cinco tubos de citometria, cada um com 1×10^6 células. As células foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos (min), com freio e aceleração, à temperatura ambiente (T.A.) e incubadas com os anticorpos conjugados com Isocianato de Fluoresceína (do inglês, *Fluorescein Isothiocyanate* - FITC), Ficoeretrina (do inglês, *Phycoerythrin* - PE), Ficoeritrina e Cianina (do inglês, *Phycoerythrin and the Cyanine Dye Cy5* - PE-Cy5) e Aloficocianina (do inglês, *Allophycocyanin* - APC) e com o corante vital 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD) por 30 min, na ausência de luz, à T.A. As células foram novamente centrifugadas com 500 microlitros (μL) de tampão fosfato salina (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) (cat: 20012-027, Gibco Invitrogen, Carlsbad, USA) a 400 g por 10 min. As células foram ressuspensas em 300 μL de PBS com 1% de paraformaldeído (cat: P6148, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). As amostras foram adquiridas no Citômetro de Fluxo BD FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, USA) e analisadas pelo software FlowJo v8.0.2 (Tree Star, Ashland, USA). Os resultados são expressos em porcentagem (%) (quadro 1).

Quadro 1 - Marcadores de células-tronco mesenquimais humanas (DOMINICI et al., 2006). A viabilidade celular foi determinada pela Anexina (marcador de apoptose) e pelo corante vital 7-AAD. Foram utilizados marcadores conjugados aos fluorocromos: FITC, PE, PE-Cy5 e APC (BD Pharmingen, San Jose, USA).

Marcador	Fluorocromo	Catálogo	Fabricante	Diluição anticorpo: amostra
Controle isotópico	FITC	555748	BD Pharmingen	1:20
Controle isotópico	PE	555787	BD Pharmingen	1:20
Controle isotópico	PE-Cy5	555750	BD Pharmingen	1:20
Controle isotópico	APC	555751	BD Pharmingen	1:20
CD29	APC	559883	BD Pharmingen	1:20
CD73	PE	550257	BD Pharmingen	1:20
CD90	PE	555596	BD Pharmingen	1:100
CD105	APC	562408	BD Pharmingen	1:20
CD166	PE	559263	BD Pharmingen	1:20
HLA-DR	PE-Cy5	551375	BD Pharmingen	1:33
CD14	FITC	555397	BD Pharmingen	1:20
CD19	FITC	555412	BD Pharmingen	1:20
CD34	APC	555824	BD Pharmingen	1:20
CD45	FITC	555482	BD Pharmingen	1:20
Anexina V	PE	556422	BD Pharmingen	1:20
7-AAD	-	559925	BD Pharmingen	1:20

CD: *Cluster of differentiation*; HLA: *Human leukocyte antigens*; 7-AAD: *7-Aminoactinomycin D*; FITC: *Fluorescein isothiocyanate*; PE: *Phycoerythrin*; PE-Cy5: *Phycoerythrin and the cyanine dye Cy5*; APC: *Allophycocyanin*.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram avaliados no estudo 100 camundongos Balb/c machos, com seis a oito semanas de idade, e peso médio de 30,86 gramas (g) (desvio padrão - DP: 0,98), provenientes do biotério da PUCPR.

Os animais foram mantidos em gaiolas (até quatro animais por caixa) com dimensões de 30 centímetros (cm) de comprimento, 20 cm de largura e 13 cm de altura. A caixa era forrada com uma camada de cepilho (Inbrasfama, São José dos Pinhais, Brasil), que era trocada duas vezes por semana ou conforme necessidade. Os camundongos permaneceram em um ambiente controlado, com temperatura entre 19-21°C, umidade relativa de aproximadamente 70% e ciclo claro/escuro de 12/12 horas (h), recebendo a ração CR1 Nuvilab (Quimtia, Colombo, Brasil) e água *ad libitum*.

3.4 MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO À ASMA E TERAPIA CELULAR

O modelo experimental de indução à asma utilizado neste estudo foi adaptado de Xisto et al. (2005), o qual utilizou a OVA (cat: A5503, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) como alérgeno. Todas as intervenções foram realizadas por um único médico veterinário durante todo o período do estudo, a fim de se obter padronização na execução dos métodos.

Resumidamente, os animais dos grupos A, 7A, 7AT, 14A e 14AT foram sensibilizados com 10 µg de OVA em 100 µL de solução fisiológica via IP, nos dias 0, 2, 4, 7, 9 e 10. As vias aéreas destes animais foram provocadas com 20 µg de OVA em 20 µL de solução fisiológica administradas por via intratraqueal (IT), nos dias 15, 18 e 21. Nestes procedimentos, os grupos C, 7C e 14C receberam apenas solução fisiológica nos mesmos volumes. No dia 22, os animais dos grupos C e A foram eutanasiados, enquanto os grupos 7C, 7A, 14C e 14A receberam infusão de solução fisiológica via IT e os animais dos grupos 7AT e 14AT foram transplantados com 1×10^6 CTMs em 20 µL de solução fisiológica pela mesma via. No dia 29 (sete dias após tratamento), os grupos 7C, 7A e 7AT foram submetidos à eutanásia. Os animais dos grupos 14C, 14A e 14AT foram eutanasiados no dia 36 (14 dias após tratamento). (figura 4).

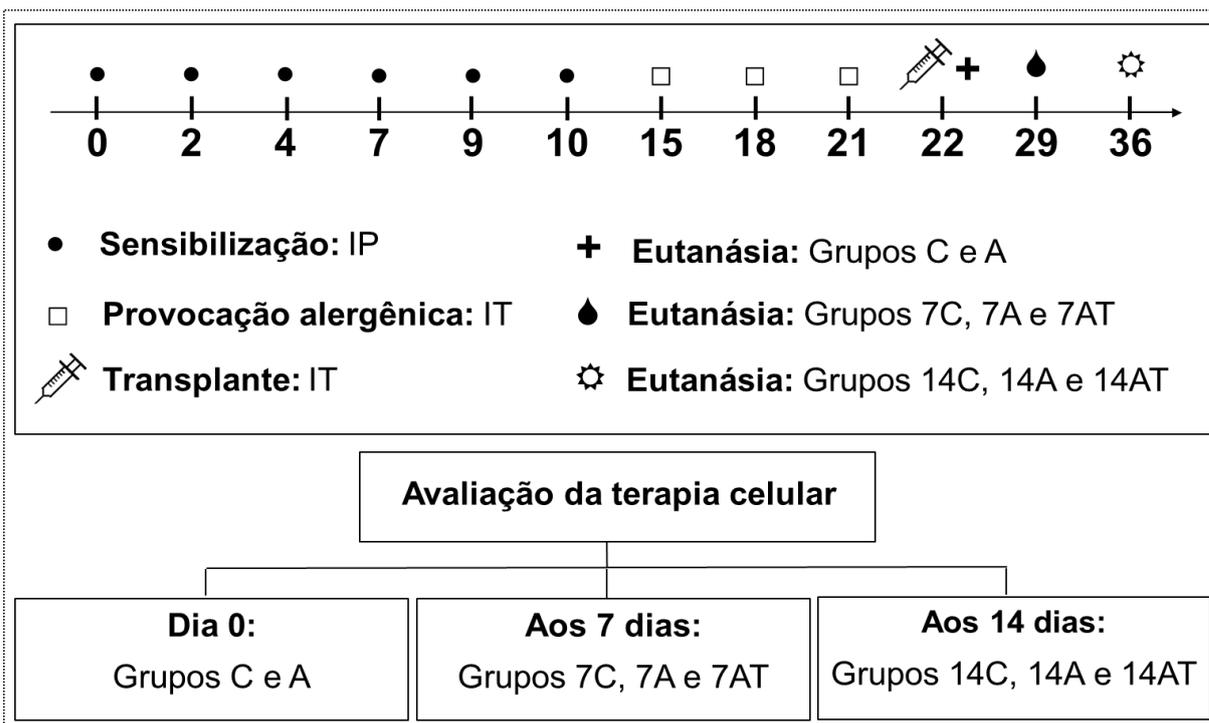


Figura 4 - Etapas do modelo experimental de indução à asma e avaliação pós-tratamento de células-tronco mesenquimais humanas em camundongos Balb/c: Sensibilização (dias 0-10), provocação alérgica (dias 15-21), transplante (dia 22) e eutanásia (dias 22, 29 e 36). A avaliação da terapia celular ocorreu no dia do transplante (grupos C e A), aos sete dias (grupos 7C, 7A e 7AT) e aos 14 dias (grupos 14C, 14A e 14AT). Adaptado de Xisto et al. (2005). IP: Intraperitoneal; IT: Intratraqueal; C: Controle e A: Asma (Dia 0); 7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento (Dia 7); 14C: Controle, 14A: Asma; 14AT: Tratamento (Dia 14).

As administrações intratraqueais da provocação alérgica, transplante, coleta de sangue e LBA ocorreram mediante anestesia com 100 mg/kg cloridrato de ketamina 5% (König, Santana de Parnaíba, Brasil) associado a 10 mg/kg de cloridrato de xilazina 2% (Vetbrands, Paulínia, Brasil). A fim de evitar a redução na temperatura corporal durante a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma cama aquecida (Master Digital SA-300; Ch@mpion Electronics, Porto Alegre, Brasil). Uma pequena incisão (aproximadamente 1 cm) na pele foi realizada sobre a região cervical ventral mediana (sobre a traqueia), no sentido crânio-caudal. Os músculos cervicais ventrais foram divulsionados e após a identificação da traqueia as soluções (provocação alérgica: solução fisiológica ou OVA / transplante: solução fisiológica ou CTMs) foram administradas por meio de uma seringa de insulina ultrafina de 0,3 mL (Becton Dickson, Curitiba, Brasil) (figura 5).

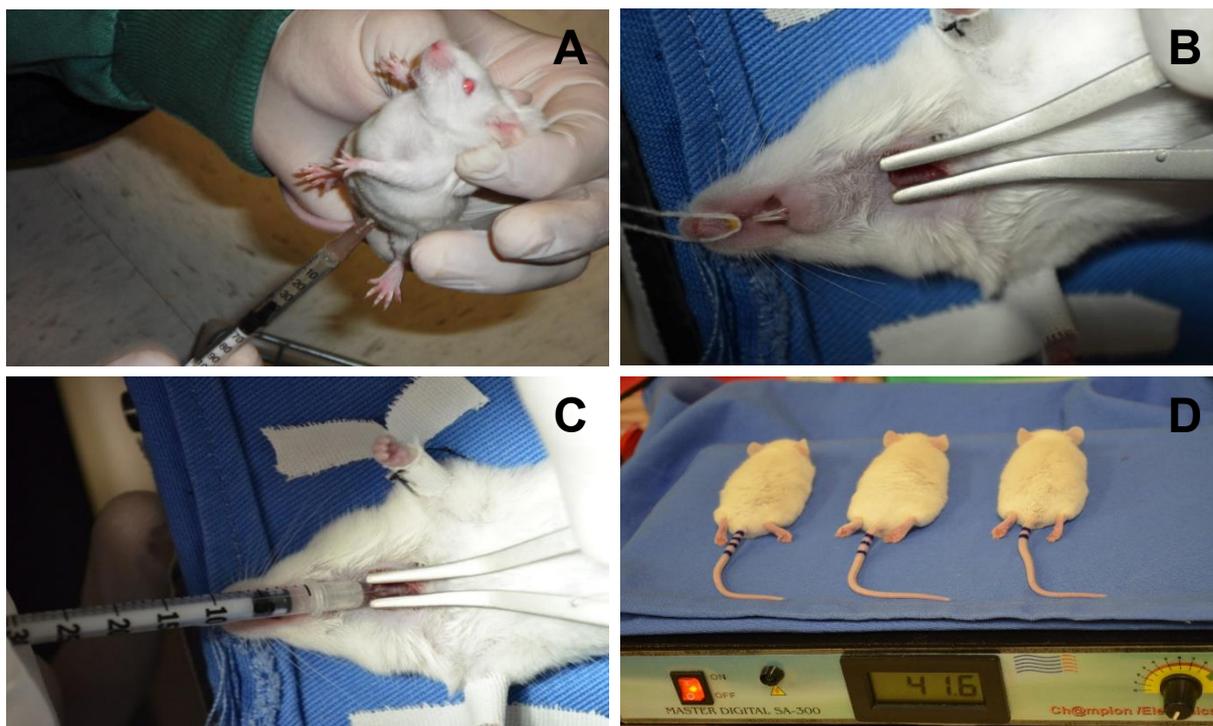


Figura 5 - Procedimentos intratraqueais: A. Aplicação anestésica via intraperitoneal em camundongos Balb/c. B. Exposição da traqueia para administração intratraqueal. C. Administração intratraqueal. D. Recuperação anestésica em cama aquecida para suporte na temperatura corporal.

3.5 LBA E SORO: COLETA E PROCESSAMENTO

Momentos antes da eutanásia foi realizada a coleta de sangue e LBA para avaliação da terapia celular. O sangue foi coletado via punção intracardíaca (0,5 a 1 mL) e transferido para um microtubo estéril. Para obtenção do soro, o sangue foi acondicionado em estufa (Nova Ética, São Paulo, Brasil) aquecida a 37°C por 30 min, a 4°C por 15 min. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 800 g por 10 min. O soro foi transferido para um novo microtubo e armazenado a -20°C, para posterior avaliação das interleucinas.

O LBA foi obtido imediatamente após a coleta do sangue dos animais. Em seguida, a traqueia foi exposta (conforme descrito na seção modelo de indução à asma e avaliação da terapia celular) e nela foi introduzido um cateter intravenoso 18 G (Solidor, Osasco, Brasil), por onde foi administrado, lentamente, três vezes o volume de 1 mL de solução fisiológica. O LBA recuperado foi transferido para microtubos que foram centrifugados a 300 g por 8 min a 4°C (MUEHLMANN et al., 2010). O sobrenadante foi separado em alíquotas e armazenado a -20°C para a determinação

de proteínas totais, H₂O₂ e interleucinas. O *pellet* celular foi ressuscitado em PBS para a avaliação citológica total e diferencial. Foram excluídas do estudo amostras que continham sangue no LBA.

3.5.1 Avaliação citológica total e diferencial do LBA

A contagem total de células do LBA foi realizada em câmara de Neubauer e os resultados são demonstrados em número de células totais x10⁴ / mL de LBA.

Para a avaliação citológica diferencial, foram preparadas lâminas com 10 µL do *pellet* celular coradas pela técnica de Romanowski (cat.: COH06, Newprov, Pinhais, Brasil). Foram contadas 200 células em aumento de 1000x no microscópio óptico Olympus CX41 (Olympus, São Paulo, Brasil).

3.5.2 Concentração de proteínas totais no LBA

A concentração de proteínas totais presentes no LBA foi mensurada pelo método de Bradford (1976), que utiliza o reagente *Coomassie Brilliant Blue*. A emissão da fluorescência foi detectada no filtro de 595 nm em leitora de microplaca (Nova Analítica, São Paulo, Brasil) e os resultados são apresentados como µg/mL.

3.5.3 Detecção de H₂O₂ no LBA

A presença de H₂O₂ no LBA foi avaliada com o kit Amplex Red (cat: A22188, Invitrogen, Eugene, EUA), conforme recomendação do fabricante. A emissão da fluorescência foi detectada no filtro de 580 nanômetro (nm) em leitora de microplaca e os resultados são demonstrados em micromolar (µM).

3.5.4 Quantificação de interleucinas no LBA e no soro

A concentração das interleucinas pró e anti-inflamatória no LBA e no soro foi determinada pelo CBA Flex SET (BD Bioscience, San Diego, USA), de acordo com recomendações do fabricante. As interleucinas foram quantificadas simultaneamente

no citômetro de fluxo FACSCalibur e analisados no software FlowJo v10 (Tree Star, Ashland, USA). Os resultados são apresentados em pg/mL (quadro 2).

Quadro 2 - Interleucinas anti e pró-inflamatórias avaliadas no LBA e no soro dos animais.

Interleucina	Atividade	Catálogo	Fabricante
IL-5	Pró-inflamatória	558302	BD Bioscience
IL-13	Pró-inflamatória	558349	BD Bioscience
IL-17A	Pró-inflamatória	560283	BD Bioscience
TNF- α	Pró-inflamatória	558299	BD Bioscience
IL-10	Anti-inflamatória	558300	BD Bioscience

IL: Interleucina; TNF: *Tumor necrosis fator- α* .

3.6 PULMÕES: COLETA E AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

Após coleta dos materiais biológicos, foi realizada a eutanásia dos camundongos de forma ética, indolor e individualizada. O procedimento foi realizado por overdose anestésica com cloridrato de ketamina 5% (400 mg/kg/IP) associado ao cloridrato de xilazina 2% (50 mg/kg/IP).

Em seguida, os pulmões foram cuidadosamente retirados da cavidade torácica e lavados em solução fisiológica para a remoção do sangue presente na superfície. Algumas amostras de pulmão foram armazenadas a -20° para futuros estudos. Os demais pulmões foram acondicionados em frascos contendo formalina tamponada a 10% (Biotec, Pinhais, Brasil) por no mínimo 48 horas. Após este período os pulmões inteiros foram transferidos para cassetes e encaminhados ao Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR para serem processados por técnicas histológicas. O remodelamento das vias aéreas foi avaliado através de cortes histológicos pulmonares corados com Hematoxilina & Eosina (do inglês, *Hematoxylin and Eosin* - H&E), ácido Periódico-Schiff (do inglês, *Periodic acid-Schiff* - PAS) e tricrômio de Masson (TM).

3.6.1 Avaliação do músculo liso, epitélio de revestimento e infiltrado inflamatório

A coloração com H&E permite avaliar a morfologia pulmonar, a presença e intensidade de infiltrado inflamatório na região peribronquiolar e área adjacente, o

espessamento do músculo liso e as alterações no epitélio de revestimento, com ênfase na descamação celular para o lúmen dos bronquíolos.

A técnica aplicada consistiu da desparafinização dos cortes histológicos em xilol (Labmaster, Pinhais, Brasil) aquecido por 5 min (três vezes), hidratação em álcool 99% (Labmaster, Pinhais, Brasil) por 1 min (três vezes) e lavagem em água corrente por 5 min. Os cortes pulmonares foram corados com Hematoxilina de Harris (cat.: 620503, Laborclin, Pinhais, Brasil) por 8 min, lavados novamente em água corrente por 5 min, corados com Eosina (CAS 17372-87-1, Nuclear, Diadema, Brasil) por 6 min e lavados novamente em água corrente. Os cortes foram desidratados em álcool 95%, 99% (três vezes) e xilol (três vezes) por 1 min cada. Para finalizar as lâminas foram seladas com resina adesiva Histolan (Labmaster, Pinhais, Brasil) e lamínula de vidro Clean Slide (cat.: EP-51-30194, EasyPath, São Paulo, Brasil).

3.6.2 Avaliação da distribuição de células caliciformes e produção de muco

A coloração com PAS, sem digestão enzimática, proporciona a identificação do muco produzido pelas células caliciformes.

Inicialmente foi realizada a desparafinização e hidratação dos cortes histológicos. Em seguida, foram lavados em água destilada e colocados no ácido periódico a 1% (cat.: T146-05, J.T. Baker, Phillipsburg, USA) por 20 min. Os cortes foram lavados novamente em água destilada (por três vezes) e então expostos ao reativo de Feulgen - fuccina básica (C.I. 42510, Nuclear, Diadema, Brasil), por 30 min, a 4°C. Em seguida foram lavados em água corrente por 10 min (duas vezes) e por mais 5 min após a substituição da água. Os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris por 6 min e lavados por 10 min em água destilada. Por fim, os cortes foram desidratados e as lâminas foram seladas com resina adesiva Histolan e lamínula de vidro.

3.6.3 Avaliação da deposição de colágeno

A coloração com TM demonstra a deposição de colágeno na região peribronquiolar. Para a realização desta técnica foi utilizado o kit comercial Tricrômio

de Masson (cat. EP-11-20013, EasyPath, São Paulo, Brasil) conforme instruções do fabricante.

Resumidamente, as lâminas foram desparafinizadas em xilol por 5 min (duas vezes), hidratadas em álcool 99% por 1 min (duas vezes), 95% e 70% por 1 min cada, e lavadas em água destilada por 5 min. Em seguida, os cortes histológicos foram incubados com uma solução contendo de hematoxilina férrica de Weiger por 10 min, lavados com água destilada, incubados com fucsina por 4 min, lavados novamente em água destilada, incubados com ácido fosfomolibdico por 5 min e azul de anilina por 5 min. As lâminas foram lavadas em água destilada e desidratadas em álcool por 1 min 95% (três vezes), 99% por 1 min (duas vezes) até o xilol por 5 min (duas vezes). Por fim, as lâminas foram seladas com resina adesiva Histolan e lamínula de vidro.

3.6.4 Análise histopatológica

Imagens de trinta bronquíolos (quinze de cada pulmão), selecionados aleatoriamente a partir dos cortes histológicos, foram capturadas pela câmera digital DP25 (Olympus, São Paulo, Brasil) acoplada ao microscópio óptico CX41 (Olympus, São Paulo, Brasil). As imagens foram adquiridas pelo software DP2-BSW (Olympus, São Paulo, Brasil) em dois aumentos: 200x e 400x.

Dois pesquisadores avaliaram a presença e intensidade da inflamação pulmonar por meio de análises semi-quantitativas, utilizando um sistema de escores adaptado de Sun et al. (2012).

Dessa forma, os cortes histológicos pulmonares corados com HE e TM foram analisados de acordo com o quadro 3:

Quadro 3 - Avaliação da presença e intensidade da inflamação pulmonar em cortes histológicos corados com hematoxilina & eosina e tricrômio de Masson, utilizando um sistema de escore (adaptado de: SUN et al., 2012).

Ausente (grau 0)
<p><i>Intensidade: 0%</i> Características:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ausência de inflamação detectável; • Bronquíolo saudável com arquitetura preservada; • Fibras colágenas de acordo com a normalidade.
Leve (grau 1)
<p><i>Intensidade: 1-33%</i> Características:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inflamação leve; • Infiltrado com reduzido número de células inflamatórias; • Leve aumento na deposição de colágeno na região peribronquiolar; • Espessamento discreto da camada epitelial e muscular; • Pouca descamação do epitélio.
Moderado (grau 2)
<p><i>Intensidade: 34-66%</i> Características:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inflamação moderada; • Regiões com infiltrado inflamatório mais disseminado, com moderado número de células inflamatórias; • Presença aumentada de colágeno circundando o bronquíolo; • Músculo liso e epitélio mais espessos; • Presença de células destacadas no lúmen do bronquíolo.
Intenso (grau 3)
<p><i>Intensidade: 67-100%</i> Características:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inflamação intensa; • Remodelamento pulmonar apresentando alterações estruturais significativas; • Região peribronquiolar difusa, com intenso número de células inflamatórias e acentuada deposição de colágeno; • Espessamento significativo na camada epitelial e muscular lisa; • Descamação frequente do epitélio.

A produção de muco foi estimada pela presença de células positivas para a coloração com PAS nos cortes pulmonares, a partir da sobreposição de um círculo dividido em oito regiões com ângulos centrais congruentes, avaliação adaptada de Firinci et al. (2011) (figura 6).

