

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA
DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO
EM UM MODELO MURINO DE BRONQUIOLITE OBLITERANTE

Aluno: William Lorenzi

Orientador: Prof. Maurício Guidi Saueressig

Dissertação de Mestrado

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA
DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO
EM UM MODELO MURINO DE BRONQUIOLITE OBLITERANTE

Aluno: William Lorenzi

Orientador: Prof. Maurício Guidi Saueressig

Dissertação de Mestrado

Agradecimento

Esta dissertação não seria possível sem a capacidade técnica e a amizade das cientistas Natty e Faby e sua chefe Aninha, que cultivaram com grande dedicação as células tronco, ensinaram-me a pipetar e nos momentos difíceis me asseguraram que tudo daria certo.

Igual mérito dedico à veterinária Fabíola e à enfermeira Marta, pelo louvável zelo com os animais de experimentação, e à expert em técnica histológica e contadora de histórias Flávia.

Finalmente, agradeço ao padawan Éverton, aluno de Medicina e futuro cirurgião, pela companhia e por dividir a carga de trabalho.

Dedicatória

Para a única pessoa que nunca teve dúvidas de que esta dissertação seria defendida, e me amou sem que eu precisasse pedir, minha linda e doce esposa, Luciana.

*Jamais se desespere em meio às sombrias aflições da vida,
pois das nuvens mais negras cai água límpida e fecunda.*

(Provérbio chinês)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Pacientes livres de Síndrome da Bronquiolite...	11
Figura 2. Incidência relativa das principais causas...	12
Figura 3. Representação de como insultos diversos...	14
Figura 4. Variações de transplante de traqueia...	20
Figura 5. Obliteração de traqueia de camundongo...	22
Figura 6. Intenso infiltrado linfocítico na parede...	23
Figura 7. Obtenção de ASC...	28
Figura 8. Imagens de microscopia óptica de ASC...	29
Figura 9. Algumas características da ASC...	31

ARTIGO ORIGINAL

Tabela 1. Critérios de avaliação histológica.....	55
Tabela 2. Obliteração traqueal por grupo de tratamento.....	56
Figura 1. Obliteração luminal (%) nos seis grupos.....	57
Figura 2. Imagens representativas de cortes...	58
Figura 3. Preservação do epitélio...	59

ORIGINAL ARTICLE

Tabela 1. Histological assessment criteria.....	76
Tabela 2. Tracheal obliteration by treatment group.....	77
Figura 1. Luminal obliteration (%) on all six groups...	78
Figura 2. Representative images of axial...	79
Figure 3. Epithelial preservation...	80

APÊNDICE I

Figura 1. Traqueia do grupo Sist0+7...	92
Figura 2. Traqueia do grupo SistC...	93
Figura 3. Traqueia do grupo Sist0...	94

APÊNDICE II

Figura 1. Imuno-histoquímica com anticorpos...	97
------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ASC	<i>Adipose-derived stem cells</i>
BFS	<i>Bovine fetal serum</i>
BO	Bronquiolite obliterante
BOS	<i>Bronchiolitis obliterans syndrome</i>
CA	Califórnia
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CT	Células tronco
DCEP	Disfunção Crônica do Enxerto Pulmonar
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FEF_{25-75%}	Fluxo médio-expiratório forçado
GVHD	<i>Graft versus host disease</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HTT	<i>Heterotopic tracheal transplantation</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
ISHLT	<i>International Society for Heart and Lung Transplantation</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MO	Missouri
MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i>
OB	<i>Obliterative bronchiolitis</i>
P/E	Penicilina/estreptomicina
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
RA	Rejeição aguda
SBO	Síndrome da bronquiolite obliterante
SFB	Soro fetal bovino
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th 1/2/17	Linfócito/resposta T <i>helper</i> 1/2/17
THT	Transplante heterotópico de traqueia
VEF₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	8
REVISÃO.....	10
A BRONQUIOLITE OBLITERANTE.....	10
MODELOS ANIMAIS DE BRONQUIOLITE.....	18
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS.....	24
CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DE ADIPÓCITOS.....	27
REFERÊNCIAS.....	33
OBJETIVOS.....	47
ARTIGO ORIGINAL.....	48
RESUMO.....	49
INTRODUÇÃO.....	50
MÉTODOS.....	51
RESULTADOS.....	56
DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ORIGINAL ARTICLE.....	70
ABSTRACT.....	71
INTRODUCTION.....	72
METHODS.....	73
RESULTS.....	77
DISCUSSION.....	80
CONCLUSION.....	84
REFERENCES.....	85
ANEXO I.....	91
APÊNDICE I.....	92
APÊNDICE II.....	95

INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas a comunidade científica observou o crescimento de um campo completamente novo e com potencial revolucionário: a terapêutica com células tronco (CT). A crença inicial de que em poucos anos inúmeras doenças seriam curadas com células totipotentes do próprio paciente, programadas para reconstituir qualquer tecido ou órgão, não se mostrou verdadeira. As pesquisas e o tempo demonstraram que os obstáculos à implementação dos tratamentos celulares eram maiores que os imaginados. Rapidamente ficou claro que as CT constituíam um grupo amplo e heterogêneo, englobando desde as CT embrionárias, passando pelas CT específicas de cada tecido, até as CT pluripotentes induzidas obtidas pela reprogramação de células diferenciadas. Também surgiram limitações: barreiras imunológicas, células com envelhecimento acelerado ou incapazes de se organizar em tecidos biologicamente funcionais [1]. Isso, no entanto, levou ao aprofundamento do conhecimento sobre CT e ao advento da engenharia tecidual como ciência. Nos últimos anos, uma nova função foi atribuída às CT, a imunomodulação. Nesse sentido, as células tronco mesenquimais (CTM) são as mais significativamente implicadas; sua atuação como fornecedoras de células diferenciadas parece ser sobrepujada pela capacidade de limitar processos inflamatórios patológicos [2].

Paralelamente aos estudos com CT, mas, até pouco tempo atrás, sem nenhuma relação com as mesmas, cresceu continuamente o número de transplantes de pulmão no mundo [3]. O procedimento deixou de ser uma exclusividade de poucos centros no mundo, e alcançou o número de 80 transplantes no Brasil em 2013 [4]. Apesar de ser uma cirurgia relativamente segura, o

transplante de pulmão ainda enfrenta, a médio e longo prazo, a grande dificuldade que é a Disfunção Crônica do Enxerto Pulmonar (DCEP). Clinicamente manifesta como a Síndrome da Bronquiolite Obliterante (SBO), o processo de agressão do receptor contra o enxerto que o mantém vivo é a maior ameaça à sobrevivência de longo prazo. Infelizmente, avanços no entendimento da fisiopatologia não foram capazes de alavancar estratégias terapêuticas realmente efetivas, e a SBO permanece como a principal causa de morte pós-transplante, além, é claro, de diminuir significativamente a qualidade de vida dos pacientes acometidos [5]. Após diversas tentativas infrutíferas de manipulação farmacológica, as CTM surgiram recentemente como possibilidade de imunossupressão celular, integrando duas áreas médicas antes afastadas.

Estudo prévio, na mesma linha de pesquisa do Professor Maurício Saueressig, não foi capaz de demonstrar efeito das células tronco mesenquimais administradas sistemicamente em um modelo animal de bronquiolite obliterante. Ao considerarmos este achado, e sabendo que o pico de inflamação no modelo utilizado - o transplante heterotópico de traqueia (THT) - se dá em torno do sétimo dia, decidimos pesquisar o efeito de uma dose adicional administrada neste momento. Além disso, tendo em vista a clássica descrição da atuação parácrina das CTM, imaginamos que sua administração local, em torno dos implantes, teria um efeito maior. Assim, trabalhamos com a hipótese conceitual de que duas administrações locais de CTM resultariam, no mesmo modelo de bronquiolite obliterante em camundongos, em uma menor obliteração da luz traqueal. Nesta dissertação, testamos esta hipótese e apresentamos os resultados no formato de artigo científico, logo após revisão da literatura pertinente.

REVISÃO DA LITERATURA

A BRONQUIOLITE OBLITERANTE

O transplante de pulmão é o único tratamento disponível efetivo para uma série de doenças pulmonares terminais. As indicações mais comuns em adultos são a doença pulmonar obstrutiva crônica em sua forma enfisematosa, a fibrose pulmonar idiopática, a fibrose cística, a deficiência de alfa-1-antitripsina e a hipertensão arterial pulmonar [3].

Desde o primeiro transplante pulmonar com resultados satisfatórios, há 30 anos, o *International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) Transplant Registry* agregou dados de pouco mais de 45.000 pacientes; este registro, no entanto, não é compulsório, de modo que o número real certamente é muito maior. Estes procedimentos foram realizados em pelo menos 250 centros ao redor do mundo [3]. No Brasil, a quantidade de transplantes pulmonares tem crescido irregularmente, atingindo o pico de 80 pacientes/ano em 2013, o que deve diminuir em 2014, haja vista o reduzido número de procedimentos no primeiro trimestre: apenas 9 [4]. Ao longo das últimas décadas, diversos fatores melhoraram os resultados dos transplantes, incluindo a melhora da imunossupressão e o melhor manejo do período peri-operatório e da rejeição aguda. No entanto, o processo de rejeição crônica ainda é o responsável pelo fato do transplante pulmonar apresentar os piores índices de sobrevida entre os órgãos sólidos, estimados em 70 a 85% em um ano e 50% em cinco anos [6].

A complicação própria do enxerto mais comum entre os pacientes que sobrevivem ao primeiro ano de transplante é a rejeição crônica, sob a forma da Síndrome da Bronquiolite Obliterante (SBO). A prevalência da SBO após um, cinco e

10 anos é 9,1%, 37,9% e 58,1%, respectivamente (figura 1), sendo diretamente responsável por aproximadamente 20% dos óbitos após um ano (figura 2) [7]. Uma consequência desses números foi um crescimento importante no volume de retransplantes pulmonares devido à perda de função do enxerto original por bronquiolite obliterante (BO), antes uma indicação muito rara de transplante.

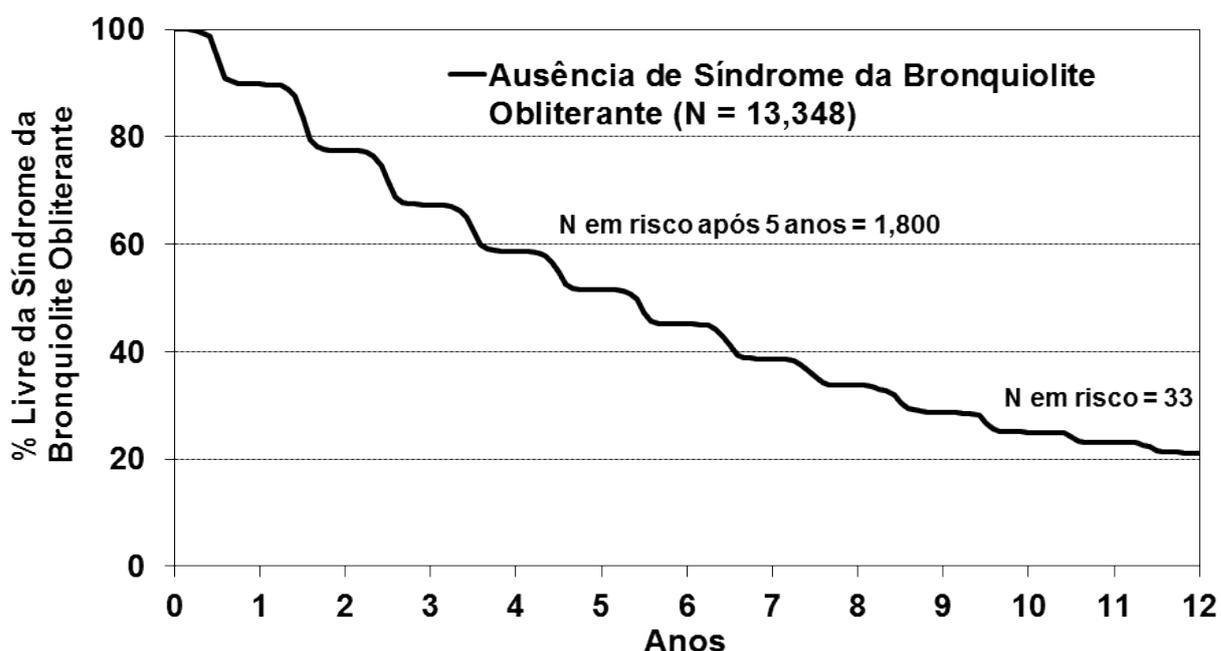


Figura 1. Pacientes livres de Síndrome da Bronquiolite Obliterante após transplante de pulmão (adaptado da ref. [7]).

Para todos os efeitos práticos, o diagnóstico da SBO é definido clinicamente. O método consiste em definir a função pulmonar basal após alguns meses do transplante, quando ocorre o pico de qualidade do enxerto, sendo utilizados os valores mais altos atingidos em espirometrias ao longo do tempo; posteriormente se observa a redução relativa do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) e da taxa de fluxo médio-expiratório ($FEF_{25-75\%}$) em comparação com o basal, caracterizando um quadro clínico obstrutivo [8]. A SBO é graduada de 0 a 3 (com

porcentagens referentes ao basal); grau 0 (zero), para $VEF_1 > 90\%$ e $FEF_{25-75\%} > 75\%$; grau 0-p, indicativo de SBO *potencial*, para VEF_1 81-90% e/ou $FEF_{25-75\%} < 75\%$; grau 1, considerado SBO estabelecida, para VEF_1 66-80%; grau 2, para VEF_1 51-65%; e grau 3 para $VEF_1 = 50\%$ ou menos.

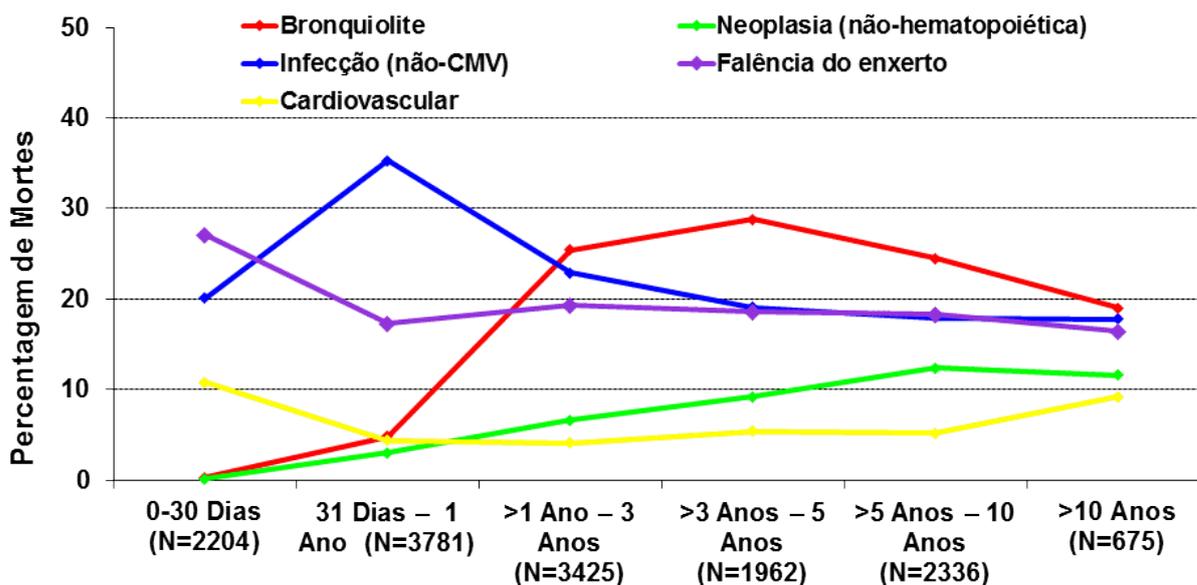


Figura 2. Incidência relativa das principais causas de morte pós-transplante (Adaptado da ref.[7]).

Recentemente, houve duas mudanças de paradigma em relação à rejeição crônica. A primeira se refere à irreversibilidade do processo. Sabe-se que cerca de 10% dos pacientes poderão ter recuperação parcial da função do enxerto com o uso de azitromicina, o que indica heterogeneidade fisiopatogênica; porém, ainda não se pode prever quais pacientes terão esse tipo de resposta [9]. A segunda mudança se refere aos pacientes com padrão espirométrico restritivo, que, embora menos comumente observado, também pode ser resultado do processo de rejeição. Essas mudanças levaram à adoção recente do termo mais amplo Disfunção Crônica do

Enxerto Pulmonar [10], englobando pacientes com padrões espirométricos obstrutivos, restritivos e reversíveis.

O diagnóstico patológico associado à SBO é a bronquiolite obliterante (BO). Apesar de bem caracterizada do ponto de vista histológico [11], muitos pacientes permanecem sem amostragem de tecidos para este diagnóstico, motivo pelo qual a SBO é definida clinicamente. Isso se deve a não uniformidade do processo patológico ao longo das áreas pulmonares e à ausência de método confiável para orientar as biópsias broncoscópicas. O processo inicia-se pela infiltração linfocitária do epitélio, levando à denudação da mucosa e ao desencadeamento de inflamação local. Exuberante tecido de granulação se estabelece na via aérea, reduzindo seu calibre. Segue-se a migração e diferenciação dos fibroblastos e miofibroblastos (fibroplasia), que estabelecem uma fibrose inespecífica das vias aéreas de pequeno calibre. A retração cicatricial final reduz de forma concêntrica a luz e explica o padrão obstrutivo no exame espirométrico típico [12].

A BO se inicia com a agressão do hospedeiro. Os insultos aloimunes decorrem obviamente do reconhecimento, por parte do receptor, de moléculas estranhas no enxerto, essencialmente MHC de classes I incompatíveis [13]. Células apresentadoras de antígenos introduzem aos linfócitos T antígenos estranhos do doador, levando a reações de citotoxicidade. Quando há BO, episódios de inflamação aguda não são resolvidos completamente, e a inflamação se cronifica. Alguns fatores pró-fibróticos como TGF- β , IL-13 e PDGF atraem e ativam fibroblastos tanto do doador quanto do receptor; neste cenário, há a perda da inibição que o tecido epitelial sadio exerce sobre este tipo celular [12]. Fibroblastos se transformam em miofibroblastos produtores de actina, uma etapa intermediária antes da diferenciação em células musculares lisas. Na BO, a inflamação aguda não

é seguida pelo reparo simples da via aérea, ao contrário, parece existir um padrão de remodelamento tecidual aberrante, possivelmente pela persistência das agressões aloimunes e não-alloimunes (Figura 3) [14].

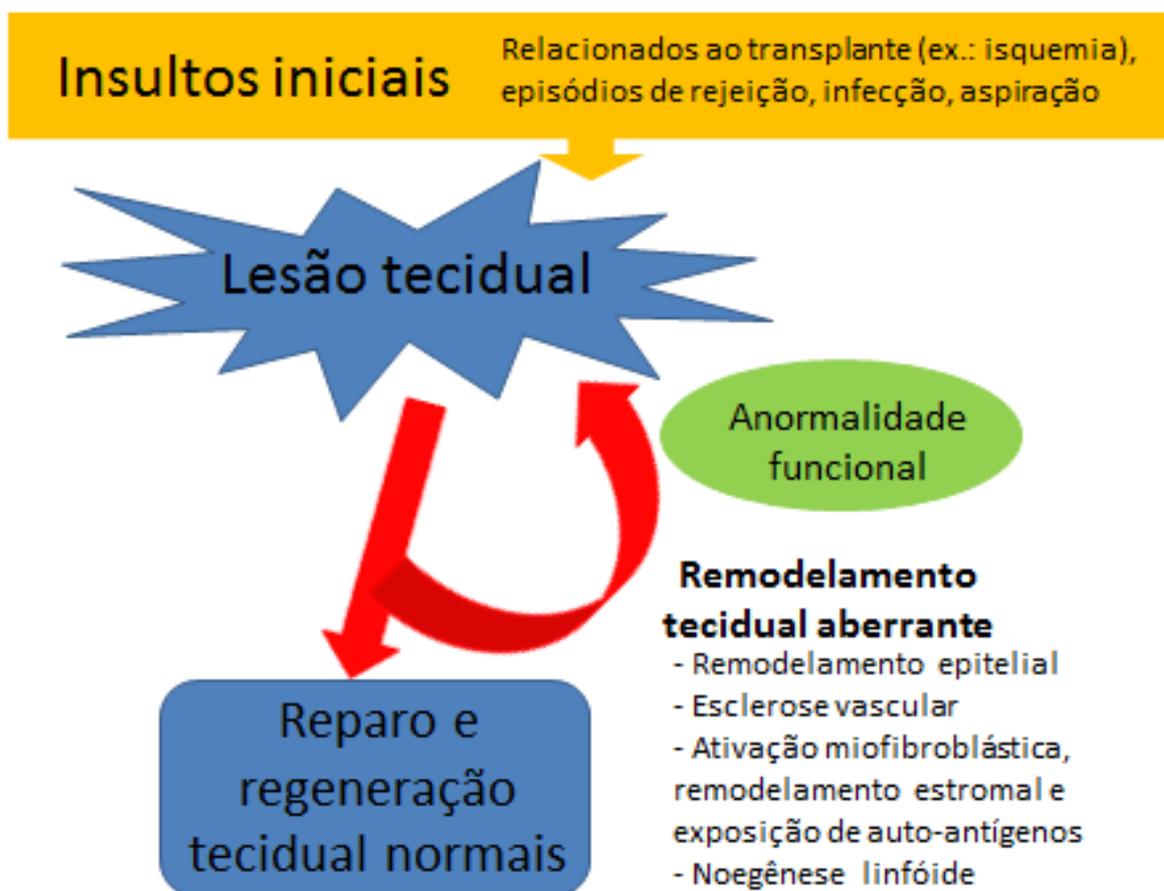


Figura 3. Representação de como insultos diversos levam à lesão do epitélio respiratório, inflamação e obliteração luminal através do remodelamento tecidual aberrante (adaptado de [12]).

