

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

Análise do efeito anti-inflamatório do transplante de células-tronco mesenquimais por
duas vias de infusão para modelo murino de colite ulcerativa aguda

FABIANY DA COSTA GONÇALVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

Análise do efeito anti-inflamatório do transplante de células-tronco mesenquimais por
duas vias de infusão para modelo murino de colite ulcerativa aguda

FABIANY DA COSTA GONÇALVES

Orientadora: Profa. Dra Ana Helena da Rosa Paz
Dissertação apresentada ao programa de Pós-
Graduação: Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, para obtenção do título de
Mestre.

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

da Costa Gonçalves, Fabiany
Análise do efeito anti-inflamatório do transplante
de células-tronco mesenquimais por duas vias de
infusão para modelo murino de colite ulcerativa
aguda / Fabiany da Costa Gonçalves. -- 2013.
79 f.

Orientadora: Ana Helena da Rosa Paz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. colite ulcerativa. 2. células-tronco
mesenquimais. 3. doença inflamatória intestinal. 4.
terapia celular. 5. vias de administração. I. da Rosa
Paz, Ana Helena, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Universidade Federal do Rio Grande do Sul com auxílio financeiro da CAPES e FIPE-HCPA.

Aos meus pais, Rosângela e Mauro, dedico essa dissertação, pois sem o apoio e o amor de vocês o caminho seria muito mais difícil.

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos:

À Dra Ana Paz, por acreditar em meu trabalho e sempre me estimular a dar o melhor de mim. Por acompanhar toda minha trajetória no laboratório, não só durante o mestrado, mas desde a época da graduação, me orientando com paciência e se mantendo sempre presente no desenvolver dos meus projetos. Por ser essa profissional competente, e mais do que isso uma amiga, e praticamente uma mãe, durante todo esse meu período de pesquisa. Não teria conseguido metade das coisas que conquistei hoje sem teu apoio e tua dedicação. Obrigada por tudo!

À Dra Elizabeth Cirne-Lima, por ter me acolhido no laboratório, me iniciado na área de pesquisa com células-tronco com todo seu conhecimento e competência, e por toda amizade durante todos esses anos.

À Dra Luíse Meurer, por todas as suas orientações, seu apoio, sua amizade e sua calma nos momentos em que eu estava perdida com os dados.

Ao Dr. Eduardo Passos, por ter aberto as portas do laboratório para mim e por apoiar nossos projetos.

Ao Dr Mario Delgado pela oportunidade da experiência de conviver e aprender com seu grupo de pesquisa no Instituto de Biomedicina y Parasitologia em Granada.

As minhas colegas de laboratório, em especial, Natália Schneider, Helena Mello e Fernanda Otesbelgue, pelo apoio não só na pesquisa, mas também psicológico. Não conseguiria ter desenvolvido todo o trabalho sem a ajuda de vocês. Tenho muito a agradecê-las pelo resultado desse mestrado. As meu/minhas colega (s) Alessandra Magrisso, Cláudia Laurino, Cristiana Khul, Letícia Gross, Mel Baggio, Paula Terraciano, Rosana e Dr. William Lorenzi pelo companheirismo durante todo esse período.

As minhas veterinárias preferidas, Fabíola Meyer e Tuane Garcez, e a enfermeira Marta Cioato pela paciência nos experimentos e pela dedicação com meu projeto.

Aos amigos do Centro de Pesquisa, Everaldo de Almeida, Roger Pascoal e Flavinha Giusti, que sempre dispostos a me ajudar não sabem o quanto contribuíram com seu trabalho e sua amizade na minha formação.

A Dra Fernanda Visioli por ter analisado com todo cuidado as amostras histológicas e por ter vibrado com nosso grupo quando encontramos diferença estatística.

A Bianca Pfaffenseller, por ter passado horas analisando amostras comigo e me ensinado passo a passo os protocolos.

Ao meu amigo Mateus Grings e ao Dr. Guilhian Leipnitz do Departamento de Bioquímica, muito obrigada pela realização de parceria com nosso grupo e por contribuírem com meu mestrado.

Ao Prof. Marcelo Lamers por sempre abrir seu laboratório ao nosso grupo e disponibilizar o uso do microscópio para os experimentos.

Finalmente, a minha família e amigos, principalmente aos meus pais, que me apoiaram durante todo esse período e acompanharam os bons e maus momentos sempre me estimulando. A minha irmã, que mesmo de longe, contribui com sua habilidade artística no material do projeto. E a todos meus amigos, que junto comigo, acompanharam meus trabalhos de finais de semana e feriados e agora comemorarão comigo.

“Não devemos nos orgulhar de ser melhores do que os outros, e sim melhores do que já fomos.” James C. Hunter

RESUMO

A terapia celular utilizando células tronco-mesenquimais (MSCs) surge como alternativa para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais (DII). Atualmente, os métodos terapêuticos consistem principalmente na utilização de fármacos que visam produzir e manter estados de remissão da colite ulcerativa e, muitas vezes, apresentam efeitos colaterais. Considerando a capacidade de modular células do sistema imune e de regenerar tecidos doentes, as MSCs podem ser consideradas uma alternativa para o tratamento de DII, como a colite ulcerativa. Além disso, muito tem se investigado a respeito do *homing* de MSCs exógenas infundidas por diversas vias em resposta a um insulto inflamatório e tem-se visto a capacidade de migração para tecidos afetados. A primeira etapa do trabalho consistiu na caracterização e desenvolvimento do modelo animal de colite ulcerativa aguda. Para isso, foram testados diferentes pesos moleculares e concentrações do reagente Dextran Sulfato de Sódio (DSS), a fim de verificar qual o melhor método de indução da doença. Após determinar o adequado modelo animal, que utilizou 2% DSS (36 000 – 50 000 Da), foi iniciado o experimento de terapia celular. Na tentativa de compreender como as MSCs podem influenciar a inflamação intestinal, o estudo avaliou o efeito do transplante de MSCs derivadas do tecido adiposo em duas diferentes vias de infusão, intraperitoneal e intravenosa, em modelo murino experimental de colite aguda. Foram avaliados os seguintes parâmetros: atividade clínica da doença, aspecto macroscópico e histopatológico do cólon, dosagem de citocinas inflamatórias, taxas de apoptose e parâmetros de estresse oxidativo. Os resultados obtidos no trabalho mostraram que o transplante celular intravenoso melhorou a severidade clínica de colite, como perda de peso, diarreia e presença de sangue nas fezes. Na avaliação histológica, observou-se a diminuição da inflamação colônica através da redução de perda de criptas e de infiltração de células inflamatórias. Ainda, os fatores secretados pelas MSCs parecem poder reduzir os níveis de IL-6 e aumentar os níveis de IL-10 e IL-4 do soro. Um aumento de células apoptóticas foi observado nos animais tratados com MSCs por via intravenosa, sugerindo que as MSCs induzem morte celular em células T resistentes à apoptose. Além disso, a terapia intravenosa foi capaz de aumentar os níveis de

glutathione reduzida, um importante antioxidante natural, revertendo o dano causado pelo estresse oxidativo no cólon. Em conjunto, nossos resultados demonstram que a melhor via para a terapia celular na colite ulcerativa foi a intravenosa e que o tratamento proposto foi eficaz no que se refere à redução da inflamação do cólon.