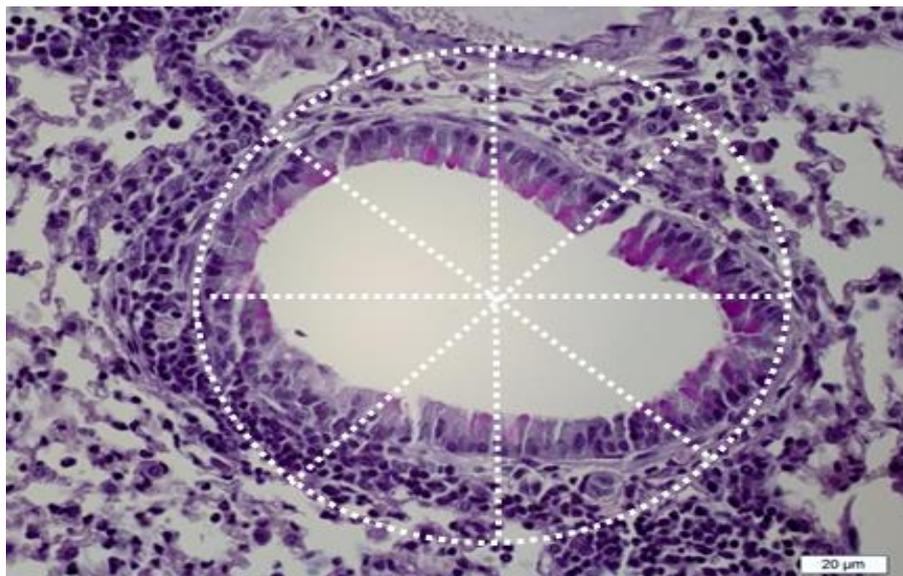


Figura 6 - Avaliação da produção de muco nos bronquíolos. As células coradas em rosa foram estimadas a partir da sobreposição de um círculo dividido em oito regiões com ângulos centrais congruentes (adaptada de FIRINCI et al., 2011). Aumento: 400x

Cada região corresponde a 12,5% do círculo. A soma das áreas marcadas positivamente foi categorizada de acordo com o sistema de escore mencionado no quadro 3.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para averiguar a distribuição de normalidade das variáveis quantitativas foi aplicado o teste de D'Agostino. Para os dados paramétricos em condição de normalidade (células totais, diferencial de células inflamatórias, proteínas, H_2O_2 e interleucinas) utilizou-se o teste *t* de *student* para comparar as médias entre os grupos C vs. A e 7AT vs. 14AT, e *one-way* ANOVA seguido de Tukey para os grupos 7C vs.7A. vs. 7AT e 14C vs.14A. vs. 14AT. Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão.

Na análise histopatológica utilizou-se os testes não-paramétricos de Mann-Whitney na comparação entre os grupos C vs. A e 7AT vs. 14AT e Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para as múltiplas comparações *post-hoc* para os grupos 7C vs.7A. vs. 7AT e 14C vs.14A. vs. 14AT. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 5.03 para Windows (GraphPad, La Jolla, USA). Considerou-se significância resultados com $p < 0,05$ em todas as avaliações realizadas.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CTMS DA MEDULA ÓSSEA HUMANA

As primeiras colônias de CTMs, obtidas a partir de cada amostra de medula óssea humana, foram observadas aderidas aos frascos em torno do quinto dia após o isolamento. Em cultivo, as CTMs apresentaram morfologia fibroblastóide. Quando as culturas atingiram aproximadamente 90% de confluência, as células foram dissociadas por ação da enzima tripsina 0,25% e replaqueadas em mais frascos, até a P3 (figura 7).

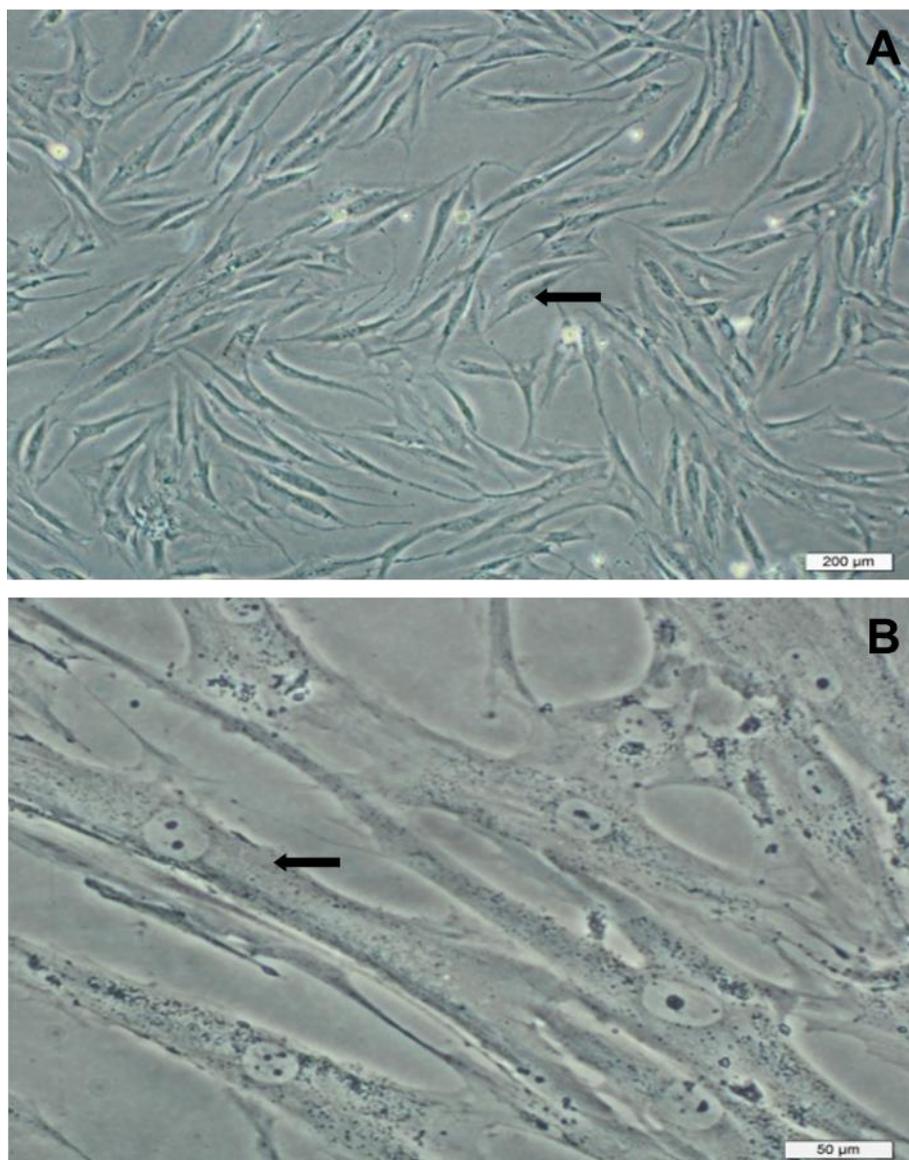


Figura 7 - Células-tronco mesenquimais de medula óssea humana, cultivadas até a passagem 3. Cultura com 90% de confluência. As células apresentam aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide (seta). Aumentos: 100x (A) e 400x (B).

4.2 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CTMS

As CTMs isoladas da medula óssea humana foram caracterizadas por citometria de fluxo de acordo com os marcadores definidos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006).

A média e o desvio padrão dos resultados obtidos revelou alta expressão de CD29 (94,6%), CD73 (96,0%), CD90 (96,1%), CD105 (91,8%) e CD166 (90,6%) e baixa expressão dos marcadores HLA-DR (2,3%), CD14 (1,3%), CD19 (1,2%), CD34 (1,4%) e CD45 (1,5%) (tabela 1, figuras 8 e 9).

Tabela 1 - Expressão dos marcadores de membrana das células-tronco mesenquimais de medula óssea humana. Média e desvio padrão. Resultados expressos em porcentagem (%).

		Marcadores de superfície positivos (%)				
		CD29+	CD73+	CD90+	CD105+	CD166+
Amostras	1	97,5	99,0	97,5	97,6	94,1
	2	96,7	96,8	95,5	93,2	93,8
	3	93,6	95,2	95,2	91,9	90,5
	4	90,5	92,8	96,2	84,4	84,0
	Média	94,6	96,0	96,1	91,8	90,6
	DP	3,2	2,6	1,0	5,5	4,7

		Marcadores de superfície negativos (%)				
		HLA-DR+	CD14+	CD19+	CD34+	CD45+
Amostras	1	5,5	3,9	3,8	4,8	4,1
	2	1,1	0,6	0,6	0,2	0,7
	3	1,1	0,4	0,3	0,3	0,4
	4	1,6	0,4	0,3	0,3	0,7
	Média	2,3	1,3	1,2	1,4	1,5
	DP	2,2	1,7	1,7	2,3	1,8

DP: Desvio padrão; CD: *Cluster of differentiation*; HLA: *Human leukocyte antigens*.

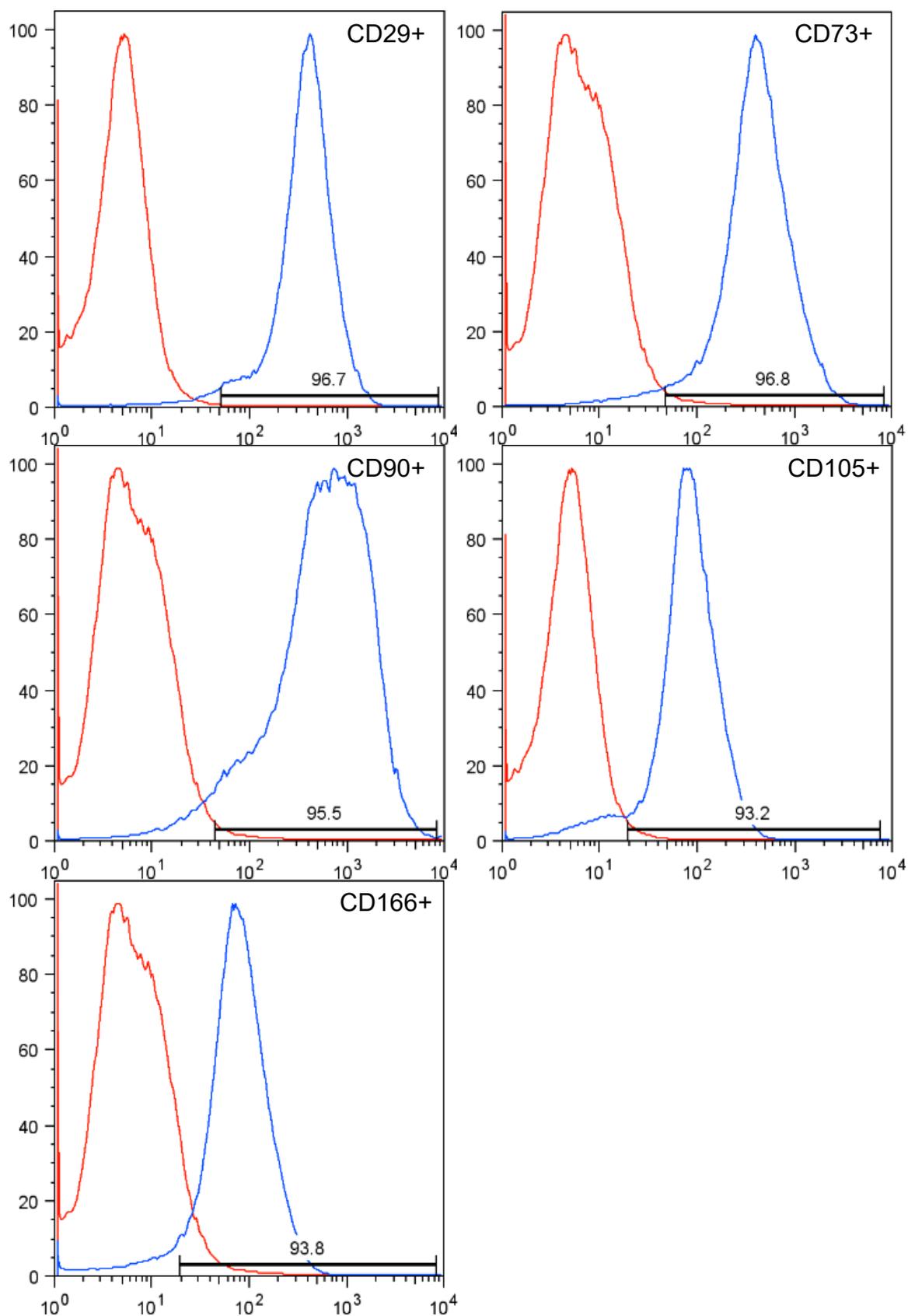


Figura 8 - Marcadores positivos de células-tronco mesenquimais humanas de uma amostra representativa de medula óssea. Dados em histogramas: Em vermelho está representado o controle isotípico e em azul os marcadores CD29, CD73, CD90, CD105 e CD166. Resultados expressos em porcentagem (%). CD: *Cluster of differentiation*.

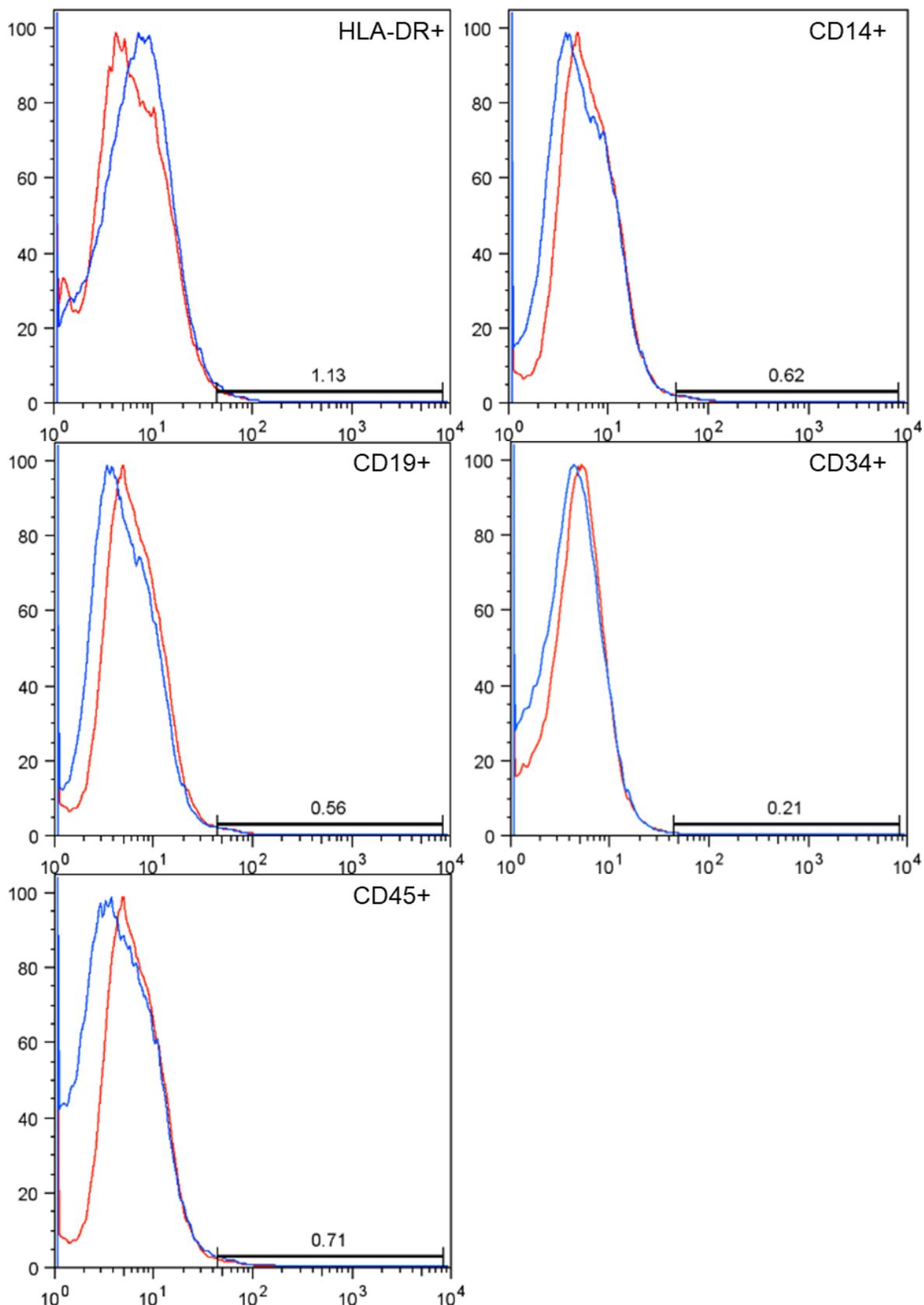


Figura 9 - Marcadores negativos de células-tronco mesenquimais humanas de uma amostra representativa de medula óssea. Dados em histogramas: Em vermelho está representado o controle isotípico e em azul os marcadores HLA-DR, CD14, CD19, CD34 e CD45. Resultados expressos em porcentagem (%). CD: *Cluster of differentiation*; HLA: *Human leukocyte antigens*.

4.3 VIABILIDADE CELULAR

As amostras apresentaram na terceira passagem, 94,92% de CTMs viáveis, 5,08% de mortalidade e 1,15% de células em apoptose (figura 10).

		Viabilidade (%)		
		Células viáveis	7-AAD+	Anexina+
Amostras	1	94,34	5,66	0,92
	2	97,04	2,96	1,45
	3	90,95	9,05	0,63
	4	97,35	2,65	1,59
Média		94,92	5,08	1,15
DP		2,97	2,57	0,45

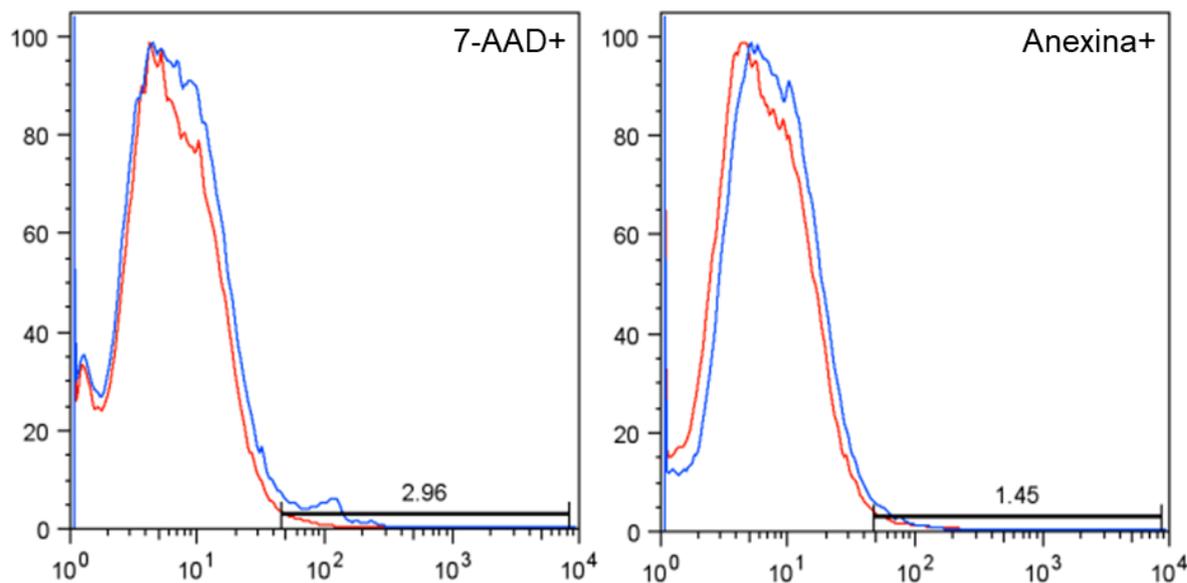


Figura 10 - Viabilidade das células-tronco mesenquimais humanas na passagem 3. O corante de ácido nucléico 7-AAD marca as células não-viáveis presentes na amostra e a Anexina V determina a porcentagem de células em apoptose. Dados em histogramas: Em vermelho está representado o controle isotópico e em azul o corante vital 7-AAD, e o marcador de células em apoptose Anexina V. Resultados expressos em porcentagem (%). 7-AAD: 7-amino-actinomicina-D.

4.4 SOBREVIDA DOS ANIMAIS

Foram submetidos ao modelo experimental de asma 100 animais. Destes, 10 foram ao óbito por asfixia imediatamente após administração intratraqueal. Como resultado, 90 animais foram avaliados no estudo, representando uma taxa de sobrevivência de 90%.

4.5 NÚMERO DE CÉLULAS TOTAIS DO LBA

Os animais do grupo 7A apresentaram maior quantidade de células totais no LBA em comparação ao 7C ($59,0 \pm 8,2$ vs. $10,8 \pm 3,3 \times 10^4/\text{mL}$, $p = 0,0006$), não havendo diferença no tratamento. No décimo quarto dia após tratamento, também havia mais células no grupo 14A em relação ao 14C ($57,9 \pm 9,9$ vs. $15,0 \pm 0,0 \times 10^4/\text{mL}$, $p < 0,0001$). Entretanto, neste momento ocorreu a redução significativa de células inflamatórias no LBA de animais do grupo 14AT quando comparado com o 14A ($15,0 \pm 5,2$ vs. $57,9 \pm 9,9 \times 10^4/\text{mL}$, $p < 0,0001$). O tratamento avaliado aos 14 dias revelou diferença estatística no grupo 14AT em relação ao 7AT, avaliado aos sete dias ($15,0 \pm 5,2$ vs. $42,0 \pm 10,5 \times 10^4/\text{mL}$, $p = 0,0115$) (gráfico 1).

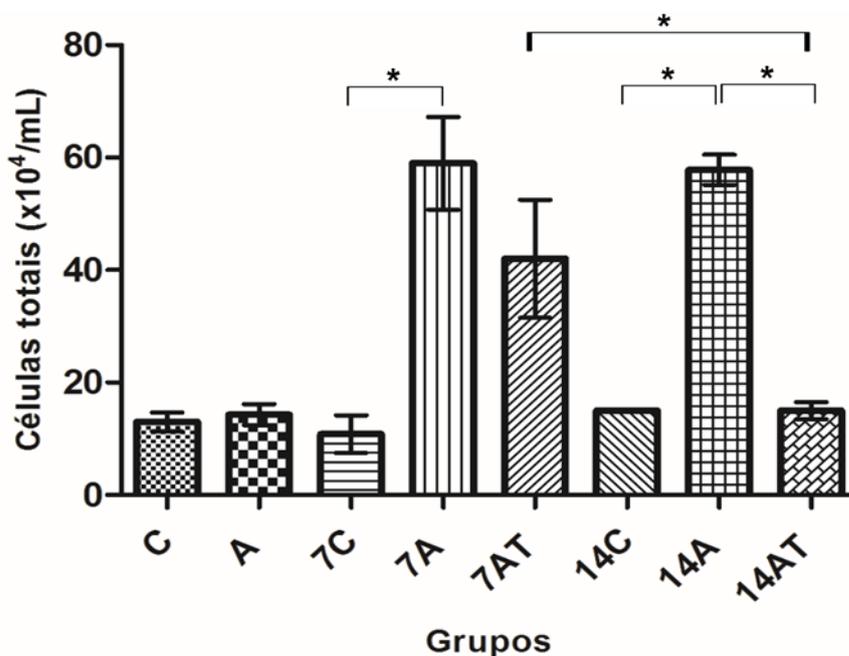


Gráfico 1 - Número total de células no LBA dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). A terapia celular mostrou resultados significativos em comparação com o grupo com asma no décimo quarto dia após tratamento de células-tronco mesenquimais. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

4.6 DIFERENCIAL DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

Houve aumento significativo no percentual de eosinófilos no LBA do grupo A comparado ao C ($16,0 \pm 8,1$ vs. $3,4 \pm 2,1\%$, $p < 0,0001$), permanecendo aos sete dias no grupo 7A em relação ao 7C ($33,8 \pm 9,2$ vs. $1,0 \pm 0,8\%$, $p < 0,0001$). O grupo 7AT, que recebeu tratamento com CTMs, apresentou redução significativa de eosinófilos em comparação ao grupo 7A, com asma e não tratado ($8,7 \pm 5,1$ vs. $33,8 \pm 9,2\%$, $p < 0,0001$). Aos 14 dias, o percentual de eosinófilos continuou aumentado no grupo 14A quando comparado ao 14C ($22,0 \pm 1,0$ vs. $2,7 \pm 1,3\%$, $p < 0,0001$). Neste momento de avaliação, não houve diferença na terapia celular. No décimo quarto dia após tratamento, a concentração de eosinófilos foi significativamente maior no grupo 14AT que no 7AT, estes avaliados no sétimo dia após tratamento ($24,8 \pm 12,6$ vs. $8,7 \pm 5,1\%$, $p = 0,0004$) (gráfico 2).