O principal intensificador da agressão imunológica e mais consistente fator de risco para o desenvolvimento da SBO é a rejeição aguda (RA). Embora possam ser controlados com aumento temporário da imunossupressão, os episódios de RA inflamam a via aérea e expõem antígenos, aspectos claramente relacionados ao

remodelamento aberrante [15]. A sinonímia rejeição celular aguda se deve à ação predominante dos linfócitos T helper 1 (Th1). Teoricamente, o aumento da imunossupressão tradicional, dirigida à imunidade celular, deveria resultar em menor incidência de SBO, o que não acontece [5]. Além disso, existem pacientes com SBO que nunca tiveram episódios de RA. Ambos os fatos evidenciam a existência de outros fatores de risco. Ainda no campo da imunologia, atualmente está bem estabelecida a existência de imunidade humoral, coordenada por linfócitos B, e da ativação do sistema complemento, ou seja, há atividade de anticorpos, tanto anti-HLA quanto não-HLA, de modo que determinadas incompatibilidades podem implicar em risco aumentado de SBO [16]. Sumpter *et al.* introduziram o conceito de que a rejeição é bifásica, primeiro com lesão tecidual e depois com autoimunidade. Por esse princípio, a inflamação expõe antígenos que normalmente ficariam protegidos, levando à formação de autoanticorpos [17]. Em particular, pacientes com anticorpos anti-colágeno tipo V e anti-tubulina K α 1 em títulos altos têm mais chance de desenvolver SBO (e disfunção primária do enxerto) [18]. A indução de tolerância, através da administração entérica de colágeno tipo V, preveniu a bronquiolite obliterante em ratos [19].

Existem também fatores de risco não-alóimunes envolvidos, que geram reações inflamatórias inespecíficas na via aérea. O tempo de isquemia da via aérea prolongado [20] e a disfunção primária do enxerto podem ser o primeiro insulto não imune ao enxerto [21]. Pacientes transplantados tem incidência aumentada de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). Teoriza-se que ocorram múltiplos episódios subclínicos de aspiração de conteúdo gástrico ácido, que lesa a mucosa respiratória [22]. Entre os agentes infecciosos relacionados a maior risco de SBO, os mais importantes são o citomegalovírus [23] e *Aspergillus sp* [24].

Nenhum tipo de tratamento, até o momento, foi uniformemente eficaz na prevenção ou tratamento da SBO, embora diversas alternativas de prevenção estejam em teste [25]. A única terapêutica preventiva considerada eficaz, em uso clínico, é a azitromicina, que pode diminuir de 44% para 12% a prevalência de SBO em dois anos após o transplante [26]. Além disso, estratégias de imunossupressão com duas drogas há muito tempo foram substituídas por esquemas de três drogas, pela menor incidência de episódios de rejeição aguda e crônica, de modo que a terapêutica tríplice contínua ainda é considerada padrão atualmente [27]. Alguns ensaios clínicos avaliaram diferentes regimes de imunossupressores como tentativa de diminuir a incidência da SBO. A substituição da azatioprina por micofenolato [28], sirolimus [29] ou everolimus [30] não surtiu efeito sobre a ocorrência da SBO em ensaios clínicos. Similarmente, estudos com tacrolimus no lugar da mais tradicional ciclosporina A ou não tiveram efeito significativo sobre a SBO [31, 32] ou, mais recentemente, demonstraram capacidade de reduzir SBO em três anos, porém sem modificar o desfecho primordial de mortalidade associada à rejeição crônica [33]. Ainda não foram feitas tentativas de prevenção com terapia celular.

Outros trabalhos investigaram formas de reverter ou estabilizar a SBO já definida. A tentativa de trocar a ciclosporina por tacrolimus possivelmente diminua a atividade da doença, mas o efeito sobre a incidência de rejeição aguda parece ser mais importante que na melhora da SBO estabelecida [34]. Sem dúvida, a mais promissora terapêutica até o momento é a azitromicina (e possivelmente outra droga da mesma classe, a claritromicina). Após o relato inicial da Gerhardt [35], diversas publicações testaram esta medicação em pacientes com SBO [9]. O efeito da droga parece existir em cerca de um terço dos pacientes apenas, que tem o seu VEF₁ estabilizado ou mesmo melhorado em torno de 10%. A azitromicina tem capacidade

imunomoduladora, não apenas na SBO, mas também em outras doenças inflamatórias como as bronquiectasias; além disso, previne a formação de biofilmes bacterianos na via aérea.

O sucesso relativamente pequeno dos tratamentos citados anteriormente induziu a procura por abordagens não farmacológicas. A irradiação linfóide total é bem tolerada pela maioria dos pacientes e reduz a velocidade de perda do VEF₁ [36], e, clinicamente, é usada como ponte para retransplante em alguns raros centros. Outra modalidade é a fototerapia extra-corpórea, que atenua a atividade das células T-regulatórias. Os custos associados a este método e sua pouca disponibilidade fizeram com que se tornasse tratamento de última linha para SBO, ainda que seja efetivamente capaz de diminuir a taxa de perda de função pulmonar e possua satisfatória tolerabilidade. A equipe de Zurique é a mais experiente com esse método [37].

Finalmente, deve-se citar a alternativa final de tratamento da SBO: o retransplante. Pacientes vítimas de DCEP sem dúvida apresentam a melhor sobrevida após um segundo transplante, superando a de pacientes com disfunção primária do enxerto grave ou rejeição aguda [38]. Ainda assim, os resultados ficam aquém dos obtidos no primeiro transplante. Isso leva a sérios questionamentos éticos e, necessariamente, a critérios ainda mais rigorosos para seleção de pacientes e alocação de órgãos, não sendo, portanto, uma abordagem amplamente disponível [39].

Em resumo, apesar das inúmeras abordagens terapêuticas já testadas, a SBO permanece como o “calcanhar de Aquiles” do transplante pulmonar [5]. Uma vez estabelecido o diagnóstico, a progressão da doença é inexorável. Como será visto abaixo, os pesquisadores continuam em busca de novos modelos animais de

bronquiolite obliterante que permitam aprofundar os conhecimentos fisiopatológicos e testar novas terapêuticas.

MODELOS ANIMAIS DE BRONQUIOLITE OBLITERANTE

As futuras estratégias de manejo clínico da SBO passam pelo desenvolvimento de adequados modelos animais para a doença. Estes, por sua vez, poderão gerar hipóteses para eventuais ensaios clínicos. O modelo ideal de bronquiolite obliterante deveria ser capaz de atender a múltiplos requisitos:

- Ser tecnicamente simples, ou seja, não exigir treinamento extenso que implique em perda exagerada de animais durante a curva de aprendizado.
- Ter resultados reprodutíveis em diferentes centros de pesquisa.
- Causar doença de pequenas vias aéreas.
- Desenvolver lesão por mecanismo imune.
- Replicar os achados histológicos da BO humana, ou seja, infiltrado inflamatório e subsequente fibrose e redução luminal.
- Permitir avaliação funcional da via aérea, através de testes de função pulmonar.
- Permitir a realização de LBA, no qual se identifica neutrofilia.
- Desenvolver doença em um período relativamente curto de tempo, uma vez que não se pode esperar anos para avaliar resultados em animais.

Atualmente, nenhum modelo preenche todos os requisitos acima. O transplante de pulmão em roedores, especialmente camundongos, provavelmente é o que mais se aproxima do ideal. Transplantes ortotópicos em ratos já foram feitos na década de 1970, mas só se tornaram tecnicamente satisfatórios em camundongos a partir de 2007, com o aperfeiçoamento da técnica do *cuff*, em substituição às suturas manuais, a qual, no entanto, ainda exige habilidades

microcirúrgicas [40]. A fragilidade extrema dos tecidos dos camundongos implica em uma curva de aprendizado relativamente longa de cerca de 20 transplantes. Utiliza-se apenas o pulmão esquerdo, que não é lobulado nesses roedores, e representa somente cerca de 25% do volume pulmonar total, de modo que não é preciso nenhum tipo de suporte circulatório transoperatório. Como esperado, é necessário que se utilize animais não isogênicos: quando um pulmão C57BL/10 é implantado em um C57BL/6, 42% deles terão achados histológicos de bronquiolite obliterante após 3 a 4 semanas [41].

Animais de grande porte, especialmente porcos, transpassam as dificuldades técnicas dos ratos e camundongos. No entanto, não há porcos isogênicos, o que induz variações maiores nos resultados do transplante e resultados menos previsíveis. Uma possibilidade é utilizar mini porcos isogênicos, mas mesmo nesse caso será necessário que os animais sobrevivam por vários meses até que se desenvolvam os achados da BO [42]. O alto custo dos animais e da sua hospedagem, além do longo tempo de espera até o desenvolvimento da BO, que pode ser de vários meses, praticamente relegaram este modelo ao uso em estudos pré-clínicos [43].

Na década de 90, observou-se que nos trabalhos sobre transplante de traqueia em pequenos animais, esta via aérea sofria um processo de obliteração imunomediada muito similar à BO dos humanos [44]. Estes achados levaram à aceitação do transplante de traqueia como o melhor modelo animal para pesquisa de doença de pequenas vias aéreas [45]. Atualmente, os transplantes ortotópico e heterotópico de traqueia em roedores são os modelos mais usados no *screening* de novos tratamentos.

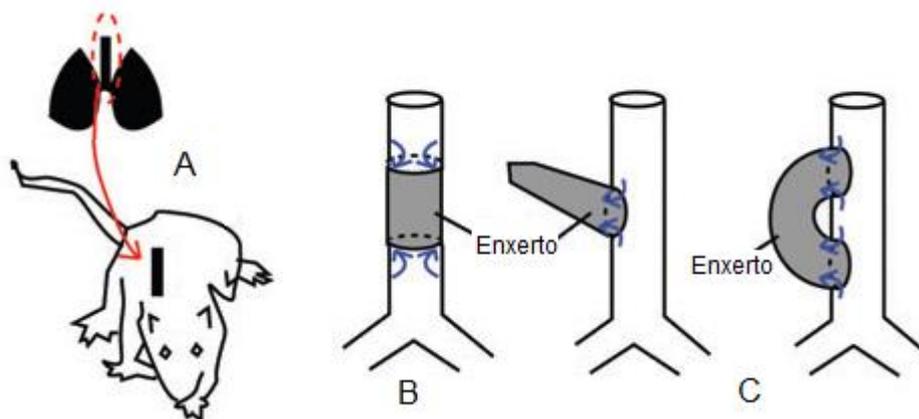


Figura 4. Variações de transplante de traqueia como modelo de bronquiolite obliterante. (A) Transplante heterotópico subcutâneo. (B) Transplante ortotópico, expondo a traqueia ao ar ambiente. (C) Transplante traqueal semi-ortotópico, em duas configurações, fundo cego e *bypass* ([43], modificado pelo autor).

O transplante ortotópico de traqueia consiste em enxertar a traqueia do doador como substituta da traqueia do receptor, fazendo uso de microanastomoses; é um verdadeiro transplante traqueal. Este modelo apresenta como seu grande diferencial a manutenção da comunicação com o ar ambiente (Figura 4). Este fator expõe o enxerto aos micro-organismos, ao fluxo de gases e permite um processo de descamação e substituição do epitélio de forma muito similar ao da BO [44]. Uma variação é o transplante semiortotópico; neste caso a continuidade da via aérea do receptor não é completamente desfeita, diminuindo problemas com mortalidade animal [46]. Outro fator exclusivo deste modelo é a migração de células epiteliais do receptor para a traqueia transplantada, substituindo o epitélio do doador [47]. Os transplantes combinados referem-se ao transplante sequencial da traqueia em dois ambientes distintos e são uma área de interesse na pesquisa imunológica [48]. O transplante ortotópico é apontado por alguns como o modelo de escolha, mas é

tecnicamente difícil e as taxas de produção de estenose não são uniformes na literatura [45].

Os modelos de transplante heterotópico de traqueia envolvem o implante de um segmento de traqueia de camundongo ou rato no omento ou tecido subcutâneo. A disponibilidade de camundongos transgênicos e a facilidade técnica envolvida na implantação heterotópica tornaram este o modelo mais utilizado até o momento, encontrando-se mais de 100 publicações relacionadas a ele na última década [43]. O poder deste modelo está no fato de que os isoenxertos sofrem uma perda inicial do epitélio, mas, passado o período inicial de isquemia, há regeneração epitelial. Os aloenxertos, no entanto, sofrem uma resposta imunológica mais intensa que leva à fibrose e obliteração da luz traqueal [49] (Figura 5), tipicamente descrita como completa ou quase completa após 28 dias, em camundongos [50]. Este é um claro indicativo da ação aloimune, presente quando murinos com incompatibilidades de MHC classe I e/ou II são utilizados. Um ponto importante a ser considerado é o local de enxertia. Não parece haver diferença quando se compara o implante subcutâneo e o omental, ainda que este último seja claramente mais bem vascularizado [51]. Tal fato sugere que a isquemia inicial, proporcionalmente maior no enxerto subcutâneo, não é determinante para os eventos inflamatórios imunologicamente mediados que se seguem [52].

Brazelton *et al.* [53] retransplantaram a traqueia de ratos receptores alogênicos em animais isogênicos aos doadores sete e 14 dias após o transplante inicial; aquelas retransplantadas em sete dias não se obliteraram, mas as retransplantadas após 14 dias, sim. O achado mostrou haver um ponto de não retorno, a partir do qual a BO se desenvolverá mesmo que não haja mais rejeição ativa. Eis uma elegante demonstração de que, neste modelo, a atividade aloimune

deixa de ser fundamental em algum momento durante a segunda semana, e que o insulto inicial não precisa se perpetuar para que o resultado final seja a BO. Clinicamente, pode-se fazer analogia com episódios de rejeição aguda que, mesmo controlados, resultarão futuramente em maior probabilidade de SBO. Além disso, fica implícito que estratégias terapêuticas serão mais eficientes se implementadas na primeira ou, no máximo, na segunda semana. Uma alternativa interessante é a inserção dos fragmentos traqueais no parênquima pulmonar, para adicionar o fator do microambiente do pulmão [54].

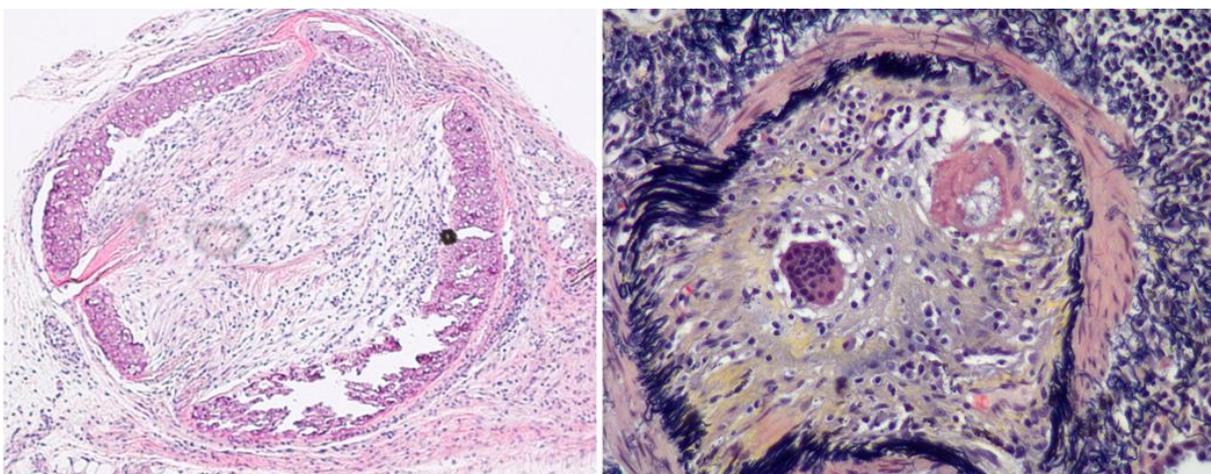


Figura 5. Obliteração de traqueia de camundongo transplantada heterotopicamente, após 28 dias (esquerda); obliteração de via aérea de pequeno calibre em bronquiolite obliterante humana (direita) (adaptado de [6]); microscopia ótica, 400x.

A melhor descrição dos eventos locais associados ao transplante traqueal heterotópico foi feita em ratos [55]; análises histológicas em 14 momentos diferentes demonstraram que o pico da infiltração inflamatória ocorre no sétimo dia (figura 6); até o terceiro dia, na fase de isquemia, não há infiltrado significativo. Particularmente, no modelo de transplante heterotópico de traqueia em

camundongos, conforme citado anteriormente, parece haver um momento, entre o sétimo e o 14º dia, a partir do qual o processo de obliteração se torna irreversível. Todos estes dados levam a considerar o período em torno do dia 7 como um momento-alvo para atuação de qualquer terapêutica.

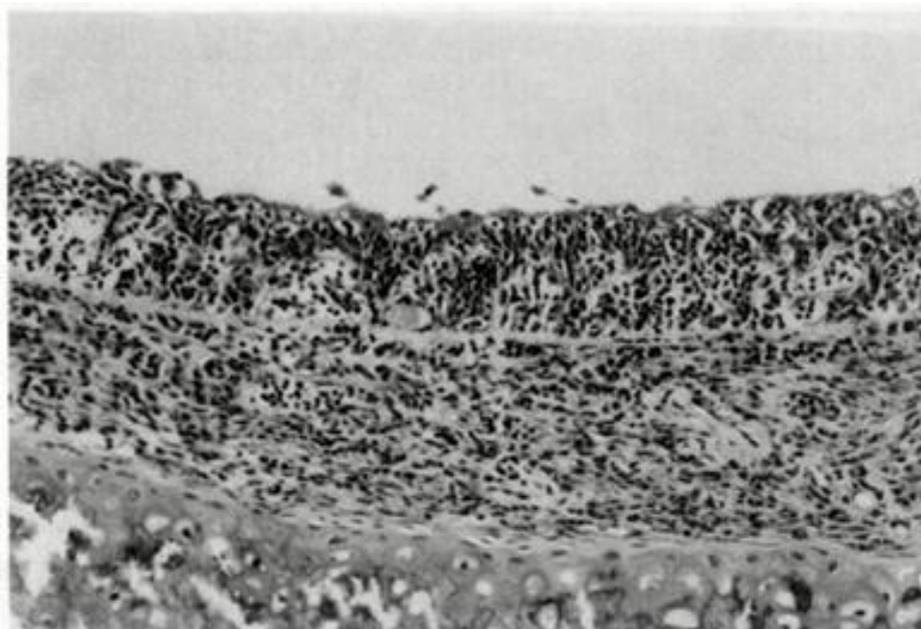


Figura 6. Intenso infiltrado linfocítico na parede de traqueia de rato transplantada heterotopicamente há sete dias [55]; microscopia ótica, 400x.

Existem ainda modelos que não envolvem a realização de transplantes. Eles procuram induzir a lesão de via aérea através de estímulos irritativos ou infecciosos, não necessariamente imunológicos. Embora não buscasse estudar a BO pós-transplante, o primeiro método descrito foi a infecção por instilação intratraqueal em cães beagle com o adenovírus canino tipo 2. Castleman *et al.* [56] demonstraram que os bronquíolos terminais desses animais tinham uma redução luminal média de 50% após 26 dias. Também a papaverina foi descrita como potencial indutora de BO em humanos, quando diversos casos foram associados ao consumo da planta

Sauropus androgynus, que tem grande concentração daquele alcaloide. Se instilada repetidamente na via aérea de ratos, provoca lesão histológica similar à BO; em especial, eleva as mesmas citocinas e marcadores inflamatórios que na doença humana [57]. Similarmente, o ácido oleico acidentalmente aspirado por cães causa pólipos e *plugs* na via aérea, lembrando o aspecto de bronquiolite obliterante/pneumonia em organização [58]. Por fim, a alta incidência de DRGE em pacientes transplantados levou a testes com instilação de ácidos gástricos na via aérea de ratos. Isso resultou em fibrose peribronquiolar após cerca de 8 semanas [59]. Nenhum destes modelos, no entanto, tornou-se popular, possivelmente por não trabalharem com mecanismos aloimunes de rejeição. Recentemente, foi descrita uma modalidade “mista”, consistindo em um transplante ortotópico de pulmão em ratos, seguido de imunossupressão com ciclosporina e instilação traqueal de lipopolissacarídeo (toxina de *E. coli*) no dia 28. Apesar de diversas similaridades com a BO humana, as análises foram feitas em 90 dias, e aguardam-se novos usos do modelo [60].

CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

As células tronco mesenquimais (CTM), também chamadas de células progenitoras multipotentes adultas, ganharam grande interesse na última década. A principal fonte é a medula óssea, de onde se obtém dois conjuntos de CT: as hematopoiéticas, que dão origem a linhagens de células sanguíneas, e as mesenquimais, que são o estroma da medula óssea e podem se diferenciar em uma série de linhagens diferentes [61]. Nos últimos anos, diversas outras fontes de CTM foram descritas, incluindo a placenta, o cordão umbilical e o tecido adiposo. Este último, devido à evidente facilidade de obtenção, tem recebido especial atenção da

comunidade científica. Já foi demonstrado que as CTM podem, em ambiente de cultura adequado, se diferenciar em tecidos respiratórios e por isso já foram consideradas as mais promissoras para futuro uso clínico [62]. Além disso, as CTM têm ação imunomoduladora em diversas doenças pulmonares [63, 64]. Em particular, já se sabe que é possível o uso das CTM no reparo da via aérea, onde as secreções do epitélio respiratório parecem ser indutoras da celular [65].