Palavras-chave: colite ulcerativa, células-tronco mesenquimais, doença inflamatória intestinal, terapia celular, vias de administração.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cell (MSC) therapy is an alternative for the treatment of inflammatory bowel disease (IBD). Currently, therapeutic methods consist primarily on the use of drugs which aim to produce and maintain state of ulcerative colitis remission and often present side effects. Considering the ability to modulate the immune system cells and regenerate injured tissues, MSCs can be considered an alternative for treating IBD, such as ulcerative colitis. Moreover, there is many research investigating the homing of exogenous MSCs infused through different routes in response to an inflammatory insult, and has demonstrated the migration capacity of these cells into the affected tissues. The first stage of this study consisted in the characterization and development of acute animal model of ulcerative. For this, different molecular weights and concentrations of Dextran Sulfate Sodium (DSS) reagent were tested in order to verify the best method for disease induction. After determining the appropriate animal model, that uses 2% DSS (36000-50000 Da), the cell therapy experiment was initiated. In an attempt to understand how MSCs can influence intestinal inflammation, the study evaluated the effect of MSCs transplantation using two different infusion routes, intraperitoneal and intravenous, in an acute colitis murine model. The following parameters were evaluated: clinical disease activity, colon macroscopic and histological analysis, serum inflammatory cytokine, determination apoptosis rates and oxidative stress parameters. Results show that MSC intravenous transplantation has improved the clinical severity of colitis, such as weight loss, diarrhea, and blood stool. Histological evaluation demonstrated a decreased colonic inflammation by reducing colonic crypt loss and infiltration of inflammatory cells. Also, MSCs secreted factors which seem to reduce levels of IL-6 and increase levels of IL-10 and IL-4 in the serum. In addition, an increase of apoptotic cells was observed in animals treated with intravenous MSCs, suggesting that MSCs induce cell death in T cells resistant to apoptosis. Furthermore, intravenous therapy was able to increase the levels of reduced glutathione, an important natural antioxidant, reversing the damage caused by oxidative stress in the colon. Taken together, our results demonstrate that the best route for cell therapy in ulcerative

colitis was intravenous and the proposed treatment was effective with regards to reducing colon inflammation.

Key words: ulcerative colitis, mesenchymal stem cell, inflammatory bowel disease, cellular therapy, routes of administration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das regiões afetadas na Doença de Crohn e na colite ulcerativa.

Figura 2: Mapa da incidência global das doenças inflamatórias intestinais.

Figura 3: Efeitos modulatórios das MSCs nas células do sistema imune.

Figura 4: Delineamento experimental de caracterização do modelo murino de colite ulcerativa.

Figura 5: Delineamento experimental do tratamento com MSCs.

Figura 6: Caracterização das MSCs quanto à morfologia e diferenciação celular.

Figura 7: Imunofenotipagem das MSCs.

Figura 8: Análise clínica dos animais tratados com diferentes concentrações e pesos moleculares de DSS.

Figura 9: Análise macroscópica do cólon de animais administrados com DSS de diferentes pesos moleculares e concentrações.

Figura 10: Características histológicas de colite induzida por DSS de diferentes pesos moleculares e concentrações.

Figura 11: Transplante de MSCs via intraperitoneal e intravenosa nos dias 2 e 5 do protocolo de indução de colite aguda induzida por DSS.

Figura 12: Análise clínica de animais dos diferentes grupos experimentais. O transplante intravenoso de MSCs protege contra a colite aguda induzida por DSS.

Figura 13: Avaliação macroscópica do cólon de animais dos diferentes grupos experimentais.

Figura 14: Fotomicrografia de cortes histológicos do cólon de animais dos diferentes grupos experimentais.

Figura 15: Escore histológico da colite dos animais tratados com MSCs.

Figura 16: Efeito do transplante de MSC nos níveis séricos de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Figura 17: Apoptose de células T nos animais com colite induzida por DSS.

Figura 18: Efeito da colite induzida por DSS nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) no cólon inflamado.

Figura 19: Efeito da colite induzida por DSS na atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT).

Figura 20: Efeito de MSCs nos níveis de glutathiona reduzida (GSH).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índice de atividade da doença

Tabela 2: Graduação histológica

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DII – Doença Inflamatória Intestinal

DC – Doença de Crohn

Th – células T auxiliares/ T helpers

DSS – Dextran sulfato de sódio

MSC – células-tronco mesequimais/*mesenchymal stem cell*

DMEM – *Dulbeccos Modified Eagle Medium*

SFB – soro fetal bovino

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

PBS – solução salina fosfatada

H&E – coloração hematoxilina e eosina

IL-10 – interleucina 10

IL-4 – interleucina 4

IL-6 – interleucina 6

TNF – fator de necrose tumoral/*tumor necrosis factor*

IL-2 – interleucina 2

IFN – interferon

IL-17 – interleucina 17

ROS – espécies reativas de oxigênio/ *reactive oxygen species*

TBA-RS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

GSH – glutationa reduzida

SOD - superóxido dismutase

CAT - catalase

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

MDA – malondialdeído

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Doença inflamatória intestinal (DII)	3
2.2 Epidemiologia.....	4
2.3 Sinais e sintomas clínicos e o curso da doença.....	6
2.31 Doença de Crohn.....	6
2.32 Colite Ulcerativa.....	6
2.4 Princípios gerais do tratamento.....	7
2.5 Papel das células T e dos mediadores inflamatórios da colite ulcerativa.....	7
2.6 Estresse oxidativo.....	8
2.7 Modelo experimental de colite ulcerativa.....	9
2.8 Células-tronco mesenquimais (MSCs).....	10
2.9 Propriedades imunológicas das células-tronco mesenquimais.....	11
2.10 Células-tronco mesenquimais na colite.....	14
2.11 Vias de administração para a terapia celular.....	15
3. JUSTIFICATIVA.....	18
4. HIPÓTESE.....	18
5. OBJETIVOS.....	19
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
6.1 Locais de realização.....	20
6.2 Animais do estudo.....	20
6.3 Isolamento e caracterização das MSCs.....	20
6.4 Caracterização do modelo murino de colite aguda induzida por DSS.....	22
6.5 Transplantes de MSCs.....	23
6.6 Avaliações clínicas.....	24
6.7 Avaliações macroscópicas do cólon.....	25
6.8 Avaliações histológicas do cólon.....	25
6.9 Determinação de citocinas no soro.....	26