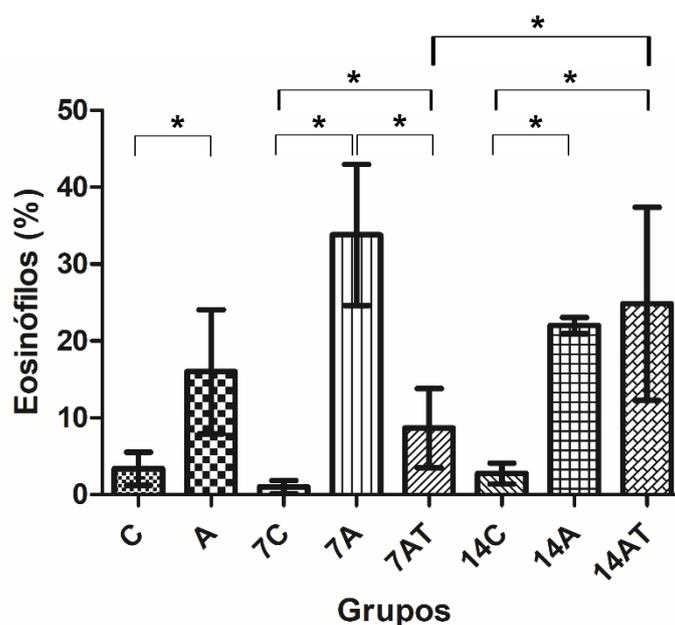


Gráfico 2 - Contagem diferencial de eosinófilos no LBA dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve diferença estatística entre os grupos A vs. C, 7AT vs. 7A e 14AT vs. 7AT. O tratamento com células-tronco mesenquimais mostrou resultados significativos no sétimo dia após tratamento. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

No grupo A houve maior percentual de linfócitos no LBA que o C ($19,0 \pm 6,9$ vs. $10,8 \pm 3,4\%$, $p = 0,004$). No sétimo dia, houve uma inversão de concentração, ou seja, o grupo 7A apresentou significativamente menos linfócitos que o 7C ($2,0 \pm 3,2$ vs. $24,3$

$\pm 17,5\%$, $p < 0,0001$) e no 7AT esta célula inflamatória estava aumentada quando comparado ao 7A ($8,8 \pm 7,1$ vs. $2,0 \pm 3,2\%$, $p = 0,0023$). Aos 14 dias, os animais do grupo 14A apresentaram maior percentual de linfócitos que o 14C ($18,0 \pm 1,0$ vs. $8,5 \pm 3,3\%$, $p < 0,0001$) e no 14AT houve redução em comparação ao 14A ($3,8 \pm 3,4$ vs. $18,0 \pm 1,0\%$, $p < 0,0001$). No décimo quarto dia após tratamento, o percentual de linfócitos no LBA do grupo 14AT foi significativamente menor comparado ao 7AT ($3,8 \pm 3,4$ vs. $8,8 \pm 7,1\%$, $p = 0,0358$) (gráfico 3).

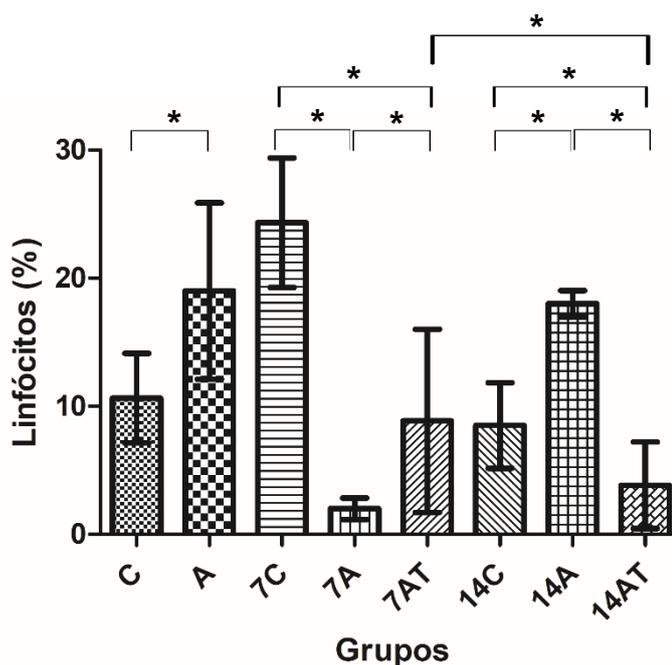


Gráfico 3 - Contagem diferencial de linfócitos no LBA dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve diferença estatística entre os grupos A vs. C, 7AT vs. 7A, 14AT vs. 14A e 14AT vs. 7AT. O tratamento com células-tronco mesenquimais mostrou resultados significativamente menores no décimo quarto dia após tratamento. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

O percentual de macrófagos no grupo A foi menor que no C ($51,8 \pm 10,0$ vs. $74,9 \pm 7,2\%$, $p < 0,0001$). Aos sete dias, o percentual continuou menor no grupo 7A quando comparado ao 7C ($44,8 \pm 8,7$ vs. $66,3 \pm 19,6\%$, $p < 0,0008$). Neste momento de avaliação, houve aumento de macrófagos no grupo 7AT em relação ao 7A ($56,3 \pm 14,7$ vs. $44,8 \pm 8,7\%$, $p = 0,0156$). Aos 14 dias, o grupo 14A apresentou menor concentração de macrófagos que o 14C ($43,0 \pm 1,0$ vs. $80,7 \pm 4,3\%$, $p = 0,0001$). Nos animais do grupo 14AT, tratados com CTMs, houve redução significativa em comparação ao 14A, que não recebeu tratamento ($0,5 \pm 0,8$ vs. $43,0 \pm 1,0\%$,

$p < 0,0001$). O percentual de macrófagos foi estatisticamente menor no grupo 14AT em comparação ao 7AT ($0,5 \pm 0,8$ vs. $56,3 \pm 14,7\%$, $p < 0,0001$) (gráfico 4).

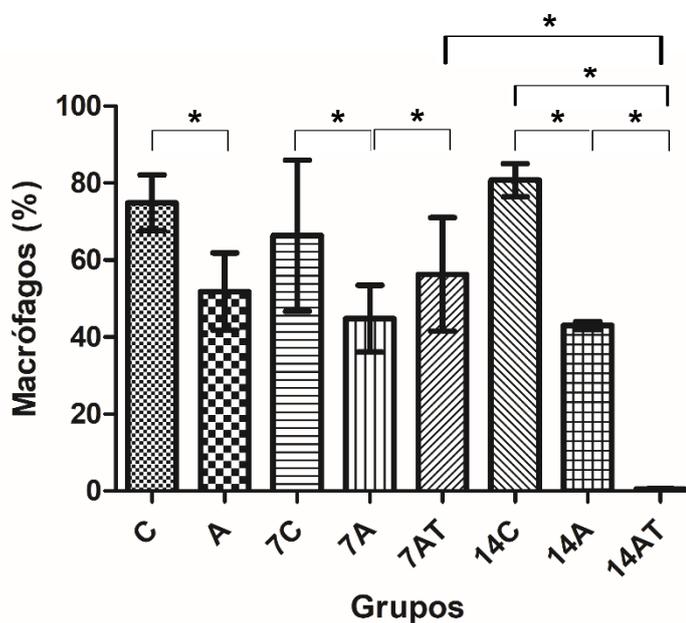


Gráfico 4 - Contagem diferencial de macrófagos no LBA dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve diferença estatística entre os grupos A vs. C, 7AT vs. 7A, 14AT vs. 14A e 14AT vs. 7AT. O tratamento com células-tronco mesenquimais mostrou resultados significativamente menores no décimo quarto dia após tratamento. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

A contagem de neutrófilos demonstrou maior percentual no LBA do grupo 7A em relação ao 7C ($10,8 \pm 3,2$ vs. $1,7 \pm 1,0\%$, $p < 0,0001$), assim como no 14A comparado ao 14C ($7,0 \pm 0,1$ vs. $4,0 \pm 1,9\%$, $p < 0,0001$) (gráfico 5).

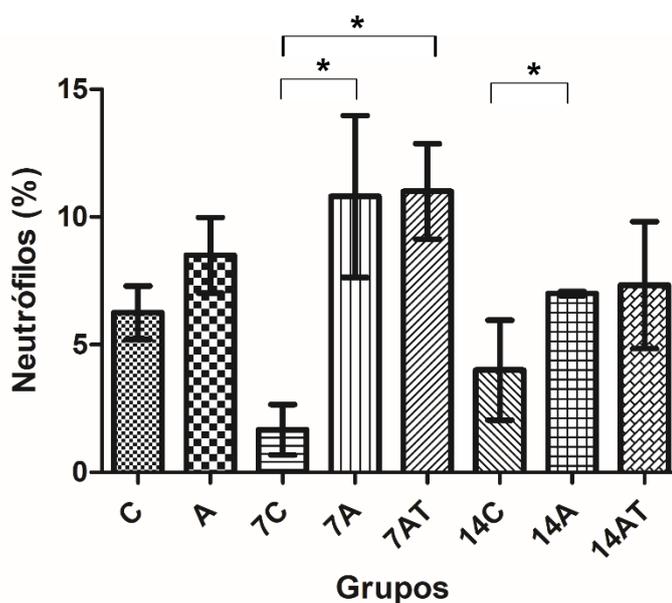


Gráfico 5 - Contagem diferencial de neutrófilos no LBA dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve maior percentual de neutrófilos no grupo 7A vs. 7C, e no 14A vs. 14C. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

Aos sete dias, houve maior percentual de mastócitos no LBA do grupo 7A comparado ao 7C ($7,2 \pm 5,1$ vs. $3,3 \pm 1,0\%$, $p = 0,0167$) que se manteve aos 14 dias no grupo 14A em relação ao 14C ($10,0 \pm 1,0$ vs. $3,5 \pm 2,3\%$, $p < 0,0001$) (gráfico 6).

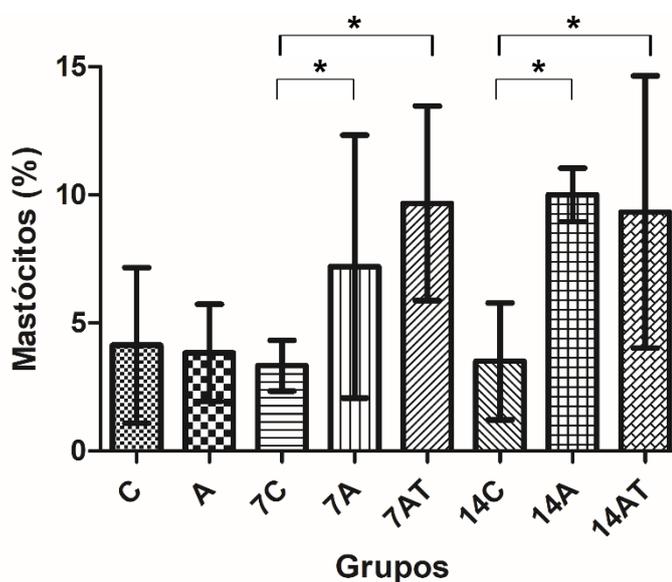


Gráfico 6 - Contagem diferencial de mastócitos no LBA dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve maior percentual de mastócitos no grupo 7A vs. 7C, e no 14A vs. 14C. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

4.7 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NO LBA

No momento do transplante, as proteínas totais no LBA estavam aumentadas no grupo A em relação ao C ($68,8 \pm 8,3$ vs. $59,1 \pm 3,8$ $\mu\text{g/mL}$, $p = 0,0058$). Aos sete dias pós-tratamento, as proteínas seguiram aumentadas no grupo 7A em comparação ao 7C ($72,3 \pm 4,6$ vs. $56,2 \pm 9,6$ $\mu\text{g/mL}$, $p = 0,0011$) e redução significativa no grupo 7AT em relação ao 7A ($60,9 \pm 7,4$ vs. $72,3 \pm 4,6$ $\mu\text{g/mL}$, $p = 0,0011$). Aos 14 dias a concentração de proteínas no grupo 14A continuou sendo maior que o 14C ($80,3 \pm 3,6$ vs. $59,0 \pm 3,5$ $\mu\text{g/mL}$, $p < 0,0001$). O grupo 14AT apresentou resultados significativamente menores que o grupo 14A ($57,4 \pm 4,4$ vs. $80,3 \pm 3,6$ $\mu\text{g/mL}$, $p < 0,0001$). Não houve diferença na quantidade de proteínas entre os animais tratados aos sete e 14 dias (gráfico 7).

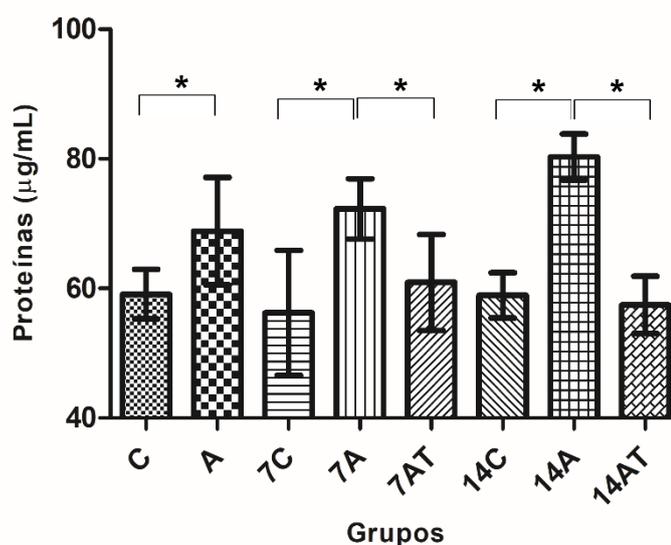


Gráfico 7 - Quantificação de proteínas no LBA dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve diferença estatística entre os grupos A vs. C, 7A vs. 7C, 7AT vs. 7A, 14A vs. 14C e 14AT vs. 14A. O tratamento com células-tronco mesenquimais mostrou resultados significativamente menores aos sete e 14 dias após transplante. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

4.8 DETECÇÃO DE H₂O₂ NO LBA

Na avaliação de sete dias, o grupo 7A apresentou maior concentração de H₂O₂ no LBA em comparação com o 7C ($5,5 \pm 1,7$ vs. $2,1 \pm 1,0$ μM , $p = 0,0003$). O tratamento realizado nos animais do grupo 7AT diminuiu este quadro

significativamente em comparação ao 7A ($3,0 \pm 0,9$ vs. $5,5 \pm 1,7 \mu\text{M}$, $p = 0,0003$) (gráfico 8). Aos 14 dias, não foi observado diferença estatística entre os grupos avaliados.

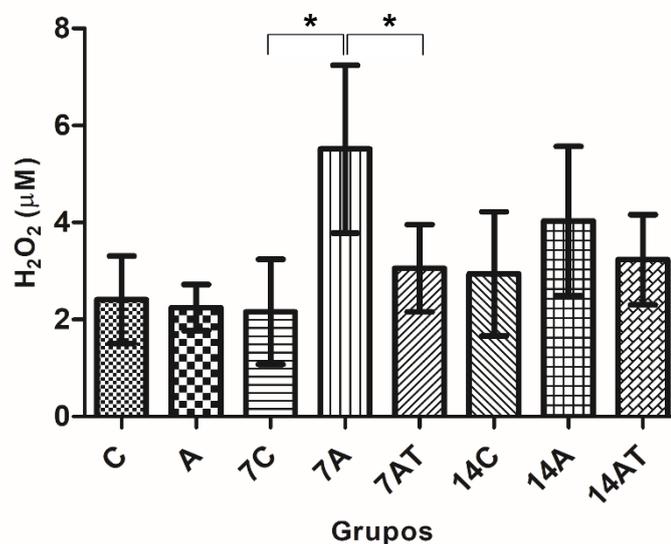


Gráfico 8 - Detecção de H₂O₂ no LBA dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve diferença estatística entre os grupos 7A vs. 7C e 7AT vs. 7A. O tratamento com células-tronco mesenquimais mostrou resultados significativamente menores aos sete e 14 dias após transplante. Os resultados são expressos em média ± desvio padrão. * $p < 0,05$.

4.9 QUANTIFICAÇÃO DE INTERLEUCINAS NO LBA E NO SORO

A concentração de IL-5 no grupo 7A foi maior que no 7C no LBA ($50,14 \pm 0,04$ vs. $50,08 \pm 0,03$ pg/mL, $p = 0,0023$) e no soro ($50,1 \pm 0,2$ vs. $49,6 \pm 0,4$ pg/mL, $p = 0,0081$). A avaliação dos animais do grupo 7AT mostrou redução significativa desta interleucina no LBA do grupo 7A ($50,06 \pm 0,03$ vs. $50,14 \pm 0,04$ pg/mL, $p = 0,0023$) e também no soro ($49,7 \pm 0,1$ vs. $50,1 \pm 0,2$ pg/mL, $p = 0,0081$). Além disso, após 14 dias de tratamento, é possível observar que houve aumento de IL-5 no grupo 14AT em relação ao 7AT ($50,1 \pm 0,02$ vs. $50,0 \pm 0,03$ pg/mL, $p = 0,0228$) (gráfico 9).

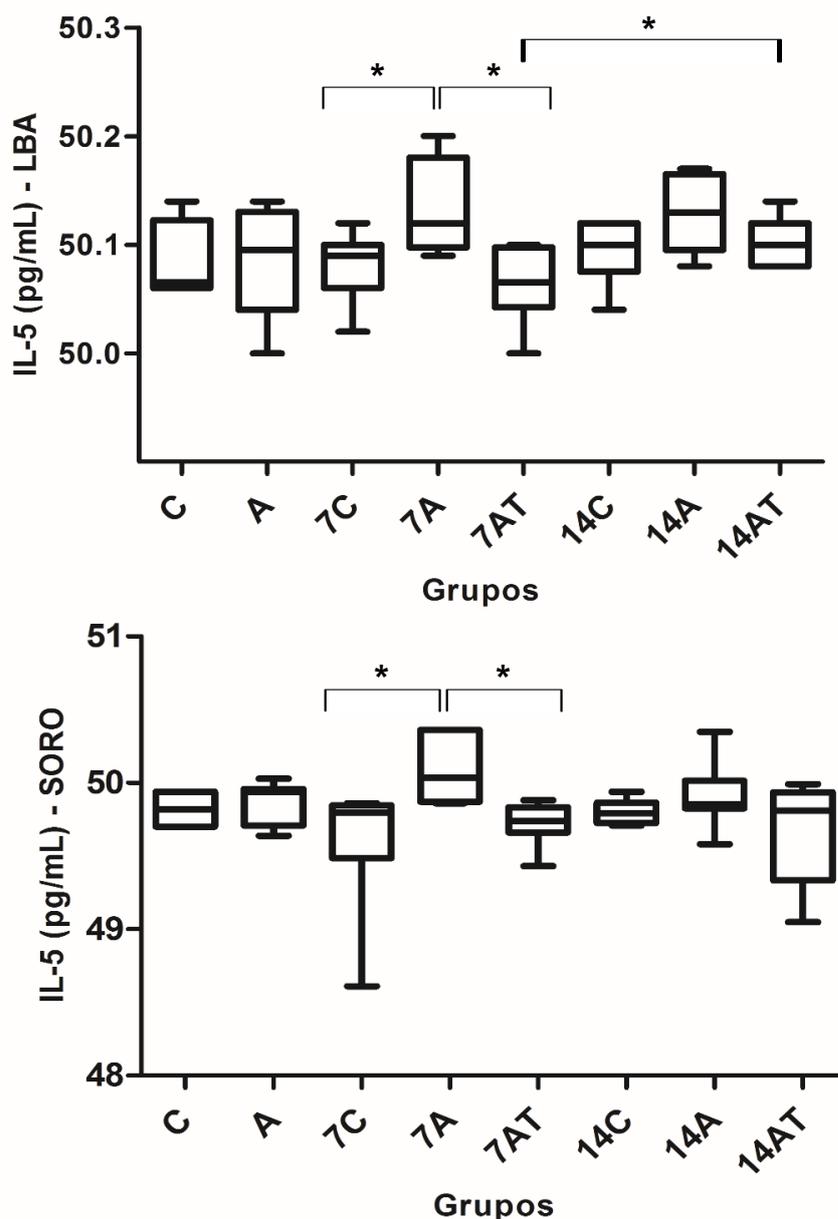


Gráfico 9 - Níveis da IL-5 no LBA e no soro dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve diferença estatística entre os grupos 7A vs. 7C, 7AT vs. 7A e 14AT vs. 7AT na IL-5 do LBA e 7A vs. 7C e 7AT vs. 7A no soro. O tratamento com células-tronco mesenquimais mostrou resultados menores sete dias após transplante. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

O grupo A apresentou maior quantidade de IL-13 no LBA que o C ($7,5 \pm 0,7$ vs. $6,1 \pm 0,4$ pg/mL, $p = 0,0005$), assim como o 7A em relação ao 7C ($6,7 \pm 0,6$ vs. $6,1 \pm 0,3$ pg/mL, $p = 0,0134$). Houve diminuição intensa de IL-13 no LBA do grupo 7AT em relação ao 7A ($6,1 \pm 0,4$ vs. $6,7 \pm 0,6$ pg/mL, $p = 0,134$). No décimo quarto dia de avaliação o perfil de expressão da IL-13 se manteve, com o aumento no grupo 14A comparado ao 14 C ($6,7 \pm 0,3$ vs. $6,1 \pm 0,5$ pg/mL, $p = 0,0195$) e os animais que

receberam CTMs do grupo 14AT tiveram o nível de IL-13 significativamente menor que o 14A ($6,0 \pm 0,5$ vs. $6,6 \pm 0,3$ pg/mL, $p = 0,0268$). Não houve diferença na concentração de IL-13 no soro dos camundongos (gráfico 10).

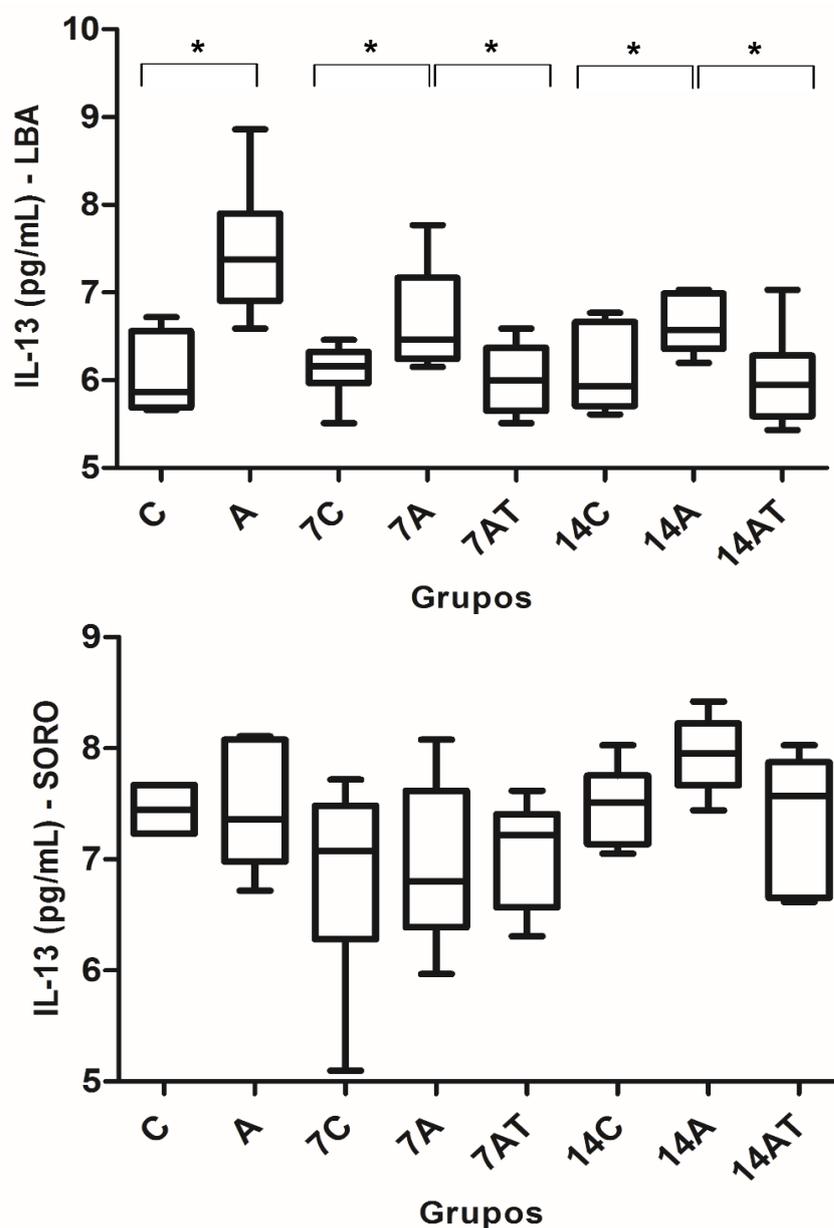


Gráfico 10 - Níveis da IL-13 no LBA e no soro dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve diferença estatística no LBA entre os grupos A vs. C, 7A vs. 7C, 7AT vs. 7A, 14AT vs. 14A e 14A vs. 14C. Não houve diferença na concentração de IL-13 no soro dos camundongos. O tratamento com células-tronco mesenquimais mostrou resultados menores sete e 14 dias após transplante. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

No LBA, foi possível verificar o aumento significativo de IL-17A no grupo A em relação ao C ($5,5 \pm 0,06$ vs. $5,4 \pm 0,06$ pg/mL, $p = 0,0055$) e no 7A comparado ao 7C

($5,5 \pm 0,1$ vs. $5,4 \pm 0,04$ pg/mL, $p = 0,0243$). Houve redução desta interleucina pró-inflamatória no sétimo dia pós-tratamento nos animais do grupo 7AT em comparação ao 7A ($5,4 \pm 0,09$ vs. $5,5 \pm 0,1$ pg/mL, $p = 0,0243$). Os níveis de IL-17A permaneceram aumentados no grupo 14A em relação ao 14C, avaliados no décimo quarto dia ($5,5 \pm 0,09$ vs. $5,4 \pm 0,04$ pg/mL, $p = 0,0003$) e o tratamento manteve a redução da IL-17A nos camundongos do 14AT em relação ao 14A ($5,3 \pm 0,05$ vs. $5,5 \pm 0,09$ pg/mL, $p = 0,0003$). No soro dos animais, foi possível verificar alteração no grupo 14A, submetido ao alérgeno, comparado ao 14C ($6,4 \pm 0,4$ vs. $5,6 \pm 0,1$ pg/mL, $p = 0,0023$) (gráfico 11).