Ainda não está bem definido o papel das CT *in vivo* no reparo e regeneração da via aérea. Em tecidos de grande *turnover* celular, como a medula óssea ou a mucosa do intestino, o papel das células progenitoras é bem descrito. A constante renovação desses tecidos se dá por um processo de mitose assimétrica, no qual uma CT dá origem a outra semelhante a fim de manter o *pool* de células multipotentes, bem como a uma célula progenitora amplificadora, que se prolifera rapidamente, gerando várias descendentes diferenciadas. O reparo do tecido pulmonar após qualquer tipo de lesão também requer a ação de células diferenciadas que ainda mantenham sua capacidade de replicação ou de células com múltiplas capacidades de diferenciação, como as CT. Qualquer dessas possibilidades é mais dificilmente demonstrada no tecido pulmonar, por ser ele bastante estável [66]. No entanto, modelos de várias doenças respiratórias podem ser usados na busca das células responsáveis pelo reparo dos alvéolos e, particularmente, quando o interesse é a SBO, pelo reparo da via aérea [67]. Já se demonstrou a capacidade de renovação de alguns tipos celulares pulmonares (células de Clara e pneumócitos tipo II), atuando como células diferenciadas, ao mesmo tempo em que são células amplificadoras [68]. Porém, ainda existem questionamentos sobre a existência ou não de CT residentes no pulmão. Um possível nicho destas células seria a junção bronquíolo/ducto alveolar [69].

O emprego das CTM já foi descrito em modelos de transplante heterotópico de traqueia. A administração sistêmica de CTM derivadas da medula óssea foi capaz de atenuar o processo de fibrose e obliteração da via aérea, possivelmente através da redução do TGF- β [45]. Esta molécula é reconhecidamente mediadora de fibrose. Além disso, houve significativo aumento da interleucina 10, cuja ação global é reduzir a resposta imune. Mais recentemente, o mesmo modelo de BO foi utilizado para se avaliar o efeito de CTM derivadas da placenta [70]. As células foram injetadas em torno das traqueias implantadas no subcutâneo, e também na luz das traqueias, o que resultou em menor obliteração luminal depois de 28 dias. Apesar da técnica duvidosa para injeção de pequenos volumes de células no interior das traqueias, que necessita reabertura da incisão e exposição das traqueias, o conceito é interessante, já que a lesão epitelial é o ponto central do processo da BO. Em traqueias transplantadas ortotopicamente após criopreservação, foi possível demonstrar a regeneração do epitélio traqueal bem como o aumento da expressão de VEGF após administração de CTM derivadas da medula óssea [71].

Além disso, existem estudos que investigaram outras células e moléculas em modelos de THT. O eixo CXCR4/CXCL12, que atua no processo de migração dos fibrócitos e favorece a produção de actina, pode ser inibido por anticorpos anti-CXCL12; em camundongos, o efeito final foi a menor migração de fibrócitos para as traqueias transplantadas e menor deposição de colágeno [72]. Focando em outra face do processo imunológico, Shi *et al.* [73] utilizaram linfócitos T regulatórios previamente induzidos com TGF- β , IL2 e ácido transretinóico para limitar a redução do lúmen de traqueias ortotopicamente transplantadas em ratos.

CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DE ADIPÓCITOS

Diversos termos já foram utilizados para descrever as células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. Atualmente, a nomenclatura recomendada pela *International Fat Applied Technology Society* (Sociedade Internacional de Tecnologias Aplicadas à Gordura) é *adipose-derived stem cell* (ASC; células tronco adipocíticas ou células tronco derivadas do tecido adiposo). O objetivo é uniformizar na literatura termos como células tronco adultas derivadas de tecido adiposo, células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, células estromais derivadas do tecido adiposo, células do lipoaspirado processado ou mesmo lipoblastos [74]. Do ponto de vista prático, as ASC são as células aderentes ao plástico das placas de cultivo, que mantêm capacidade de proliferação e diferenciação induzida. O processo de obtenção das células geralmente envolve a desagregação de gordura branca por colagenase, seguida de centrifugação, a fim de separar a fração estromal e vascular dos adipócitos maduros (Figuras 7 e 8). Deve-se atentar para o número de passagens utilizado no cultivo das ASC, pois células em passagens iniciais parecem ter ação imunossupressora mais marcada que células de passagens altas [75].

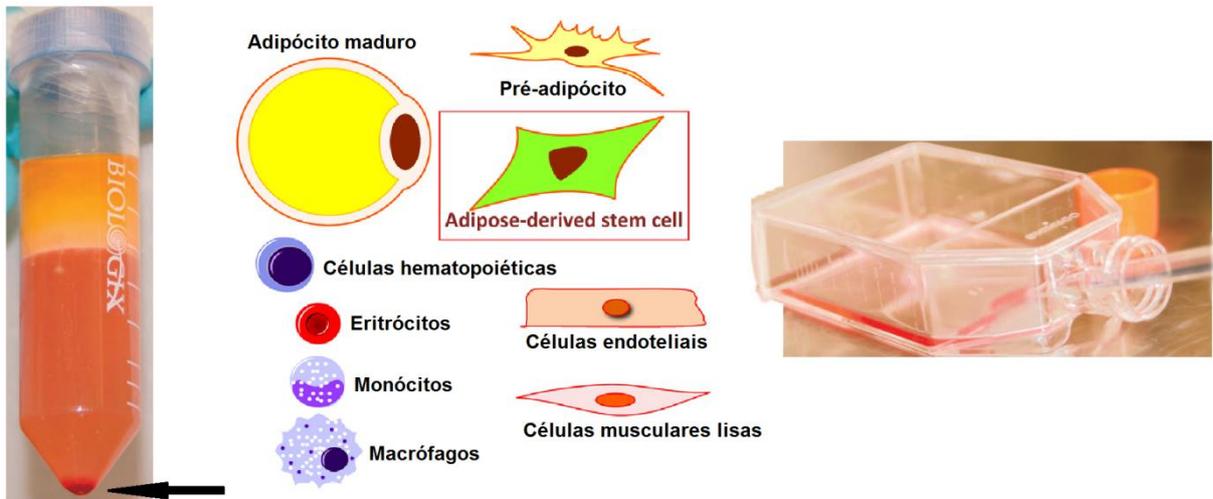


Figura 7. Obtenção de ASC. À esquerda, resultado da digestão de gordura lipoaspirada e centrifugada, com o *pellet* da fração vascular/estromal marcada pela seta. Ao centro, os diversos tipos celulares encontrados no *pellet*. À direita, garrafa de cultura, que revelará as ASC aderentes. (Adaptado de [1, 74]). ASC: *adipose-derived stem cells*.

Não existem marcadores específicos que definam uma célula isolada como sendo uma ASC. Algumas moléculas de superfície são típicas de qualquer CTM (hematopoiéticas, placentárias, etc.): positividade para CD73, CD90 e CD105 e negatividade para CD14, CD19 ou CD79 α , CD34, CD45 e HLA-DR. Tentativas de caracterizar CTM de diferentes fontes por imunofenotipagem apresentam variabilidade na literatura, possivelmente por heterogeneidade entre humanos e metodologias não uniformes [76].

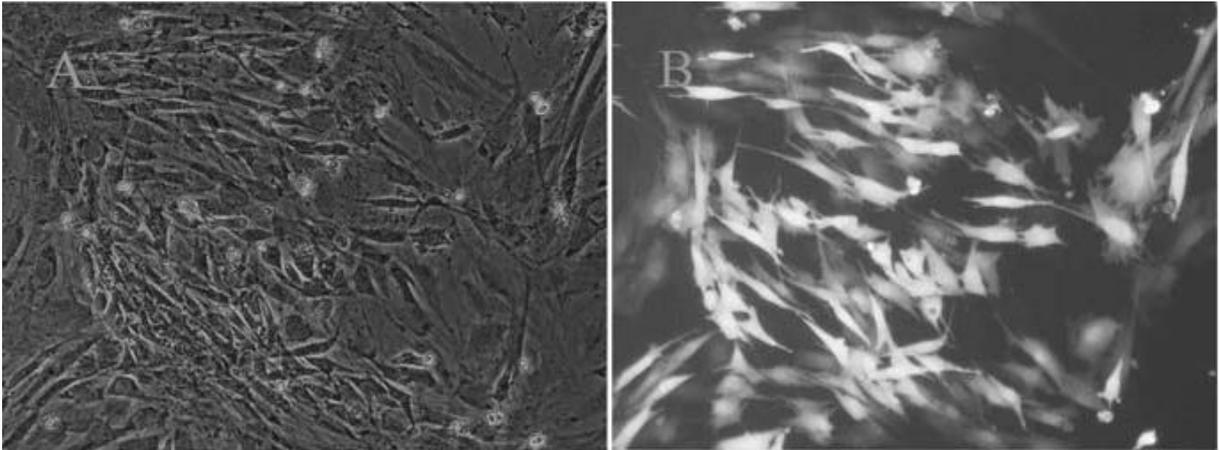


Figura 8. Imagens de microscopia óptica de ASC confluentes (A), e imunofluorescência de ASC marcadas com *green-fluorescent protein* (B). Atentar para a o aspecto fibroblástico alongado das células [77].

Os principais depósitos de gordura são o tecido subcutâneo e os depósitos viscerais, especialmente intra-abdominais. ASC são encontradas em qualquer tecido adiposo, e não parece haver diferenças significativas entre as ASC obtidas do subcutâneo abdominal e do omento [78]. No entanto, os perfis de acúmulo patológico de gorduras, de produção de adipocinas e relação com doenças sistêmicas são claramente diferentes; se existe alguma relação dessas diferenças com as ASC, isto ainda não foi determinado. Culturas a partir de gordura pericárdica tem crescimento mais lento e, juntamente com as ASC de subcutâneo, têm maior capacidade de diferenciação adipogênica [79]. Independente do sítio anatômico, as ASC tem localização perivascular, posição estratégica em tecidos envolvidos no metabolismo energético. Interessantemente, as ASC representam cerca de 1% das células do tecido adiposo, o que pode parecer pouco à primeira vista, mas claramente é uma vantagem prática quando comparamos ao percentual que as CTM hematopoiéticas representam na medula óssea – apenas 0,001 a 0,002% [80]. Não bastasse, um paciente pode fornecer cerca de 200 vezes mais CTM de gordura que

de medula óssea, já que uma sessão de lipoaspiração pode facilmente fornecer um litro de tecido adiposo, enquanto que apenas 100mL de tecido da medula podem ser retirados com segurança [81].

A função básica das ASC em humanos é a adipogênese, ou seja, fornecer novos adipócitos. Para tal, seguem uma etapa intermediária, gerando um pré-adipócito, com morfologia tipicamente mesenquimal, para finalmente tornarem-se um adipócito totalmente diferenciado. Evidentemente, essa sequência é acompanhada de ativações gênicas específicas com as respectivas marcas imunofenotípicas [1]. Adicionalmente, com os estímulos adequados, as ASC podem seguir outras linhagens, incluindo a diferenciação neural, endotelial vascular, miocítica, condrogênica, osteogênica e hepatocítica. Protocolos mais complexos conseguem até induzir a formação de células β das ilhotas de Langerhans [82, 83].

Uma das características mais importantes é a capacidade imunossupressora das ASC. Parece haver um consenso que os efeitos terapêuticos da ASC *in vivo* estão mais relacionados à sua ação endócrina/parácrina do que propriamente à reposição celular [84]. Elas reduzem a transformação de monócitos em células dendríticas e diminuem a apresentação antigênica e a quantidade de moléculas coestimulatórias nas demais populações celulares [85]. Sua ação atenua a resposta Th1, celular, através da inibição da secreção de interleucinas como IL-2 e IFN- γ por parte dos linfócitos. Como se sabe, o ataque aos enxertos pulmonares é essencialmente coordenado por células Th1. Outro subtipo de células T de interesse na rejeição aos órgãos sólidos são as células Th17, cuja função também é inibida pelo contato com CTM [86]. A citotoxicidade direta é amplamente comprometida quando linfócitos T se tornam anérgicos por não receberem sinais coestimulatórios; isso decorre do fato de que ASC expressam poucas moléculas para tal [87].

Indiretamente, a atividade dos linfócitos B também é inibida. Em um interessante estudo, CTM obtidas diretamente de pulmões transplantados (consideradas CTM “residentes”) foram capazes de inibir a função imune adaptativa dos linfócitos T [88].

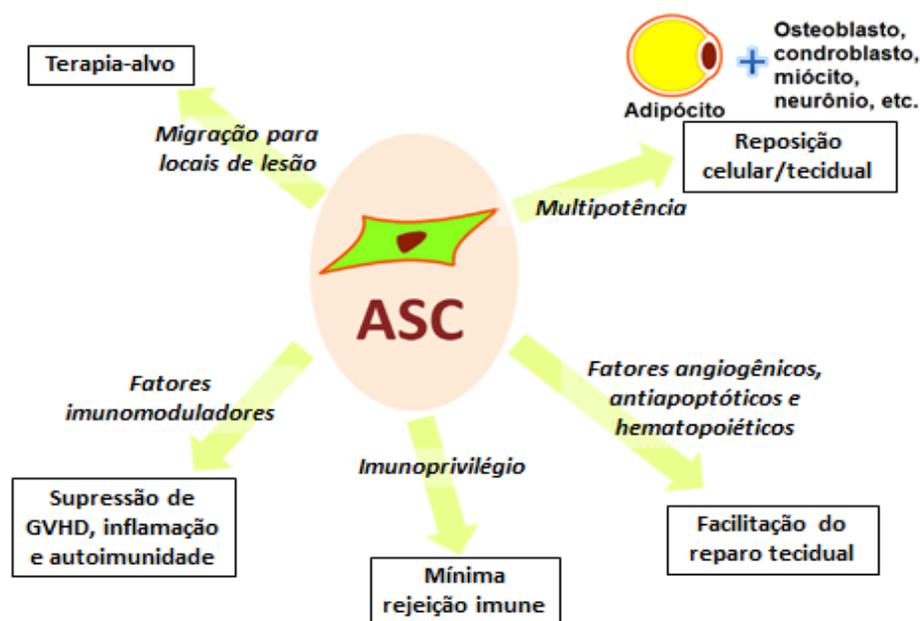


Figura 9. Algumas características da ASC, como migração para local de lesão, multipotência e imunoprivilégio, e componentes do seu secretoma (citocinas e fatores de reparo tecidual) (adaptado de [1]). ASC: *adipose-derived stem cell*; GVHD: *graft versus host disease*.

É preciso estar ciente de que as ASC podem ter um efeito contrário, aumentando a resposta inflamatória em determinados cenários. Um exemplo é a injeção intravenosa de ASC em murinos; ela, *per se*, aumenta a atividade inflamatória, mas após três dias este efeito já está revertido e a resposta sistêmica a insultos citocina-mediados é atenuada [89]. Outro exemplo é que CTM obtidas por LBA de enxertos podem criar uma alça de *feedback* positivo com endotelina-1, o que contribuiria para o processo fibrótico da BO [90].

Busca na literatura não foi capaz de encontrar trabalhos em que as CT, de qualquer origem, tenham sido administradas em mais de um momento do curso evolutivo da fibrose traqueal, seja em modelos de transplante heterotópico ou ortotópico. Os trabalhos sempre descrevem a administração no momento do transplante traqueal ou logo após. Um trabalho apenas usou CTM no terceiro dia, ainda assim em dose única e com metodologia pouco clara [70]. Sabe-se, porém, que no sétimo dia pós-transplante, há grande infiltrado inflamatório na traqueia implantada, processo que permanece pelo menos até 30 dias e diminui gradualmente após, sendo que em 60 dias a fibrose já se estabeleceu [45]. Também se sabe que no décimo dia, muitas vezes já se verá algum grau de estenose traqueal, sugerindo que estratégias terapêuticas devam ser implementadas antes deste ponto [49]. Na área da cardiologia, foi publicado recentemente estudo com administração repetida de CTM hematopoiéticas, em duas doses, com uma semana de intervalo, em um modelo de infarto do miocárdio. A fração de ejeção dos animais que receberam tratamento duplo foi em média 40,7%, após quatro semanas, enquanto a dos ratos tratados com dose única foi 35,9% [91].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ong WK, Sugii S. *Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy*. Int J Biochem Cell Biol 2013;45:1083-6.
- [2] Galderisi U, Giordano A. *The Gap Between the Physiological and Therapeutic Roles of Mesenchymal Stem Cells*. Med Res Rev 2014.
- [3] Stehlik J, Hosenpud JD, Edwards LB, Hertz MI, Mehra MR, Transplantation ISfHaL. *ISHLT International Registry for Heart and Lung Transplantation--into the fourth decade, from strength to strength*. J Heart Lung Transplant 2013;32:941-50.
- [4] ABTO. Registro Brasileiro de Transplantes, ano XX, nº1. *RBT*, 2014.
- [5] Weigt SS, DerHovanessian A, Wallace WD, Lynch JP, Belperio JA. *Bronchiolitis obliterans syndrome: the Achilles' heel of lung transplantation*. Semin Respir Crit Care Med 2013;34:336-51.
- [6] McDyer JF. *Human and murine obliterative bronchiolitis in transplant*. Proc Am Thorac Soc 2007;4:37-43.
- [7] Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dobbels F, Kirk R *et al*. *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report--2011*. J Heart Lung Transplant 2011;30:1104-22.

- [8] Estenne M, Maurer JR, Boehler A, Egan JJ, Frost A, Hertz M *et al.* *Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria.* J Heart Lung Transplant 2002;21:297-310.
- [9] Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden SE, Ruttens D, Vaneylen A, Van Raemdonck DE *et al.* *Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of azithromycin involved in treatment and prevention of chronic lung allograft rejection.* Transplantation 2012;94:101-9.
- [10] Verleden GM, Raghu G, Meyer KC, Glanville AR, Corris P. *A new classification system for chronic lung allograft dysfunction.* J Heart Lung Transplant 2014;33:127-33.
- [11] Jonigk D, Theophile K, Hussein K, Bock O, Lehmann U, Bockmeyer CL *et al.* *Obliterative airway remodelling in transplanted and non-transplanted lungs.* Virchows Arch 2010;457:369-80.
- [12] Sato M, Keshavjee S. *Bronchiolitis obliterans syndrome: alloimmune-dependent and -independent injury with aberrant tissue remodeling.* Semin Thorac Cardiovasc Surg 2008;20:173-82.
- [13] Lu KC, Jaramillo A, Mendeloff EN, Huddleston CB, Sweet SC, Patterson GA *et al.* *Concomitant allorecognition of mismatched donor HLA class I- and class II-derived peptides in pediatric lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome.* J Heart Lung Transplant 2003;22:35-43.

- [14] Sato M. *Chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation: the moving target*. Gen Thorac Cardiovasc Surg 2013;61:67-78.
- [15] Todd JL, Palmer SM. *Bronchiolitis obliterans syndrome: the final frontier for lung transplantation*. Chest 2011;140:502-8.
- [16] Hachem RR. *Antibodies to human leukocyte antigens in lung transplantation*. Clin Transpl 2011:327-32.
- [17] Sumpter TL, Wilkes DS. *Role of autoimmunity in organ allograft rejection: a focus on immunity to type V collagen in the pathogenesis of lung transplant rejection*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;286:L1129-39.
- [18] Tiriveedhi V, Gautam B, Sarma NJ, Askar M, Budev M, Aloush A *et al*. *Pre-transplant antibodies to $\alpha 1$ tubulin and collagen-V in lung transplantation: clinical correlations*. J Heart Lung Transplant 2013;32:807-14.
- [19] Yasufuku K, Heidler KM, Woods KA, Smith GN, Cummings OW, Fujisawa T *et al*. *Prevention of bronchiolitis obliterans in rat lung allografts by type V collagen-induced oral tolerance*. Transplantation 2002;73:500-5.
- [20] Snell GI, Westall GP. *The contribution of airway ischemia and vascular remodelling to the pathophysiology of bronchiolitis obliterans syndrome and chronic lung allograft dysfunction*. Curr Opin Organ Transplant 2010;15:558-62.

- [21] Hall DJ, Baz M, Daniels MJ, Staples ED, Klodell CT, Moldawer LL *et al.* *Immediate postoperative inflammatory response predicts long-term outcome in lung-transplant recipients.* *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2012;15:603-7.
- [22] Castor JM, Wood RK, Muir AJ, Palmer SM, Shimpi RA. *Gastroesophageal reflux and altered motility in lung transplant rejection.* *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:841-50.
- [23] Snyder LD, Finlen-Copeland CA, Turbyfill WJ, Howell D, Willner DA, Palmer SM. *Cytomegalovirus pneumonitis is a risk for bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplantation.* *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:1391-6.
- [24] Weigt SS, Copeland CA, Derhovanessian A, Shino MY, Davis WA, Snyder LD *et al.* *Colonization with small conidia Aspergillus species is associated with bronchiolitis obliterans syndrome: a two-center validation study.* *Am J Transplant* 2013;13:919-27.
- [25] Krueger T, Berutto C, Aubert JD. *Challenges in lung transplantation.* *Swiss Med Wkly* 2011;141:w13292.
- [26] Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden SE, De Vleeschauwer SI, Willems-Widyastuti A, Van Raemdonck DE *et al.* *A randomised controlled trial of azithromycin to prevent chronic rejection after lung transplantation.* *Eur Respir J* 2011;37:164-72.