6.10	Avaliação da apoptose no cólon.....	27
6.11	Avaliação do estresse oxidativo.....	27
6.12	Análise estatística.....	29
7.	RESULTADOS.....	30
8.	DISCUSSÃO.....	44
9.	CONCLUSÃO.....	50
10.	REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

Doenças inflamatórias intestinais (DII), como a colite ulcerativa, são inflamações crônicas, recorrentes, idiopáticas do trato gastrointestinal de etiologia desconhecida e que apresentam dois fenótipos distintos: a Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerativa (Hisamatsu et al, 2013). Embora a etiologia das DII ainda não tenha sido esclarecida, vários estudos indicam para a ocorrência de uma disfunção do sistema imunológico da mucosa intestinal aos antígenos entéricos, desencadeando um processo inflamatório crônico em indivíduos geneticamente susceptíveis (Hisamatsu et al, 2013). A DC é frequentemente descrita como o protótipo de uma doença mediada por linfócitos T *helper* 1 (Th1) cujos mediadores inflamatórios são as citocinas IL-12, INF- δ , e TNF- α , enquanto a UC é usualmente interpretada como uma resposta relacionada à ação do linfócito T *helper* 2 (Th2) devido à expressão intestinal aumentada de citocinas ligadas a esta célula como a IL-5, a IL-13 e provavelmente a IL-4 (Muzes et al., 2013). Um desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias estaria associada ao início e à progressão de ambos os fenótipos (Muzes et al., 2012). Atualmente, não existem opções terapêuticas que possam reverter definitivamente a inflamação, a dor abdominal, e a hipersensibilidade visceral (Zhou et al., 2012). As terapias atuais visam suprimir a inflamação e aliviar os sintomas e muitas vezes causam efeitos colaterais, sendo eficazes para a indução e manutenção da remissão mas não sobre a recidiva ou reativação da doença (Tanaka et al., 2008; Wei et al., 2009). Tendo em vista a necessidade de novos métodos de tratamento, torna-se necessário o estudo de outras estratégias terapêuticas, como a terapia celular.

As células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cells* - MSCs) estão presentes na medula óssea e em diversos outros tecidos, incluindo músculos, tecido adiposo e sangue do cordão umbilical, e apresentam grande plasticidade (Nardi e Meirelles, 2006; Meirelles et al., 2006). Essas células-tronco-adultas, quando em condições apropriadas, possuem a capacidade de diferenciação em diversos tecidos como cartilagem, músculos, ossos, tendões/ligamentos (Caplan, 2005; Bielby et al., 2007). As MSCs possuem um grande potencial terapêutico na medicina regenerativa devido à sua capacidade de diferenciação *in vitro*, *homing* para tecidos inflamados

após infusão *in vivo* e secreção de várias moléculas bioativas, que lhes conferem propriedades imunomodulatórias (Hao et al., 2012).

Considerando a capacidade de modular células do sistema imune e de regenerar tecidos doentes, as MSCs podem ser consideradas uma alternativa para o tratamento de DII, o que inclui o tratamento da colite ulcerativa. Além disso, muito se têm investigado a respeito do *homing* das MSCs exógenas infundidas por diversas vias em resposta a um insulto isquêmico/inflamatório e tem-se evidenciado a capacidade de migração para tecidos afetados (Meirelles et al., 2006).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença inflamatória intestinal (DII)

As doenças inflamatórias intestinais (DIIs), principalmente a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa, são inflamações crônicas, recorrentes, idiopáticas do trato gastrointestinal de etiologia desconhecida. Sugere-se que seja decorrente de uma disfunção no sistema imunológico da mucosa intestinal, havendo uma predominância de resposta inflamatória, em um indivíduo geneticamente susceptível quando em contato com a flora intestinal normal (Hisamatsu et al., 2013). Essas doenças são caracterizadas pela disfunção de linfócitos T da mucosa, alteração na produção e secreção de citocinas e inflamações celulares que afetam o trato digestivo, especialmente o intestino delgado distal e a mucosa do cólon (Buoma e Strober, 2003). Enquanto a DC pode afetar qualquer parte do segmento gastrointestinal e é caracterizada por um processo inflamatório com recrutamento de macrófagos e formação de granulomas, a colite ulcerativa afeta a região do cólon e do reto, sendo caracterizada por infiltrado neutrocitário com formação de abscessos cripticos e ulceração epitelial (Figura 1). Nessa última condição, o processo inflamatório é confinado à mucosa ou superficialmente à submucosa. Na DC o envolvimento transmural é comum, com deposição de colágeno e formação de estenoses e fístulas (Singh et al., 2011). Embora a exata causa da DII permaneça indeterminada, as condições parecem estar relacionadas a combinações de fatores ambientais e genéticos, onde se descrevem uma grande variedade de genes de baixa penetrância interagindo com fatores ambientais e desencadeando um processo inflamatório multissistêmico (Actis e Rosina, 2013).