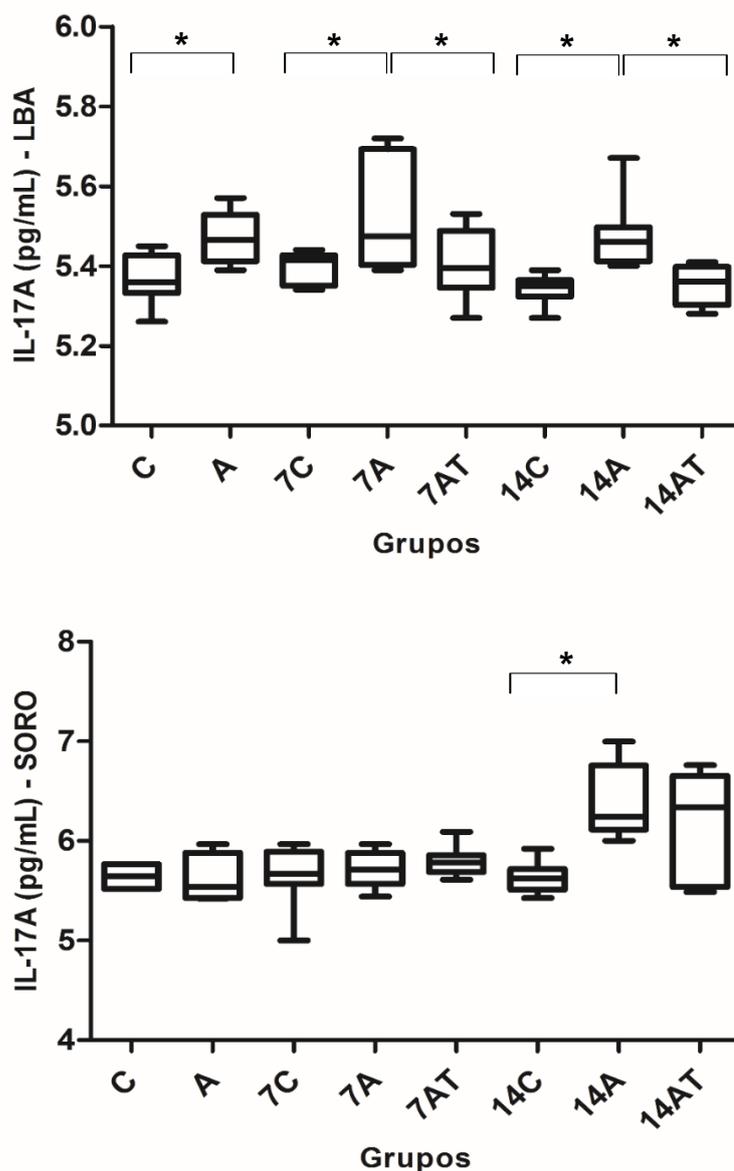


Gráfico 11 - Níveis da IL-17A no LBA e no soro dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve diferença estatística no LBA entre os grupos A vs. C, 7A vs. 7C, 7AT vs. 7A, 14A vs. 14C, 14AT vs. 14A. No soro apenas os grupos 14AT vs. 14A tiveram concentrações de IL-17 quando comparados entre si. O tratamento com células-tronco mesenquimais mostrou resultados níveis reduzido desta interleucina aos sete e 14 dias após transplante. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

Os níveis de TNF- α estavam aumentados apenas no LBA do grupo A em relação ao C ($19,95 \pm 3,0$ vs. $15,8 \pm 0,4$ pg/mL, $p = 0,0014$). Não houve diferenças nas avaliações do soro dos animais (gráfico 12).

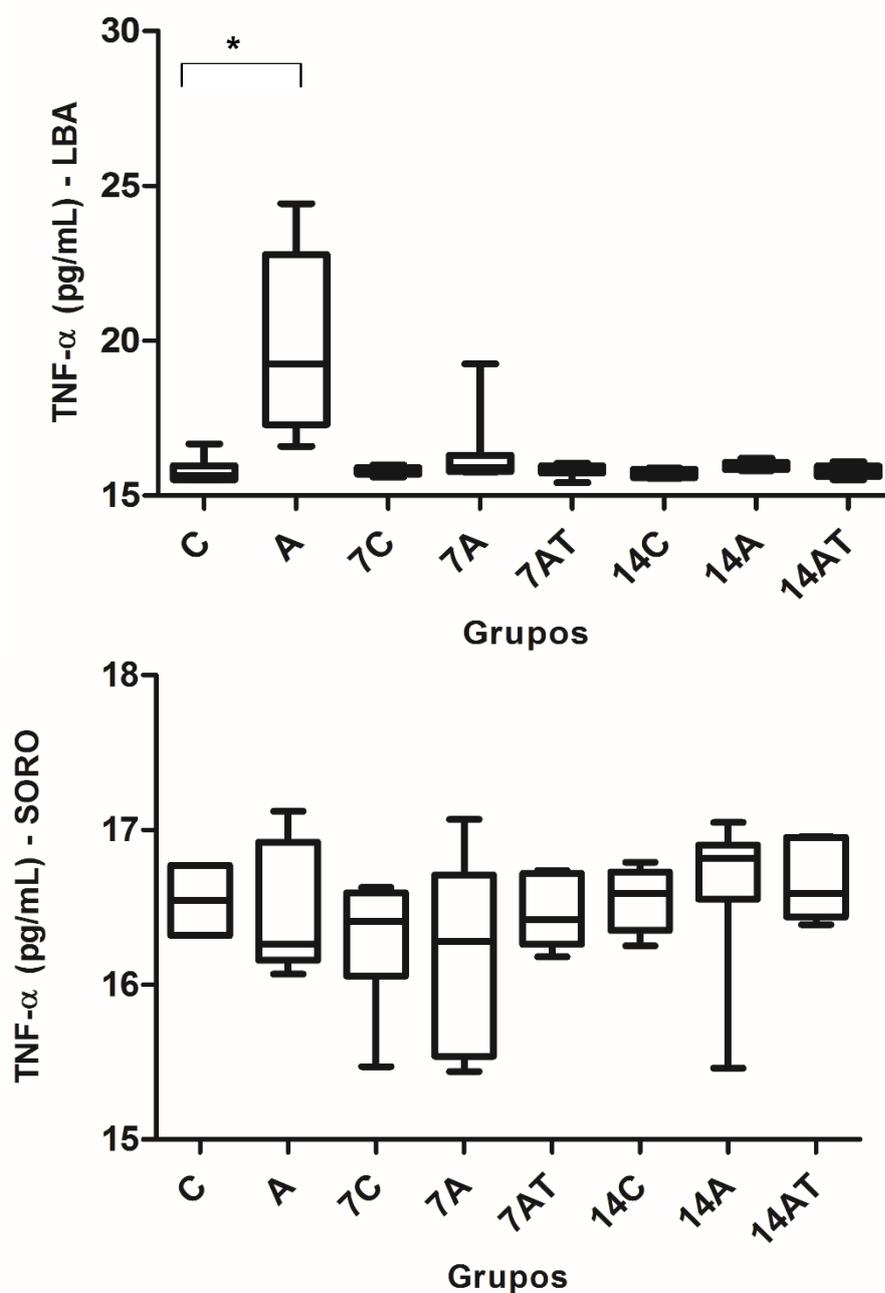


Gráfico 12 - Níveis de TNF- α no LBA e no soro dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve diferença estatística no LBA entre os grupos A vs. C. Não houveram alterações na concentração de TNF- α nos grupos avaliados. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

Na avaliação de sete dias, os camundongos do grupo 7AT apresentaram níveis significativamente maiores de IL-10 que os animais não tratados do grupo 7A, tanto no LBA ($8,6 \pm 1,1$ vs. $5,7 \pm 1,1$ pg/mL, $p < 0,0001$) quanto no soro avaliado ($15,1 \pm 1,9$ vs. $12,2 \pm 3,0$ pg/mL, $p < 0,0372$). Os resultados para esta interleucina anti-inflamatória no LBA do grupo 7AT foram maiores que o 7C ($8,6 \pm 1,1$ vs. $6,4 \pm 0,8$ pg/mL, $p < 0,0001$). Após 14 dias de tratamento, houve redução na concentração de IL-10 no LBA

do grupo 14AT em comparação ao 7AT ($7,0 \pm 1,4$ vs. $8,6 \pm 1,1$ pg/mL, $p = 0,0227$) (gráfico 13).

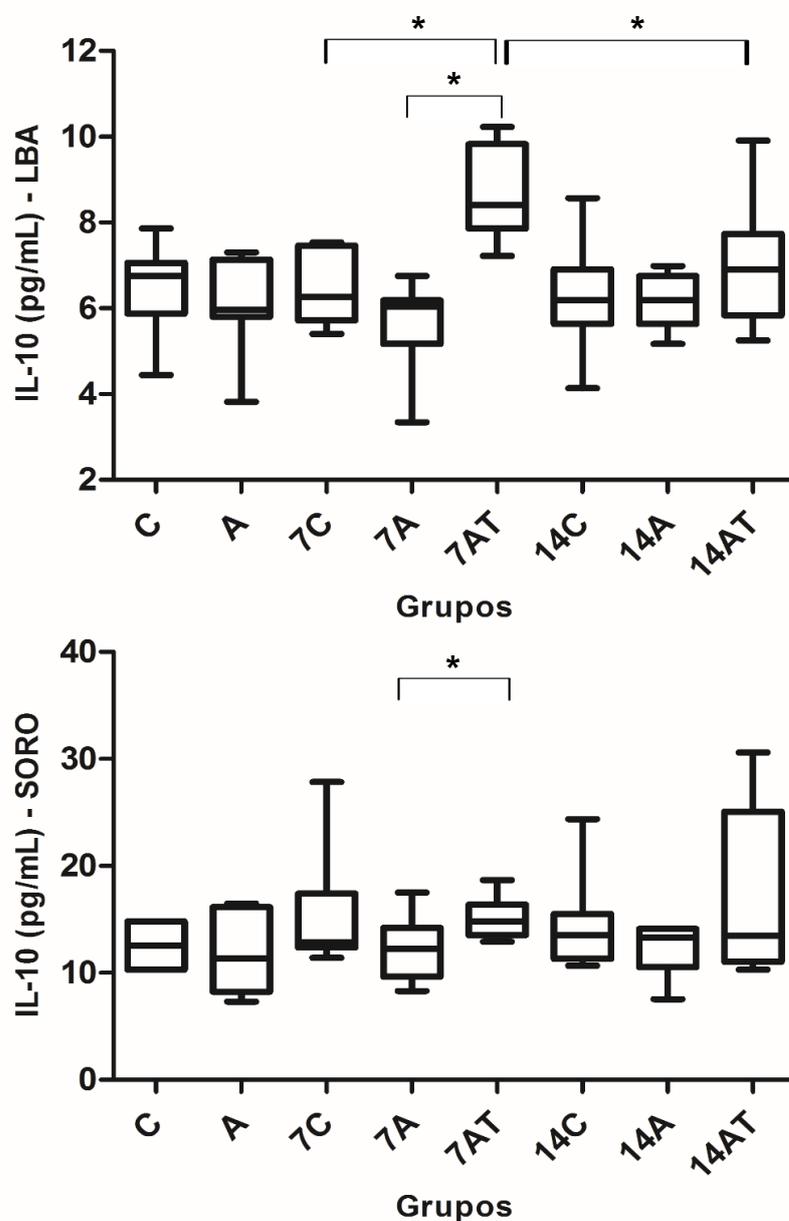


Gráfico 13 - Níveis da IL-10 no LBA e no soro dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve diferença estatística no LBA dos grupos 7AT vs. 7A, 7AT vs. 7C e 14AT vs. 7AT e no soro a IL-10 foi significativamente diferente entre os grupos 7AT vs. 7A. O tratamento com células-tronco mesenquimais mostrou resultados mais expressivos aos sete dias após infusão, tanto no LBA quanto no soro. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

4.10 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os resultados histopatológicos pulmonares dos espécimes estudados demonstraram aspectos do remodelamento pulmonar nos animais que foram

submetidos ao modelo experimental de indução à asma, nos três tempos avaliados, e diminuição dessas alterações em camundongos que receberam infusão de CTMs, em todos os critérios avaliados (figuras 11 a 19, gráficos 14 a 16).

No dia 0, o grupo A apresentou modificações significativas em comparação ao C, no infiltrado inflamatório ($1,4 \pm 0,1$ vs. $0,1 \pm 0,1$, $p = 0,0009$), deposição de colágeno ($1,4 \pm 0,3$ vs. $0,1 \pm 0,05$, $p = 0,0011$), espessamento muscular ($1,7 \pm 0,1$ vs. $0,4 \pm 0,1$, $p = 0,0009$) e epitelial ($2,1 \pm 0,3$ vs. $0,3 \pm 0,04$, $p = 0,0009$), produção de muco ($1,4 \pm 0,2$ vs. $0,0 \pm 0,0$, $p = 0,0004$) e descamação do epitélio ($1,6 \pm 0,1$ vs. $0,4 \pm 0,05$, $p = 0,0009$) (figuras 11 a 13).

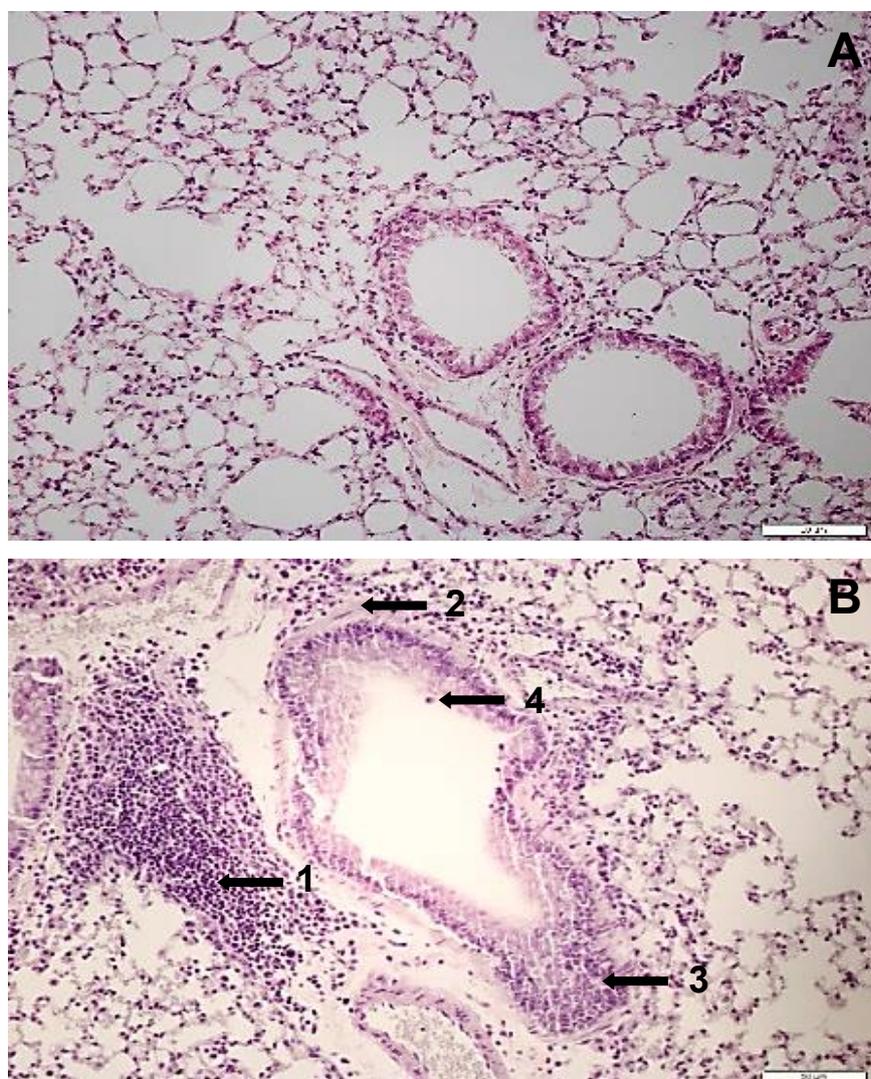


Figura 11 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com hematoxilina & eosina no dia 0. A. Grupo Controle. B. Grupo Asma. O grupo Controle apresentou o pulmão preservado e os animais do grupo Asma, apresentam alterações do remodelamento pulmonar: 1. Infiltrado inflamatório, 2. Espessamento muscular, 3. Espessamento epitelial, 4. Descamação do epitélio. Aumento: 200x.

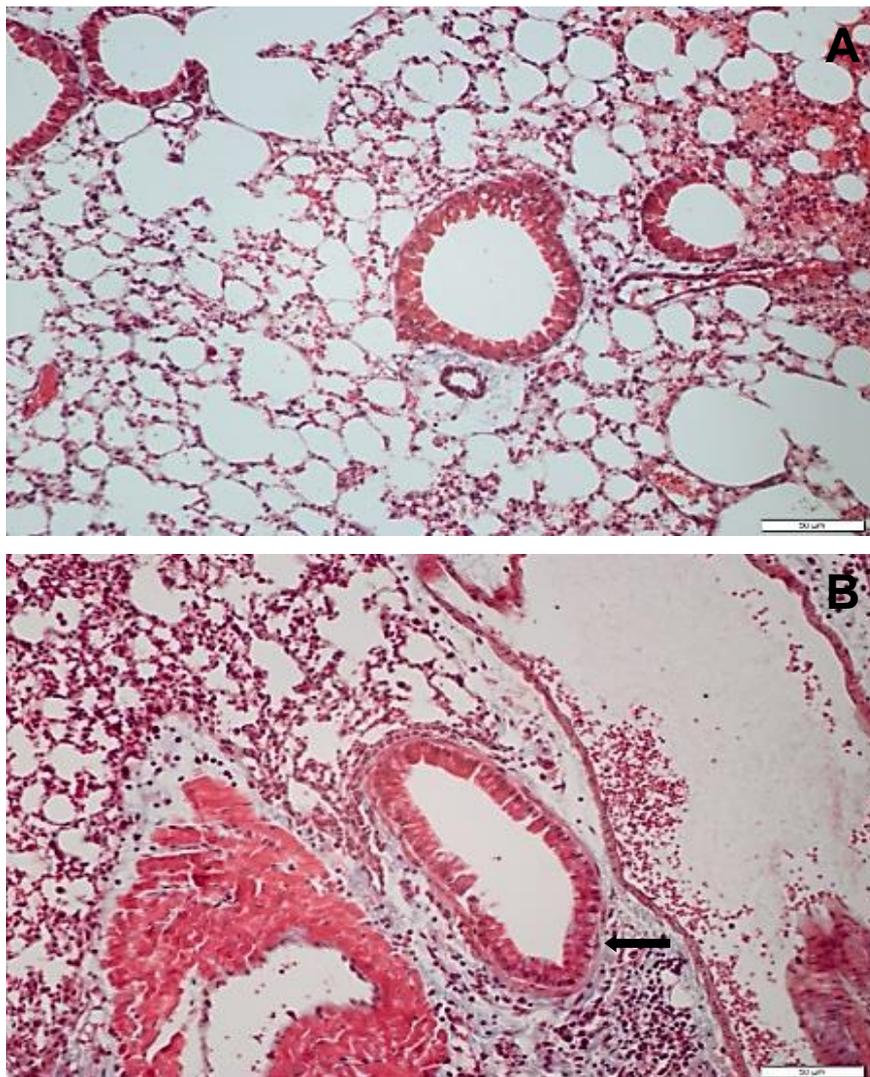


Figura 12 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com tricrômio de Masson no dia 0. *A.* Grupo Controle. *B.* Grupo Asma. No grupo Controle a deposição de colágeno está dentro da normalidade e nos animais do grupo Asma há deposição acentuada de colágeno na região peribronquiolar. Aumento: 200x.

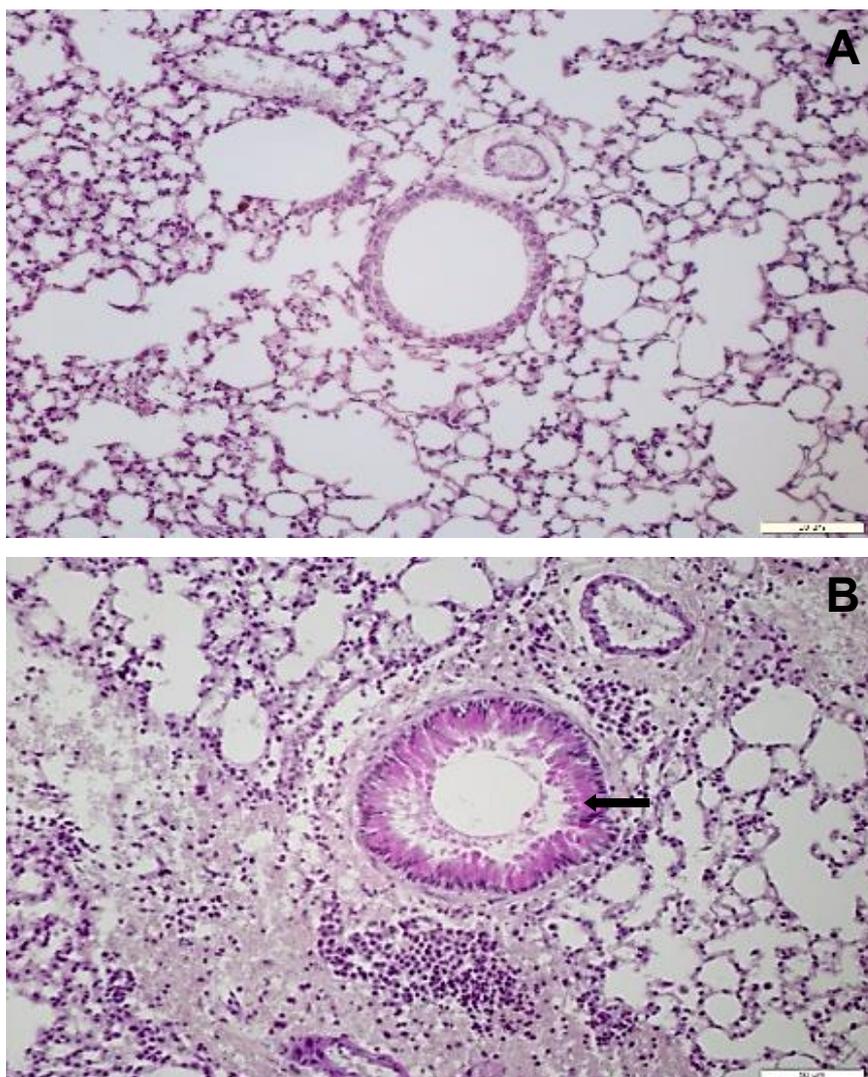


Figura 13 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com ácido periódico-Schiff no dia 0. *A.* Grupo Controle. *B.* Grupo Asma. O grupo Controle apresenta pouca ou nenhuma produção de muco e os animais do grupo Asma, apresentam hipersecreção de muco pelas células caliciformes. Aumento: 200x.