- [27] Jiang X, Nicolls MR. *Working toward immune tolerance in lung transplantation.* J Clin Invest 2014;124:967-70.
- [28] McNeil K, Glanville AR, Wahlers T, Knoop C, Speich R, Mamelok RD *et al.* *Comparison of mycophenolate mofetil and azathioprine for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome in de novo lung transplant recipients.* Transplantation 2006;81:998-1003.
- [29] Borade S, Ahya VN, Baz MA, Valentine VG, Arcasoy SM, Love RB *et al.* *Comparison of sirolimus with azathioprine in a tacrolimus-based immunosuppressive regimen in lung transplantation.* Am J Respir Crit Care Med 2011;183:379-87.
- [30] Snell GI, Valentine VG, Vitulo P, Glanville AR, McGiffin DC, Loyd JE *et al.* *Everolimus versus azathioprine in maintenance lung transplant recipients: an international, randomized, double-blind clinical trial.* Am J Transplant 2006;6:169-77.
- [31] Hachem RR, Yusef RD, Chakinala MM, Meyers BF, Lynch JP, Aloush AA *et al.* *A randomized controlled trial of tacrolimus versus cyclosporine after lung transplantation.* J Heart Lung Transplant 2007;26:1012-8.
- [32] Zuckermann A, Reichenspurner H, Birsan T, Treede H, Deviatko E, Reichart B *et al.* *Cyclosporine A versus tacrolimus in combination with mycophenolate mofetil and steroids as primary immunosuppression after lung transplantation: one-year results of a 2-center prospective randomized trial.* J Thorac Cardiovasc Surg 2003;125:891-900.

- [33] Treede H, Glanville AR, Klepetko W, Aboyoun C, Vettorazzi E, Lama R *et al.* *Tacrolimus and cyclosporine have differential effects on the risk of development of bronchiolitis obliterans syndrome: results of a prospective, randomized international trial in lung transplantation.* J Heart Lung Transplant 2012;31:797-804.
- [34] Sarahrudi K, Estenne M, Corris P, Niedermayer J, Knoop C, Glanville A *et al.* *International experience with conversion from cyclosporine to tacrolimus for acute and chronic lung allograft rejection.* J Thorac Cardiovasc Surg 2004;127:1126-32.
- [35] Gerhardt SG, McDyer JF, Girgis RE, Conte JV, Yang SC, Orens JB. *Maintenance azithromycin therapy for bronchiolitis obliterans syndrome: results of a pilot study.* Am J Respir Crit Care Med 2003;168:121-5.
- [36] Fisher AJ, Rutherford RM, Bozzino J, Parry G, Dark JH, Corris PA. *The safety and efficacy of total lymphoid irradiation in progressive bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation.* Am J Transplant 2005;5:537-43.
- [37] Benden C, Speich R, Hofbauer GF, Irani S, Eich-Wanger C, Russi EW *et al.* *Extracorporeal photopheresis after lung transplantation: a 10-year single-center experience.* Transplantation 2008;86:1625-7.
- [38] Warnecke G, Haverich A. *Lung re-transplantation: review.* Curr Opin Organ Transplant 2012;17:485-9.

- [39] Xiang F, Murray S. *Restricted mean models for transplant benefit and urgency*. Stat Med 2012;31:561-76.
- [40] Okazaki M, Krupnick AS, Kornfeld CG, Lai JM, Ritter JH, Richardson SB *et al*. *A mouse model of orthotopic vascularized aerated lung transplantation*. Am J Transplant 2007;7:1672-9.
- [41] Suzuki H, Fan L, Wilkes DS. *Development of obliterative bronchiolitis in a murine model of orthotopic lung transplantation*. J Vis Exp 2012.
- [42] Shoji T, Wain JC, Houser SL, Benjamin LC, Johnston DR, Hoerbelt R *et al*. *Indirect recognition of MHC class I allopeptides accelerates lung allograft rejection in miniature swine*. Am J Transplant 2005;5:1626-34.
- [43] Sato M, Keshavjee S, Liu M. *Translational research: animal models of obliterative bronchiolitis after lung transplantation*. Am J Transplant 2009;9:1981-7.
- [44] De Vleeschauwer S, Vanaudenaerde B, Vos R, Meers C, Wauters S, Dupont L *et al*. *The need for a new animal model for chronic rejection after lung transplantation*. Transplant Proc 2011;43:3476-85.
- [45] Deuse T, Schrepfer S, Reichenspurner H, Hoyt G, Fischbein MP, Robbins RC *et al*. *Techniques for experimental heterotopic and orthotopic tracheal transplantations - When to use which model?* Transpl Immunol 2007;17:255-61.

- [46] Genden EM, Iskander A, Bromberg JS, Mayer L. *The kinetics and pattern of tracheal allograft re-epithelialization*. Am J Respir Cell Mol Biol 2003;28:673-81.
- [47] Ikonen TS, Brazelton TR, Berry GJ, Shorthouse RS, Morris RE. *Epithelial re-growth is associated with inhibition of obliterative airway disease in orthotopic tracheal allografts in non-immunosuppressed rats*. Transplantation 2000;70:857-63.
- [48] Sato M, Hirayama S, Hwang DM, Lara-Guerra H, Wagnetz D, Waddell TK *et al*. *The role of intrapulmonary de novo lymphoid tissue in obliterative bronchiolitis after lung transplantation*. J Immunol 2009;182:7307-16.
- [49] Grove DA, Xu J, Joodi R, Torres-Gonzales E, Neujahr D, Mora AL *et al*. *Attenuation of early airway obstruction by mesenchymal stem cells in a murine model of heterotopic tracheal transplantation*. J Heart Lung Transplant 2011;30:341-50.
- [50] Fan K, Qiao XW, Nie J, Yuan L, Guo HZ, Zheng ZK *et al*. *Orthotopic and heterotopic tracheal transplantation model in studying obliterative bronchiolitis*. Transpl Immunol 2013;28:170-5.
- [51] Huang X, Reichenspurner R, Shorthouse W, Cao G, Morris R. *Heterotopic tracheal allograft transplantation: a new model to study the molecular events causing obliterative airway disease in rats*. J Heart Lung Transplant 1995;14.
- [52] Hele DJ, Yacoub MH, Belvisi MG. *The heterotopic tracheal allograft as an animal model of obliterative bronchiolitis*. Respir Res 2001;2:169-83.

- [53] Brazelton TR, Adams BA, Cheung AC, Morris RE. *Progression of obliterative airway disease occurs despite the removal of immune reactivity by retransplantation.* Transplant Proc 1997;29:2613.
- [54] Dutly AE, Andrade CF, Verkaik R, Kugathasan L, Trogadis J, Liu M *et al.* *A novel model for post-transplant obliterative airway disease reveals angiogenesis from the pulmonary circulation.* Am J Transplant 2005;5:248-54.
- [55] Boehler A, Chamberlain D, Kesten S, Slutsky AS, Liu M, Keshavjee S. *Lymphocytic airway infiltration as a precursor to fibrous obliteration in a rat model of bronchiolitis obliterans.* Transplantation 1997;64:311-7.
- [56] Castleman WL. *Bronchiolitis obliterans and pneumonia induced in young dogs by experimental adenovirus infection.* Am J Pathol 1985;119:495-504.
- [57] Svetlecic J, Molteni A, Chen Y, Al-Hamed M, Quinn T, Herndon B. *Transplant-related bronchiolitis obliterans (BOS) demonstrates unique cytokine profiles compared to toxicant-induced BOS.* Exp Mol Pathol 2005;79:198-205.
- [58] Li X, Botts S, Morton D, Knickerbocker MJ, Adler R. *Oleic acid-associated bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia in beagle dogs.* Vet Pathol 2006;43:183-5.

- [59] Appel JZ, Lee SM, Hartwig MG, Li B, Hsieh CC, Cantu E *et al.* *Characterization of the innate immune response to chronic aspiration in a novel rodent model.* Respir Res 2007;8:87.
- [60] Atanasova S, Hirschburger M, Jonigk D, Obert M, Petri K, Evers A *et al.* *A relevant experimental model for human bronchiolitis obliterans syndrome.* J Heart Lung Transplant 2013;32:1131-9.
- [61] Otto WR, Wright NA. *Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic.* Fibrogenesis Tissue Repair 2011;4:20.
- [62] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR *et al.* *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.* Nature 2002;418:41-9.
- [63] Iyer SS, Co C, Rojas M. *Mesenchymal stem cells and inflammatory lung diseases.* Panminerva Med 2009;51:5-16.
- [64] Brody AR, Salazar KD, Lankford SM. *Mesenchymal stem cells modulate lung injury.* Proc Am Thorac Soc 2010;7:130-3.
- [65] Sun Z, Wang Y, Gong X, Su H, Han X. *Secretion of rat tracheal epithelial cells induces mesenchymal stem cells to differentiate into epithelial cells.* Cell Biol Int 2012;36:169-75.

- [66] Rawlins EL, Hogan BL. *Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many?* Development 2006;133:2455-65.
- [67] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S *et al.* *Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer.* Cell 2005;121:823-35.
- [68] Roomans GM. *Tissue engineering and the use of stem/progenitor cells for airway epithelium repair.* Eur Cell Mater 2010;19:284-99.
- [69] Kotton DN, Fine A. *Lung stem cells.* Cell Tissue Res 2008;331:145-56.
- [70] Zhao Y, Gillen JR, Harris DA, Kron IL, Murphy MP, Lau CL. *Treatment with placenta-derived mesenchymal stem cells mitigates development of bronchiolitis obliterans in a murine model.* J Thorac Cardiovasc Surg 2014;147:1668-77.e5.
- [71] Han Y, Lan N, Pang C, Tong X. *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhance cryopreserved trachea allograft epithelium regeneration and vascular endothelial growth factor expression.* Transplantation 2011;92:620-6.
- [72] Harris DA, Zhao Y, LaPar DJ, Emaminia A, Steidle JF, Stoler M *et al.* *Inhibiting CXCL12 blocks fibrocyte migration and differentiation and attenuates bronchiolitis obliterans in a murine heterotopic tracheal transplant model.* J Thorac Cardiovasc Surg 2013;145:854-61.

- [73] Shi Q, Cao H, Liu J, Zhou X, Lan Q, Zheng S *et al.* *CD4+ Foxp3+ regulatory T cells induced by TGF- β , IL-2 and all-trans retinoic acid attenuate obliterative bronchiolitis in rat trachea transplantation.* *Int Immunopharmacol* 2011;11:1887-94.
- [74] Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. *Adipose-derived stem cells for regenerative medicine.* *Circ Res* 2007;100:1249-60.
- [75] Wang X, Liu C, Li S, Xu Y, Chen P, Liu Y *et al.* *Effects of continuous passage on immunomodulatory properties of human adipose-derived stem cells.* *Cell Tissue Bank* 2014.
- [76] Baer PC, Geiger H. *Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity.* *Stem Cells Int* 2012;2012:812693.
- [77] Lin Y, Chen X, Yan Z, Liu L, Tang W, Zheng X *et al.* *Multilineage differentiation of adipose-derived stromal cells from GFP transgenic mice.* *Mol Cell Biochem* 2006;285:69-78.
- [78] Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R *et al.* *Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue.* *FASEB J* 2009;23:3494-505.
- [79] Russo V, Yu C, Belliveau P, Hamilton A, Flynn LE. *Comparison of human adipose-derived stem cells isolated from subcutaneous, omental, and intrathoracic*

adipose tissue depots for regenerative applications. Stem Cells Transl Med 2014;3:206-17.

[80] Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. *Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology.* Trends Biotechnol 2006;24:150-4.

[81] McIntosh KR, Frazier T, Rowan BG, Gimble JM. *Evolution and future prospects of adipose-derived immunomodulatory cell therapeutics.* Expert Rev Clin Immunol 2013;9:175-84.

[82] Konno M, Hamabe A, Hasegawa S, Ogawa H, Fukusumi T, Nishikawa S *et al.* *Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine.* Dev Growth Differ 2013;55:309-18.

[83] Lin Y, Liu L, Li Z, Qiao J, Wu L, Tang W *et al.* *Pluripotency potential of human adipose-derived stem cells marked with exogenous green fluorescent protein.* Mol Cell Biochem 2006;291:1-10.

[84] Katz A, Mericli A. Stem cells derived from fat. In: Atala A, Lanza R, Nerem R, (eds). *Principles of regenerative medicine:* Academic Press, 2011:365-81.

[85] Kirby JA, O'boyle G. *Lung transplantation: the Yin and Yang of mesenchymal stem cells.* Transplantation 2011;92:129-30.

- [86] Franquesa M, Hoogduijn MJ, Baan CC. *The impact of mesenchymal stem cell therapy in transplant rejection and tolerance*. Curr Opin Organ Transplant 2012;17:355-61.
- [87] Parekkadan B, Milwid JM. *Mesenchymal stem cells as therapeutics*. Annu Rev Biomed Eng 2010;12:87-117.
- [88] Jarvinen L, Badri L, Wettlaufer S, Ohtsuka T, Standiford TJ, Toews GB *et al*. *Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator*. J Immunol 2008;181:4389-96.
- [89] Hoogduijn MJ, Roemeling-van Rhijn M, Engela AU, Korevaar SS, Mensah FK, Franquesa M *et al*. *Mesenchymal stem cells induce an inflammatory response after intravenous infusion*. Stem Cells Dev 2013;22:2825-35.
- [90] Salama M, Andrukhova O, Jaksch P, Taghavi S, Kelpetko W, Dekan G *et al*. *Endothelin-1 governs proliferation and migration of bronchoalveolar lavage-derived lung mesenchymal stem cells in bronchiolitis obliterans syndrome*. Transplantation 2011;92:155-62.
- [91] Richardson JD, Psaltis PJ, Frost L, Paton S, Carbone A, Bertaso AG *et al*. *Incremental benefits of repeated mesenchymal stromal cell administration compared with solitary intervention after myocardial infarction*. Cytotherapy 2014;16:460-70.

OBJETIVOS

O objetivo geral desta dissertação é avaliar o efeito da administração repetida de células tronco mesenquimais derivadas de adipócitos, quando comparada à administração em dose única, tanto por via sistêmica quanto local, sobre a estenose traqueal no modelo de transplante heterotópico de traqueia em camundongos.

Podemos citar como objetivos específicos:

- Analisar a capacidade das CTM de preservar o epitélio da via aérea, considerado ponto central nas estratégias de prevenção da bronquiolite obliterante.
- Verificar o efeito das CTM sobre outros parâmetros histológicos de resposta, a saber, alterações decorrentes de perfusão anormal e isquemia e infiltração linfoplasmocitária.
- Descrever a mortalidade animal associada à administração sistêmica de CTM, dado não disponível na maioria das publicações.

ARTIGO ORIGINAL

TÍTULO: A ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA REPETIDA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE ADIPÓCITOS REDUZ A OBLITERAÇÃO TRAQUEAL EM MODELO MURINO DE BRONQUIOLITE OBLITERANTE

AUTORES:

WILLIAM LORENZI¹

FABIANY DA COSTA GONÇALVES²

NATÁLIA SCHNEIDER²

ÉVERTON FRANCO SILVA¹

ANA HELENA DA ROSA PAZ²

MAURICIO GUIDI SAUERESSIG¹

[1] Serviço de Cirurgia Torácica, Hospital de Clínica de Porto Alegre, Brasil

[2] Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil

Autor para correspondência: William Lorenzi

Rua Ramiro Barcelos, 2350, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, Brasil.

CEP: 90.035-903. Phone/Fax: +55 51 33598684

E-mail: williamlorenzi@gmail.com

Contagem de palavras: 2846

Resumo

INTRODUÇÃO: A Síndrome da Bronquiolite Obliterante (SBO) é a maior causa de morte após o primeiro ano de transplante pulmonar, e não existem formas eficazes de preveni-la. Modelos animais são essenciais para se entender a doença, e o mais usado é o transplante heterotópico de traqueia. O uso de células tronco mesenquimais (CTM) de diferentes origens tem sido investigado na modulação de diversas doenças pulmonares, incluindo a SBO. Este estudo testa o efeito de CTM derivadas de adipócitos epididimários em camundongos.

MÉTODOS: CTM foram cultivadas a partir da gordura epididimária de camundongos C57BL/6. Duas traqueias de camundongos Balb/C foram inseridas no tecido subcutâneo do dorso de cada animal C57BL. CTM (10^6 células) foram administradas sistemicamente pela veia da cauda, ou localmente em torno dos implantes, em dose única no dia do transplante, ou novamente após sete dias, constituindo os grupos de tratamento. Os controles sistêmicos e locais receberam solução salina. Todos os animais foram mortos após 28 dias. As traqueias transplantadas foram removidas e avaliadas morfometricamente para determinar o percentual de obliteração luminal.

RESULTADOS: Quando comparada com o controle, uma segunda dose de CTM reduziu significativamente a obliteração traqueal 28 dias após o transplante ($P < 0,01$). Uma dose única apresentou tendência a menos estenose que o controle, mas não alcançou o nível de significância estatística ($P = 0,054$). Contrariamente, a injeção local repetida não foi capaz de reduzir significativamente a obliteração traqueal quando comparada a uma injeção única ou ao controle. Duas doses sistêmicas também tenderam a ser melhor que duas injeções locais ($P = 0,058$), e foram melhor que dose única local.

CONCLUSÃO: O estudo demonstra que uma segunda dose de CTM, administrada sistemicamente após 7 dias, é capaz de evitar a obliteração luminal em um modelo de transplante heterotópico de traqueia em camundongos. Esse resultado sugere que CTM derivadas de adipócitos podem ser usadas para prevenir a bronquiolite obliterante pós transplante de pulmão.

Palavras chave: células tronco mesenquimais derivadas de adipócitos, transplante heterotópico de traqueia, síndrome da bronquiolite obliterante

INTRODUÇÃO

O transplante de pulmão é a única forma de tratamento para diversas doenças pulmonares terminais. A menor sobrevida em longo prazo quando comparado ao transplante de outros órgãos sólidos é explicada pela disfunção crônica do enxerto, que se manifesta como a Síndrome da Bronquiolite Obliterante (SBO), e como seu correlato patológico, a bronquiolite obliterante (BO) [1]. Processos aloimunes e não-alloimunes estão envolvidos na gênese da doença, que cursa com lesão do epitélio da via aérea de pequeno calibre, infiltração linfocitária e subsequente fibrose. O resultado final é a obstrução das vias aéreas [2].

Infelizmente, não há tratamentos eficazes ou formas de prevenção adequadas contra a SBO. Por isso, diversas estratégias têm sido investigadas. Entre elas, a imunomodulação com células tronco (CT) pode ser uma opção viável. No entanto, o tipo e origem destas células e a melhor forma de administração das mesmas não estão definidos. CT mesenquimais (CTM) já foram testadas em várias doenças pulmonares, com resultados variáveis [3]. CTM derivadas de adipócitos parecem ser particularmente promissoras, em parte devido à sua abundância em um tecido de fácil obtenção [4], mas seu efeito em modelos de BO ainda não foi publicado. Estas

células, mais apropriadamente chamadas de células tronco adipocíticas (*adipose-derived stem cells*, ASC), chamam atenção mais pela sua capacidade imunossupressora e seu secretoma do que pela habilidade de se diferenciar *in vivo* [5]. Elas são consideradas imunoprivilegiadas, ou seja, passam despercebidas mesmo por sistemas imunes competentes, na medida em que não expressam MHC de classe II nem moléculas coestimulatórias em sua superfície [6].

O objetivo deste estudo é verificar o efeito das CTM derivadas de adipócitos sobre a obliteração da via aérea, quando administradas sistemicamente ou localmente, em uma ou duas doses, no modelo murino de transplante heterotópico de traqueia (THT).

MÉTODOS

Animais

Camundongos doadores Balb/C e receptores C57, machos, com idade entre 8 e 10 semanas e com peso entre 20 e 30g, foram obtidos pela Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e submetidos à quarentena de uma semana. Todos foram mantidos em instalações padronizadas com até seis animais por gaiola, temperatura de 20 a 22°, ciclos de claro/escuro de 12h, ração comercial balanceada e água *ad libitum*. Os animais foram tratados humanamente de acordo com as normas internacionais e conforme a Lei 11.794/08 e a Resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do HCPA sob o número 12-0066.

Delineamento

Implantamos duas traqueias em cada animal receptor que foram, por sua vez, divididos em seis grupos de acordo com a via de administração e número de doses de ASC. Em todos os animais, foi realizada a administração de uma dose de ASC ou solução fisiológica (grupo controle) no mesmo dia do transplante traqueal (D0), logo após o fim do procedimento. Os grupos com administração sistêmica (Sist) ou local (Local) de ASC em D0 foram denominados, respectivamente, Sist0 (n = 8 traqueias) e Local0 (n = 12). Aqueles que receberam uma dose adicional de ASC em D7 (7º dia de transplante) foram chamados de Sist0+7 (n = 12) e Local0+7 (n = 16). Os grupos controle foram nomeados como SistC (n = 8) ou LocalC (n = 8) de acordo com a via de administração em D0. Todos os animais foram mortos em D28 (28º dia de transplante).

Transplante heterotópico de traqueia

Os animais doadores foram anestesiados com cetamina (100 mg/Kg, intraperitoneal) e xilazina (10 mg/Kg, intraperitoneal). As traqueias foram dissecadas através de cervicoesternotomia e retiradas após secção abaixo da cartilagem cricoide e junto da carina traqueal, procedendo-se à eutanásia com cardiectomia imediatamente após. As traqueias foram conservadas em solução salina a 4º C até o momento do implante. Os receptores foram anestesiados com isoflurano 5%, depois ajustado para 1 a 2%, e o dorso foi preparado com solução alcoólica. Nos receptores do grupo de injeção sistêmica foi realizada incisão única vertical de 1 cm entre as escápulas e, logo após, dissecamos bilateralmente o espaço subcutâneo. Uma traqueia foi implantada em cada lado e a ferida operatória suturada com mononylon 6-0. Receptores de injeção local receberam os implantes através de duas incisões de 5 mm separadas por 2 cm, no dorso, e a dissecção subcutânea foi mínima,

apenas o suficiente para receber uma traqueia. Esta modificação foi necessária para que as traqueias não se movessem e a injeção de CTM ao seu redor pudesse ser feita com precisão. A analgesia pós-operatória foi feita com tramadol 10 mg/Kg, IM. Os receptores foram mortos por deslocamento nugal após anestesia inalatória com isoflurano.