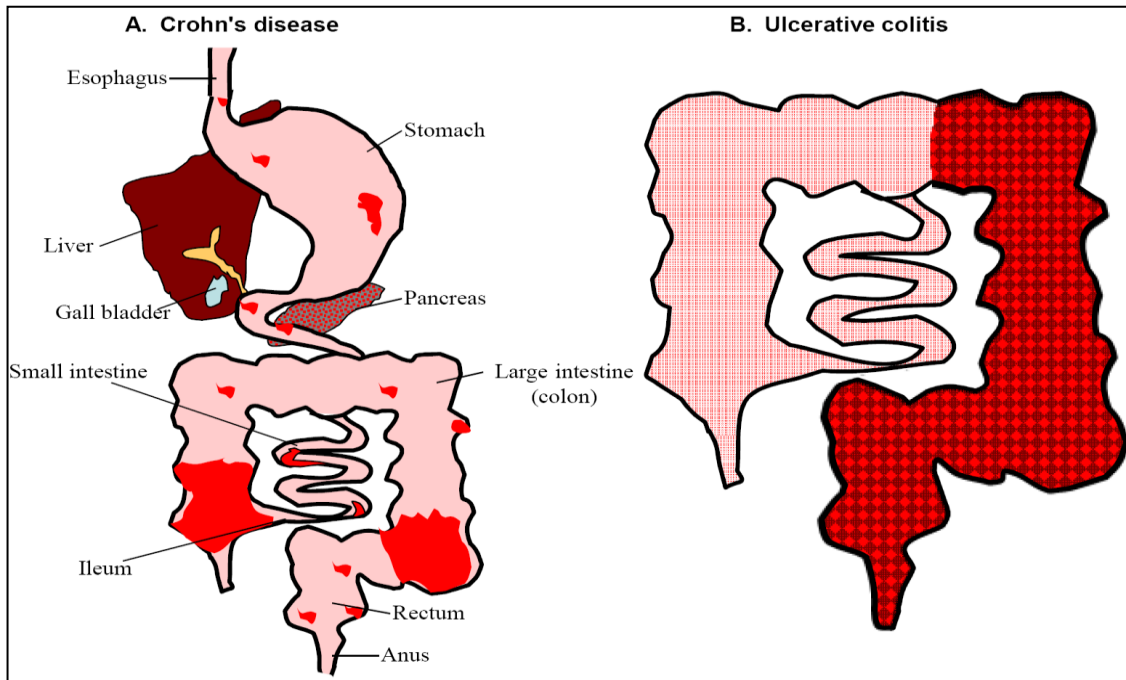


Figura 1: Representação esquemática das regiões afetadas (em vermelho) na Doença de Crohn e na colite ulcerativa. (A) Doença de Crohn. A inflamação afeta o trato digestivo, da boca ao ânus. (B) Colite Ulcerativa. A inflamação é limitada à área do cólon. Fonte: Singh et al., 2011.

2.2 Epidemiologia

A prevalência das DIIs tem aumentado nos últimos 50 anos. As altas incidências de colite ulcerativa e DC são relatadas no norte da Europa, no Reino Unido e na América do Norte (Figura 2) (Cosnes et al., 2011). Atualmente, a incidência anual de DC é a mais alta da América do Norte (20.2 para cada 100.000 pessoas por ano); enquanto que a incidência anual da colite ulcerativa é mais alta na Europa (24.3 para cada 100.000 pessoas por ano). A prevalência da colite ulcerativa e da DC são mais elevadas na Europa (505 e 322 para cada 100.000 pessoas por ano, respectivamente) (Ponder e Long, 2013). Nessas regiões, tais incidências podem indicar fatores etiológicos comuns: uma maior industrialização nessas áreas pode estar ligada à alteração na microbiota gastrointestinal que afeta o sistema imunitário e aumenta o risco de DII (Singh et al., 2010).

As DIIs são mais comuns em pessoas jovens. O pico de idade para a ocorrência da colite ulcerativa é de 30-40 anos, enquanto que na DC a idade de ocorrência gira em torno de 20-30 anos. A colite ulcerativa ocorre mais frequentemente em homens,

ao passo que a DC é 20 a 30% mais frequente em mulheres nas áreas de alta incidência (Cosnes et al., 2011).

Na América Central e do Sul, dados epidemiológicos sobre as DII ainda são escassos, o que demonstra baixa frequência ou registro insuficiente dessas doenças (Cosnes et al., 2011). Um relatório de 2009 do Estado de São Paulo composto por 115 pacientes residentes na região, atendidos no hospital de referência durante um intervalo de 20 anos (1986-2005), mostrou um aumento progressivo da incidência da colite ulcerativa nos primeiros 15 anos e diminuição nos últimos 5 anos (período de 2001 a 2005). Além disso, a incidência da colite ulcerativa foi maior que a DC. Entretanto, a incidência das DIIs relatadas na área desse estudo foi semelhante à encontrada em outros países da América latina, ou seja, menor do que as incidências encontradas nos países do Sul da Europa (Victoria et al., 2009). Na macrorregião leste de Minas Gerais, durante o período de 1998 a 2005, houve 363 internações hospitalares, em razão das DII distribuídas em 184 e 179 casos nos gêneros masculino e feminino, respectivamente. Setenta por cento dos casos ocorreram em indivíduos entre vinte e 69 anos (Oliveira et al., 2010).

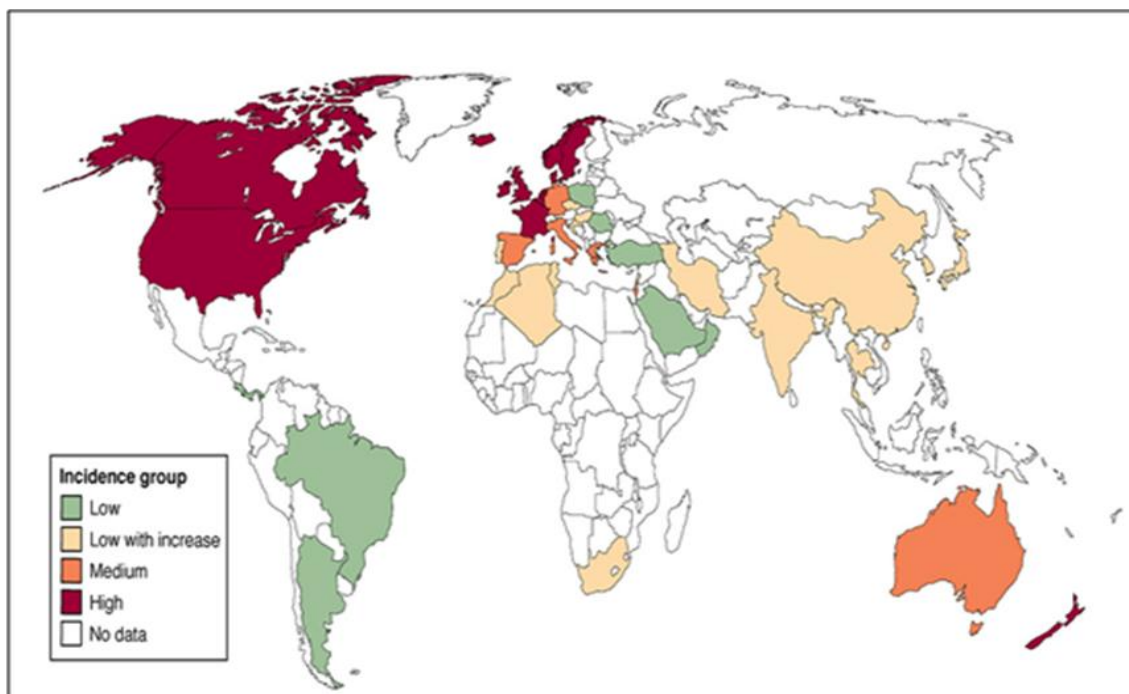


Figura 2: Mapa da incidência global das doenças inflamatórias intestinais. O *vermelho* refere-se à incidência anual superior a 10/105, *laranja* à incidência de 5-10/105, *verde* à incidência inferior a 4/105, *amarelo* à baixa incidência que é continuamente crescente. A ausência de cor indica ausência de dados. Fonte: Cosnes et al., 2011.