No sétimo dia após tratamento, os animais do grupo 7A mantiveram as alterações quando comparados ao 7C, no infiltrado inflamatório ($1,6 \pm 0,1$ vs. $0,3 \pm 0,1$, $p = 0,0002$), deposição de colágeno ($1,8 \pm 0,1$ vs. $0,4 \pm 0,1$, $p = 0,0002$), espessamento muscular ($1,8 \pm 0,1$ vs. $0,4 \pm 0,1$, $p = 0,0002$) e epitelial ($2,0 \pm 0,2$ vs. $0,2 \pm 0,06$, $p = 0,0001$), produção de muco pelas células caliciformes ($1,5 \pm 0,1$ vs. $0,01 \pm 0,01$, $p = 0,0004$) e descamação do epitélio ($1,4 \pm 0,1$ vs. $0,6 \pm 0,1$, $p = 0,0014$). Entretanto, a terapia celular no grupo 7AT reduziu significativamente as modificações histológicas em relação aos animais não tratados do grupo 7A, no infiltrado inflamatório ($0,6 \pm 0,1$ vs. $1,6 \pm 0,1$, $p = 0,0002$) e deposição de colágeno ($0,8 \pm 0,1$ vs. $1,8 \pm 0,1$, $p = 0,0002$), espessamento muscular ($0,7 \pm 0,1$ vs. $1,8 \pm 0,1$, $p = 0,0002$)

e epitelial ($1,2 \pm 0,2$ vs. $2,0 \pm 0,2$, $p = 0,031$) e descamação do epitélio ($0,8 \pm 0,1$ vs. $1,4 \pm 0,1$, $p = 0,0014$), exceto na produção de muco (figuras 14 a 16).

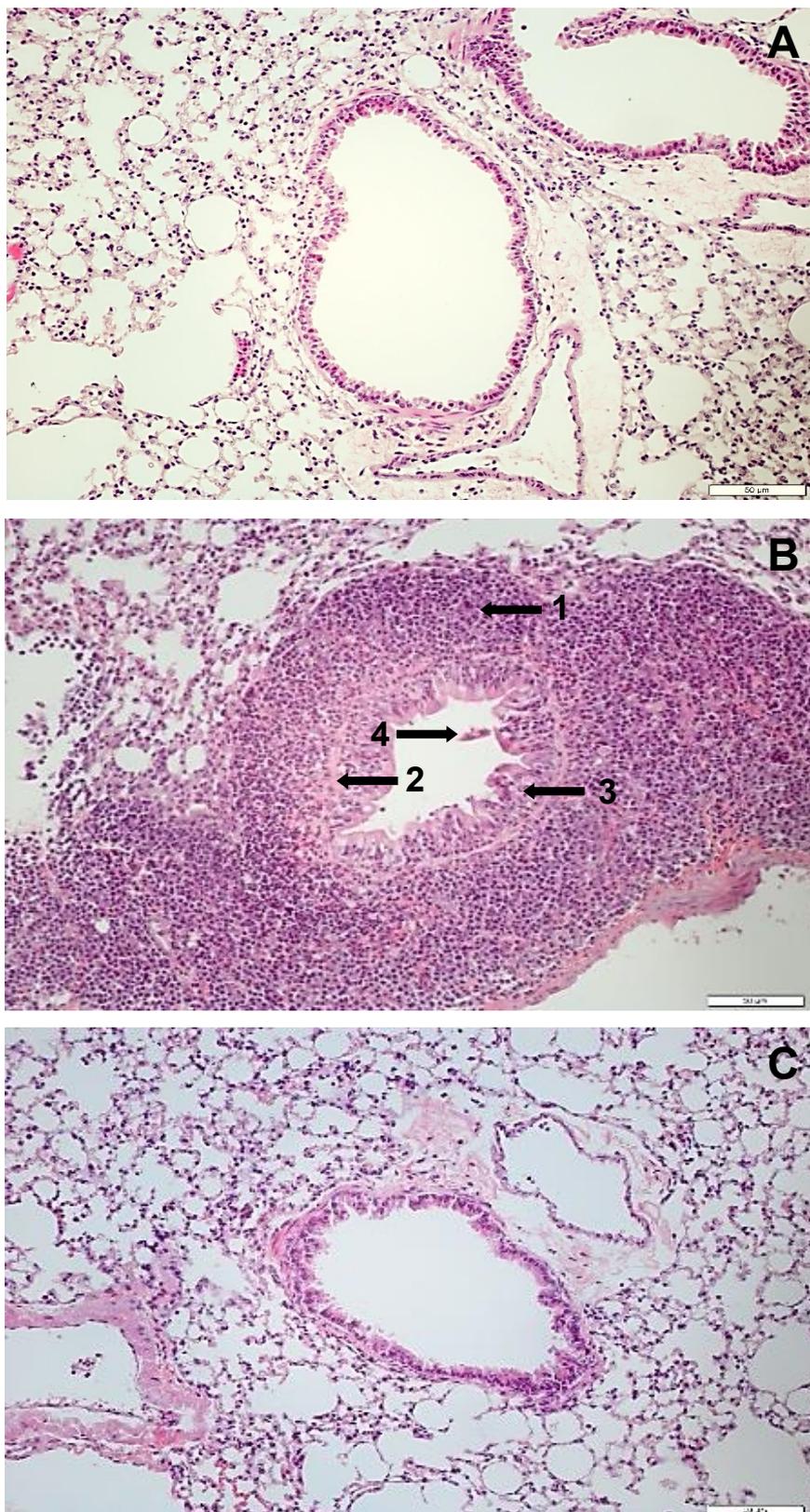


Figura 14 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com hematoxilina & eosina aos sete dias. A. Grupo Controle (7C). B. Grupo Asma (7A). C. Grupo Tratamento (7AT). O grupo Controle apresenta o pulmão preservado e os animais do grupo Asma, apresentam alterações do remodelamento pulmonar: 1. Infiltrado inflamatório, 2. Espessamento muscular, 3. Espessamento epitelial, 4. Descamação do epitélio. Estas são menos evidentes no grupo Tratamento. Aumento: 200x.

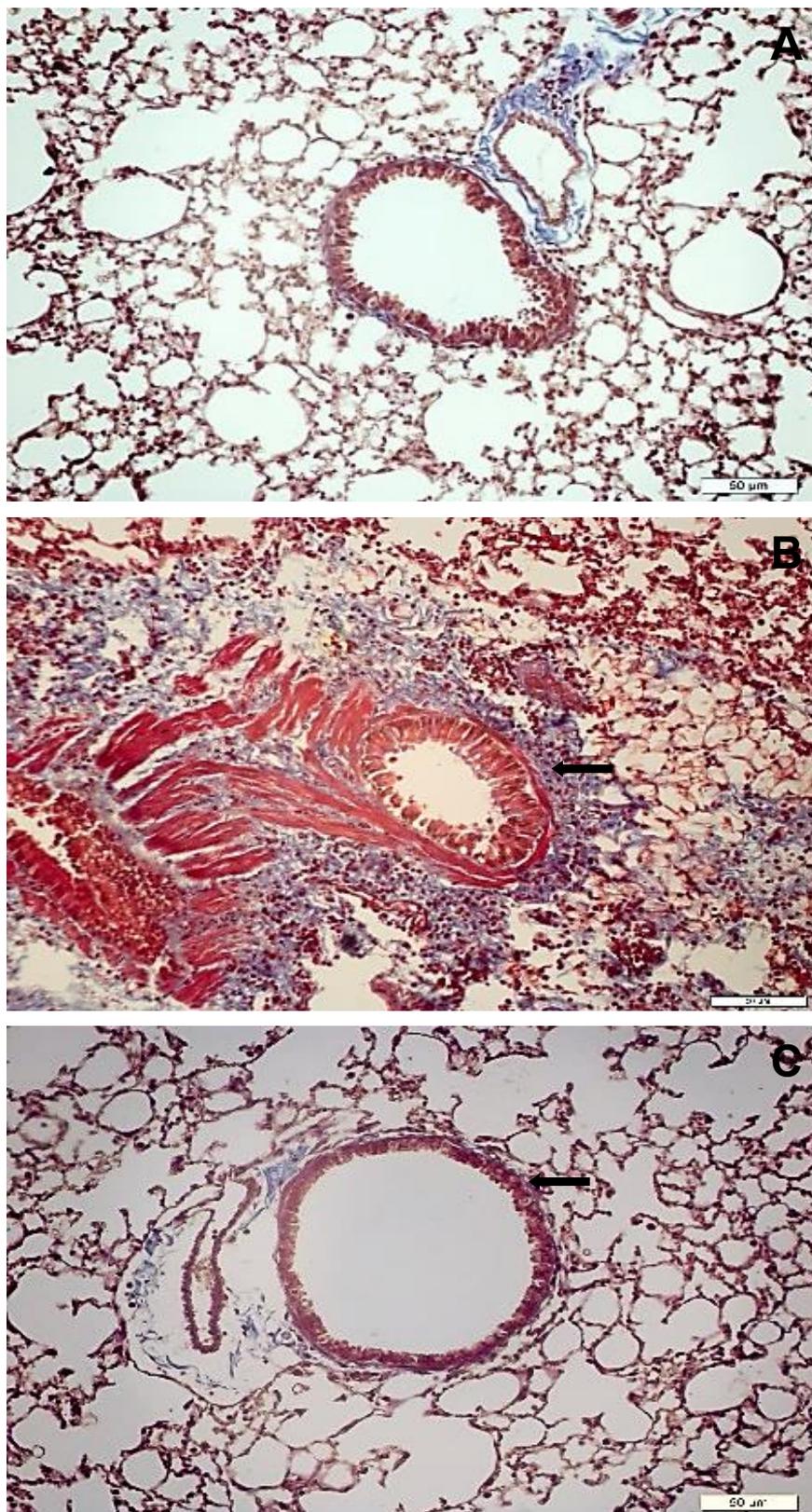


Figura 15 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com tricrômio de Masson aos sete dias. *A.* Grupo Controle (7C). *B.* Grupo Asma (7A). *C.* Grupo Tratamento (7AT). No grupo Controle a deposição de colágeno está dentro da normalidade e nos animais do grupo Asma há deposição acentuada de colágeno na região peribronquiolar estando reduzida no grupo Tratamento. Aumento: 200x.

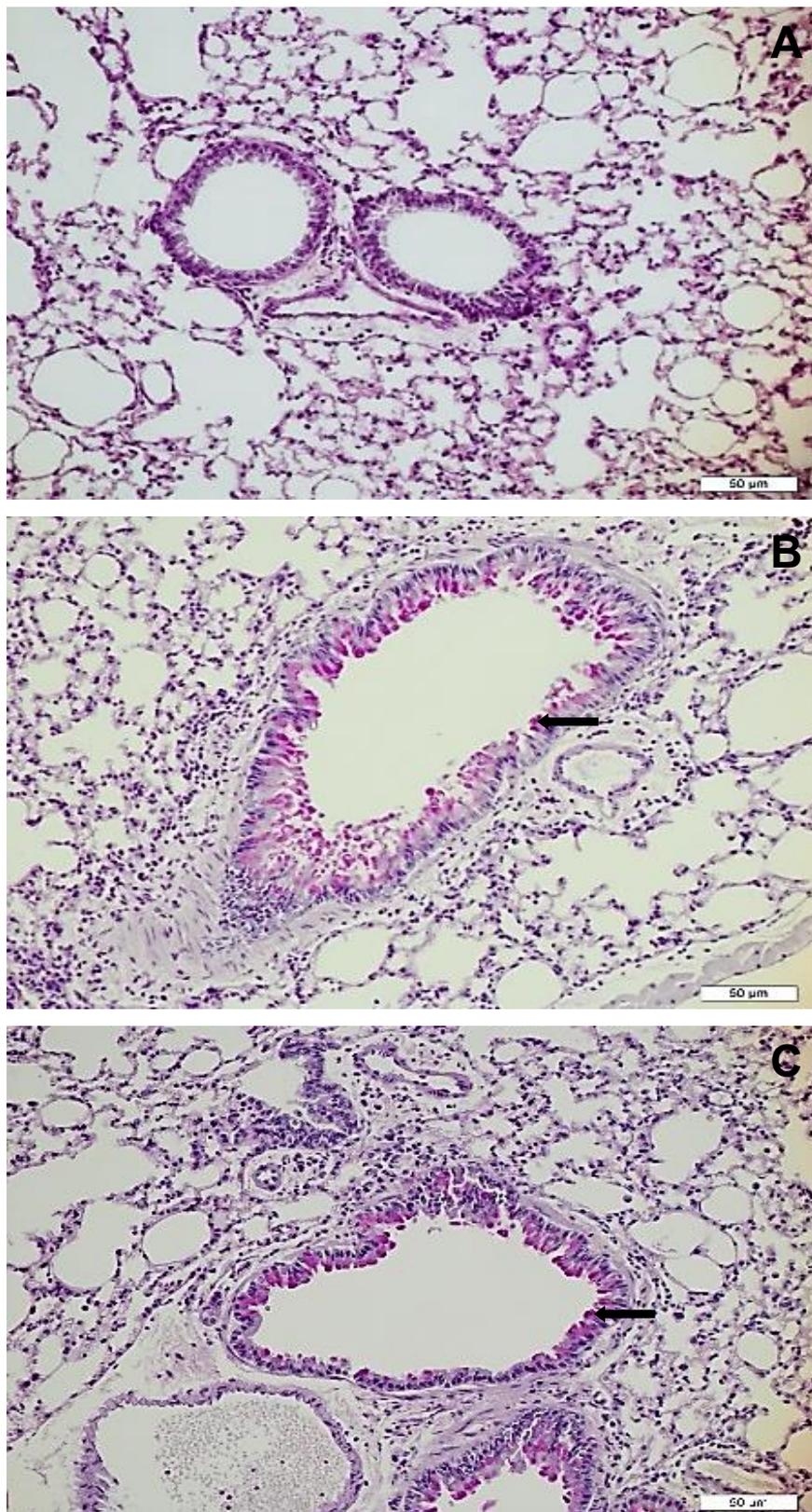


Figura 16 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com ácido periódico-Schiff aos sete dias. A. Grupo Controle (7C). B. Grupo Asma (7A). C. Grupo Tratamento (7AT). No grupo Controle há pouca ou nenhuma produção de muco e os animais do grupo Asma e Tratamento, apresentam hipersecreção de muco pelas células caliciformes. Aumento: 200x.

No décimo quarto dia após tratamento, o remodelamento continuou bem intenso no grupo 14A em comparação ao 14C, no infiltrado inflamatório ($1,2 \pm 0,1$ vs. $0,3 \pm 0,2$, $p = 0,0044$), e deposição de colágeno ($1,6 \pm 0,1$ vs. $0,7 \pm 0,1$, $p = 0,0042$), espessamento muscular ($1,1 \pm 0,1$ vs. $0,3 \pm 0,1$, $p = 0,0002$) e epitelial ($1,5 \pm 0,2$ vs. $0,2 \pm 0,04$, $p = 0,0003$), produção de muco pelas células caliciformes ($0,5 \pm 0,1$ vs. $0,0 \pm 0,0$, $p = 0,0008$) e descamação do epitélio ($1,4 \pm 0,1$ vs. $0,6 \pm 0,1$, $p = 0,0004$). No entanto, com exceção da avaliação do espessamento muscular e do muco produzido pelas células caliciformes, foi possível verificar redução significativa no grupo 14AT em relação ao 14A, no infiltrado inflamatório ($0,7 \pm 0,1$ vs. $1,2 \pm 0,1$, $p = 0,0235$), deposição de colágeno ($1,0 \pm 0,2$ vs. $1,6 \pm 0,1$, $p = 0,0042$), espessamento epitelial ($0,9 \pm 0,1$ vs. $1,5 \pm 0,2$, $p = 0,0353$) e descamação do epitélio ($0,8 \pm 0,1$ vs. $1,4 \pm 0,1$, $p = 0,0004$) (figuras 17 a 19).

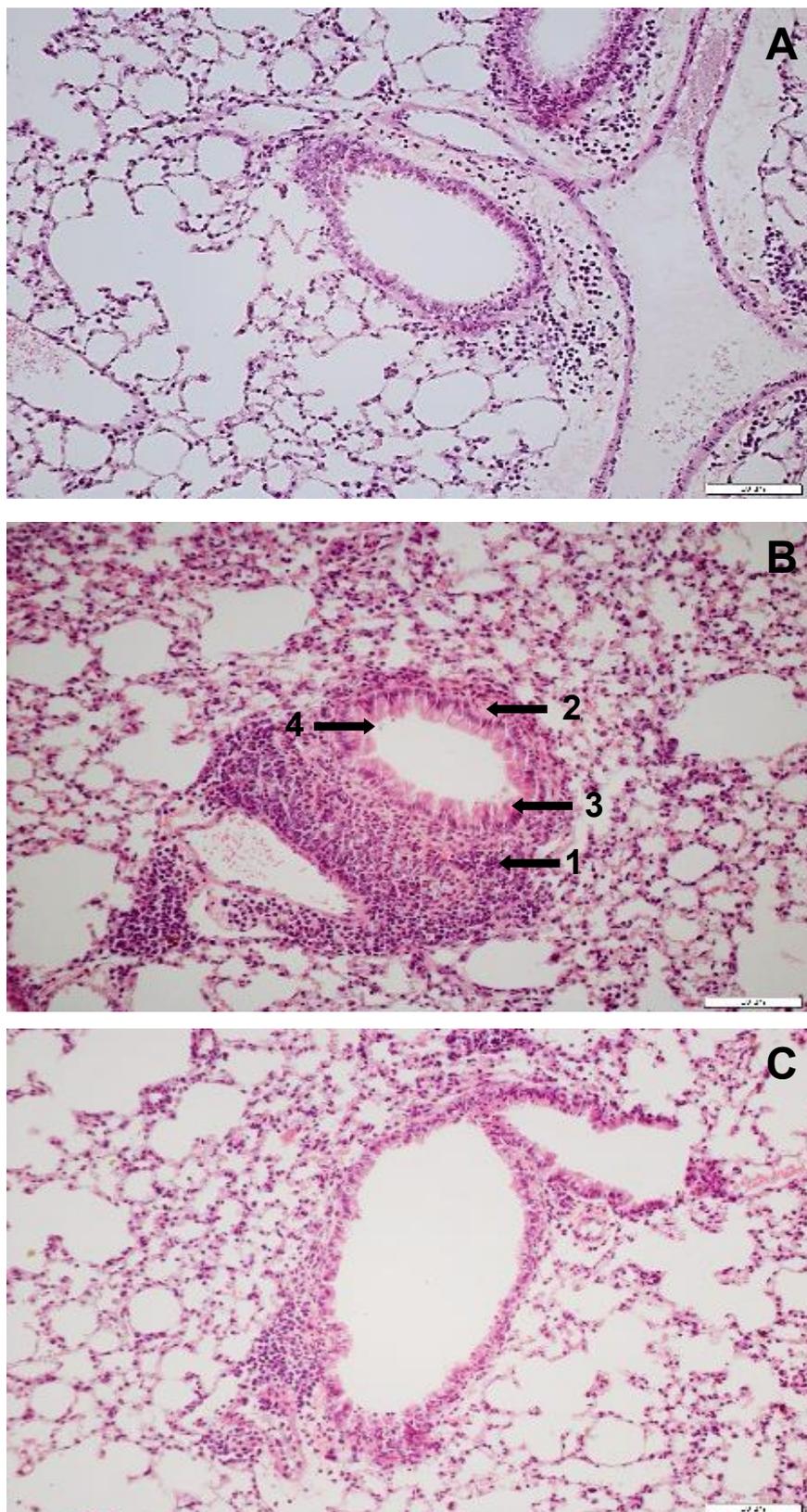


Figura 17 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com hematoxilina & eosina aos 14 dias. A. Grupo Controle (14C). B. Grupo Asma (14A). C. Grupo Tratamento (14AT). O grupo Controle apresenta o pulmão preservado e os animais do grupo Asma, apresentam alterações do remodelamento pulmonar: 1. Infiltrado inflamatório, 2. Espessamento muscular, 3. Espessamento epitelial, 4. Descamação do epitélio. Estas são menos intensas no grupo Tratamento. Aumento: 200x.

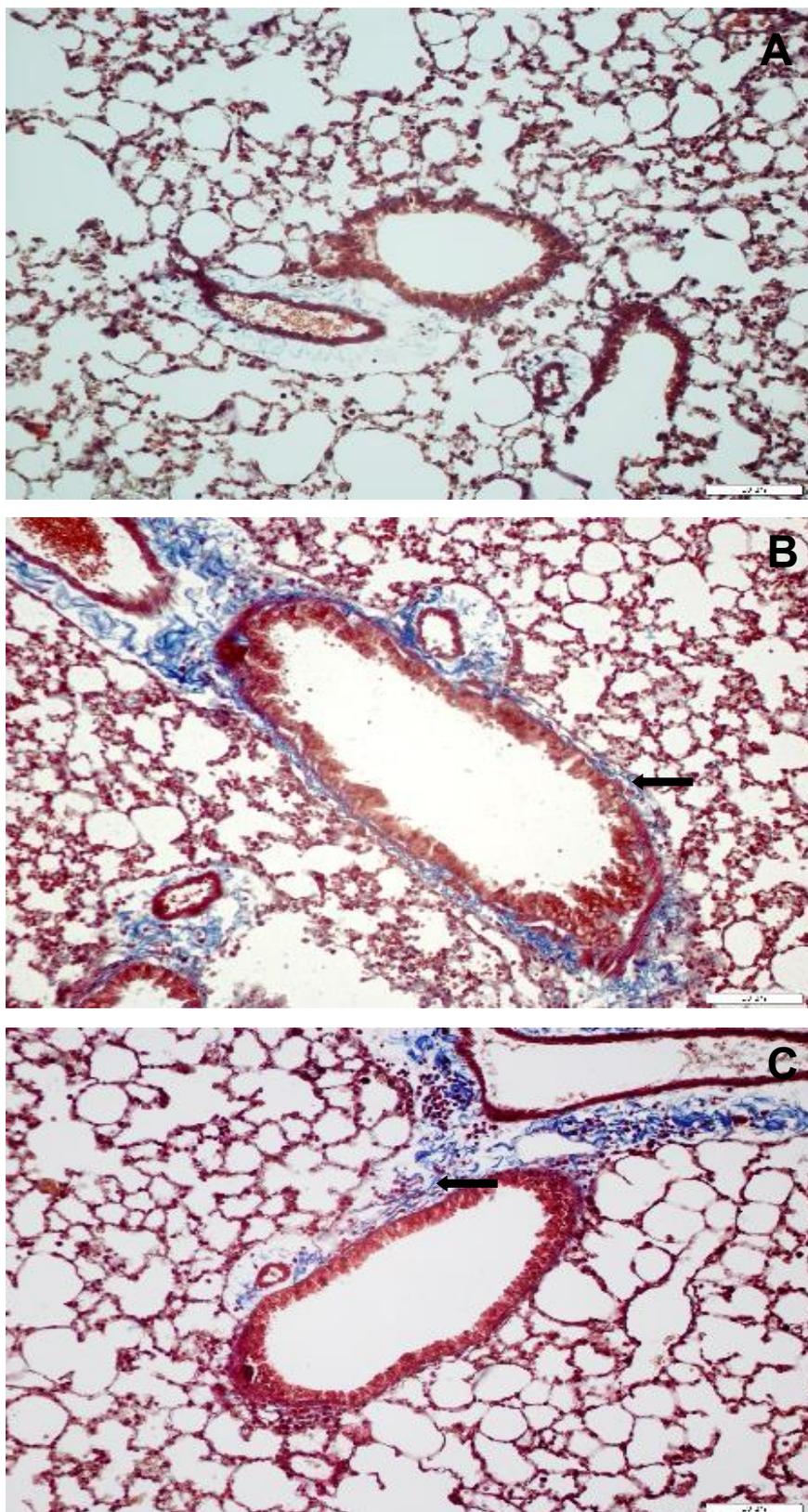


Figura 18 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com tricrômio de Masson aos 14 dias. A. Grupo Controle (14C). B. Grupo Asma (14A). C. Grupo Tratamento (14AT). No grupo Controle (14C) a deposição de colágeno está dentro da normalidade e nos animais do grupo Asma (14A) há deposição acentuada de colágeno na região peribronquiolar estando está reduzida no grupo Tratamento (14AT). Aumento: 200x.