Cultivo das ASC

A gordura epididimária de camundongos C57BL/6 foi retirada de forma asséptica e macerada em câmara de fluxo laminar. O tecido foi incubado a 37°C por 30 minutos, após digestão com colagenase tipo I, 1 mg/mL (Sigma, MO, EUA) em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, CA, EUA) com baixa concentração de glicose (1 g/L). A enzima foi subsequentemente inativada pela adição de DMEM com soro fetal bovino (SFB; Gibco, CA, EUA) a 20%. A suspensão celular resultante foi centrifugada a 600 g por 10 minutos e o pellet ressuspendido em DMEM com SFB 20%, 100 un/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (P/E; Gibco, CA, EUA). As células foram semeadas em placas de cultura de seis poços (TPP, Trasadingen, Suíça) e incubadas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, a 37°C. Após 72h de cultivo, as células não aderentes foram lavadas. Quando havia 80% de confluência, as células aderentes eram removidas com solução de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco, CA, EUA) e mantidas na solução de DMEM, SFB 20% e P/E. Foram injetadas, nos animais, células entre as passagens 3 e 6. Os protocolos experimentais de Gonçalves *et al.* [7] foram seguidos para caracterizar as capacidades de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica das culturas.

Administração das ASC

A administração sistêmica das ASC foi feita pela veia da cauda, sempre pelo mesmo profissional veterinário, após contenção mecânica dos animais em equipamento específico. Foram ressuspendidas 10^6 células em 120 μ L de solução salina tamponada com fosfato (*phosphate-buffered saline*; PBS) e injetadas em alíquotas de 10 a 20 μ L, ao longo de aproximadamente três minutos, através de agulha 25 Ga. Nos grupos de tratamento local, os animais foram levemente sedados com isoflurano e a injeção de 5×10^5 células em 60 μ L de PBS foi feita em *bolus* em torno de cada uma das traqueias, que eram facilmente palpadas em seu sítio de implante.

Análise morfométrica

As traqueias removidas do subcutâneo em D28 foram fixadas em formol por 24h. Após, foram cortadas ao meio e incluídas em parafina com a extremidade seccionada para baixo, permitindo que a porção média da traqueia fosse avaliada. Cortes axiais de 4 μ m foram corados com hematoxilina-eosina e fotografados em microscópio óptico com auxílio do programa QCapture Pro versão 5.1.1.14 (QImaging, EUA). As fotos foram analisadas no software ImageJ versão 1.45s (NIH, EUA). Os limites internos da cartilagem (*I*) e da luz traqueal (*L*) foram delimitados manualmente e suas áreas calculadas. A obliteração traqueal foi obtida pela fórmula $[(I - L)/I] \times 100$.

Análise histológica

Os mesmos cortes histológicos usados para análise morfométrica foram avaliados por patologista cegado. Cada traqueia foi classificada de acordo com os

critérios de Boehler *et al* [8] (Tabela 1), com o objetivo de quantificar aspectos histopatológicos relevantes da BO.

Tabela 1. Critérios de avaliação histopatológica.

Escore	Perda do epitélio da via aérea	Alteração vascular e extravascular refletindo perfusão anormal e isquemia	Infiltração linfoplasmocitária
0	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
1	Perda de menos de 25% da circunferência	Congestão vascular e edema	Infiltrado perivascular esparso envolvendo alguns vasos
2	Perda de 25-50% da circunferência	Congestão vascular com trombose de vaso e/ hemorragia tecidual	Infiltrado perivascular envolvendo a maioria dos vasos com extensão para o tecido conjuntivo adjacente
3	Perda de 50-75% da circunferência	Necrose isquêmica de espessura parcial com infiltrado leucocitário polimorfonuclear esparso	Difusa, mas infiltração transmural apenas leve a moderada
4	Perda de mais de 75% da circunferência	Necrose isquêmica de espessura total com infiltrado leucocitário polimorfonuclear marcado	Infiltração transmural difusa marcada, com importante componente sub-epitelial e intra-epitelial

Análise estatística

Dados de obliteração traqueal e escores histológicos foram analisados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW) para comparação entre os 6 grupos. A avaliação *post hoc* foi feita com o teste de Dunn par a par, sendo utilizada sempre a significância ajustada para comparações múltiplas, como definido *a priori*. Todos os testes foram feitos com o *Predictive Analytics Software* versão 18 (SPSS Inc., 2009), com nível de significância $\alpha=0,05$.

RESULTADOS

A mediana de obliteração traqueal nos grupos de tratamento por via sistêmica Sist0, Sist0+7 e SistC foi, respectivamente, 28%, 16% e 94% (Tabela 2). O teste KW mostrou haver pelo menos um grupo diferente dos demais. Análise *post hoc* indicou que o grupo Sist0+7 teve percentual de obliteração significativamente menor que o grupo controle ($P < 0,001$). O grupo Sist0 apresentou tendência a ter menos obliteração que o controle, mas não atingiu o valor estatístico crítico ($P = 0,054$). Também não houve diferença entre os grupos de tratamento Sist0+7 e Sist0 ($P > 0,05$) (Figura 1 e 2).

Tabela 2. Obliteração traqueal por grupo de tratamento.

Grupo	Obliteração*
Sist0	28%
Sist0+7	16%
SistC	94%
Local0	71%
Local0+7	37%
LocalC	87%

*Mostrada como porcentagem mediana.

Nos grupos de administração local, as medianas de obliteração de Local0, Local 0+7 e LocalC foram 71%, 37% e 87% (Tabela 2). Apesar de o grupo Local0+7 ter tido uma redução luminal aparentemente menor que os demais, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 1 e 2).

Ao comparar grupos sistêmicos e locais, pode-se verificar que o grupo Sist0+7 teve obliteração menor que o Local0 ($P < 0,001$), e teve tendência a menor estenose que o Local 0+7 ($P = 0,058$). Contrariamente, uma única injeção sistêmica não teve o mesmo efeito, seja quando comparado com uma ou duas injeções locais ($P > 0,05$).

A avaliação histológica demonstrou haver preservação significativamente maior do epitélio no grupo Sist0+7 ($P < 0,01$), quando comparado com todos os outros; entre os demais grupos não houve diferença. No critério de alterações refletindo perfusão anormal e isquemia, Sist0+7 teve escore menor que os demais grupos de tratamento. Quanto à infiltração linfoplasmocitária, apenas os controles tiveram escore pior que Sist0+7.

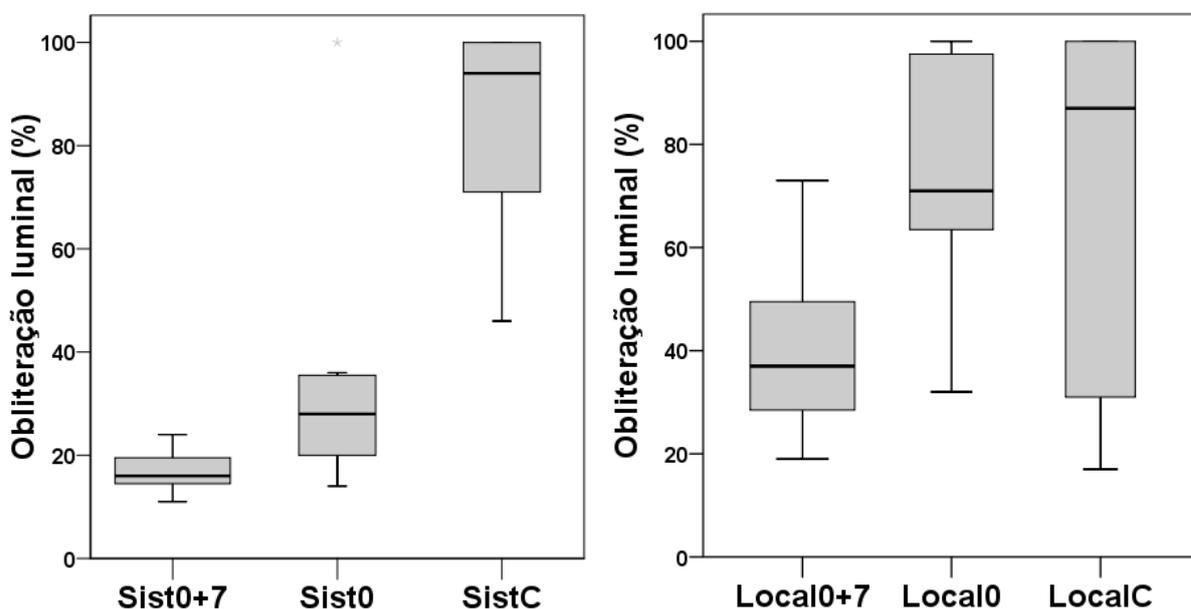


Figura 1. Obliteração luminal (%) nos seis grupos. Dados mostrados com mediana e quartis. Obliteração no grupo Sist0+7 foi significativamente menor que no SistC e no Local0 ($P < 0,001$), e teve tendência a ser menor que no Local0+7 ($P = 0,058$).

Neste estudo foram realizadas 26 injeções sistêmicas de CTM, causando a morte de 10 animais (38,5%) que foram necessariamente excluídos da análise, enquanto a injeção local não provocou nenhum óbito ($P < 0,01$). Todas as mortes ocorreram nos primeiros minutos após as injeções, em alguns animais antes de receberem a dose completa. Os sobreviventes apresentaram disfunção respiratória manifestada por taquipneia e letargia por um período de 4 a 6 horas, mas não houve nenhuma morte tardia.

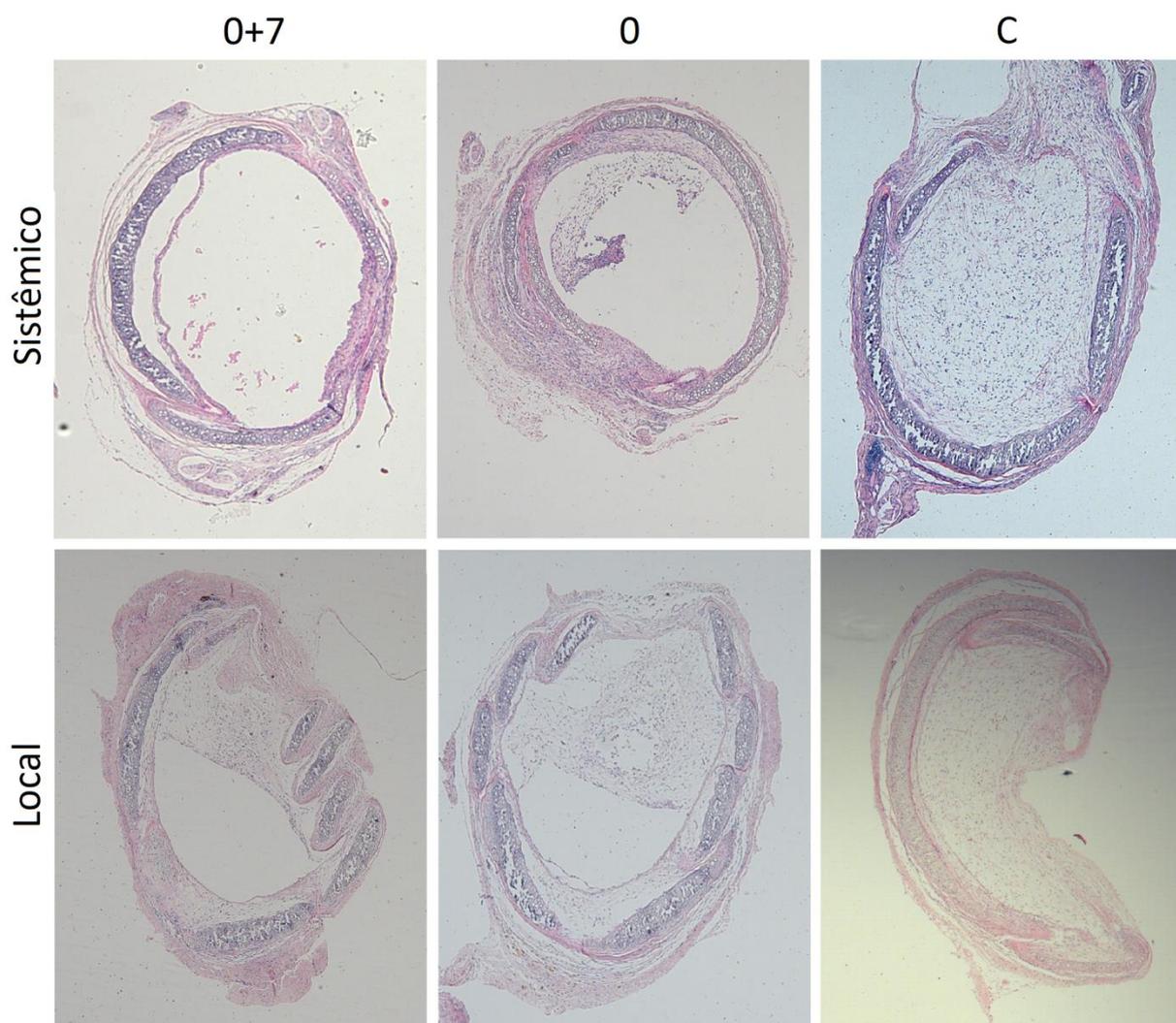


Figura 2. Imagens representativas de cortes axiais de traqueias de cada grupo. H&E, 40x.

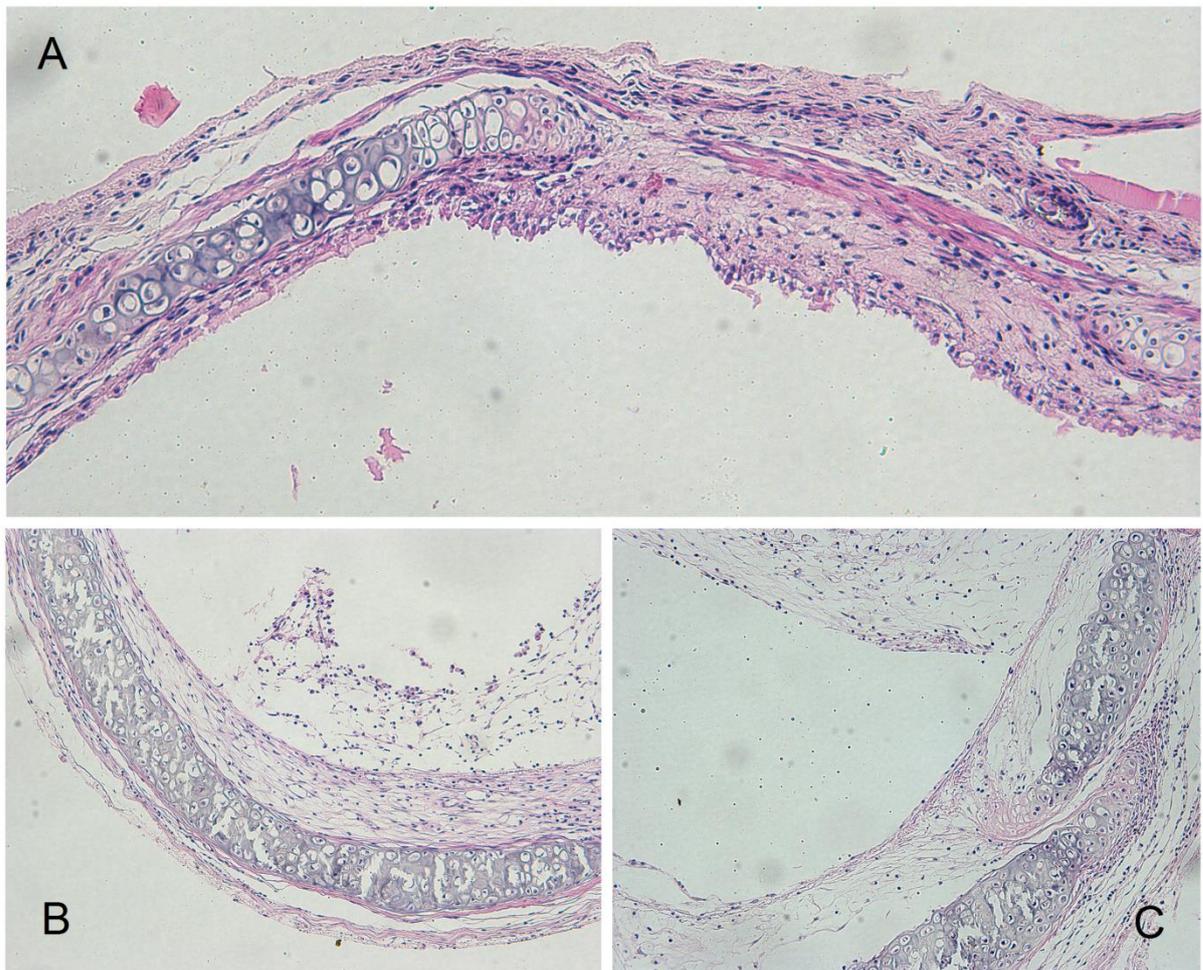


Figura 3. Preservação do epitélio, inclusive do aspecto pseudo-estratificado, em traqueia do grupo Sist0+7 (A). Preservação parcial e achatamento do epitélio em traqueia do grupo Sist0 (B). Ausência quase completa de epitélio em traqueia do grupo Local0 (C). H&E, 200x.

DISCUSSÃO

Este estudo comparou o efeito das ASC sobre a estenose traqueal após THT, administradas em uma ou duas doses, tanto por via sistêmica quanto local. O pico da inflamação neste modelo ocorre aproximadamente entre o dia 7 e o dia 10, e após 14 dias o processo inflamatório talvez não seja mais reversível [9]. Esses dados sugerem que a segunda semana é crucial para determinar o destino do

enxerto no THT. Optamos por usar a segunda dose após sete dias como uma tentativa de minimizar o pico inflamatório do modelo.

A participação das CTM em diversos cenários de lesão pulmonar é bem documentada [10]. As CTM derivadas da medula óssea foram mais extensamente testadas que aquelas de outras origens. Utilizamos as CTM derivadas de adipócitos por terem características comparáveis [11] e pela relativa facilidade em se obtê-las. Em humanos, os tecidos adiposos omental e subcutâneo claramente tem comportamentos metabólicos distintos em doenças como o diabetes. Essa diferença parece se refletir em uma melhor diferenciação adipogênica *in vitro* das ASC do subcutâneo e do mediastino [12], embora não existam diferenças morfológicas ou imunofenotípicas entre estas células e as de origem omental [13]. Nós utilizamos a gordura epididimária por ser facilmente retirada sem contaminação de outros tecidos, mas em camundongos as possíveis discordâncias entre ASC de diferentes regiões anatômicas ainda não foram avaliadas.

Entre todos os grupos, aquele cuja luz traqueal foi mais preservada recebeu duas doses de CTM, ou seja, no dia do transplante traqueal e novamente após uma semana, indicando que a dose adicional potencializa o efeito da primeira. Talvez o melhor resultado deva-se ao tempo que as CTM sobrevivem no receptor, não muito maior que 24h [14], havendo evidências de que as CTM sofrem apoptose logo após a injeção [15]. Mesmo com esta vida curta, o efeito global pode se perpetuar por outros mecanismos, como a ativação de células hematopoiéticas [16] ou pela fagocitose de *debris* celulares por macrófagos, alterando a resposta inflamatória [17]. A segunda injeção de CTM, justamente quando o modelo apresenta maior grau de inflamação, parece causar um efeito aditivo. Entre as publicações que testaram CTM em modelos de BO, nenhuma as utilizou em mais de uma dose. Assim como

qualquer droga imunossupressora, doses regulares podem ser necessárias para manter a rejeição sob controle. Entretanto, não se sabe que efeitos adversos podem se somar após períodos prolongados de tratamento, uma vez que CTM são capazes de induzir fibrose em determinadas situações, produzindo TGF- β , que é o maior ativador de fibroblastos conhecido [18]. Especificamente, as CTM encontradas em enxertos pulmonares produzem quantidades adicionais de endotelina-1 em pacientes com BOS, e CTM são encontradas em maior número no lavado broncoalveolar dos pacientes mais doentes [19]. Os mecanismos que direcionam as ações das ASC para um ou outro fim ainda não são completamente entendidos.

A via de administração é importante na atuação das ASC. Nós identificamos pelo menos uma tendência a um menor efeito das células injetadas em torno dos implantes traqueais. Teoricamente, a promoção de um contato direto entre as células e as traqueias poderia levar a um melhor controle do processo inflamatório. Este resultado contradiz o pensamento de que a atuação das células tronco é parácrina, como classicamente descrito [20]. Supostamente, após um *homing* inicial nos pulmões, as células migrariam para os sítios de inflamação [21], mas diversos trabalhos não foram capazes de encontrar as células nesses locais. Sendo assim, a modulação imune a partir do pulmão pode ser o principal mecanismo de ação e, de fato, já foi documentada [22]. Uma possível explicação para a menor eficácia das CTM injetadas localmente é a ausência de um microambiente adequado [23]. Além disso, o tecido subcutâneo possui uma vascularização deficiente [8], que pode comprometer a meia-vida das CTM ou limitar sua atividade [24]. Analogamente, em um modelo de retocolite ulcerativa, a administração intraperitoneal de CTM também foi menos eficiente no controle do processo inflamatório que a intravenosa, ainda que no primeiro método as células tivessem contato direto com o intestino [25].

Finalmente, curvas de dose-resposta para tratamento sistêmico ou local não são conhecidas; uma curva em U invertido com zênite abaixo de 10^6 células, por exemplo, poderia explicar nossos achados, mas esta informação não está disponível. A resposta para a dúvida se doses menores ou maiores influenciam os resultados é matéria para pesquisas adicionais.

Como esperado, o grupo cujas traqueias tiveram o epitélio mais preservado também apresentou menor estenose. Prevenir a perda epitelial seria, portanto, uma estratégia fundamental. Isso é confirmado pela relação menos consistente da infiltração linfocítica e das alterações vasculares com a obliteração. Células tronco de origem embrionária [26] e placentária [27] também já demonstraram capacidade de proteger o epitélio das pequenas vias aéreas, evitando sua estenose. A indução de quimeras, ou seja, o revestimento das traqueias com células tanto do receptor quanto do doador, através da instilação traqueal de células epiteliais do hospedeiro, é outra terapia celular que pode ser bem sucedida [28].