2.3 Sinais e sintomas clínicos e o curso da doença

2.31 Doença de Crohn

A DC torna-se sintomática quando as lesões são extensas ou na região distal do intestino, associada a uma reação inflamatória sistêmica, ou quando elas são acometidas por estenose ou abscessos e fístulas. O curso da doença é geralmente distinguido por uma sequência de episódios de agravamento da doença e remissões de diferentes durações, enquanto que uma minoria dos pacientes apresenta um curso contínuo. Quando a doença atinge a região do cólon há frequentemente manifestações extra-intestinais, enquanto que a doença na região ileal pode permanecer latente por vários anos. Entre as manifestações extra-intestinais podemos citar artrite, eritema nodoso, irite e uveíte, aftas, e pioderma gangrenoso. A progressão dos danos anatômicos leva ao desenvolvimento de complicações que são inacessíveis à terapia médica e requerem cirurgia (Cosnes et al., 2011).

2.32 Colite Ulcerativa

O quadro clínico característica da colite ulcerativa é o aparecimento de diarreia sanguinolenta. O curso da doença é caracterizado por crises que se alternam com períodos de remissão; sendo que uma minoria dos pacientes tem atividade contínua. A severidade das crises e a resposta ao tratamento variam, desde sintomas leves, sem manifestações sistêmicas, até risco de morte fulminante por colite naqueles pacientes que não respondem ao tratamento e, portanto, são candidatos à intervenção cirúrgica (Cosnes et al., 2011). Sintomas mais leves incluem um progressivo amolecimento das fezes, cólicas abdominais e diarreia. Com a progressão da doença, o paciente acaba por apresentar perda de peso, fadiga, perda do apetite relacionada à deficiência de nutrientes, muco nas fezes, sangramento retal que pode ser severo, febre e anemia (Head e Jurenka, 2003).

2.4 Princípios gerais do tratamento

Crescente progresso no entendimento da DII tem promovido o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas dirigidas principalmente aos aspectos relacionados à fisiopatologia da doença (Löwenberg e D'Haens, 2013). Estes incluem imunossupressivos dirigidos ao bloqueio de citocinas pró-inflamatórias, anticorpos monoclonais, corticosteróides, terapia antimicrobiana (Singh et al., 2011; Löwenberg e D'Haens, 2013). O objetivo do tratamento é indução da remissão da doença em um esquema terapêutico livre de esteróides, boa qualidade de vida do paciente e, em se tratando da colite ulcerativa, redução do risco de colectomia e desenvolvimento de neoplasia (Hoetjen et al., 2011).

Atualmente, não existem opções terapêuticas que possam reverter definitivamente a inflamação gastrointestinal, a dor abdominal e a hipersensibilidade visceral (Zhou et al., 2012). As terapias atuais visam suprimir a inflamação e aliviar os sintomas, sendo eficazes para a indução e manutenção da remissão (Tanaka et al., 2008; Wei et al., 2009). Entretanto, as drogas comumente utilizadas têm alto custo, são frequentemente tóxicas e não efetivas em todos os pacientes (Tanaka et al., 2008). Novas estratégias terapêuticas são necessárias para os pacientes que não respondem aos tratamentos atualmente disponíveis e para reduzir os efeitos colaterais associados à terapia convencional.

Discutiremos a seguir, mais detalhadamente, as bases fisiopatológicas que norteiam o tratamento da colite ulcerativa.

2.5 Papel das células T e dos mediadores inflamatórios

Estudos têm demonstrado que pacientes com colite ulcerativa e DC apresentam células T da mucosa intestinal resistentes à apoptose, e que esse mecanismo pode ser uma causa importante de desregulação imune e da inflamação tecidual na colite. Os dados demonstram que o grau de apoptose não está relacionado com a atividade ou extensão da doença, pois os níveis de apoptose das células T em todos os pacientes do estudo apresentaram-se baixos, independente da etiologia. (Bu et al., 2001). Somado a isso, terapias que visam o aumento dos níveis da citocina anti-

inflamatória IL-10 e o bloqueio da sinalização da citocina pró-inflamatória de IL-6 podem induzir apoptose em células T da lamina própria que são resistentes à apoptose (Atreya et al. 2000; Bailey et al. 2006). Desta maneira, a apoptose reduzida pode ser um fator de desregulação imunitária da colite ulcerativa; entretanto, não desempenha um papel primário etiológico.

Diferentes citocinas e outros mediadores inflamatórios têm sido identificados na colite ulcerativa e na DC. A produção de citocinas por células inflamatórias e macrófagos residentes desempenha um papel crítico na destruição do tecido do cólon, modulando importantes funções celulares como proliferação e diferenciação (Hisamatsu et al., 2012).

As lesões envolvendo a camada mucosal com extensivo dano epitelial, abundantes neutrófilos e perda de criptas característicos da colite ulcerativa, tem levado à busca da explicação dos mecanismos imunológicos envolvidos no dano epitelial colonico (Muzez et al., 2012). Nas DIIs, a desregulação da resposta imunológica é reflexo do desequilíbrio de células T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2) e da produção de citocinas mediada por estas células nos diferentes estágios do processo da doença. Nesse sentido, a DC primeiramente foi associada a uma desordem Th1 (mediada por TNF- α , IL-2 e IFN- α), enquanto a colite ulcerativa foi associada a uma resposta Th2 (mediada principalmente por IL-5 e IFN- α) (Alex et al. 2009; Bamias et al. 2011; Muzes et al., 2012). Entretanto, estudos têm indicado um perfil Th2 na DC (super-regulação de IL-5) e perfil Th1 na colite ulcerativa (TNF- α) (Fuss et al.,2008; Feng et al.,2011.). Além disso, tem-se revelado um crescente aumento de interesse na via Th17, mediada por IL-23 e IL-17, ambas importantes em manifestações crônicas da inflamação intestinal (Yen et al., 2006). Dada a importância da complexa rede de citocinas nas DII, uma análise abrangente destas é fundamental para identificar perfis de diagnóstico e prognóstico da colite ulcerativa.

2.6 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a geração de espécie reativa de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) e a diminuição do sistema de defesa antioxidante (Roessner et al., 2008). Sob condições fisiológicas normais, as

defesas químicas e antioxidantes protegem os tecidos contra os efeitos nocivos das ROS. Entretanto, os oxidantes podem causar lesão tecidual se a taxa de sua produção exceder a capacidade dos mecanismos de defesa dos antioxidantes endógenos. Dessa forma, a inflamação do cólon pode produzir altos níveis de produtos oxidantes que provavelmente excedem essa capacidade antioxidante e leva ao estresse oxidativo e à ruptura de células epiteliais (Fillmann et al., 2007). A superprodução de ROS foi demonstrada no cólon de pacientes com DII e é objeto de estudo em modelos animais experimentais de colite ulcerativa (Lih-Brody et al., 1996; Damiani et al., 2007; Fillmann et al.; 2007; Trivedi e Jena, 2012). Ainda, as principais fontes de ROS na mucosa do cólon inflamada são neutrófilos e leucócitos fagocitários ativados, capazes de produzir várias espécies reativas que causam esses distúrbios na estabilidade da membrana celular (Damiani et al., 2007).