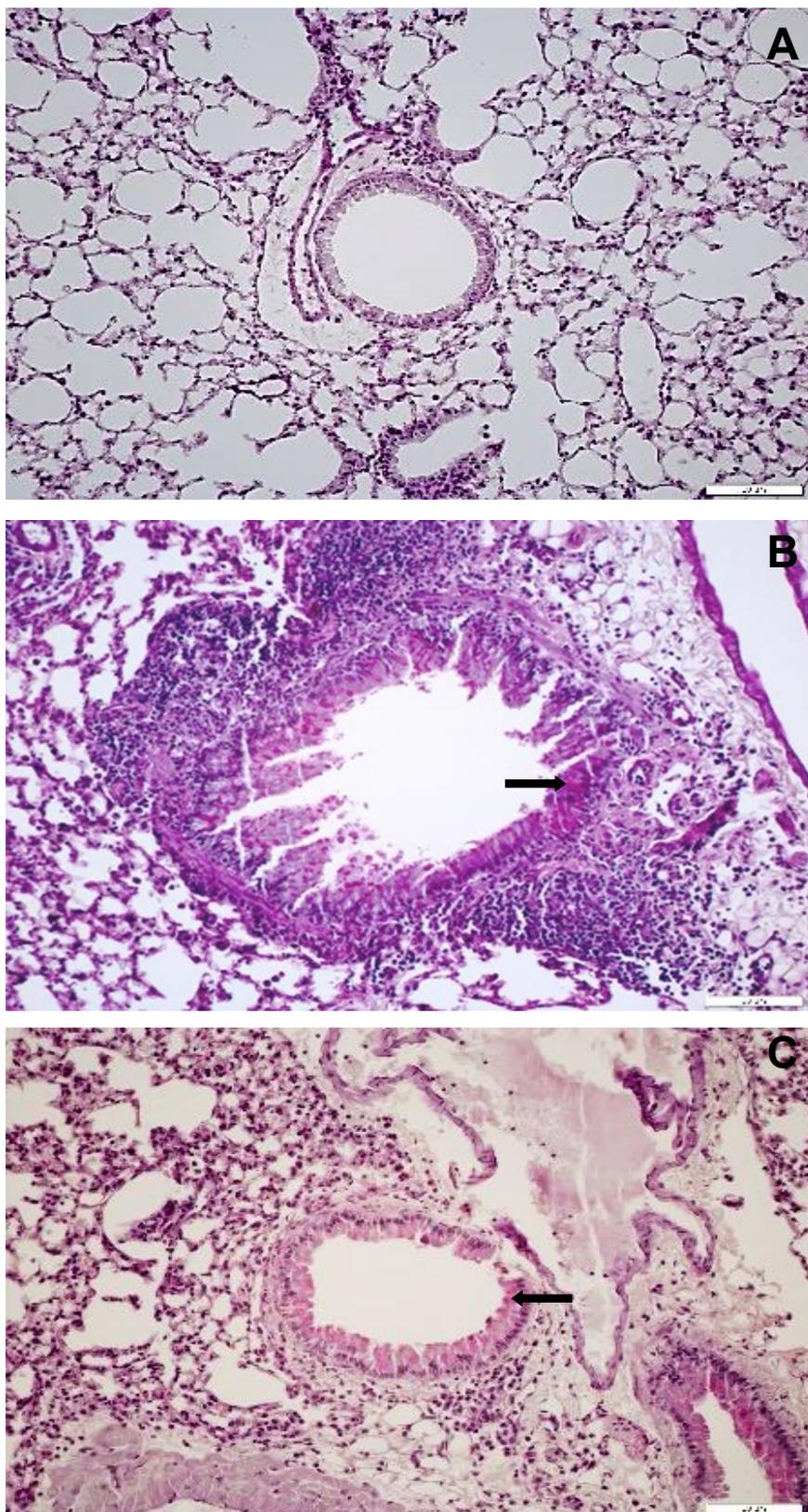


Figura 19 - Avaliação histopatológica em cortes pulmonares corados com ácido periódico-Schiff aos 14 dias. *A.* Grupo Controle (14C). *B.* Grupo Asma (14A). *C.* Grupo Tratamento (14AT). No grupo Controle (14C) há pouca ou nenhuma produção de muco e os animais do grupo Asma (14A) e Tratamento (14AT), apresentam hipersecreção de muco pelas células caliciformes. Aumento: 200x.

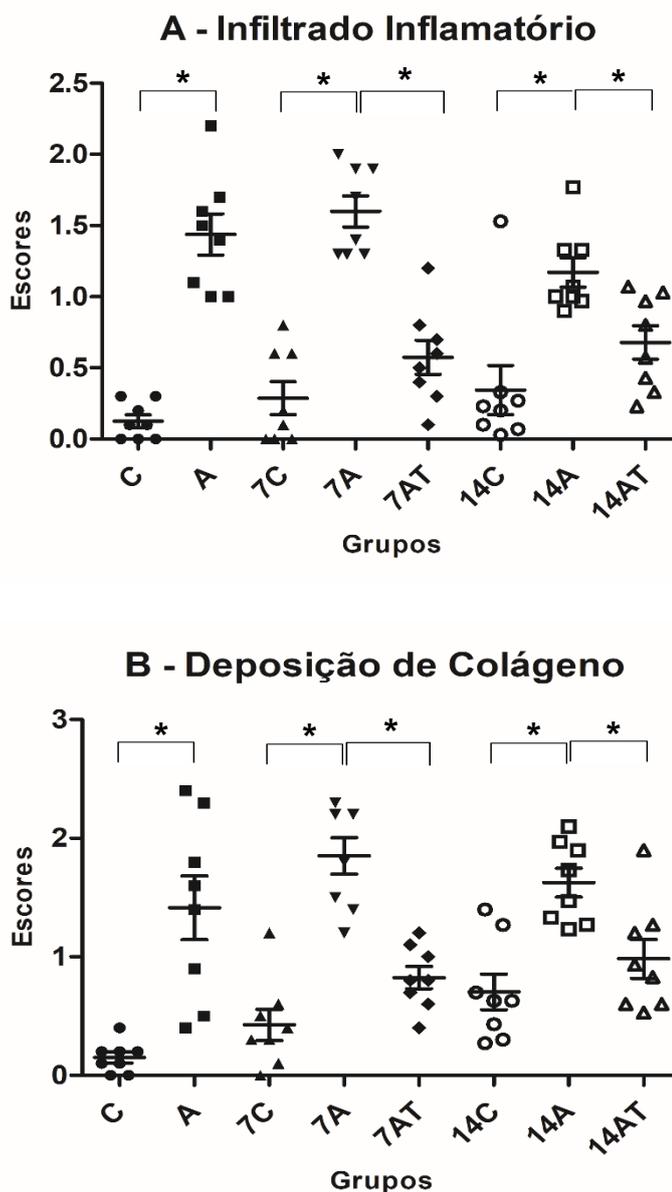


Gráfico 14 - Análises histopatológicas no epitélio pulmonar dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve diferença estatística no espessamento epitelial entre os grupos A vs. C, 7A vs. 7C, 7AT vs. 7A, 7AT vs. 7C, 14A vs. 14C, 14AT vs. 14A e 14AT vs. 14A. Na descamação do epitélio, houveram alterações nos grupos A vs. C, 7A vs. 7C, 7AT vs. 7A, 14A vs. 14C, 14AT vs. 14A. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$.

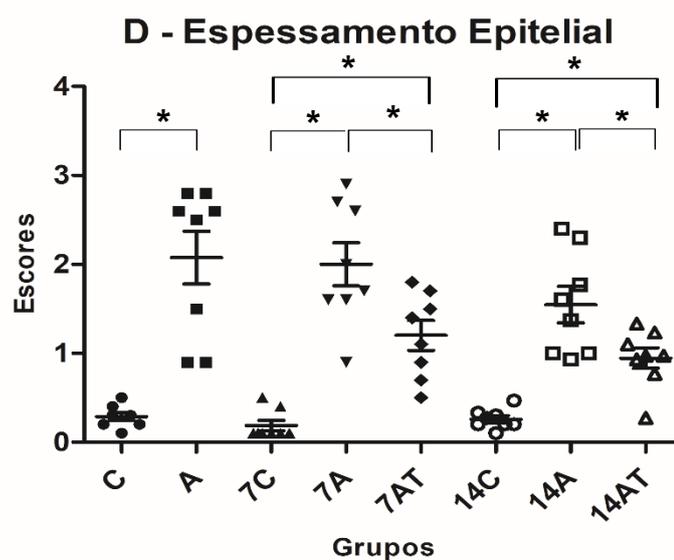
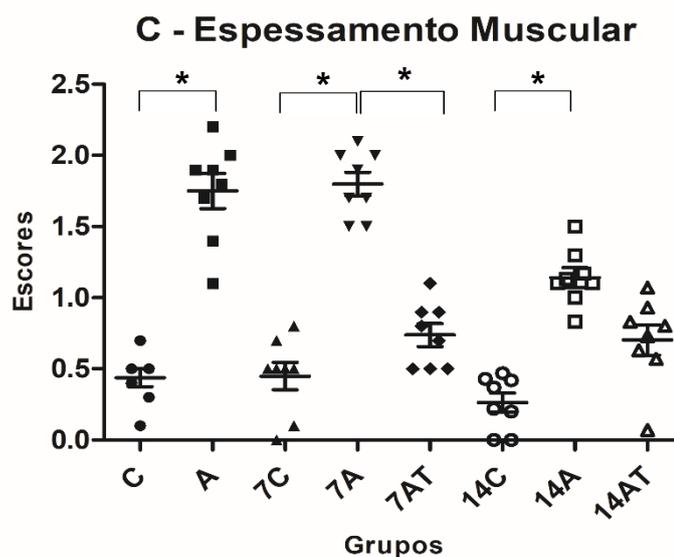


Gráfico 15 - Análises histopatológicas no músculo liso e no infiltrado inflamatório pulmonar dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve diferença estatística no espessamento muscular entre os grupos A vs. C, 7A vs. 7C, 7AT vs. 7A e 14A vs. 14C. No infiltrado inflamatório, houveram diferenças entre os grupos A vs. C, 7A vs. 7C, 7AT vs. 7A, 14A vs. 14C, 14AT vs. 14A. Os resultados são expressos em média ± erro padrão. * $p < 0,05$.

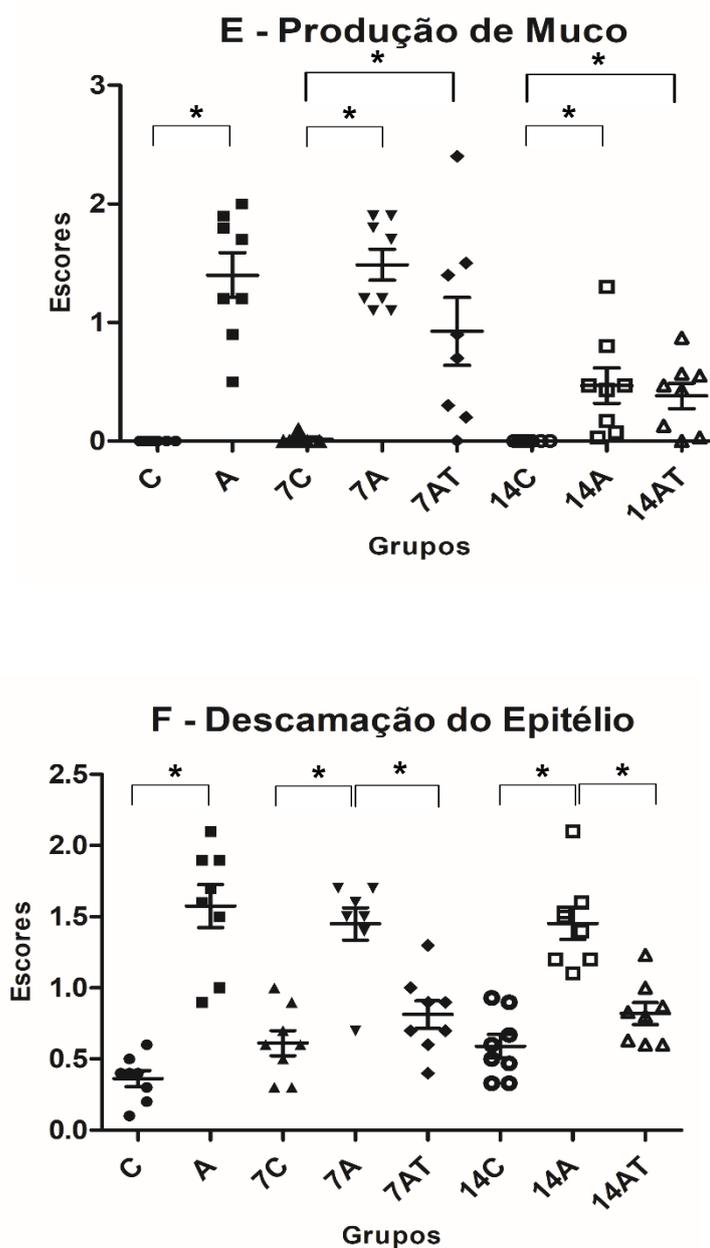


Gráfico 16 - Análises histopatológicas quanto à produção de muco e deposição de colágeno no pulmão dos animais avaliados no dia 0 (C: Controle e A: Asma), aos sete dias (7C: Controle, 7A: Asma e 7AT: Tratamento) e aos 14 dias (14C: Controle, 14A: Asma e 14AT: Tratamento). Houve diferença estatística no muco produzido pelas células caliciformes dos grupos A vs. C, 7A vs. 7C, 7AT vs. 7C, 14A vs. 14C, 14AT vs. 14C. Na deposição de colágeno houveram diferenças entre os grupos A vs. C, 7A vs. 7C, 7AT vs. 7A, 14A vs. 14C, 14AT vs. 14A. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo investigar as propriedades imunomoduladoras das CTMs de medula óssea humana em camundongos Balb/c submetidos ao modelo experimental de asma alérgica, no momento do transplante, aos sete e 14 dias após tratamento. Foi possível observar a funcionalidade e confiabilidade do modelo empregado, em todos os momentos investigados e, os efeitos benéficos das CTMs até os sete dias após o transplante. Contudo, em algum momento entre sete e 14 dias após a instilação intratraqueal de CTMs ocorreu um declínio dos efeitos anti-inflamatórios, com recorrência do quadro, o que necessitará um melhor entendimento em futuras investigações.

Este estudo se utilizou dos camundongos Balb/c como modelo animal e, a OVA como alérgeno. As alterações nos sinais clínicos que caracterizam a asma dificilmente são observadas nestes animais, o que implicaria em dificuldade na comparação com as manifestações clínicas observadas em pessoas com asma. Contudo, o modelo experimental de asma utilizado permite a investigação dos mecanismos fisiopatológicos, objetivo do presente estudo, sendo considerado padrão ouro para este tipo de investigação, como a nossa, na qual se buscou o entendimento de mecanismos inflamatórios no processo da asma (SHIN et al., 2009).

A via intratraqueal utilizada para a provocação alérgica das vias aéreas também foi empregada em outros estudos (XIE et al., 2015; Abreu et al., 2017), a qual simula a exacerbação da asma em pessoas quando o alérgeno é inalado (NIALS et al., 2008). Foi a mesma via de administração das CTMs para a avaliação da terapia celular, utilizada com sucesso em estudos prévios (SPAZIANO et al., 2016; URBANEK et al., 2016). A via intravenosa também é estudada em protocolos semelhantes ao nosso (OGULUR et al., 2014). A administração das CTMs pela via intravenosa faz com que a maioria das células seja aprisionada nos pulmões (KURTZ, 2008), o que pode ser vantajoso para o tratamento da asma, mas ainda precisa ser melhor investigado para a ocorrência de efeito indesejável como a embolia pulmonar (JUNG et al., 2013), sendo que a via intratraqueal permite o transplante das células diretamente no órgão afetado.

O transplante xenogênico, tal qual empregado no presente estudo onde se utilizou CTMs derivadas de medula óssea humana, é a escolha de muitos

pesquisadores que empregam o modelo de asma em camundongos. São bem demonstrados os efeitos positivos pelo sistema imunológico de animais que são tratados com CTMs advindas de outra espécie (BONFIELD et al., 2010; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2014; CHAN et al., 2016).

A eficácia do modelo experimental de asma alérgica utilizado no presente estudo, foi verificada nos animais que sofreram repetidas exposições à OVA durante as etapas de sensibilização e provocação alérgica, e que foram eutanasiados no dia 0. Este foi um cuidado que usualmente não se observa em estudos semelhantes a este, mas que demonstrou a presença do processo inflamatório difuso nos animais que seriam tratados com CTMs.

A alteração que, no presente estudo inicialmente demonstrou a presença e persistência do processo inflamatório compatível com a asma, foi a maior concentração de células totais no LBA aos sete e 14 dias. Estes resultados corroboram com o intenso infiltrado inflamatório no tecido pulmonar nos três momentos avaliados. Além disso, a concentração aumentada de proteínas no LBA dos animais com asma em todas as avaliações temporais indica o comprometimento da barreira alvéolo-capilar como resultado do processo inflamatório instalado (VAN VYVE et al., 1995; HAMSTEN et al., 2016).

A asma alérgica em estado de exacerbação é caracterizada pelo aumento de eosinófilos no pulmão (ZHANG et al., 2007), conforme observado no LBA dos animais no dia 0 e aos sete dias. O recrutamento destas células ocorre pela IL-5, que se encontra aumentada na resposta inflamatória tanto no LBA quanto no soro dos animais com asma avaliados no sétimo dia. Aos 14 dias, os níveis da IL-5 diminuíram e conseqüentemente os eosinófilos também. O padrão eosinofílico representa um evento importante na asma alérgica e tem sido correlacionado em diversos estudos com a intensa inflamação nas vias aéreas (OU-YANG et al., 2011; CHO et al., 2014; GROOT et al., 2015; MOHAMMADIAN et al., 2016).

Uma importante consequência decorrente da ativação dos eosinófilos no pulmão é a produção aumentada de espécies reativas do oxigênio. Optou-se pela investigação do peróxido de hidrogênio, o qual pode originar o radical hidroxila, altamente nocivo ao tecido pulmonar (RAHMAN et al., 2006). Os níveis aumentados do oxidante H₂O₂ aos sete dias, sugerem uma das vias pela qual houve a

intensificação dos danos pulmonares observados na avaliação histopatológica (REIS et al., 2015).

Adicionalmente, as alterações teciduais que foram observadas nos animais investigados, são decorrentes também do aumento da produção de IL-13, a qual participa intensamente do processo inflamatório na asma. No presente estudo, houve aumento significativo desta interleucina pró-inflamatória no LBA dos animais submetidos à OVA, observado no dia 0 e estendeu-se aos sete e 14 dias de avaliação. A IL-13 está relacionada à hiperresponsividade das vias aéreas, o que não foi medido neste estudo. No entanto, nas alterações do remodelamento pulmonar, para os quais a IL-13 está envolvida (ERLE; SHEPPARD, 2014), verificou-se o espessamento da camada muscular lisa, que favorece o estreitamento das vias aéreas e conseqüentemente a hiperresponsividade (IJPMA et al., 2017). Adicionalmente, os resultados observados de IL-13 podem ser corroborados com a intensa deposição de colágeno na região peribronquiolar observado em todos os tempos avaliados. Esta alteração também contribui para a hiperresponsividade e para o desenvolvimento da fibrose subepitelial em várias intensidades (CORREN, 2013; KANG et al., 2017). A IL-13 ainda é responsável pelas alterações no tecido pulmonar relacionadas ao espessamento e descamação do epitélio, bem como a metaplasia calciforme, identificados em todos os momentos de avaliação.

O aumento da quantidade de células calciformes no dia 0, sete e 14, resultando na metaplasia da mucosa, inicialmente ocorre para aumentar a produção de muco melhorando a depuração de células mortas e patógenos das vias aéreas, mas que resultam em obstrução luminal o que, em pessoas, compromete a troca gasosa e agrava os sinais clínicos de dificuldade respiratória. Esta é uma característica da asma reconhecidamente mediada pela IL-4 e IL-13 (COHN et al., 2002), apesar da IL-4 não ter sido investigada no presente estudo. Em doenças crônicas respiratórias, a metaplasia mucosa persiste e resulta em obstrução das vias aéreas que contribui significativamente para a morbidade e mortalidade (CURRAN; COHN, 2010; FIRINCI et al., 2011; ERLE; SHEPPARD, 2014).

Tem sido bastante discutida a participação da IL-17A no contexto da asma. Sendo assim, optou-se por quantificá-la neste estudo. A IL-17A foi identificada em níveis aumentados no LBA dos animais com asma no dia do transplante (grupo A). A presença de IL-17A tem sido reportada no pulmão, escarro, LBA e soro de pacientes

com asma (MOLET et al., 2001; SONG et al., 2008), e no presente estudo, o aumento da IL-17 juntamente da IL-5 na avaliação sete dias após o transplante, possivelmente ocorreu por uma atividade sinérgica no recrutamento e ativação dos eosinófilos (DIAS; BANERJEE, 2013).

Também houve interesse neste estudo em investigar o TNF- α , mediador inflamatório da resposta TH1. No presente estudo, o TNF- α encontrou-se aumentado no momento do transplante em animais com asma. O TNF- α é uma citocina expressa em grandes quantidades por mastócitos, e já foi identificado em concentrações aumentadas no LBA das vias aéreas de pacientes com asma. É um importante quimioatrativo para neutrófilos e eosinófilos. O TNF- α aumenta o efeito citotóxico dos eosinófilos nas células endoteliais e também contribui para a hiperresponsividade das vias aéreas (BERRY et al., 2006).

O tratamento realizado nos animais interferiu significativamente no processo inflamatório da asma aos sete dias, o que demonstra os efeitos positivos das CTMs no modelo experimental de asma alérgica. Houve melhora significativa das alterações observadas na maioria dos critérios avaliados, nos animais tratados em comparação aos que não receberam tratamento.

Sete dias após o transplante com CTM foi possível identificar a redução do processo inflamatório através da redução na quantidade de eosinófilos no LBA juntamente com níveis mais baixos de IL-5 e IL-17, das proteínas, e conseqüentemente, também da produção do oxidante H₂O₂.

Adicionalmente, o tratamento com as CTMs resultou na redução da IL-13 no LBA, o que esteve associado à melhora dos danos provocados no tecido pulmonar, que pôde ser observado pela redução do infiltrado inflamatório, deposição de colágeno, espessamento muscular e epitelial e descamação do epitélio para o lúmen dos bronquíolos. Neste caso, transpondo este tratamento para um possível paciente asmático ainda jovem, pode-se sugerir que o tratamento com CTMs auxiliará no controle do processo inflamatório e das alterações teciduais decorrentes da asma, mas também trará benefício na qualidade da troca gasosa e bem-estar.

O controle do processo inflamatório parece ser o ponto central dentre os efeitos obtidos pelo tratamento da asma com as CTM e, pode ser observado não somente pela redução das interleucinas pró-inflamatórias, mas especialmente por isto ter sido acompanhado pelo aumento na produção da interleucina anti-inflamatória IL-10 no

LBA e no soro dos animais tratados. Este resultado evidencia a participação das CTMs na imunomodulação na asma e na recuperação do tecido pulmonar.

Aos 14 dias após infusão de CTMs, os animais apresentaram algumas alterações que retornaram ao quadro da asma, sugerindo que o tratamento não permaneceu com toda a eficácia observada no sétimo dia de avaliação. Observou-se o aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, novo aumento da IL-5 com a resultante atração de eosinófilos para o pulmão dos animais. Com a manutenção dos níveis reduzidos da IL-13 e IL-17, o tratamento continuou controlando o dano tecidual através da redução do infiltrado inflamatório, deposição de colágeno, espessamento epitelial e descamação do epitélio. E ainda, de acordo com os resultados obtidos aos sete dias, a IL-10 permaneceu inalterada no décimo quarto dia após transplante, sinalizando os efeitos benéficos da terapia celular. Contudo, levanta-se a hipótese de que, no período entre o sétimo e décimo quarto dias após o transplante de CTMs pode ser necessário uma nova infusão para o prolongamento dos efeitos terapêuticos.

6 CONCLUSÃO

O modelo experimental de inflamação pulmonar proposto neste estudo desencadeou a asma alérgica em camundongos Balb/c e manteve-se aos 14 dias.

As CTMs de medula óssea humana apresentaram efeitos imunomoduladores em camundongos Balb/c submetidos ao modelo experimental de asma, pelo controle do processo inflamatório e do remodelamento pulmonar principalmente aos sete dias após tratamento, contudo novos estudos devem investigar a intervenção com CTMs antes dos 14 dias após o tratamento inicial.

7 REFERÊNCIAS

ABREU, S. C. et al. Bone Marrow, adipose, and lung tissue-derived murine mesenchymal stromal cells release different mediators and differentially affect airway and lung parenchyma in experimental asthma. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1557-1567, 2017.