A mortalidade de animais de pesquisa após injeção intravenosa de CTM não é descrita na maioria dos artigos. O desfecho letal em roedores possivelmente seja devido à embolia pulmonar. Eventos dessa natureza podem estar associados ao grande tamanho das CTM quando comparadas às células sanguíneas [29]. Moléculas de adesão específicas também podem ter um papel relevante na retenção das CTM na microvasculatura pulmonar [30]. Isso ocorre mesmo após injeção arterial periférica, sugerindo que o leito capilar pulmonar pode ser particularmente propenso à oclusão por células tronco [31]. Nesse sentido, a quantidade de células que podem ser infundidas com segurança por via intravenosa é relevante. Por outro lado, estudo de Ra *et al.* [32] mostrou que, em camundongos imunossuprimidos, doses de 4 a 5×10^6 de ASC humanas causaram morte imediata em apenas 3 de 40

animais, desde que uma taxa de infusão lenta fosse usada. Dessa maneira, a possível explicação para nossa mortalidade de 38,5% seria a injeção manual, que poderia resultar em taxas de infusão mais altas; o uso de microbombas seria mais recomendado. As consequências da retenção pulmonar das células em humanos ainda não foram completamente avaliadas.

Por fim, limitações devem ser consideradas. O modelo de THT, apesar de tecnicamente simples e com resultados reprodutíveis, usa um fragmento de grande via aérea, não vascularizado, sem comunicação com o meio externo. Isso não invalida as conclusões deste estudo, pois o modelo é considerado adequado para testes de intervenção imunológica [33]. A mortalidade associada à injeção intravenosa de ASC também é uma limitação terapêutica óbvia, e é um obstáculo a ser superado em estudos futuros.

CONCLUSÃO

O efeito imunossupressor das células tronco mesenquimais derivadas de adipócitos é maior quando mais de uma dose é administrada por via sistêmica, e múltiplas doses parecem ter um efeito aditivo, achado não descrito previamente em modelos de BO. Além disso, a via de administração sistêmica provavelmente é mais eficaz que a via local, pelo menos no modelo de transplante heterotópico de traqueia. O dado é especialmente relevante para o transplante de pulmão, pois o uso local transtraqueal de CTM seria factível [34]. Como a administração sistêmica de CTM em humanos é mais segura que em animais, especialmente com células autólogas, a sua utilização como parte do esquema imunossupressor em humanos poderá ser testada em breve [35]. A incidência de neoplasias e a ocorrência de infecções oportunistas são os principais temores relacionados à intensificação da

imunossupressão, e ensaios clínicos em humanos com seguimento longo são necessários para maior esclarecimento.

REFERÊNCIAS

- [1] Stehlik J, Hosenpud JD, Edwards LB, Hertz MI, Mehra MR, Transplantation ISfHaL. *ISHLT International Registry for Heart and Lung Transplantation--into the fourth decade, from strength to strength*. J Heart Lung Transplant 2013;32:941-50.
- [2] Jonigk D, Theophile K, Hussein K, Bock O, Lehmann U, Bockmeyer CL *et al*. *Obliterative airway remodelling in transplanted and non-transplanted lungs*. Virchows Arch 2010;457:369-80.
- [3] Conese M, Piro D, Carbone A, Castellani S, Di Gioia S. *Hematopoietic and mesenchymal stem cells for the treatment of chronic respiratory diseases: role of plasticity and heterogeneity*. ScientificWorldJournal 2014;2014:859817.
- [4] Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. *Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology*. Trends Biotechnol 2006;24:150-4.
- [5] Ong WK, Sugii S. *Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy*. Int J Biochem Cell Biol 2013;45:1083-6.
- [6] Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. *The potential of adipose stem cells in regenerative medicine*. Stem Cell Rev 2011;7:269-91.

- [7] Gonçalves FaC, Paz AH, Lora PS, Passos EP, Cirne-Lima EO. *Dynamic culture improves MSC adhesion on freeze-dried bone as a scaffold for bone engineering*. World J Stem Cells 2012;4:9-16.
- [8] Boehler A, Chamberlain D, Kesten S, Slutsky AS, Liu M, Keshavjee S. *Lymphocytic airway infiltration as a precursor to fibrous obliteration in a rat model of bronchiolitis obliterans*. Transplantation 1997;64:311-7.
- [9] Brazelton TR, Adams BA, Cheung AC, Morris RE. *Progression of obliterative airway disease occurs despite the removal of immune reactivity by retransplantation*. Transplant Proc 1997;29:2613.
- [10] Brody AR, Salazar KD, Lankford SM. *Mesenchymal stem cells modulate lung injury*. Proc Am Thorac Soc 2010;7:130-3.
- [11] Lin Y, Liu L, Li Z, Qiao J, Wu L, Tang W *et al*. *Pluripotency potential of human adipose-derived stem cells marked with exogenous green fluorescent protein*. Mol Cell Biochem 2006;291:1-10.
- [12] Russo V, Yu C, Belliveau P, Hamilton A, Flynn LE. *Comparison of human adipose-derived stem cells isolated from subcutaneous, omental, and intrathoracic adipose tissue depots for regenerative applications*. Stem Cells Transl Med 2014;3:206-17.

- [13] Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R *et al.* *Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue.* FASEB J 2009;23:3494-505.
- [14] Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ *et al.* *Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion.* Front Immunol 2012;3:297.
- [15] Liu XB, Chen H, Chen HQ, Zhu MF, Hu XY, Wang YP *et al.* *Angiopoietin-1 preconditioning enhances survival and functional recovery of mesenchymal stem cell transplantation.* J Zhejiang Univ Sci B 2012;13:616-23.
- [16] Yang X, Balakrishnan I, Torok-Storb B, Pillai MM. *Marrow Stromal Cell Infusion Rescues Hematopoiesis in Lethally Irradiated Mice despite Rapid Clearance after Infusion.* Adv Hematol 2012;2012:142530.
- [17] Lu W, Fu C, Song L, Yao Y, Zhang X, Chen Z *et al.* *Exposure to supernatants of macrophages that phagocytized dead mesenchymal stem cells improves hypoxic cardiomyocytes survival.* Int J Cardiol 2013;165:333-40.
- [18] Kirby JA, O'boyle G. *Lung transplantation: the Yin and Yang of mesenchymal stem cells.* Transplantation 2011;92:129-30.
- [19] Salama M, Andrukhova O, Jaksch P, Taghavi S, Kelpetko W, Dekan G *et al.* *Endothelin-1 governs proliferation and migration of bronchoalveolar lavage-derived*

lung mesenchymal stem cells in bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 2011;92:155-62.

[20] Parekkadan B, Milwid JM. *Mesenchymal stem cells as therapeutics*. *Annu Rev Biomed Eng* 2010;12:87-117.

[21] Hoogduijn MJ, Roemeling-van Rhijn M, Engela AU, Korevaar SS, Mensah FK, Franquesa M *et al*. *Mesenchymal stem cells induce an inflammatory response after intravenous infusion*. *Stem Cells Dev* 2013;22:2825-35.

[22] Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL *et al*. *Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6*. *Cell Stem Cell* 2009;5:54-63.

[23] Choi DH, Suhaeri M, Hwang MP, Kim IH, Han DK, Park K. *Multi-lineage differentiation of human mesenchymal stromal cells on the biophysical microenvironment of cell-derived matrix*. *Cell Tissue Res* 2014.

[24] Wu J, Niu J, Li X, Li Y, Wang X, Lin J *et al*. *Hypoxia Induces Autophagy of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells via Activation of ERK1/2*. *Cell Physiol Biochem* 2014;33:1467-74.

- [25] Gonçalves FdC, Schneider N, Pinto FO, Meyer FS, Visioli F, Pfaffenseller B *et al.* *Intravenous versus intraperitoneal MSCs administration: what's the best route for treating experimental colitis?* World J Gastroenterol 2014; accepted for publishing.
- [26] McIntyre BA, Alev C, Mechael R, Salci KR, Lee JB, Fiebig-Comyn A *et al.* *Expansive generation of functional airway epithelium from human embryonic stem cells.* Stem Cells Transl Med 2014;3:7-17.
- [27] Zhao Y, Gillen JR, Harris DA, Kron IL, Murphy MP, Lau CL. *Treatment with placenta-derived mesenchymal stem cells mitigates development of bronchiolitis obliterans in a murine model.* J Thorac Cardiovasc Surg 2014;147:1668-77.e5.
- [28] Zhao Y, Steidle JF, Upchurch GR, Kron IL, Lau CL. *Prevention of the second stage of epithelial loss is a potential novel treatment for bronchiolitis obliterans.* J Thorac Cardiovasc Surg 2013;145:940-7.
- [29] Toma C, Wagner WR, Bowry S, Schwartz A, Villanueva F. *Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics.* Circ Res 2009;104:398-402.
- [30] Nystedt J, Anderson H, Tikkanen J, Pietilä M, Hirvonen T, Takalo R *et al.* *Cell surface structures influence lung clearance rate of systemically infused mesenchymal stromal cells.* Stem Cells 2013;31:317-26.

- [31] Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I *et al.* *Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy.* *Microvasc Res* 2009;77:370-6.
- [32] Ra JC, Shin IS, Kim SH, Kang SK, Kang BC, Lee HY *et al.* *Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans.* *Stem Cells Dev* 2011;20:1297-308.
- [33] Sato M, Keshavjee S, Liu M. *Translational research: animal models of obliterative bronchiolitis after lung transplantation.* *Am J Transplant* 2009;9:1981-7.
- [34] Leblond AL, Naud P, Forest V, Gourden C, Sagan C, Romefort B *et al.* *Developing cell therapy techniques for respiratory disease: intratracheal delivery of genetically engineered stem cells in a murine model of airway injury.* *Hum Gene Ther* 2009;20:1329-43.
- [35] Alagesan S, Griffin MD. *Autologous and allogeneic mesenchymal stem cells in organ transplantation: what do we know about their safety and efficacy?* *Curr Opin Organ Transplant* 2014;19:65-72.

ORIGINAL ARTICLE

TITLE: REPEATED SYSTEMIC ADMINISTRATION OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS REDUCES TRACHEAL OBLITERATION IN A MURINE MODEL OF BRONCHIOLITIS OBLITERANS

AUTHORS:

WILLIAM LORENZI¹

FABIANY DA COSTA GONÇALVES²

NATÁLIA SCHNEIDER²

ÉVERTON FRANCO SILVA¹

ANA HELENA DA ROSA PAZ²

MAURICIO GUIDI SAUERESSIG¹

[1] Thoracic Surgery Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

[2] Laboratory of Embriology and Cellular Differentiation, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author: William Lorenzi

Rua Ramiro Barcelos, 2350, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, Brazil.

CEP: 90.035-903. Phone/Fax: +55 51 33598684

E-mail: williamlorenzi@gmail.com

Word count: 2771

Abstract

INTRODUCTION: *Bronchiolitis obliterans* syndrome (BOS) is the greatest cause of death after one year of lung transplantation, and there are no effective ways to prevent it. Animal models are essential to understand the disease, and the most widely used one is the heterotopic tracheal transplant. Mesenchymal stem cells (MSC) of different sources have been extensively tested for their modulating effect in several pulmonary diseases, including BOS. The present study investigates the effects of epididymal adipocyte-derived MSC in mice.

METHODS: MSC were cultured from C57BL mice epididymal fat. Two Balb/C mice tracheas were inserted in the dorsal subcutaneous tissue of each C57BL animal. MSC (10^6 cells) were administered either systemically through the tail vein, or locally around the implants, as a single dose on the day of transplantation, or again after 7 days, consisting on the treatment groups. Both systemic and local control groups were injected with saline. All animals were killed after 28 days. Transplanted tracheas were harvested and analyzed morphometrically for the percentage of luminal obliteration.

RESULTS: When compared to controls, a second dose of MSC significantly reduced tracheal obliteration 28 days after transplantation ($P < .01$). A single dose tended towards less stenosis than controls, but did not reach statistical significance ($P = .054$). On the contrary, repeated local injection was not capable of reducing tracheal obliteration when compared to a single injection or controls. Two systemic doses also tended to be better than two local injections ($P = .058$), and were better than a single local dose.

CONCLUSION: The study demonstrates that a second dose of MSC, when given systemically after 7 days, reduces luminal obliteration in a heterotopic tracheal

transplantation model in mice. This result suggests that adipocyte-derived MSC can be used to prevent obliterative bronchiolitis after lung transplantation.

Keywords: *adipose-derived stem cells, heterotopic tracheal transplantation, bronchiolitis obliterans syndrome*

INTRODUCTION

Lung transplantation is the only possible treatment for many end-stage pulmonary diseases. Diminished long-term survival when compared to other solid-organ transplants is explained by chronic graft dysfunction, manifested as *Bronchiolitis Obliterans Syndrome* (BOS), and as its pathological counterpart, obliterative *bronchiolitis* (OB) [1]. Alloimmune and non-alloimmune events are involved in the pathogenesis of the disease, which begins with small caliber airway epithelial lesion, followed by lymphocytic infiltration and subsequent fibrosis. The end result is airway obstruction [2].

Unfortunately, there are no effective treatments or adequate prevention for BOS. Because of that, several strategies have been evaluated. Stem cell (SC) immunomodulation may be a viable option. Nonetheless, type and origin of cells and best route of administration are not yet clarified. Mesenchymal stem cells (MSC) have been tested for many pulmonary diseases, with variable results [3]. Adipocyte-derived MSC seem particularly promising, partly due to their abundance in an easily obtainable tissue [4], but their effects on OB scenarios have not been reported. These cells, more appropriately called adipose-derived stem cells (ASC), are more attractive for their immunosuppressive capacity and their secretome than for the ability to differentiate in vivo [5]. ASC are considered immunoprivileged, *i.e.*, are not

attacked even by immunocompetent systems, as they do not express class II MHC or co-stimulatory molecules in their surface [6].

The aim of this study is to evaluate the effect of ASC on airway obliteration, when administered either systemically or locally, in one or two doses, in the murine model of heterotopic tracheal transplantation (HTT).

METHODS

Animals

Donor Balb/C and receptor C57BL/6 male mice, 8-10 weeks old and weighing 20-30g were provided by the Animal Experimentation Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and quarantined for a week. They were all kept in standard six animals facilities, with temperature of 20-22°C, 12h light/dark shifts, fed with standard diet and water *ad libitum*. Animals were treated humanely in accordance with international regulations and with the Brazilian Federal Law 11.794/08 and Resolution 1000/2012 of the Federal Council of Veterinary Medicine, which rule animal research in Brazil. The study was approved by the Animal Research Ethics Commission at HCPA under the number 12-0066.

Study groups

We implanted two tracheas in each receptor, which were divided in six groups according to route of administration and number of ASC doses. In all animals, one dose of ASC or saline (control group) was administered on the same day of the tracheal implant (D0), immediately after the procedure. Groups of systemic (Syst) or local (Local) administration of ASC on D0 were named, respectively, Syst0 (n = 8 tracheas) and Local0 (n = 12). Those that received an additional dose of ASC on D7

(7th day after transplantation) were named as Syst0+7 (n = 12) and Local0+7 (n = 16). Control groups were named according to the route of administration on D0. All animals were killed on D28 (28th day after transplantation).

Heterotopic tracheal transplantation

Donor animals were anesthetized with ketamine (100 mg/Kg, intraperitoneal) and xilazine (10 mg/Kg, intraperitoneal). Tracheas were dissected through cervicosternotomy and removed after being cut below the cricoid and at the main carina; immediately after that, animals were killed by cardiectomy. Tracheas were preserved in saline at 4°C until implant. Receptors were anesthetized with 5% isoflurane, then adjusted to 1-2%, and the dorsum was prepared with alcoholic solution. In those of systemic treatment groups a single 1 cm vertical incision was made between the scapulae and the subcutaneous space dissected bilaterally. One trachea was implanted on each side and the wound sutured with 6-0 mononylon. Animals from local injection groups received the implants through two 5 mm dorsal incisions, 2 cm apart, and subcutaneous dissection was minimal, only enough to place one trachea. This modification was necessary so the tracheas would not move and ASC injections could be done around them with precision. Post-operative analgesia was done with tramadol 10 mg/Kg, IM. Receptors were killed by nuchal dislocation after isoflurane inhaled anesthesia.

ASC culture

Epididymal fat from male C57BL/6 was aseptically removed and minced in a laminar flow chamber. Tissue was incubated at 37°C for 30 minutes, after digestion with type 1 collagenase, 1 mg/mL (Sigma, MO, USA) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, CA, USA) with low glucose concentration (1 g/L). Enzyme

was subsequently inactivated by adding DMEM with 20% bovine fetal serum (BFS; Gibco, CA, USA). The resultant cellular suspension was centrifuged at 600 g for 10 minutes and the pellet resuspended in DMEM with 20% BFS, 100 un/mL of penicillin and 100 mg/mL of streptomycin (P/E; Gibco, CA, USA). Cells were seeded in 6-well culture dishes (TPP, Trasadingen, Switzerland) and incubated in humidified atmosphere with 5% CO₂, at 37°C. After 72h, non-adherent cells were washed. When reaching 80% confluence, adherent cells were removed with 0.25% trypsin-EDTA (Gibco, CA, USA) and kept in DMEM, 20% BFS and P/E solution. They were injected fresh between passages 3 and 6. Experimental protocols as per Gonçalves *et al.* [7] were followed to characterize the cultures' adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation capacities.

ASC administration

ASC were systemically injected through the tail vein, always by the same veterinarian, with the mice in a small rodent restrainer. Cells (1×10^6) were resuspended in 120 μ L of PBS and injected in 10-20 μ L aliquots, along approximately 3 minutes, through a 25Ga needle. For the local treatment groups, animals were lightly sedated with isoflurane and injection of 5×10^5 cells in 60 μ L PBS were injected *in bolus* around each trachea, which were easily palpated at their implant site.

Morphometric analysis

Tracheas removed from the subcutaneous on D28 were fixated in formaldehyde for 24h. After that, they were cut in half and embedded in paraffin with the cut side down, so that the middle portion of each trachea could be evaluated. Axial slices of 4 μ m were stained with hematoxylin and eosin and photographed on optical microscope using the software QCapture Pro version 5.1.1.14 (QImaging,

USA). Pictures were analyzed on software ImageJ version 1.45s (NIH, USA). Internal boundaries of the cartilage (I) and tracheal lumen (L) were manually delimited and their areas calculated. Tracheal obliteration was obtained with the formula $[(I - L)/I] \times 100$.

Histological analysis

The same sections used for morphometric analysis were evaluated by a blinded pathologist. Each trachea was classified according to Boehler et al [8] criteria (Table 1), with the aim of quantifying relevant OB histopathological aspects.

Table 1. Histological assessment criteria.

Score	Airway lining epithelial loss	Vascular and extravascular changes reflecting abnormal perfusion/ischemia	Lymphocyte/plasma cell infiltration
0	No change	No change	No change
1	<25% circumference loss	Vascular congestion and edema	Sparse perivascular infiltrates involving some vessels
2	25-50% circumference loss	Vascular congestion with vessel thrombosis and/or tissue hemorrhage	Perivascular infiltrates involving most vessels with extension into adjacent connective tissue
3	50-75% circumference loss	Partial thickness ischemic necrosis with sparse polymorphonuclear leukocytic infiltrates	Diffuse but mild to moderate panmural infiltration
4	>75% circumference loss	Full thickness ischemic necrosis with marked polymorphonuclear leukocytic infiltrates	Diffuse marked panmural infiltration with striking subepithelial and intra-epithelial component

Statistical analysis

Tracheal obliteration and histological score data were analyzed with non-parametrical Kruskal-Wallis test (KW) for comparisons among the 6 groups. *Post hoc* evaluation was done using pairwise Dunn's test, always using adjusted significance

for multiple comparisons, as defined *a priori*. All tests ran on Predictive Analytics Software version 18 (SPSS Inc., 2009), using a significance level of $\alpha = .05$.

RESULTS

Median tracheal obliteration for systemically treated groups Syst0, Syst0+7 e SystC were, respectively, 28%, 16% e 94% (Table 2). KW test indicated that at least one group was different from the others. *Post hoc* analysis showed that group Syst0+7 had significantly less tracheal obliteration than control group ($P < .001$). Group Syst0 tended towards less obliteration than controls, but did not reach the critical statistical value ($P = .054$). There was also no difference between treatment groups Syst0+7 e Syst0 ($P > .05$) (Figure 1 and 2).

Table 2. Tracheal obliteration by treatment group.

Group	Obliteration*
Syst0	28%
Syst0+7	16%
SystC	94%
Local0	71%
Local0+7	37%
LocalC	87%

*Shown as median percentage.

In local administration groups, median obliteration for Local0, Local 0+7 e LocalC groups was 71%, 37% and 87% (Table 2). Despite group Local0+7 apparent

lesser luminal reduction, the difference was not statistically significant (Figure 1 and 2).

Comparing systemic and local groups, it was showed that Syst0+7 group's obliteration was less than Local0 ($P < .001$), and tended towards less stenosis than Local0+7 ($P = .058$). On the contrary, a single systemic injection did not have the same effect, when compared with either one or two local injections ($P > .05$).

Histological evaluation demonstrated significantly greater epithelial preservation on group Syst0+7 ($P < .01$), when compared to all others; there were no differences among the rest of them. On the criterion of alterations reflecting abnormal perfusion and ischemia, Syst0+7 had a lower score than other treatment groups. Concerning lymphoplasmocytic infiltration, only controls score less than Syst0+7.