2.7 Modelo experimental de colite ulcerativa

Dada a variedade de fatores etiológicos e a complexa heterogeneidade genética, muito do conhecimento da patogênese das DIIs vem de estudos em modelos experimentais (Alex et al., 2009; Anderson et al., 2012). Estes tornam-se ferramentas essenciais para a investigação dos mecanismos celulares e moleculares que conduzem as DIIs, sendo utilizados na avaliação de novos tratamentos (Bauer et al., 2010). Entre os reagentes utilizados para a indução da inflamação intestinal em modelos murinos encontram-se o ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), que produz lesão similar à DC, e o dextran sulfato de sódio (DSS), que ocasiona lesão semelhante à colite ulcerativa (Strober et al., 2002). Esses modelos são amplamente utilizados e de fácil reprodução, primeiramente, porque o início é imediato e a duração da inflamação é controlável; além disso, não existem deleções ou manipulações genéticas nos animais experimentais (Alex et al., 2009).

Tanto a DC, quanto a colite ulcerativa experimental resultam da excessiva função de células T efectoras ou da deficiência da função das células T regulatórias na inflamação. Dessa forma, a ativação de células Th1 promove ativação e infiltração demasiadas de macrófagos e neutrófilos, ocasionando inflamações da mucosa intestinal e produção descontrolada de citocinas. A excessiva resposta de células Th1

está associada com um aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IFN- γ e/ou TNF; assim como a excessiva resposta de células Th2 está associada com a secreção de IL-4, IL-5 e/ou IL-13 (Bouma e Strober, 2003).

Visando a reprodução desse quadro inflamatório em modelo experimental, o DSS, um polissacarídeo que contém até três grupos sulfato por molécula de glicose, quando administrado por via oral na água de beber, pode induzir colite ulcerativa aguda ou crônica em camundongos. O exato mecanismo de indução e patogênese da colite induzida por DSS ainda é desconhecido. O DSS, inicialmente, induz lesão na mucosa e inflamação através de um efeito tóxico sobre as células epiteliais com posterior recrutamento e ativação de células inflamatórias e alta regulação de mediadores inflamatórios, ocasionando o desenvolvimento de colite severa (Vowinkel et al., 2004). A colite aguda induzida por DSS apresenta características morfológicas e fisiológicas semelhantes à colite ulcerativa em humanos, incluindo ulcerações superficiais, lesão da mucosa, produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios, infiltrações leucocitárias, diarreia, sangue nas fezes, perda de peso (Vowinkel et al., 2004; Bauer et al., 2010; Yazbeck et al., 2011). Esse modelo tem demonstrado vantagens para estudos que visam novas terapias ou de manipulações genéticas devido à sua simplicidade e reprodutibilidade (Elsheikh et al., 2012).

Entretanto, os animais podem apresentar diferentes susceptibilidades e respostas ao DSS variando a concentração (Egger et al., 2000; Vowinke et al., 2004; Wirtz et al., 2007; Tanaka et al., 2008; Zhang et al., 2009; Sydora et al., 2012) e o peso molecular (Kitajima et al., 2000; Vowinke et al., 2004; He et al., 2012) estando associados à gravidade da inflamação. Para melhor compreender os mecanismos da colite no modelo induzido por DSS, torna-se importante elucidar a relação entre peso molecular e concentração de DSS (Gonçalves et al., 2013).

2.8 Células-tronco mesenquimais (MSCs)

As células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cells* - MSCs) estão presentes na medula óssea e em diversos outros tecidos e apresentam grande plasticidade (Nardi e Meirelles, 2006). Muito do conhecimento sobre essas células foi gerado a partir de estudos de MSCs derivadas da medula óssea. No entanto, a origem

da obtenção de MSCs foi expandida para outros tecidos, incluindo músculos, tecido adiposo e sangue do cordão umbilical (Meirelles et al., 2006). Essas células tronco-adultas, quando em condições apropriadas, possuem a capacidade de diferenciação em diferentes tecidos como cartilagem, músculo, osso, tendões/ligamento (Caplan, 2005; Bielby et al., 2007). Tem-se atribuído às MSCs potencial de diferenciação em todas as três camadas germinativas: mesoderma, neuroectoderma e endoderma (Krampera et al., 2006).

As MSCs possuem um grande potencial terapêutico na medicina regenerativa devido à sua capacidade de diferenciação *in vitro*, *homing* para tecidos inflamados após infusão *in vivo* e secreção de várias moléculas bioativas (Hao et al., 2012). Além disso, as propriedades imunomodulatórias de MSCs sugerem que mesmo MSCs de HLA incompatíveis podem ser adequadas para uma grande variedade de novas aplicações terapêuticas, em especial para terapia celular de doenças autoimunes (Gebler et al., 2012).

2.9 Propriedades imunológicas das células-tronco mesenquimais

Acredita-se que a terapia celular com MSCs apresente resultados promissores no tratamento das doenças degenerativas, inflamatórias e autoimunes. Tem-se observado o potencial terapêutico de seus efeitos imunomoduladores na isquemia do miocárdio, no acidente vascular cerebral, na doença renal, na doença inflamatória intestinal, na doença enxerto-*versus*-hospedeiro, na esclerose múltipla, na diabetes mellitus e no transplante de órgãos (Griffin et al., 2010; Paz et al., 2011).

As MSCs possuem baixa imunogenicidade, podendo “escapar” do sistema imune por possuírem fenótipos de superfície que não são reconhecidos por linfócitos T. Além do reconhecimento de antígenos através do receptor de células T, a ativação de células T requer sinais co-estimulatórios, envolvendo moléculas específicas na superfície dessas células e de células dendríticas (Nauta et al., 2006). A ausência de MHC II ou moléculas co-estimulatórias de células T (B7-1, B7-2, CD40 ou CD40L) podem explicar o mecanismo pelo qual as MSCs não são reconhecidas por linfócitos T (Jorgensen et al., 2003). Interessantemente, tanto MSCs singênicas (células do próprio

indivíduo), quanto alogênicas (células de um doador da mesma espécie) são imunotoleradas pelo receptor (Gonzalez et al., 2009).