AMORIN, B. et al. Mesenchymal stem cells-characterization, cultivation, immunological properties, and clinical applications. **Revista do HCPA & Faculdade de Medicina da UFRGS**, v. 32, n. 1, p. 71-81, 2012.

BAI, L. et al. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 862-870, 2012.

BARNES, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 11, p. 3546-3556, 2008.

BARUSSI, F. C. M. et al. Intratracheal therapy with autologous bone marrow-derived mononuclear cells reduces airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. **Respiratory, Physiology & Neurobiology**, v. 232, p. 35-42, 2016.

BAXI, S. N.; PHIPATANAKUL, Wanda. The role of allergen exposure and avoidance in asthma. **Adolescent Medicine: State of the Art Reviews**, v. 21, n. 1, p. 57, 2010.

BERAIR, R.; SAUNDERS, R.; BRIGHTLING, C. E. Origins of increased airway smooth muscle mass in asthma. **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, p. 145, 2013.

BERRY, M. A. et al. Evidence of a role of tumor necrosis factor α in refractory asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 7, p. 697-708, 2006.

BIEBACK, K. et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Stem Cells**, v. 22, n. 4, p. 625-634, 2004.

BLOOMFIELD, S. F. et al. Time to abandon the hygiene hypothesis: new perspectives on allergic disease, the human microbiome, infectious disease prevention and the role of targeted hygiene. **Perspectives in Public Health**, v. 136, n. 4, p. 213-224, 2016.

BONFIELD, T. L. et al. Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo. **Journal of Inflammation**, v. 7, p. 1-12, 2010.

BONFIELD, T. L.; ROSS, K. R. Asthma heterogeneity and therapeutic options from the clinic to the bench. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 12, n. 1, p. 60-67, 2012.

BRUSSELLE, G. G. et al. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 24, n. 1, p. 73-80, 1994.

BUSSE, P. J. et al. Chronic exposure to TNF- α increases airway mucus gene expression in vivo. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 6, p. 1256-1263, 2005.

BUSSE, P. J. et al. Decrease in airway mucous gene expression caused by treatment with anti-tumor necrosis factor α in a murine model of allergic asthma. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 103, n. 4, p. 295-303, 2009.

BUSSE, W. W.; LEMANSKE, R. F.; GERN, J. E. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. **The Lancet**, v. 376, n. 9743, p. 826-834, 2010.

CAFFARELLI, C. et al. Asthma and food allergy in children: Is there a connection or interaction? **Frontiers in Pediatrics**, v. 4, p. 1-7, 2016.

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1076-1084, 2006.

CHAN, C. K. et al. The modulation of Th2 immune pathway in the immunosuppressive effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells in a murine asthmatic model. **Inflammation Research**, v. 65, n. 10, p. 795-801, 2016.

CHO, K. S. et al. Adipose-derived stem cells ameliorate allergic airway inflammation by inducing regulatory T cells in a mouse model of asthma. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

COHN, L. et al. Cytokine regulation of mucus production in a model of allergic asthma. **Novartis Foundation Symposia**, v. 248, p. 201-220, 2002.

CORCIONE, A. et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 367-372, 2006.

CORREN, J. Role of interleukin-13 in asthma. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 13, n. 5, p. 415-420, 2013.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 5771-5777, 2008.

CURRAN, D. R.; COHN, L. Advances in mucous cell metaplasia: a plug for mucus as a therapeutic focus in chronic airway disease. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 42, n. 3, p. 268-275, 2010.

DE MIGUEL, M. et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. **Current Molecular Medicine**, v. 12, n. 5, p. 574-591, 2012.

DENNING, D. W. et al. Fungal allergy in asthma - state of the art and research needs. **Clinical and Translational Allergy**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2014.

DIAS, P. M.; BANERJEE, G. The role of TH17/IL-17 on eosinophilic inflammation. **Journal of Autoimmunity**, v. 40, p. 9-20, 2013.

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

ERLE, D. J.; SHEPPARD, D. The cell biology of asthma. **Journal of Cell Biology**, v. 205, n. 5, p. 621-631, 2014.

FIGUEIREDO, C. A. et al. Environmental conditions, immunologic phenotypes, atopy, and asthma: new evidence of how the hygiene hypothesis operates in Latin America. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 4, p. 1064-1068. 2013.

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.

FOONG, R. X.; DU TOIT, G.; FOX, A. T. Asthma, food allergy, and how they relate to each other. **Frontiers in Pediatrics**, v. 5, p. 1-6, 2017.

GAO, F. et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. **Cell Death & Disease**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2016.

GARCIA, G. et al. Anti-interleukin-5 therapy in severe asthma. **European Respiratory Review**, v. 22, n. 129, p. 251-257, 2013.

GLENN, J. D.; WHARTENBY, K. A. Mesenchymal stem cells: emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 5, p. 526-539, 2014.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2015. http://ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/01/GINA_Pocket_2015.pdf. Acessado em: 08 de fevereiro de 2017.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA, 2017. <http://ginasthma.org/2017-pocket-guide-for-asthma-management-and-prevention/>. Acessado em: 02 de maio de 2017.

GOLDENBERG, R. C.; CARVALHO, A. C. C.; Células-tronco mesenquimais: Conceitos, métodos de obtenção e aplicações. Atheneu editora; 2012. 224 p.

GREGORY, L. G. et al. Overexpression of Smad2 drives house dust mite - mediated airway remodeling and airway hyperresponsiveness via activin and IL-25. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 2, p. 143-154, 2010.

GRONTHOS, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 8, p. 531-535, 2002.

GROOT, J. C.; TEN BRINKE, A.; BEL, E. H. D. Management of the patient with eosinophilic asthma: a new era begins. **ERJ Open Research**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2015.

GUALDI, L. P. et al. Modelos murinos para pesquisas em asma: uma análise crítica atualizada. **Scientia Medica**, v. 20, n. 3, p. 236-242, 2010.

GUARNIERI, M.; BALMES, J. R. Outdoor air pollution and asthma. **The Lancet**, v. 383, n. 9928, p. 1581-1592, 2014.

HAMSTEN, C. et al. Elevated levels of FN1 and CCL2 in bronchoalveolar lavage fluid from sarcoidosis patients. **Respiratory Research**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2016.

HAN, S. W.; CARVALHO, A. C. C.; SOUZA, C. F. Células-tronco: Novas Perspectivas Terapêuticas em Cardiologia. Atheneu editora; 2011. 258 p.

HASSAN, M. et al. Airway smooth muscle remodeling is a dynamic process in severe long-standing asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 5, p. 1037-1045. 2010.

HE, Y. et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase transfected mesenchymal stem cells induce kidney allograft tolerance by increasing the production and function of regulatory T cells. **Transplantation**, v. 99, n. 9, p. 1829-1838, 2015.

HIROTA, N.; MARTIN, J. G. Mechanisms of airway remodeling. **CHEST Journal**, v. 144, n. 3, p. 1026-1032, 2013.

HOLLOWAY, J. W.; ARSHAD, S. H.; HOLGATE, S. T. Using genetics to predict the natural history of asthma? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 2, p. 200-209, 2010.

HORWITZ, E. M. et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nature medicine**, v. 5, n. 3, p. 309-313, 1999.

HSU, W. T. et al. Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell-induced IL-10+ IFN- γ + CD4+ regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 5, p. 2372-2380, 2013.

IJPMA, G. et al. Directional preference of airway smooth muscle mass increase in human asthmatic airways. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 312, n. 6, p. L845-L854, 2017.

JAMES, A. L. et al. Airway smooth muscle hypertrophy and hyperplasia in asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 185, n. 10, p. 1058-1064, 2012.

JUNG, J. W. et al. Familial occurrence of pulmonary embolism after intravenous, adipose tissue-derived stem cell therapy. **Yonsei Medical Journal**, v. 54, n. 5, p. 1293-1296, 2013.

KAMARUZAMAN, N. A. et al. The rabbit as a model for studying lung disease and stem cell therapy. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

KANG, S. Y. et al. Immunologic regulatory effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in a murine ovalbumin asthma model. **Clinical & Experimental Allergy**, v.47, n.7 p. 1-9, 2017.

KNIGHT, D. A.; ROSSI, F. M.; HACKETT, T. L. Mesenchymal stem cells for repair of the airway epithelium in asthma. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 4, n. 6, p. 747-758, 2010.

KONDO, M. et al. Elimination of IL-13 reverses established goblet cell metaplasia into ciliated epithelia in airway epithelial cell culture. **Allergology International**, v. 55, n. 3, p. 329-336, 2006.

KONDO, M. et al. Niflumic acid inhibits goblet cell degranulation in a Guinea pig asthma model. **Allergology International**, v. 61, n. 1, p. 133-142, 2012.

KUMAR, H. M. S. et al. Development of novel lipidated analogs of picoside as vaccine adjuvants: acylated analogs of picoside-II elicit strong Th1 and Th2 response to ovalbumin in mice. **Vaccine**, v. 28, n. 52, p. 8327-8337, 2010.

KUMAR, R. K.; HERBERT, C.; FOSTER, P. S. Mouse models of acute exacerbations of allergic asthma. **Respirology**, v. 21, n. 5, p. 842-849, 2016.

KURTZ, A. Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. **International Journal of Stem Cells**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2008.

LAN, Y. W. et al. Oncostatin M-Preconditioned mesenchymal stem cells alleviate bleomycin-induced pulmonary fibrosis through paracrine effects of the hepatocyte growth factor. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 3, p. 1006-1017, 2017.

LIN, F. et al. ADAM33 protein expression and the mechanics of airway smooth muscle cells are highly correlated in ovalbumin-sensitized rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 4, p. 1209-1215, 2013.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, I. et al. Human mesenchymal stem cells resolve airway inflammation, hyperreactivity, and histopathology in a mouse model of occupational asthma. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 19, p. 2352-2363, 2014.

MARTINEZ-NUNEZ, R. T.; LOUAFI, F.; SANCHEZ-ELSNER, T. The interleukin 13 (IL-13) pathway in human macrophages is modulated by microRNA-155 via direct targeting of interleukin 13 receptor $\alpha 1$ (IL13R $\alpha 1$). **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 3, p. 1786-1794, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis-/sas/2010/prt0709_17_12_2010.html. Acessado em: 15 de Agosto de 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015. <http://www.blog.saude.gov.br/35040-asma-atinge-6-4-milhoes-de-brasileiros.html>. Acessado em: 24 de Outubro de 2016.

MOHAMMADIAN, M. et al. Evaluation of simvastatin and bone marrow-derived mesenchymal stem cell combination therapy on airway remodeling in a mouse asthma model. **Lung**, v. 194, n. 5, p. 777-785, 2016.

MOIR, L. M.; BURGESS, J. K.; BLACK, J. L. Transforming growth factor β 1 increases fibronectin deposition through integrin receptor α 5 β 1 on human airway smooth muscle. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 4, p. 1034-1039, 2008.

MOLET, S. et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 3, p. 430-438, 2001.

MUEHLMANN, L. A. et al. Dietary supplementation with soybean lecithin increases pulmonary PAF bioactivity in asthmatic rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 6, p. 532-537, 2010.

MUKHERJEE, A. B.; ZHANG, Z. Allergic asthma: influence of genetic and environmental factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 38, p. 32883-32889, 2011.

MULLANE, K. Asthma translational medicine: report card. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 6, p. 567-585, 2011.

MULLANE, K; WILLIAMS, M. Animal models of asthma: reprise or reboot? **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 131-139, 2014.

MURDOCH, J. R.; LLOYD, C. M. Chronic inflammation and asthma. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 690, n. 1, p. 24-39, 2010.

MURPHY, D. M. et al. Recent advances in the pathophysiology of asthma. **CHEST Journal**, v. 137, n. 6, p. 1417-1426, 2010.

NIALS, A. T.; UDDIN, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. **Disease Models & Mechanisms**, v. 1, n. 4-5, p. 213-220, 2008.

OGULUR, I. et al. Suppressive effect of compact bone-derived mesenchymal stem cells on chronic airway remodeling in murine model of asthma. **International Immunopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 101-109, 2014.

OU-YANG, H. F. et al. Suppression of allergic airway inflammation in a mouse model of asthma by exogenous mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, n. 12, p. 1461-1467, 2011.

PATTERSON, M. F.; BORISH, L.; KENNEDY, J. L. The past, present, and future of monoclonal antibodies to IL-5 and eosinophilic asthma: a review. **Journal of Asthma and Allergy**, v. 8, p. 125-134, 2015.

QU, J. et al. Recent developments in the role of reactive oxygen species in allergic asthma. **Journal of Thoracic Disease**, v. 9, n. 1, p. E32-E43, 2017.

RAHMAN, I.; BISWAS. S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n. 1-3, p. 222-239, 2006.

REBELATTO, C. K. et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 7, p. 901-913, 2008.

REIS, A. C. et al. Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation. **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 2, p. 1-10, 2015.

ROYCE, S. G. et al. The regulation of fibrosis in airway remodeling in asthma. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 2, p. 167-175, 2012.

SAHINER, U. M. et al. Oxidative stress in asthma. **World Allergy Organization Journal**, v. 4, n. 10, p. 151-158, 2011.

SCHNYDER-CANDRIAN, S. et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 12, p. 2715-2725, 2006.

SHARMA, R. R. et al. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. **Transfusion**, v. 54, n. 5, p. 1418-1437, 2014.

SHIN, Y. S.; TAKEDA, K.; GELFAND, E. W. Understanding asthma using animal models. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 1, n. 1, p. 10-18, 2009.

SILVA, P. L. et al. Impact of lung remodeling on respiratory mechanics in a model of severe allergic inflammation. **Respiratory, Physiology & Neurobiology**, v. 160, n. 3, p. 239-248, 2008.

SONG, C. et al. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 6117-6124, 2008.

SPAGGIARI, G. M. et al. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer–cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2, 3-dioxygenase and prostaglandin E2. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1327-1333, 2008.

SPAZIANO, G. et al. Intratracheal administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorates lung function. **European Respiratory Journal**, v. 48, n. 60, p. 1-10, 2016.

STEINKE, J. W. Anti–interleukin-4 therapy. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 24, n. 4, p. 599-614, 2004.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ: British Medical Journal**, v. 299, n. 6710, p. 1259-1260, 1989.

SUN, Y. Q. et al. Human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation in mice. **Stem Cells**, v. 30, n. 12, p. 2692-2699, 2012.

TANG, Y. et al. Combinatorial intervention with mesenchymal stem cells and granulocyte colony-stimulating factor in a rat model of ulcerative colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, n. 7, p. 1948-1957, 2015.

TAYLOR, D. R. et al. A new perspective on concepts of asthma severity and control. **European Respiratory Journal**, v. 32, n. 3, p. 545-554, 2008.

TO, T. et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. **BMC Public Health**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2012.

TRIPATHI, P.; AWASTHI, S.; GAO, P. ADAM metallopeptidase domain 33 (ADAM33): a promising target for asthma. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 10, p. 2566-2573, 2006.

URBANEK, K. et al. Intratracheal administration of mesenchymal stem cells modulates tachykinin system, suppresses airway remodeling and reduces airway hyperresponsiveness in an animal model. **Plos One**, v. 11, n. 7, p.1-19, 2016.

URRY, Z.; XYSTRAKIS, E.; HAWRYLOWICZ, C. M. Interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 6, n. 5, p. 363-371, 2006.

VAN VIVE, T. et al. Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 95, n. 1, p. 60-68, 1995.

VANDENPLAS, O. Occupational asthma: etiologies and risk factors. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 3, n. 3, p. 157-167, 2011.

VIJVERBERG, S. J. et al. Clinical utility of asthma biomarkers: from bench to bedside. **Biologics**, v. 7, p. 199-210, 2013.

WEDES, S. H. et al. Noninvasive markers of airway inflammation in asthma. **Clinical and Translational Science**, v. 2, n. 2, p. 112-117, 2009.

WENZEL, S. E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 716-725, 2012.

XIAO, C. et al. Defective epithelial barrier function in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 3, p. 549-556, 2011.

XIE, J. et al. An intratracheal challenge murine model of asthma: can bronchial inflammation affect the nose? **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 7, n. 1, p. 76-82, 2015.

XISTO, D. G. et al. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, n. 8, p. 829-837, 2005.

XU, C. et al. TGF- β promotes immune responses in the presence of mesenchymal stem cells. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 1, p. 103-109, 2014.

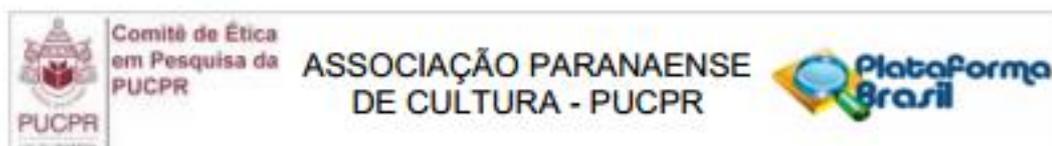
ZHANG, J. Y.; WENZEL, S.E. Tissue and BAL based biomarkers in asthma. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 623-632, 2007.

ZHAO, Q.; REN, H.; HAN, Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. **Journal of Cellular Immunotherapy**, v. 2, n. 1, p. 3-20, 2016.

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

8 ANEXOS

PARECER DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos da Injeção Intravenosa de Células-Tronco Mesenquimais Humanas na Inflamação Pulmonar em Modelo de Asma Aguda em Camundongos Balb/c.

Pesquisador: LIDIANE MARIA BOLDRINI LEITE

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 04425212.6.0000.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 119.994

Data da Relatoria: 10/10/2012

Apresentação do Projeto:

Projeto de grande relevância acadêmico-científica que objetiva avaliar os efeitos da Injeção Intravenosa de Células-Tronco Mesenquimais Humanas na Inflamação Pulmonar em Modelo de Asma Aguda em Camundongos Balb/c. Serão utilizados 48 camundongos Balb/c machos de 6 a 8 semanas de idade, provenientes do biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Os animais serão divididos em 4 grupos, sendo que dois grupos serão avaliados 7 dias após transplante e os demais 14 dias após transplante:

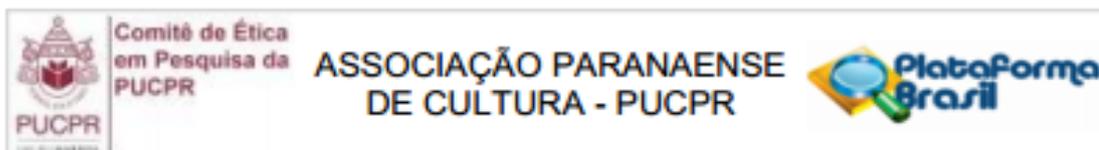
asmáticos não tratados (controle 7 dias, n=12), asmáticos tratados (7 dias, n=12), asmáticos não tratados (controle 14 dias, n=12) e asmáticos tratados (14 dias, n=12).

O projeto contém as etapas de obtenção das Células-Tronco Mesenquimais (CTMs) Humanas, isolamento das

células mononucleares da medula óssea humana, cultivo de CTMs, imunofenotipagem, indução dos camundongos à Asma, imunização à Ovalbumina (OVA), desafio Alergênico Pulmonar, tratamento com CTMs

humanas, colheita e processamento do Lavado Broncoalveolar (LBA), determinação do volume de

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
 Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3271-2292 Fax: (41)3271-2292 E-mail: nep@pucpr.br



LBA,

concentração de proteínas do LBA, concentração de nitritos no LBA, avaliação de estresse oxidativo, colheita dos pulmões, avaliações histopatológicas, mensuração do influxo de Ca^{++} em Polimorfonucleares Induzidos por PAF (Bioatividade de PAF) e análise estatística.

Apresentação do Projeto:

Primários: Verificar os efeitos, bem como os mecanismos de ação das Células Tronco Mesenquimais Humanas

no quadro inflamatório na asma aguda em camundongos Balb/c.

Secundários: Avaliar os seguintes parâmetros, em camundongos Balb/c asmáticos tratados com células-tronco

mesenquimais humanas:- Acompanhamento citológico e histopatológico pulmonar;- Bioatividade de PAF e/ou

PAF-like, bem como a produção de hidroperóxidos no tecido pulmonar;- Produção de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) e nitrogênio (óxido nítrico), no lavado broncoalveolar e no pulmão.

Objetivo da Pesquisa:

Primários: Verificar os efeitos, bem como os mecanismos de ação das Células Tronco Mesenquimais Humanas

no quadro inflamatório na asma aguda em camundongos Balb/c.

Secundários: Avaliar os seguintes parâmetros, em camundongos Balb/c asmáticos tratados com células-tronco

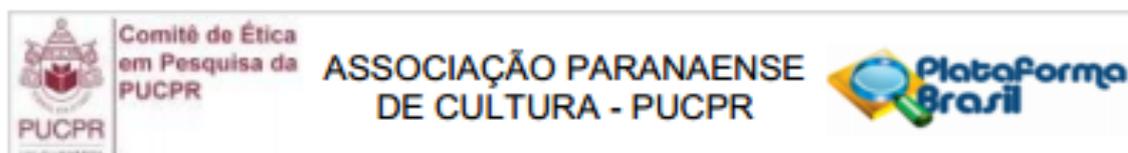
mesenquimais humanas:- Acompanhamento citológico e histopatológico pulmonar;- Bioatividade de PAF e/ou PAF-like, bem como a produção de hidroperóxidos no tecido pulmonar;- Produção de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) e nitrogênio (óxido nítrico), no lavado broncoalveolar e no pulmão.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos referem-se a indivíduos que são submetidos à procedimentos anestésicos, porém, serão minimizados considerando que o procedimento de coleta de material biológico será realizado em ambiente hospitalar devidamente equipado e contará com profissionais habilitados pra tal, que acompanharão os pacientes antes, durante e após a coleta da medula. Vale lembrar que estes pacientes já participam de outro projeto, o qual,

necessita da células-tronco mesenquimais da medula óssea para o seu desenvolvimento. Portanto,

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
 Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3271-2292 Fax: (41)3271-2292 E-mail: nep@puopr.br



apenas será coletado um volume maior de medula óssea para ser utilizado neste projeto.

Benefícios:

Este projeto não trará benefícios aos indivíduos que participarão da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de altíssima relevância científico-acadêmica, apresentando-se em acordo com todos os quesitos da Res. 196/96.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os TCLE e autorizações foram adequadamente entregues e cumprem os padrões definidos pela RES. 196/96.

Recomendações:

Não há recomendações ao projeto, uma vez que cumpre a Res. 196/96.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto encontra-se dentro das normas e recomendações do CEP, cumprindo todas a res. 196/96.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

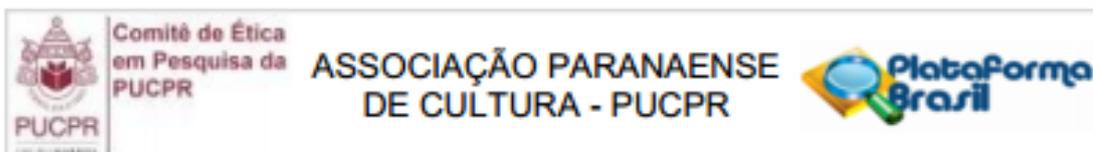
Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEPPUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
 Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3271-2292 Fax: (41)3271-2292 E-mail: nep@pucpr.br



CURITIBA, 10 de Outubro de 2012

Assinador por:
NAIM AKEL FILHO
(Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3271-2292 Fax: (41)3271-2292 E-mail: nep@pucpr.br

PARECER DO CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 27 de setembro de 2012.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 724 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Efeitos da injeção intravenosa de células-tronco mesenquimais humanas na inflamação pulmonar em modelo asma aguda em camundongos BALB/C

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Lidiane Maria Boldrini Leite

EQUIPE DE PESQUISA:

Lidiane Maria Boldrini Leite, Paulo Roberto Slud Brofman, Pedro Vicente Michelotto

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Medicina - Medicina

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Camundongo	Macho / Fêmea	6 á 8 semanas / 30g	B	100

O colegiado do CEUA em reunião no dia 27/09/2012, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser



mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,



Profª Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

XLIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ALERGIA E IMUNOLOGIA

28.09 a 01.10.2016 | Expo Curitiba | PR

XVII Congresso Luso Brasileiro de Alergia e Imunologia Clínica (SLBAIC)
Simpósio do Cone Sul da SLAAI | Simpósio Imunodeficiências Primárias LASID
III Congresso Latino Americano de Angioedema Hereditário

Certificamos que o trabalho

EFETOS DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NO REMODELAMENTO PULMONAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA

dos autores: LIDIANE MARIA BOLDRINI LEITE; PEDRO VICENTE MICHELOTTO JR; SÉRGIO ADRIANE BEZERRA DE MOURA; LUIZ GUILHERME ACHCAR CAPRIGLIONE; ALEXANDRA CRISTINA SENEAGLIA; FELIPE YUKIO ISHIKAWA FRAGOSO; PAULO ROBERTO SLUD BROFMAN, foi apresentado, na modalidade Oral, no evento XLIII Congresso Brasileiro de Alergia e Imunologia ocorrido de 28 de setembro a 01 de outubro de 2016 no Expo Unimed Curitiba em Curitiba/PR.