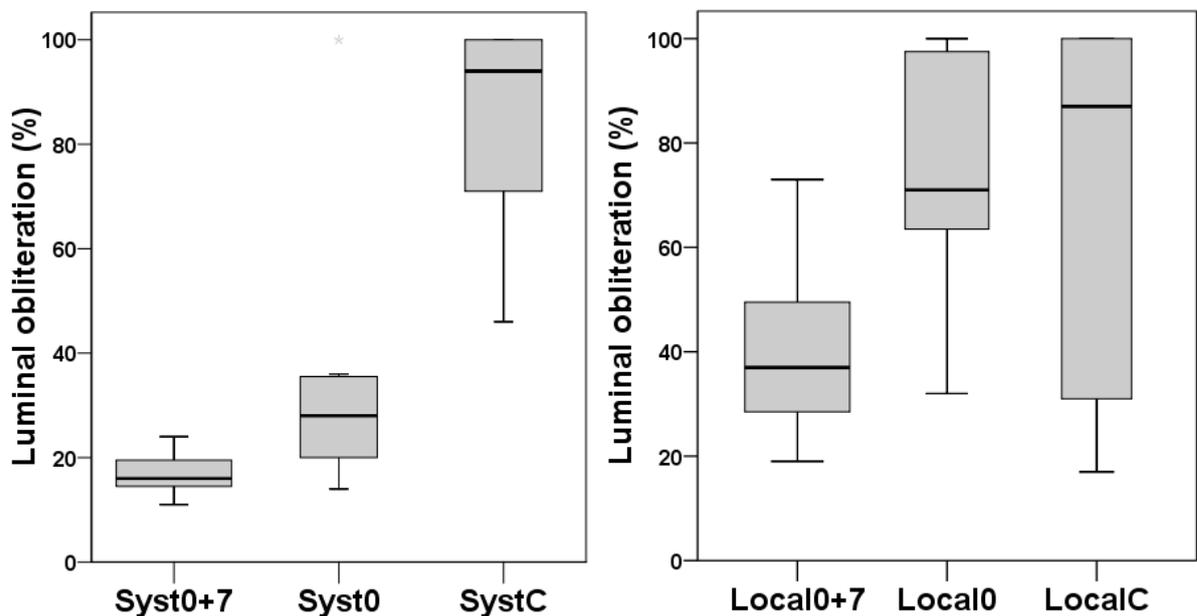


Figure 1. Luminal obliteration (%) on all six groups. Data showed as median and quartiles. Obliteration on group Syst0+7 was significantly less than on SystC and Local0 ($P < .001$), and tended to be less than on Local0+7 ($P = .058$).

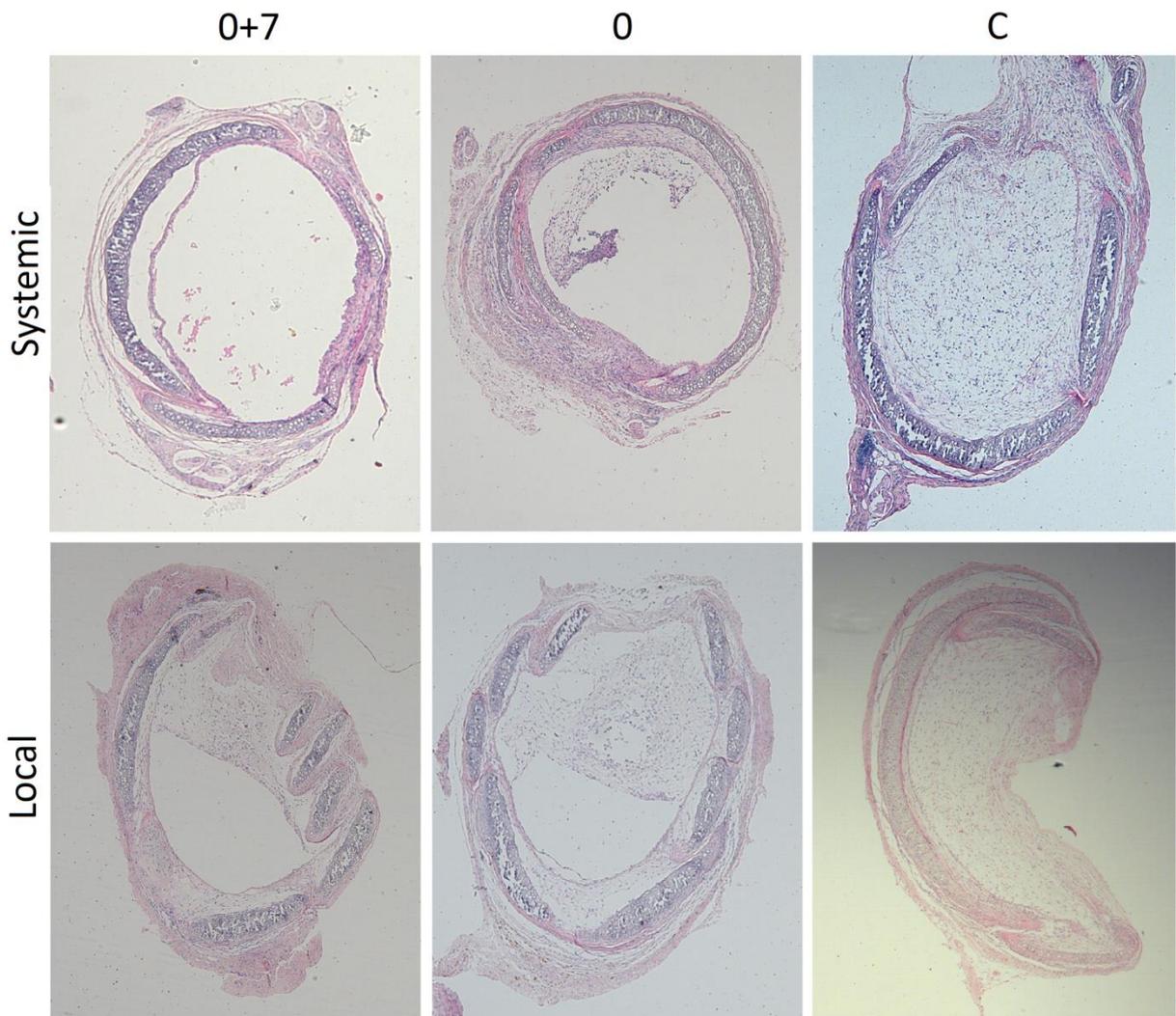


Figure 2. Representative images of axial sections of tracheas from each group. H&E, 40x.

In this study, 26 systemic ASC injections were made, causing the death of 10 animals (38.5%), which were necessarily excluded from analysis, while local administration did not cause any losses ($P < .01$). All deaths occurred in the first few minutes after the injection, in some animals even before receiving the full dose. Surviving animals presented respiratory distress manifested by increased respiratory rate and lethargy for a period of 4 to 6h, but there was no late mortality.

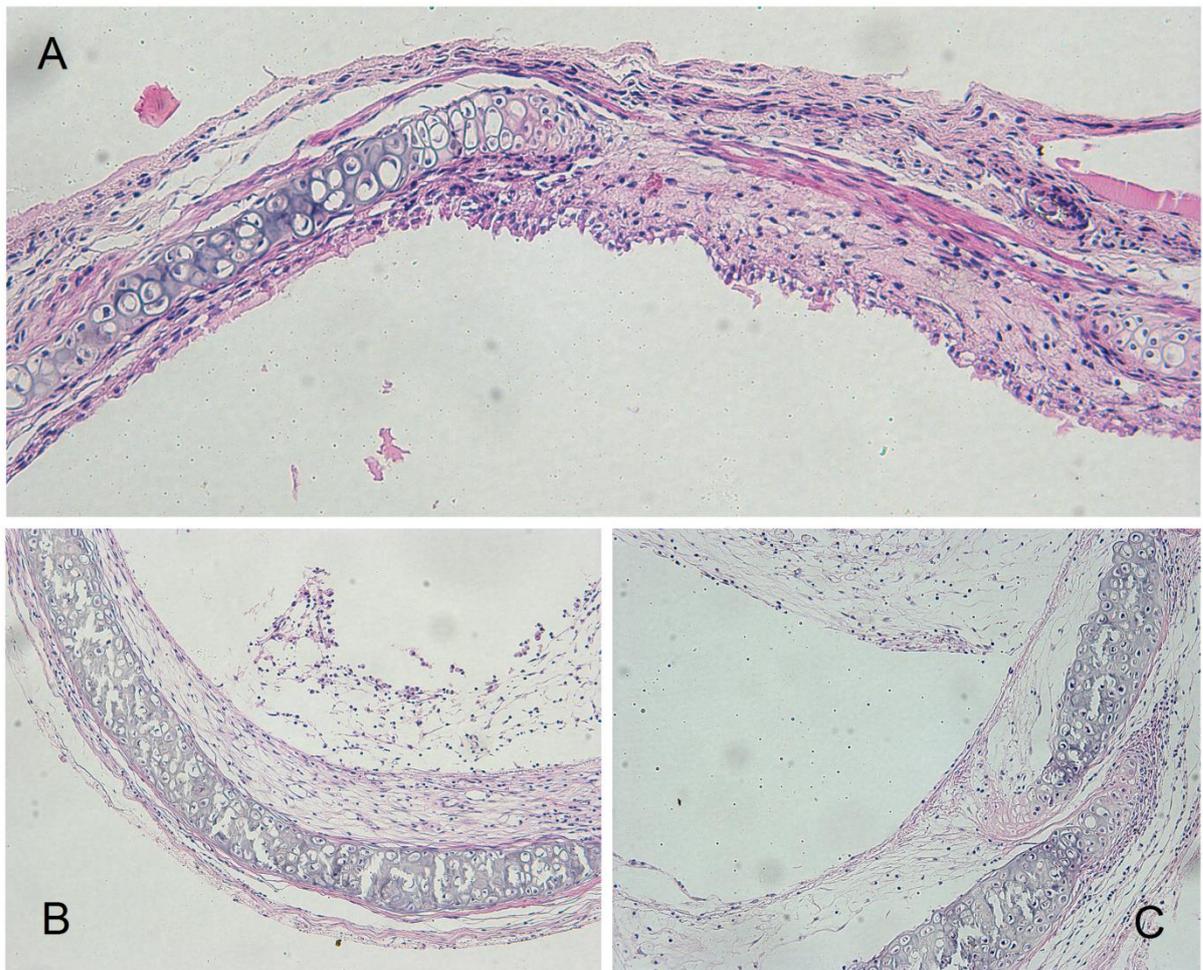


Figure 3. Epithelial preservation, including the pseudostratified aspect, in a trachea from group Syst0+7 (A). Partial preservation and epithelial flattening in a trachea from group Syst0 (B). Almost complete absence of epithelial lining in a trachea from group Local0 (C). H&E, 200x.

DISCUSSION

This study compared the effect of ASC on tracheal stenosis after HTT, administered in one or two doses, by either systemic or local routes. The peak of inflammation in the HTT model is approximately between days 7 and 10, and after day 14 the process may no longer be reversible [9]. These data suggest that the

second week is crucial in determining the graft's fate. We decided to use the second dose after 7 days as an attempt to minimize the model's inflammatory peak.

MSC activity on several pulmonary lesion scenarios is well documented [10]. Bone marrow-derived MSC were more extensively tested than cells from other origins. We used ASC for their comparable characteristics [11] and the relative easiness of obtainment. In humans, visceral and subcutaneous adipose tissues have clearly different metabolic behaviors in diseases such as diabetes. This difference seems to be reflected in better adipogenic *in vitro* differentiation seen in ASC from subcutaneous and mediastinal tissues [12], even though there are no morphologic or immunophenotypic distinctions between those cells and the ones from omental origin [13]. We used epididymal fat because it is easily removed without contamination from other tissues, but possible peculiarities of ASC from various anatomical regions have not been evaluated in mice.

Among all groups, the one that had the tracheal lumen mostly preserved received two doses of ASC, *i.e.*, on the day of the implant and again after a week, indicating that the additional dose potentiates the effect of the first one. Maybe this result relates to how long ASC survive in the receptor, not much more than 24 hours [14], and there is evidence that MSC become apoptotic shortly after their injection [15]. Despite this short life, the global effect of ASC may persist through other mechanisms, such as activation of hematopoietic cells [16] or through phagocytosis of cellular debris by macrophages, altering the immune response [17]. A second injection of ASC, precisely when the tracheas are most inflamed, seems to create an additive effect. Among studies that tested MSC in models of OB, none used them in more than one dose. Just like any immunosuppressive drug, regular doses may be necessary to keep rejection under control. Nonetheless, it is not known if adverse

effects may add up after prolonged courses of treatment, since MSC are capable of inducing fibrosis under certain conditions, by producing TGF- β , which is the greatest fibroblast activator known [18]. Specifically, MSC found in lung grafts produce additional amounts of endothelin-1 in patients with BOS, and there are larger numbers of MSC in the bronco-alveolar lavage of sicker patients [19]. Mechanisms that direct the actions of ASC to one path or the other are not completely understood.

Route of administration is important for the performance of ASC. We identified at least a tendency towards a lesser effect when ASC were injected around the tracheas. Theoretically, promoting direct contact between cells and grafts could lead to a better control of the inflammation. This result contradicts the thought that SC actions are paracrine, as classically described [20]. Supposedly, after initial pulmonary homing, cells would migrate to sites of inflammation [21], but several studies have not been able to find MSC at those locations. Therefore, immunomodulation from the lung might be the main mechanism of MSC action, what has, in fact, been documented [22]. Possible explanation for an inferior effectiveness of ASC applied locally is the absence of an appropriate microenvironment [23]. Besides that, the subcutaneous space has a deficient vascularization [8], what may compromise ASC survival or limit their activity [24]. Analogously, in a model of ulcerative rectocolitis, intraperitoneal administration of ASC was also less effective in controlling inflammation than the intravenous route, in spite of the fact that the former directly contacted the cells and bowel [25]. Finally, dose-response curves for either local or systemic treatments with ASC are not known; an inverted U-shaped curve with zenith below 1×10^6 cells, for instance, could explain our findings, but that information is not available. The answer to whether smaller or larger doses influence results is a matter for further research.

As expected, the group with more preserved epithelium also had less stenosis. Therefore, preventing epithelial loss would be a primordial strategy. That is confirmed by the less consistent relation between lymphocytic infiltration and vascular changes with obliteration. Embryonic [26] and placental [27] stem cells have also proved capable of protecting small airways, preventing stenosis. Induction of chimeras, *i.e.*, coating tracheas with cells from the receptor as well as from the donor, through tracheal instillation of epithelial cells from the host is another cellular therapy that might be successful [28].

Mortality of research animals after intravenous injection of MSC is not described in most articles. The lethal event in rodents is possibly due to pulmonary embolism. Such events after stem cell administration may be related to their large size when compared to blood cells [29]. Specific adhesion molecules may also play a relevant role in trapping MSC in the pulmonary microvasculature [30]. This happens even after peripheral arterial injection, suggesting that the pulmonary capillary bed may be particularly prone to occlusion by stem cells [31]. Concerning this, the amount of cells that can be safely infused intravenously is a relevant issue. A study by Ra *et al.* [32] showed that, in immunosuppressed mice, doses of $4-5 \times 10^6$ human ASC caused immediate death in only 3 of 40 animals, provided that a slow rate of infusion was used. That being the case, a possible explanation for our 38.5% mortality could be the manual injection, which might result in faster rates of infusion; use of microinfusion pumps would then be recommended. Consequences of pulmonary cell entrapment in humans have not been thoroughly evaluated.

Finally, limitations must be considered. The HTT model, despite being technically simple and with reproducible results, uses a non-vascularized fragment of large airway without communication with the environment. That does not discredit the

conclusions of this study, since the model is suitable for immunological intervention [33]. Mortality associated with intravenous injection of ASC is also an obvious limitation, and an obstacle to be overcome in future studies.

CONCLUSIONS

The immunosuppressive effect of ASC is greater when more than one dose is administered systemically, and multiple doses seem to have an additive effect, a finding not previously described in models of OB. Besides that, the intravenous route of administration is probably more effective than the local one, at least in the HTT model. This is particularly relevant in lung transplantation, since the local intratracheal delivery of ASC is feasible [34]. As the systemic infusion of MSC in humans is considerably safer than in animals, especially with autologous cells, their use as part of the immunosuppressive regimen in humans may soon be tested [35]. The incidence of neoplasms and opportunistic infections are the main concerns related to more intense immunosuppression, and clinical trials with long enough follow-up are necessary for clarification.

REFERENCES

- [1] Stehlik J, Hosenpud JD, Edwards LB, Hertz MI, Mehra MR, Transplantation ISfHaL. *ISHLT International Registry for Heart and Lung Transplantation--into the fourth decade, from strength to strength*. J Heart Lung Transplant 2013;32:941-50.
- [2] Jonigk D, Theophile K, Hussein K, Bock O, Lehmann U, Bockmeyer CL *et al*. *Obliterative airway remodelling in transplanted and non-transplanted lungs*. Virchows Arch 2010;457:369-80.
- [3] Conese M, Piro D, Carbone A, Castellani S, Di Gioia S. *Hematopoietic and mesenchymal stem cells for the treatment of chronic respiratory diseases: role of plasticity and heterogeneity*. ScientificWorldJournal 2014;2014:859817.
- [4] Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. *Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology*. Trends Biotechnol 2006;24:150-4.
- [5] Ong WK, Sugii S. *Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy*. Int J Biochem Cell Biol 2013;45:1083-6.
- [6] Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. *The potential of adipose stem cells in regenerative medicine*. Stem Cell Rev 2011;7:269-91.

- [7] Gonçalves FaC, Paz AH, Lora PS, Passos EP, Cirne-Lima EO. *Dynamic culture improves MSC adhesion on freeze-dried bone as a scaffold for bone engineering*. World J Stem Cells 2012;4:9-16.
- [8] Boehler A, Chamberlain D, Kesten S, Slutsky AS, Liu M, Keshavjee S. *Lymphocytic airway infiltration as a precursor to fibrous obliteration in a rat model of bronchiolitis obliterans*. Transplantation 1997;64:311-7.
- [9] Brazelton TR, Adams BA, Cheung AC, Morris RE. *Progression of obliterative airway disease occurs despite the removal of immune reactivity by retransplantation*. Transplant Proc 1997;29:2613.
- [10] Brody AR, Salazar KD, Lankford SM. *Mesenchymal stem cells modulate lung injury*. Proc Am Thorac Soc 2010;7:130-3.
- [11] Lin Y, Liu L, Li Z, Qiao J, Wu L, Tang W *et al*. *Pluripotency potential of human adipose-derived stem cells marked with exogenous green fluorescent protein*. Mol Cell Biochem 2006;291:1-10.
- [12] Russo V, Yu C, Belliveau P, Hamilton A, Flynn LE. *Comparison of human adipose-derived stem cells isolated from subcutaneous, omental, and intrathoracic adipose tissue depots for regenerative applications*. Stem Cells Transl Med 2014;3:206-17.

- [13] Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R *et al.* *Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue.* FASEB J 2009;23:3494-505.
- [14] Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ *et al.* *Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion.* Front Immunol 2012;3:297.
- [15] Liu XB, Chen H, Chen HQ, Zhu MF, Hu XY, Wang YP *et al.* *Angiopoietin-1 preconditioning enhances survival and functional recovery of mesenchymal stem cell transplantation.* J Zhejiang Univ Sci B 2012;13:616-23.
- [16] Yang X, Balakrishnan I, Torok-Storb B, Pillai MM. *Marrow Stromal Cell Infusion Rescues Hematopoiesis in Lethally Irradiated Mice despite Rapid Clearance after Infusion.* Adv Hematol 2012;2012:142530.
- [17] Lu W, Fu C, Song L, Yao Y, Zhang X, Chen Z *et al.* *Exposure to supernatants of macrophages that phagocytized dead mesenchymal stem cells improves hypoxic cardiomyocytes survival.* Int J Cardiol 2013;165:333-40.
- [18] Kirby JA, O'boyle G. *Lung transplantation: the Yin and Yang of mesenchymal stem cells.* Transplantation 2011;92:129-30.
- [19] Salama M, Andrukhova O, Jaksch P, Taghavi S, Kelpetko W, Dekan G *et al.* *Endothelin-1 governs proliferation and migration of bronchoalveolar lavage-derived*

lung mesenchymal stem cells in bronchiolitis obliterans syndrome. Transplantation 2011;92:155-62.

[20] Parekkadan B, Milwid JM. *Mesenchymal stem cells as therapeutics.* Annu Rev Biomed Eng 2010;12:87-117.

[21] Hoogduijn MJ, Roemeling-van Rhijn M, Engela AU, Korevaar SS, Mensah FK, Franquesa M *et al.* *Mesenchymal stem cells induce an inflammatory response after intravenous infusion.* Stem Cells Dev 2013;22:2825-35.

[22] Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL *et al.* *Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6.* Cell Stem Cell 2009;5:54-63.

[23] Choi DH, Suhaeri M, Hwang MP, Kim IH, Han DK, Park K. *Multi-lineage differentiation of human mesenchymal stromal cells on the biophysical microenvironment of cell-derived matrix.* Cell Tissue Res 2014.

[24] Wu J, Niu J, Li X, Li Y, Wang X, Lin J *et al.* *Hypoxia Induces Autophagy of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells via Activation of ERK1/2.* Cell Physiol Biochem 2014;33:1467-74.