As MSCs podem imunomodular tipos celulares do sistema imune inato e do sistema imune adaptativo, tais como linfócitos T e B, células dendríticas, células NK (*natural killer*), neutrófilos, e células T regulatórias (Treg) (Figura 3) (Abdi et al., 2008). Essas células desencadeiam a liberação de diversos fatores solúveis que atuam no sistema imunológico e modulam a resposta imune (Di Nicola et al., 2002; Aggarwal e Pittenger 2005; Meirelles et al., 2006). Entre os fatores solúveis, estão as prostaglandinas (PGE₂), as interleucinas (IL-4, IL-6, IL-10), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), o fator de crescimento do hepatócito (HGF), a enzima indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) e o óxido nítrico (ON) (Nauta e Fibbe, 2007; Monteiro et al., 2008; Ren et al., 2008).

A liberação de PGE₂ inibe o recrutamento dos linfócitos T citotóxicos e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Aggarwal e Pittenger, 2005). A produção da citocina anti-inflamatória IL-10 pode promover tolerância a monócitos e macrófagos, diminuindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a atividade fagocitária e conseqüentemente amenizando a inflamação (English, 2013). Já a liberação de TGF- β e HGF suprime a proliferação dos linfócitos T e B, sendo que o TGF- β exerce efeito também na indução de células Treg (Di Nicola et al., 2002). A enzima IDO regula a proliferação das células T e pode induzir a apoptose dos linfócitos T, por transformar o triptofano (aminoácido essencial para a ativação dessas células) em produtos tóxicos (Aggarwal e Pittenger, 2005). Da mesma forma, IDO, PGE₂ e TGF- β induzem a perda do potencial citotóxico das células NK, uma vez que suprimem a produção de IL-2, IL-15 e INF- γ pelas mesmas (Nauta e Fibbe, 2007). O ON, por sua vez, é produzido como resultado da reação enzimática de ON sintase e tem capacidade de inibir a proliferação de células T e induzi-las à apoptose (Ren et al., 2008).

Estudos *in vitro* de co-cultivo celular realizados com o sistema *transwell* (membrana semipermeável que separa células polimorfonucleares de MSCs) demonstram que há participação de fatores solúveis, uma vez que a membrana não impede a inibição da proliferação das células do sistema imune. Esse resultado sugere que o contato célula-célula não é obrigatório para haver imunossupressão, entretanto alguns estudos relatam uma dependência parcial do mecanismo de contato célula-

célula pela indução da secreção de fatores imunossupressivos para células T (Gonzalez et al., 2009; Souza et al., 2010).

Outro mecanismo da imunossupressão exercido pelas MSCs tem sido observado na inibição sobre a diferenciação e maturação das células dendríticas derivadas de monócitos (Maccario et al., 2005; Ivanova et al., 2009). Dessa forma, as MSCs podem alterar a produção de citocinas pelas células dendríticas através da estimulação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, e da inibição de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , IL-12 e TNF- α (Nauta et al., 2006). Somado a isso, as MSCs derivadas do tecido adiposo têm demonstrado maior potencial imunossupressor que MSCs derivadas da medula óssea, pois são capazes de inibir com maior eficiência a diferenciação e a expressão de moléculas co-estimulatórias de importância funcional na superfície de células dendríticas derivadas de monócitos (Todorova et al., 2009; Zheng et al., 2008).

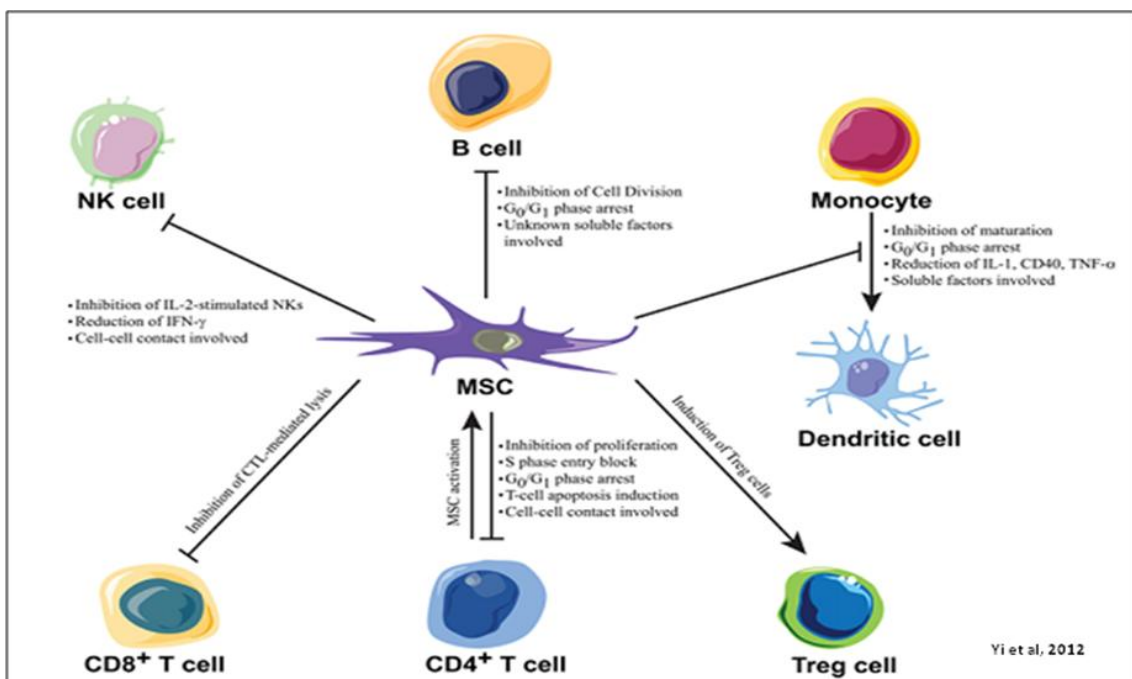


Figura 3: Efeitos modulatórios das MSCs nas células do sistema imune. Os efeitos imunomodulatórios das MSCs incluem supressão da proliferação de células T, indução de células Treg, influência na maturação e indução de células dendríticas, supressão na proliferação e diferenciação terminal de células B e inibição da função de células NK. Fonte: Yi et al., 2012.

2.10 Células-tronco mesenquimais na colite

O tratamento das DII é dependente da intensidade, do local, da severidade, das manifestações clínicas e das complicações da doença. Muitas vias patológicas celulares e moleculares têm sido identificadas como alvos de tratamento (Lichtenstein et al., 2006). A progressão em forma exacerbada da DII exige uma escala que vai de anti-inflamatórios a terapia com agentes biológicos, geralmente com sucesso limitado no que se refere à cura da doença e importantes eventos adversos (Sandborn, 2012). Apesar dos progressos alcançados com tratamento clínico-medicamentoso intensivo, aproximadamente 30% dos pacientes com colite ulcerativa necessitam de intervenção cirúrgica, cujas indicações ainda incluem: presença de displasia ou carcinoma, doença não efetivamente controlada, recorrência e agudização da doença (Mowat et al., 2011). Diante do exposto, alguns estudos têm abordado a terapia com células-tronco como promissora no tratamento de DII (Singh et al., 2011; Hawkey, 2012).