Curitiba, 01 de outubro de 2016



Loraine Farias Lanógraf
Presidente do XLIII Congresso Brasileiro de Alergia e Imunologia



José Carlos Pertini
Presidente da ASBAI



Nelson Augusto Rosário Filho
Presidente de Honra do XLIII Congresso Brasileiro de Alergia e Imunologia



Luisa Karla de Paula Arruda
Diretora Científica ASBAI

Realização



ASBAI
Associação Brasileira de
Alergia e Imunologia



Universidad de
los Andes



Sra. Lidiane Maria Boldrini Leite

has participated at Oral Presentation

**EFFECTS OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS IN
LUNG REMODELING IN ASTHMATIC BALB/C MICE**

**IV ISCT South and Central America Regional Meeting y
III Congreso de Terapia Celular y Medicina Regenerativa**

*Organized by the School of Medicine of Universidad de los Andes, Cells for Cells- Regenero and ISCT
From October 14 to 16, 2015
In Santiago, Chile*

Dr. Fernando Figueroa E.
Director Programa de Terapia Celular
Facultad de Medicina
Universidad de los Andes

Dr. Maroun Khoury
Director de Investigación
Cell for Cells
Universidad de los Andes

Dr. Massimo Dominici
Presidente
ISCT

Dr. Rogelio Altuzarra H.
Decano
Facultad de Medicina
Universidad de los Andes



Universidad de
los Andes



Sra. Lidiane Maria Boldrini Leite

has participated at Poster Presentation

*EFFECTS OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS IN LUNG
REMODELING IN ASTHMATIC BALB/C MICE.*

**IV ISCT South and Central America Regional Meeting y
III Congreso de Terapia Celular y Medicina Regenerativa**

*Organized by the School of Medicine of Universidad de los Andes, Cells for Cells- Regenero and ISCT
From October 14 to 16, 2015
In Santiago, Chile*

Dr. Fernando Figueroa E.
Director Programa de Terapia Celular
Facultad de Medicina
Universidad de los Andes

Dr. Maroun Khoury
Director de Investigación
Cell for Cells
Universidad de los Andes

Dr. Massimo Dominici
Presidente
ISCT

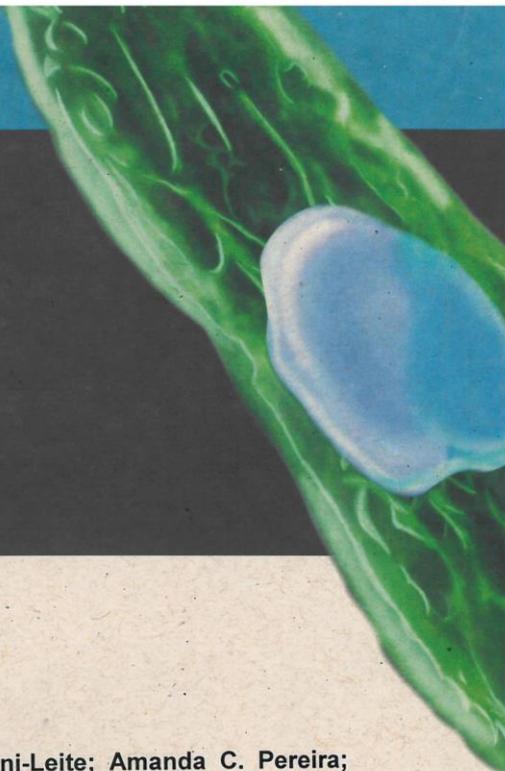
Dr. Rogelio Altuzarra H.
Decano
Facultad de Medicina
Universidad de los Andes

CERTIFICATE



I LATIN AMERICAN
VIII BRAZILIAN AND
I ARGENTINE CONGRESS
OF **STEM CELLS AND
CELL THERAPY**

I MEETING ON STEM CELLS
AND CELL THERAPY IN
VETERINARY MEDICINE



We hereby certify that **Lidiane Maria Boldrini-Leite; Amanda C. Pereira; Pedro Vicente Michelotto Junior; Sérgio Adriane B. Moura; Luiz Guilherme A. Capriglione; Alexandra Cristina Senegaglia; Marciel Z. Drobniowski; Felipe Yukio I. Fragoso; Paulo Roberto S. Brofman** contributed as **AUTHORS** during the I Latin American, VIII Brazilian and I Argentine Congress of Stem Cells and Cell Therapy, and I Meeting on Cell Therapy and Stem Cells in Veterinary Medicine, held in Foz do Iguaçu, Brazil, on October 15-17, 2014.
Title: **INTRATRACHEAL INJECTION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS IN AN ACUTE ASTHMA MODEL IN BALB/C MICE**

Paulo R. S. Brofman - PhD
Coordinator - Brazil

Fernando Pitossi - PhD
Coordinator - Argentina

Sérgio Paulo Bydlowski
ABT.Cel President

PROMOTION AND REALIZATION



SUPPORT



SPONSOR



PP-155 Intratracheal injection of human mesenchymal stem cells in an acute asthma model in BALB/c mice

In vivo models

¹LM Boldrini Leite¹, PV Michelotto Júnior², S Moura³, LGA Capriglione¹, AC Senegaglia¹, CL Rebelatto¹, JAL Santos¹, AL Zanatta⁴ & PRS Brofman¹

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Núcleo de Tecnologia Celular, Curitiba, Brazil

²Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária, São José dos Pinhais, Brazil

³Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Morfologia, Natal, Brazil

⁴Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Metabolismo Celular, Curitiba, Brazil

Objective

To evaluate the effects of the intratracheal injection of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) in the inflammatory process in an acute asthma model using BALB/c mice.

Materials & methods

This study was approved by the local Ethics Committee (n.119,994 and 724). Nine male mice were divided into three groups: control (C), asthmatics (A) and treated asthmatics (TA). Mice were immunized using an adjuvant-free protocol of intraperitoneal injections of 10 µg of ovalbumin on days 0, 2, 4, 7, 9 and 10. On days 15, 18 and 21, A and TA groups received intratracheal instillation of 20 µg of ovalbumin and C received saline. A total of 24 h after the last challenge, the TA group was treated with an intratracheal injection of 1×10^6 MSCs, A and C received the same volume of saline. On the seventh day after transplant, the animals were euthanized. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was collected for the measurement of protein concentration, while lungs were removed for histopathology. Histopathology analysis was carried out in 30 randomly selected bronchioles, 15 of each lung. To assess the presence and intensity of the inflammatory cell infiltrate and remodeling, lung sections were stained with hematoxylin–eosin. Collagen deposition was observed using Masson Trichrome and evaluation of mucus-producing cells was performed using PAS/Alcian Blue. Evaluations were semi-quantitative, applying a grading system used to calculate the ratio of inflammation severity according to the following criteria: thickening of the epithelium and epithelium desquamation, inflammatory infiltration, thickening of muscle, increased collagen fibers and mucus production. Statistical analysis was performed with ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons.

Results

The protein concentration in BAL fluid of the A group was higher than in C (0.47 ± 0.01 vs 0.21 ± 0.01 mg/ml of BAL fluid; $p < 0.001$), and lower in the TA than in A (0.24 ± 0.02 vs 0.47 ± 0.01 mg/mL of BAL fluid; $p < 0.001$). Increase in BAL fluid protein concentration is a sign of pulmonary inflammation and alveolar–capillary barrier disruption. According to histopathological results an epithelial layer thickening was observed in animals of the A group in comparison with C (1.87 ± 1.0 vs 1.17 ± 0.05 cells/mm²; $p < 0.001$). Although MSC treatment improved this condition, the TA group showed recovering of epithelial layer architecture in comparison with A (1.23 ± 0.9 vs 1.87 ± 1.0 cells/mm²; $p < 0.05$). Also the desquamation shedding of the epithelium in A group was higher than in C (1.30 ± 1.0 vs 0.23 ± 0.50 cells/mm²; $p < 0.001$), decreasing in the TA group in comparison with A (0.74 ± 0.77 vs 1.3 ± 1.0 cells/mm²; $p < 0.05$). Additionally, collagen deposition was higher in group A than in C (1.87 ± 0.78 vs 1.1 ± 0.35 fibers/mm²; $p < 0.001$), decreasing in the TA in comparison with A (1.33 ± 0.48 vs 1.87 ± 0.78 fibers/mm²; $p < 0.05$). Bronchiolar muscle layer thickness was increased in animals of the A group in comparison with C (1.51 ± 0.78 vs 0.40 ± 0.56 cells/mm²; $p < 0.001$), which was lower in TA than in A (0.80 ± 0.76 vs 1.51 ± 0.78 cells/mm²; $p < 0.001$). Finally, the intensity of the inflammatory infiltrate as well as the amount of mucus-producing cells did not differ between groups.

Conclusion

The results demonstrated a reduction of inflammatory process in the asthmatic mice 7 days after intratracheal injection of human MSCs, mainly concerning airway remodeling, suggesting a potential therapeutic use of MSCs in acute asthma.

POS-G

PPGCS14

INJEÇÃO INTRATRAQUEAL DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS NO MODELO DE ASMA AGUDA EM CAMUNDONGOS BALB/C

LEITE, Lidiane Maria Boldrini¹
 MICHELOTTO JUNIOR, Pedro Vicente²
 MOURA, Sergio Adriane Bezerra de³
 CAPRIGLIONE, Luiz Guilherme Achcar⁴
 SENEGAGLIA, Alexandra Cristina⁵
 REBELATTO, Carmen Lucia Kuniyoshi⁶
 SANTOS, Jorge Augusto Lopes dos⁷
 ZANATTA, Ana Lucia⁸
 FRAGOSO, Felipe Yukio Ishikawa⁹
 BROFMAN, Paulo Roberto Slud¹⁰
 Projeto em andamento - Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Escola de Medicina

Introdução: A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela obstrução variável do fluxo de ar, infiltração eosinofílica pulmonar, secreção aumentada de muco e remodelamento das vias aéreas. Os tratamentos convencionais não previnem os sintomas. Surge, neste contexto, a terapia celular a partir de células-tronco mesenquimais (CTMs) que, por meio de efeitos antiinflamatórios e imunomodulatórios reconhecidos, poderia atuar no processo inflamatório e minimizar as alterações teciduais decorrentes desta patologia. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da injeção intratraqueal de CTMs derivadas de medula óssea humana no processo inflamatório do modelo de asma aguda em camundongos Balb/c. **Metodologia:** O projeto foi aprovado nos Comitês de Ética da PUCPR (nº 119.994 e 724). Nove camundongos machos foram divididos em 3 grupos: Controle (C), asmáticos (A) e asmáticos tratados (AT). Os camundongos foram imunizados utilizando um protocolo livre de adjuvante, com injeções intraperitoneais de 10 µg OVA nos dias 0, 2, 4, 7, 9 e 10. Nos dias 15, 18 e 21 os grupos A e AT receberam instilação intratraqueal de 20 µg de OVA e C recebeu salina. Vinte e quatro horas após o último dia de desafio, o grupo AT foi tratado com injeção intratraqueal de 1x10⁶ CTMs, enquanto A e C receberam o mesmo volume de salina. No sétimo dia após o transplante, os animais foram eutanasiados. O lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado para a dosagem de proteínas e os pulmões foram retirados para a histopatologia. A análise histopatológica foi realizada aleatoriamente selecionando 30 bronquíolos, sendo 15 de cada pulmão. A deposição de colágeno foi observada usando o Tricrômio de Masson. As avaliações da inflamação foram semi-quantitativas, seguindo os critérios: espessamento da camada epitelial e descamação do epitélio, espessamento da camada muscular e aumento de fibras colágenas. A análise estatística foi realizada com ANOVA seguida do teste de Tukey de múltipla comparação. **Resultados:** A concentração de proteínas no LBA do grupo A foi maior que o C (0,47±0,01vs.0,21±0,01mg/mL, p<0,001) e mais baixa no grupo AT em relação ao A (0,24±0,02vs.0,47±0,01mg/mL de LBA, p<0,001). Corroborando com os resultados histopatológicos, observamos um espessamento da camada epitelial no grupo A quando comparados com o C (1,87±1,0vs.1,17±0,05 células/mm², p<0,001). O grupo AT mostrou recuperação da arquitetura da camada epitelial em comparação com o grupo A (1,23±0,9vs.1,87±1,0 células/mm², p<0,05). A descamação do epitélio no grupo A foi maior que no C (1,30±1,0vs.0,23±0,50 células/mm², p<0,001) e houve uma redução no grupo AT quando comparado com o A (0,74±0,77vs.1,3±1,0 células/mm², p<0,05). A deposição de colágeno no grupo A foi maior que no C (1,87±0,78vs.1,1±0,35 fibras/mm², p<0,001) enquanto no grupo AT foi menor em comparação com A (1,33±0,48vs.1,87±0,78 fibras/mm², p<0,05). O espessamento da camada muscular dos bronquíolos aumentou nos animais do grupo A em relação ao C (1,51±0,78vs.0,40±0,56 células/mm², p<0,001) sendo menor no grupo AT quando comparado com A (0,80±0,76vs.1,51±0,78 células/mm², p<0,001). **Conclusões:** Os resultados demonstraram redução do processo inflamatório em camundongos asmáticos, sete dias após injeção intratraqueal de CTMs humanas, principalmente em relação ao remodelamento das vias aéreas, sugerindo um potencial terapêutico para as CTMs na asma aguda.

Palavras-chave: Asma aguda. Remodelamento das vias aéreas . Processo anti-inflamatório. Células-tronco mesenquimais.

ARTIGOS PUBLICADOS



Original Article

Lung Tissue Damage Associated with Allergic Asthma in BALB/c Mice Could Be Controlled with a Single Injection of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow up to 14 d After Transplantation

Lidiane Maria Boldrini-Leite¹ , Pedro Vicente Michelotto Jr², Sérgio Adriane Bezerra de Moura³, Luiz Guilherme Achcar Capriglione¹, Fernanda Cristina Mendes Barussi², Felipe Yukio Ishikawa Fragoso¹, Alexandra Cristina Senegaglia¹, and Paulo Roberto Slud Brofman¹

Cell Transplantation
Volume 29: 1–13
© The Author(s) 2020
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/0963689720913254
journals.sagepub.com/home/cll


Abstract

Mesenchymal stem cell (MSC) research has demonstrated the potential of these cells to modulate lung inflammatory processes and tissue repair; however, the underlying mechanisms and treatment durability remain unknown. Here, we investigated the therapeutic potential of human bone marrow-derived MSCs in the inflammatory process and pulmonary remodeling of asthmatic BALB/c mice up to 14 d after transplantation. Our study used ovalbumin to induce allergic asthma in male BALB/c mice. MSCs were injected intratracheally in the asthma groups. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected, and cytology was performed to measure the total protein, hydrogen peroxide (H₂O₂), and proinflammatory (IL-5, IL-13, and IL-17A) and anti-inflammatory (IL-10) interleukin (IL) levels. The lungs were removed for the histopathological evaluation. On day zero, the eosinophil and lymphocyte percentages, total protein concentrations, and IL-13 and IL-17A levels in the BALF were significantly increased in the asthma group, proving the efficacy of the experimental model of allergic asthma. On day 7, the MSC-treated group exhibited significant reductions in the eosinophil, lymphocyte, total protein, H₂O₂, IL-5, IL-13, and IL-17A levels in the BALF, while the IL-10 levels were significantly increased. On day 14, the total cell numbers and lymphocyte, total protein, IL-13, and IL-17A levels in the BALF in the MSC-treated group were significantly decreased. A significant decrease in airway remodeling was observed on days 7 and 14 in almost all bronchioles, which showed reduced inflammatory infiltration, collagen deposition, muscle and epithelial thickening, and mucus production. These results demonstrate that treatment with a single injection of MSCs reduces the pathophysiological events occurring in an experimental model of allergic asthma by controlling the inflammatory process up to 14 d after transplantation.

Keywords

asthma, inflammation, lung remodeling, mesenchymal stem cells, immunomodulation

¹ Core for Cell Technology, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Paraná, Brazil

² Department of Animal Science, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Paraná, Brazil

³ Department of Morphology, Campus Universitário Lagoa Nova, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

Submitted: September 29, 2019. Revised: February 18, 2020. Accepted: February 25, 2020.

Corresponding Author:

Lidiane Maria Boldrini-Leite, Core for Cell Technology, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), 1155 Imaculada Conceição St., Prado Velho, Curitiba, Paraná 80215-901, Brazil.
Email: lidiane.leite@pucpr.br



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

Airway Remodeling in the Asthma Model: Is there Standardization in this Evaluation?

Lidiane Maria Boldrini Leite^{*1}, Pedro Vicente Michelotto Jr², Sérgio Adriane Bezerra de Moura³, Paulo Roberto Slud Brofman¹ and Alexandra Cristina Senegaglia^{*1}

¹Core for Cell Technology, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Brazil

²Department of Animal Science, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Brazil

³Department of Morphology, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Brazil

***Corresponding author:** Alexandra Cristina Senegaglia, Core for Cell Technology, Curitiba, Paraná, Brazil

Lidiane Maria Boldrini Leite, Core for Cell Technology, Curitiba, Paraná, Brazil



ARTICLE INFO

Received: February 14, 2019

Published: February 25, 2019

Citation: Leite LMB, Michelotto Jr PV, Moura SAB, Brofman PRS, Senegaglia AC. Airway Remodeling in the Asthma Model: Is there Standardization in this Evaluation?. Biomed J Sci & Tech Res 15(1)-2019. BJSTR. MS.ID.002655.

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory disease characterized by obstruction of airflow causing respiratory difficulties at various intensities. Airways inflammation has an important role in the pathophysiology of asthma. The inflammatory process in the airways promotes significant changes in the respiratory structures called airway remodeling, which represents a late and permanent response to tissue injury. This review aimed emphasize the importance of histological evaluation of airway remodeling in the asthma experimental model. There are several methods of histopathological analysis available today, but the implementation of a standardized methodology would help in the damages caused by the allergens and future assessments of possible therapies used to treat the disease.

Keywords: Asthma; Airway; Airway Remodeling; Histological Evaluation

Abbreviations: TH2: T helper 2; IgE: Immunoglobulin E; OVA: Ovalbumin; H&E: Hematoxylin & Eosin; PAS: Periodic-Schiff Acid; MT: Masson's Trichrome

Introduction

Asthma is a chronic inflammatory disease characterized by obstruction of airflow causing respiratory difficulties at various intensities [1]. It represents a major cause of physical disability, affecting 300 million people worldwide [2]. Airways inflammation has an important role in the pathophysiology of asthma, which is characterized mainly by the TH2 type immune response. The inflammatory process in the airways of individuals with asthma promotes significant changes in the respiratory structures, induced by repeated lesions and repairs [3]. This review aimed emphasize the importance of histological evaluation of airway remodeling in the asthma experimental model.

Airway Remodeling

Airway remodeling represents a late and permanent response to tissue injury, mainly caused by primary irritants. It is characterized by tissue and cellular changes in the bronchioles, such as increased

collagen deposition, hyperplasia and smooth muscle hypertrophy, increased vascularization, basement membrane thickening and epithelial layer and epithelial desquamation, goblet cell metaplasia, mucus production and hypersecretion [4]. Inflammatory cells participate of this process in different intensities (Figure 1) [5]. In the normal airway, the distribution of collagen and other components of the extracellular matrix is in equilibrium due to regulation of synthesis and degradation. In asthma, interruption of homeostasis results in increased deposition of extracellular matrix, especially in the reticular lamina, lamina propria and submucosa [6]. Smooth muscle thickening is primarily responsible for bronchoconstriction of the airways and persistent airflow obstruction. Muscle layer thickening may be caused by hyperplasia, hypertrophy or migration and differentiation of progenitors such as myofibroblasts [7]. Further to the center of the bronchiole is located the epithelium, which is considered a physical barrier that protects the body

Histopathologic evaluation, anesthetic protocol, and physiological parameters for an experimental Balb/c mouse model of asthma

Leite LMB^{1*}, Michelotto Jr PV², Moura SAB³, Capriglione LGA¹, Fragoso FYT¹, Pimpao CT², Senegaglia AC¹ and Brofman PRS¹

¹Core for Cell Technology, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Prado Velho, 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil

²School of Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Prado Velho, 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil

³Department of Morphology, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário UFRN - Lagoa Nova, 59.072-970, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

Abstract

Asthma is known to induce airway remodeling, which subsequently promotes pulmonary dysfunction. The aim of this study was to present data on the management, physiological parameters, and anesthetic procedure for using a Balb/c mice asthma model in research. The study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of Pontifícia Universidade Católica do Paraná. The animals ($n = 32$) were randomly divided into four groups: Control-A, ovalbumin (OVA)-A, Control-B, and OVA-B. The OVA groups were sensitized with an intraperitoneal injection of a suspension containing 10 μg of OVA on days 0, 2, 4, 7, 9 and 10, and airways were challenged by intratracheal instillation of a 20 μg OVA suspension on days 15, 18, and 21. On these same days, the control groups received saline. On day 22 (Control-A and OVA-A groups) and on day 29 (Control-B and OVA-B groups), the animals were euthanized in order to investigate the efficiency of the protocol using histopathological examination. Detailed information on the anesthetic protocol and the monitoring of physiological parameters are presented. Results demonstrated that the OVA-A and OVA-B groups exhibited increased inflammatory infiltrate, muscle and epithelial thickening, epithelial desquamation, goblet cell metaplasia, and collagen deposition in comparison with their respective control groups ($p < 0.001$). In conclusion, the studied experimental Balb/c mouse model of asthma proved to be effective as it caused the lung remodeling observed in the asthma inflammatory process. Moreover, anesthetic and physiological parameters, scarcely described, are demonstrated here.

Introduction

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways characterized by recurrent and variable episodes of airflow obstruction and bronchial hyperresponsiveness [1]. The disease affects the quality of life of 300 million individuals of all ages and is considered a problem worldwide [2].

The inflammatory process within the airways of patients with asthma induces significant structural changes in the respiratory architecture, which subsequently promotes pulmonary dysfunction [3,4]. Therefore, it is important to investigate the pathophysiologic events responsible for the development of asthma. To this end, the use of pre-clinical models in research is important.

Different animal species have been used in the study of the inflammatory processes in the airways such as mice [5], rats [6], guinea pigs [7], rabbits [8], and horses [9]. In particular, the Balb/c mice used in our study are isogenic animals that have been used frequently. These mice have the ability to develop a strong TH2 type immune response, with specific IgE levels, after allergic sensitization and challenge [10] to ovalbumin (OVA), which is the current gold standard in small animal models for inducing an immune reaction [1].

In this study, we demonstrate a protocol of an experimental model of asthma using adjuvant-free OVA in Balb/c mice, with the purpose of investigating the airway remodeling that occurs in the asthma

process. Moreover, it is our aim to present detailed data regarding the management, physiological parameters, and anesthetic procedure for using Balb/c mice as a model for asthma in research, which are not often described in research papers.

Materials and methods

Animals

Thirty-two male Balb/c mice, aged 6 to 8 weeks, were obtained from the central animal facility at Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) and evaluated in the present study. They were maintained in collective cages (up to four animals per cage) with dimensions of 30 cm in length, 20 cm in width, and 13 cm in height. They remained under a light/dark cycle of 12/12h, receiving a diet of CR1 Nuvilab (Quimtia, Colombo, Brazil) and water *ad libitum*. Their bedding was made of pine wood shavings (Inbrasfama, São José dos Pinhais, Brazil), which was changed twice weekly.

*Correspondence to: Lidiane Maria Boldrini Leite, Core for Cell Technology, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Prado Velho, 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil, Tel: (+55 41) 3271-2219; Fax: (+55 41) 3271-2646; E-mail: lidiane.leite@pucpr.br

Key words: asthma model, airway remodeling, lung inflammation, ovalbumin

Received: December 28, 2018; **Accepted:** January 09, 2019; **Published:** January 11, 2019