- [25] Gonçalves FdC, Schneider N, Pinto FO, Meyer FS, Visioli F, Pfaffenseller B *et al.* *Intravenous versus intraperitoneal MSCs administration: what's the best route for treating experimental colitis?* World J Gastroenterol 2014; accepted for publishing.
- [26] McIntyre BA, Alev C, Mechael R, Salci KR, Lee JB, Fiebig-Comyn A *et al.* *Expansive generation of functional airway epithelium from human embryonic stem cells.* Stem Cells Transl Med 2014;3:7-17.
- [27] Zhao Y, Gillen JR, Harris DA, Kron IL, Murphy MP, Lau CL. *Treatment with placenta-derived mesenchymal stem cells mitigates development of bronchiolitis obliterans in a murine model.* J Thorac Cardiovasc Surg 2014;147:1668-77.e5.
- [28] Zhao Y, Steidle JF, Upchurch GR, Kron IL, Lau CL. *Prevention of the second stage of epithelial loss is a potential novel treatment for bronchiolitis obliterans.* J Thorac Cardiovasc Surg 2013;145:940-7.
- [29] Toma C, Wagner WR, Bowry S, Schwartz A, Villanueva F. *Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics.* Circ Res 2009;104:398-402.
- [30] Nystedt J, Anderson H, Tikkanen J, Pietilä M, Hirvonen T, Takalo R *et al.* *Cell surface structures influence lung clearance rate of systemically infused mesenchymal stromal cells.* Stem Cells 2013;31:317-26.

- [31] Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I *et al.* *Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy.* *Microvasc Res* 2009;77:370-6.
- [32] Ra JC, Shin IS, Kim SH, Kang SK, Kang BC, Lee HY *et al.* *Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans.* *Stem Cells Dev* 2011;20:1297-308.
- [33] Sato M, Keshavjee S, Liu M. *Translational research: animal models of obliterative bronchiolitis after lung transplantation.* *Am J Transplant* 2009;9:1981-7.
- [34] Leblond AL, Naud P, Forest V, Gourden C, Sagan C, Romefort B *et al.* *Developing cell therapy techniques for respiratory disease: intratracheal delivery of genetically engineered stem cells in a murine model of airway injury.* *Hum Gene Ther* 2009;20:1329-43.
- [35] Alagesan S, Griffin MD. *Autologous and allogeneic mesenchymal stem cells in organ transplantation: what do we know about their safety and efficacy?* *Curr Opin Organ Transplant* 2014;19:65-72.

ANEXO I

Critérios para avaliação das traqueias transplantadas heterotopicamente em roedores, segundo Boehler et al (Transplantation: Volume 64(2), 27 July 1997, pp 311-317).

Perda do epitélio da via aérea:

- (0) sem alteração
- (1+) perda de menos de 25% da circunferência
- (2+) perda de 25-50% da circunferência
- (3+) perda de 50-75% da circunferência
- (4+) perda de mais de 75% da circunferência

Alteração vascular e extravascular refletindo perfusão anormal/isquemia:

- (0) sem alteração
- (1+) congestão vascular e edema
- (2+) congestão vascular com trombose de vaso e/ hemorragia tecidual
- (3+) necrose isquêmica de espessura parcial com infiltrado leucocitário polimorfonuclear esparso
- (4+) necrose isquêmica de espessura total com infiltrado leucocitário polimorfonuclear marcado

Infiltração linfoplasmocitária

- (0) sem alteração
- (1+) infiltrado perivascular esparso envolvendo alguns vasos
- (2+) infiltrado perivascular envolvendo a maioria dos vasos com extensão para o tecido conjuntivo adjacente
- (3+) difusa, mas infiltração transmural apenas leve a moderada
- (4+) infiltração transmural difusa marcada, com importante componente sub-epitelial

APÊNDICE I

Exemplos de análise morfométrica e determinação do percentual de estenose traqueal com o software ImageJ versão 1.45s (NIH, EUA). Valores usados no cálculo correspondem ao número de pixels dentro da área delimitada pelas linhas amarelas. I é a área interna à cartilagem, e L é área da luz traqueal. Todas as imagens foram coradas com H&E e fotomicrografadas em 40x.

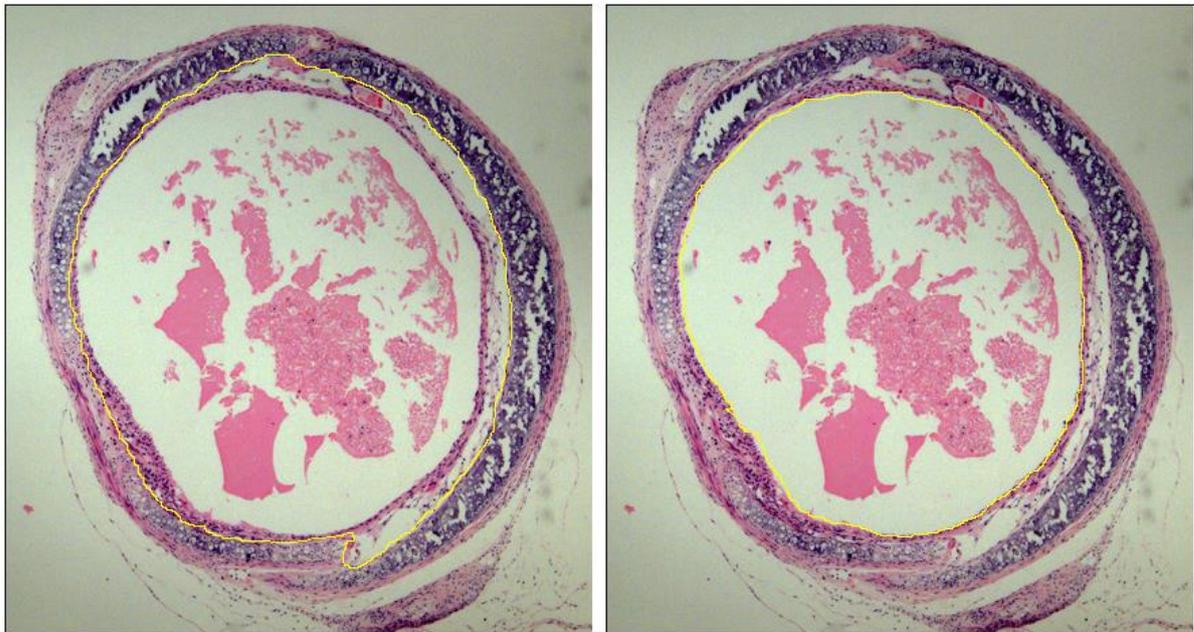


Figura 1: Traqueia do grupo Sist0+7 (duas doses sistêmicas) com luz amplamente preservada.

$$[(I - L) / I] \times 100 = [(4037 - 3441) / 4037] \times 100 = 14,7\%$$

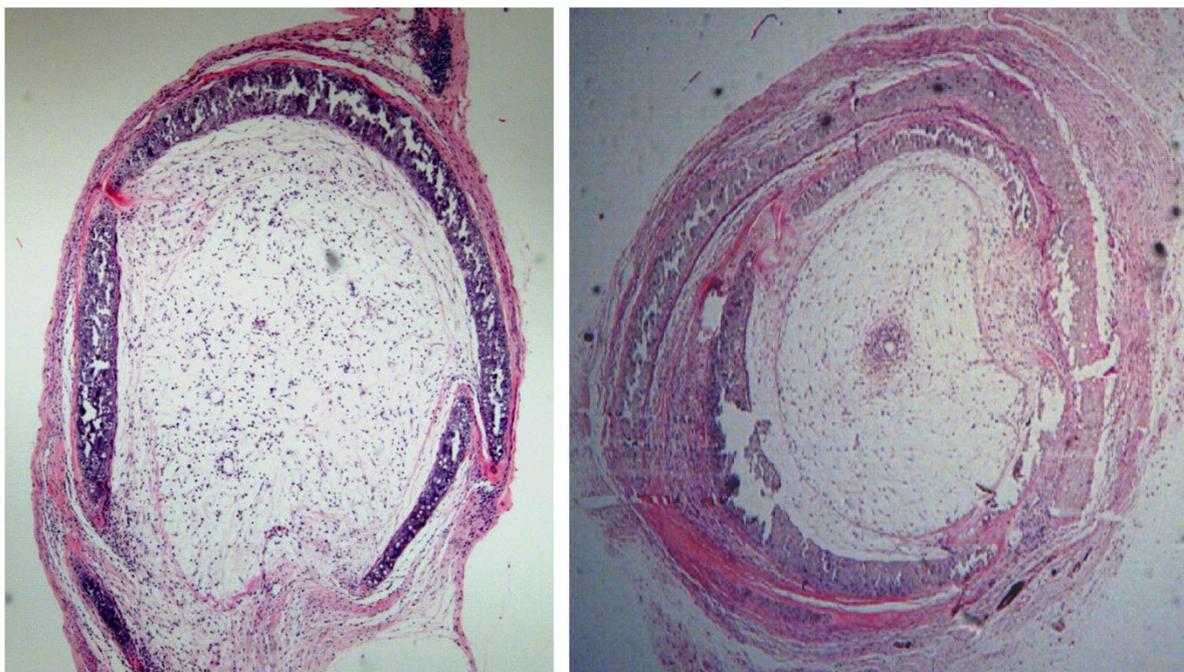


Figura 2: Traqueia do grupo SistC (controle sistêmico), à esquerda; e do grupo LocalC (controle local), à direita. A estenose completa destas traqueias é evidente, e o cálculo das áreas não foi necessário, atribuindo-se obliteração de 100%.

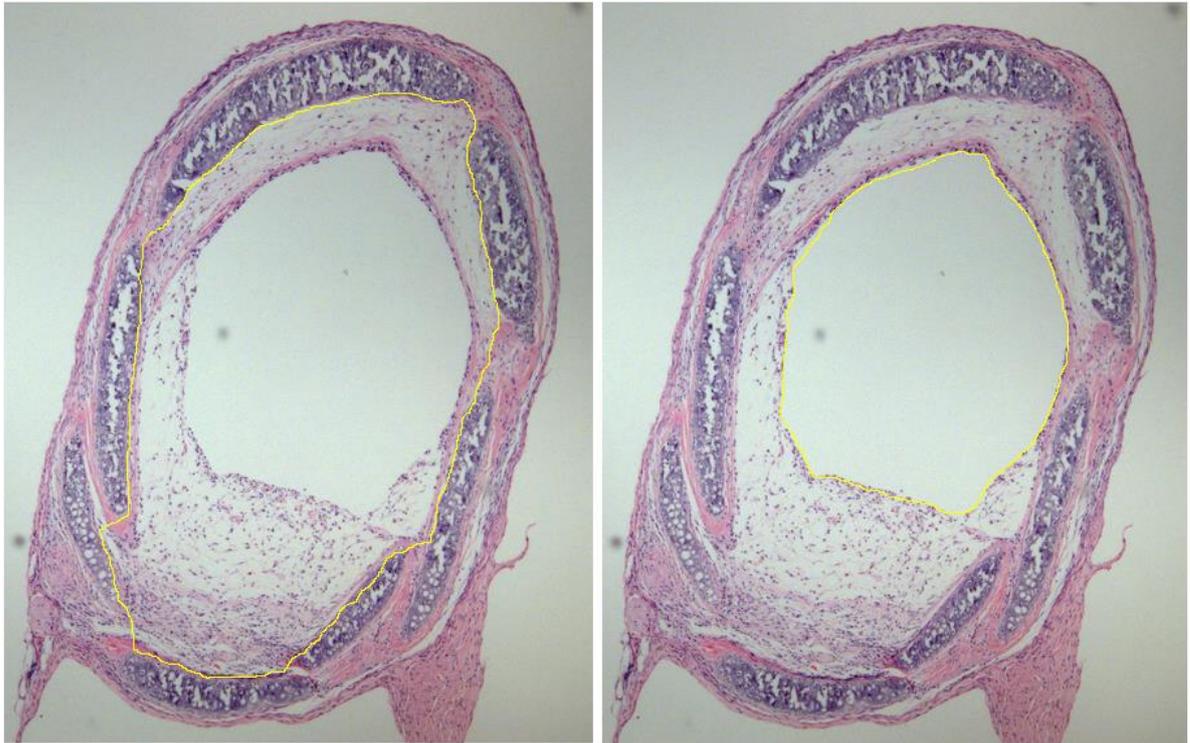


Figura 3: Traqueia do grupo Syst0 (uma dose sistêmica) com luz parcialmente comprometida.

$$[(I - L) / I] \times 100 = [(4406 - 2051) / 4406] \times 100 = 53,4\%$$

APÊNDICE II

AVALIAÇÃO DE MORTALIDADE APÓS INJEÇÃO SISTÊMICA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

Trabalhos previamente realizados na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre reportaram informalmente mortalidades elevadas após a injeção sistêmica de ASC. Para adequada quantificação do evento, reunimos dados de mortalidade do estudo principal, de estudo paralelo que avaliou a distribuição de ASC em camundongos, e de estudo citado na discussão do Artigo, realizado por Gonçalves *et al*, com camundongos nos quais se desenvolveu modelo de retocolite ulcerativa (RCU).

MÉTODOS

Todos os animais aqui somados eram camundongos C57BL/6 que receberam 1×10^6 células tronco mesenquimais derivadas de adipócitos, cultivadas segundo o método descrito no Artigo. Muitos animais com RCU induzida receberam a injeção pela veia jugular, permitindo a avaliação do efeito do sítio de injeção; além disso, estes animais estavam debilitados, de modo que se pode avaliar a mortalidade frente à gravidade da doença (segundo índice de atividade de doença, soma dos critérios da tabela 1) neste subgrupo. Animais que morreram após receber células tronco marcadas com a proteína ubíqua e inerte *green fluorescent protein* (GFP) tiveram seus órgãos coletados e corados com anticorpos anti-GFP. Análise estatística foi feita com PASW versão 18, utilizando-se teste qui-quadrado para variáveis dicotômicas (com correção de Yates para cruzamentos 2x2), teste T de

Student para variáveis contínuas paramétricas e U de Mann-Whitney para não-paramétricas, sempre com $\alpha = 0,05$.

Tabela 1. Índice de gravidade de doença.

Escore	Perda de peso	Consistência das fezes	Sangramento
0	Nenhuma	Normal	Nenhum
1	1-5%	-	-
2	5-10%	Amolecida	Pequeno
3	10-15%	-	-
4	>15%	Diarreia aquosa	Grande

RESULTADOS

Foram feitas 82 administrações de ASC por via intravenosa. A mortalidade global foi de 32,9% (27 animais). No grupo de animais com implante traqueal subcutâneo a mortalidade foi de 35,3% (12/34), não diferente ($p = 0,88$) daqueles com RCU, que foi de 31,3% (15/48). A administração pela veia da cauda ou pela veia jugular foi analisada. A mortalidade pela jugular foi de 45,8% (11/24) e pela veia da cauda 27,6% (16/58). Não houve diferença ($p = 0,18$) entre as mortalidades por uma ou outra via. A média ($\pm DP$) de peso dos animais que sobreviveram e morreram foi, respectivamente, 25,6 ($\pm 3,6$) g e 26,6 ($\pm 3,5$) g, não havendo diferença significativa ($p = 0,23$). Finalmente, não houve diferença ($p = 0,12$) de mortalidade relacionada à gravidade da RCU, sendo o escore mediano 2 tanto entre os animais que morreram quanto entre os sobreviventes. Vale ressaltar que todos os óbitos ocorreram imediatamente após as injeções ou mesmo antes de terminá-las. Os animais sobreviventes permaneceram pouco ativos, sem se alimentar, e com

frequência respiratória aumentada. Após um período de 4 a 6 horas, todos retomaram o comportamento habitual. Nenhum animal morreu tardiamente.

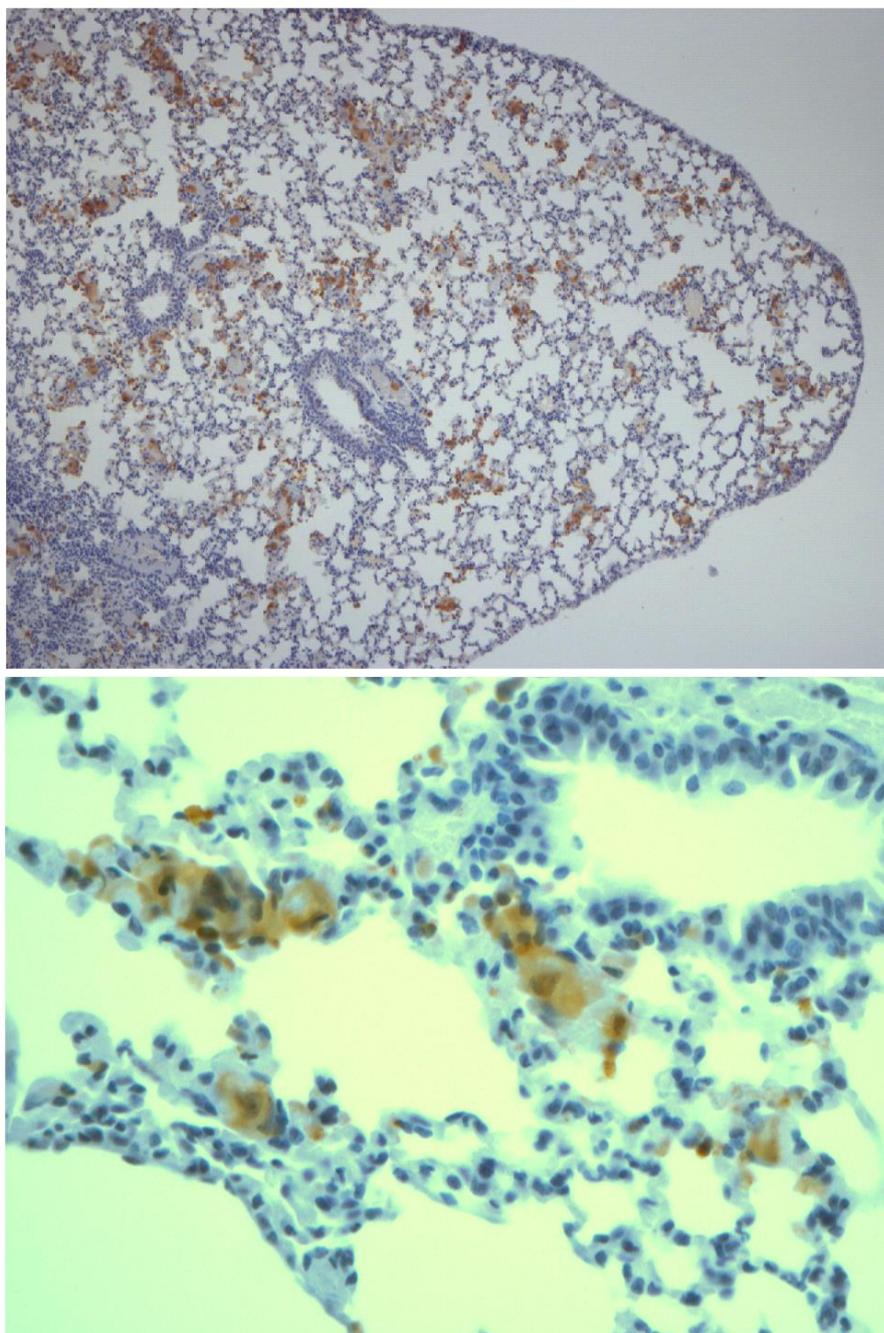


Figura 1: Imuno-histoquímica com anticorpos anti-GFP. Acima, ampla distribuição da ASC pela vasculatura pulmonar. Abaixo, ASC ocluindo vasos de pequeno calibre.

Dois animais que morreram pertenciam ao estudo paralelo citado anteriormente, que visava avaliar a distribuição das ASC após injeção intravenosa. Como haviam recebido células GFP, pudemos pesquisar com facilidade a causa da morte nesses animais. Conforme se vê na figura 1, as ASC foram amplamente retidas na circulação pulmonar, e não foram encontradas em outros órgãos.

DISCUSSÃO

Mortalidades raramente são descritas nos estudos que utilizam CTM por via sistêmica, mas se sabe que ela pode ser tão alta quanto 40% em camundongos que receberam 1×10^6 células e 25% quando a dose foi 2×10^5 células [1], muito próximo do nosso achado. Outros estudos apresentaram taxas muito menores. Ra testou três doses diferentes de ASC humanas em camundongos: 5×10^6 , $3,5 \times 10^7$ e $2,5 \times 10^8$ células/Kg, sempre diluídas em solução salina 10 mL/Kg. Dentre os 120 animais, apenas três, que pertenciam ao grupo de maior dose, tiveram morte imediata [2]. Comparativamente, nós utilizamos uma dose intermediária, tanto no número de células quanto na diluição, e com velocidade de infusão semelhante, porém com mortalidade consideravelmente maior.

A embolia pulmonar parece ser a causa do óbito imediato pós injeção intravenosa de CTM. A primeira evidência é a dificuldade ventilatória evidente dos animais que sobrevivem. A segunda é o acúmulo de ASC no leito vascular pulmonar, onde células isoladas ou em grupos foram encontradas obstruindo vasos de pequeno e médio calibre. Além de serem maiores que a maioria das células sanguíneas [3], as ASC também expressam moléculas de adesão como CD49 e fibronectina, em quantidades variáveis de acordo com a origem da CTM, que tem afinidade pela vasculatura pulmonar [4]. Ao que parece, o fenômeno é capaz de

reduzir agudamente o fluxo na circulação pulmonar e, por consequência, o débito cardíaco esquerdo, causando a morte do animal.

CONCLUSÃO

A administração intravenosa de ASC, mesmo em doses consideradas intermediárias, relaciona-se com mortalidade potencialmente alta em camundongos. Estratégias de infusão lenta que permitam a adaptação da circulação pulmonar ou inibidores da adesão celular devem ser testados a fim de se reduzir esta complicação.

REFERÊNCIAS

- [1] Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I *et al.* *Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy.* *Microvasc Res* 2009;77:370-6.

- [2] Ra JC, Shin IS, Kim SH, Kang SK, Kang BC, Lee HY *et al.* *Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans.* *Stem Cells Dev* 2011;20:1297-308.

- [3] Toma C, Wagner WR, Bowry S, Schwartz A, Villanueva F. *Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics.* *Circ Res* 2009;104:398-402.

[4] Nystedt J, Anderson H, Tikkanen J, Pietilä M, Hirvonen T, Takalo R *et al.* *Cell surface structures influence lung clearance rate of systemically infused mesenchymal stromal cells.* Stem Cells 2013;31:317-26.