As MSCs possuem efeito supressor na resposta de células T e benéfico em várias desordens do sistema imune. Nesse sentido, estudos experimentais em modelos animais têm demonstrado uma melhora clínica e histopatológica da colite, como diminuição da diarreia e inflamação, e aumento da sobrevivência. Em trabalhos realizados por Gonzalez-Rey e colaboradores (2009) e González e colaboradores (2009), as MSCs derivadas do tecido adiposo demonstraram ter papel regulador na resposta imunológica da colite experimental, aumentando a secreção de citocinas anti-inflamatórias e diminuindo as citocinas pró-inflamatórias e a proliferação de células Th1. Akiyama e colaboradores (2012) demonstraram que a infusão sistêmica de MSCs derivadas da medula óssea induz a apoptose de células T resistentes à apoptose via Fas ligante (FasL), podendo melhorar a colite induzida por DSS. Em experimentos *in vitro* com MSCs, foi visto que a proliferação celular não foi afetada quando medicamentos para a DC foram adicionados ao meio de cultura (Duijvestein et al., 2011).

O sucesso dos estudos pré-clínicos utilizando a terapia com MSCs em modelos animais de doenças autoimunes, inflamatórias ou de dano tecidual tem aberto caminho para os ensaios clínicos. Atualmente, estes estudos têm focado a viabilidade e a potencialidade das MSCs, assim como nos benefícios e riscos para os pacientes (Salas, et al., 2009). Nenhum evento adverso durante ou depois dos

transplantes celulares tem sido observado. Um estudo em humanos demonstrou que a administração intravenosa de MSCs derivadas da medula óssea é uma forma segura e viável para o tratamento da DC refratária (Duijvestein et al., 2010). Em outro estudo clínico de fase I, resultados animadores utilizando administração local de MSCs do tecido adiposo em fístulas perianais em DC corroboram o uso dessa terapia em pacientes que não respondem ao infliximab (García-Olmo et al., 2005). Quatro anos depois, esse mesmo grupo publicou um estudo de fase II descrevendo a eficácia e a segurança das MSCs derivadas do tecido adiposo no tratamento de fístulas perianais complexas (García-Olmo et al., 2009).

Os dados experimentais e clínicos indicam que as MSCs têm um grande potencial terapêutico tanto para regeneração de tecidos, quanto para a promoção da reparação, em virtude de sua plasticidade e de suas propriedades imunomoduladoras. Ainda há muito a se investigar a respeito da biologia desta população de células-tronco; entretanto, devido ao seu potencial benéfico na inflamação e em várias desordens do sistema imune, as MSCs podem ser uma excelente ferramenta no tratamento de DII.

2.11 Vias de administração para a terapia celular

Muito se tem pesquisado a respeito da mobilização de MSCs nativas e do *homing* de MSCs exógenas infundidas por diferentes vias em resposta a um insulto inflamatório. As MSCs demonstram a capacidade de migrar preferencialmente a sítios de inflamação quando infundidas em modelos animais, através da expressão de fatores de crescimento e citocinas, além de receptores de proteínas de matriz extracelular em sua superfície (Meirelles et al., 2006; Souza et al., 2010; He et al., 2012). Dessa forma, após a recepção de sinais biológicos adequados durante a lesão ou a inflamação do tecido, essas células podem migrar aos sítios afetados e auxiliar na sua recuperação, tendo um alto potencial terapêutico na reparação tecidual e/ou no controle da inflamação local (Abdi et al., 2008).

Diferentes vias de transplante de MSCs em modelos experimentais de doenças têm sido descritos na literatura. Meyerrose e colaboradores (2008) demonstraram que não houve diferença significativa na distribuição das MSCs derivadas do tecido adiposo

humano nos tecidos após o transplante intravenoso, intraperitoneal e subcutâneo em três diferentes modelos de animais imunodeficientes. Em modelo animal de infarto do miocárdio, a infusão intravenosa sistêmica de MSCs derivadas da medula óssea humana apresentou, após 4h do transplante, aprisionamento das células principalmente nos pulmões, e, em menor número, no fígado, coração, e baço (Barbash et al., 2003). Em modelo murino de colite induzida por DSS, a administração sistêmica de MSCs revelou que as células migram à região do cólon inflamada, podendo ser encontradas até 21 dias após o transplante (Tanaka et al., 2008; Wei et al., 2009). Já os estudos com o transplante via intraperitoneal de MSCs têm apresentado resultados de enxertia dessas células no baço, fígado, rim, pâncreas, pulmão, coração e cérebro, entre 2 e 4 meses após o transplante (Meyerrose et al., 2008). Somado a isso, Gonzalez-Rey e colaboradores (2009) demonstraram em modelo experimental de colite induzida por DSS que as MSCs são preferencialmente recrutadas por órgãos linfoides e pelo cólon inflamado. Um único estudo comparativo entre as vias intravenosa e intraperitoneal em modelo de colite induzida por TNBS concluiu que, na administração sistêmica, as MSCs acumulam-se preferencialmente nos pulmões, sem evidência de migração para o cólon, e que as MSCs injetadas via intraperitoneal foram localizadas no cólon inflamado (Castelo-Branco et al., 2012). A injeção tópica de células também tem sido uma via terapêutica estudada na colite experimental. A implantação de MSCs ao redor do cólon inflamado em modelo de colite induzida por TNBS melhorou o dano na região (Hayashi et al., 2008). Outras vias de infusão celular menos frequentes, porém alternativas para o tratamento de determinadas doenças, são a via intramuscular e a subcutânea. Vilalta e colaboradores (2008) demonstraram que MSCs implantadas via intramuscular são capazes de colonizar o fígado e foram encontradas no local após 8 meses do transplante. Já no estudo de López-Iglesias e colaboradores (2011), as MSCs injetadas no subcutâneo de camundongos imunodeficientes puderam ser detectadas no local da infusão até 17 meses após o transplante, sem que ocorresse migração celular.

Há controvérsias sobre a localização e a permanência das MSCs no organismo após o transplante. A via de administração é um fator importante para determinar o destino das células. Em humanos, a via de administração preferencialmente utilizada é a intravenosa; entretanto, devido ao tamanho das MSCs (15-19 μ m), parte considerável

das células injetadas por via intravenosa pode permanecer presa nos filtros dos capilares dos pulmões causando, inclusive desconforto respiratório aos receptores (Fischer et al., 2009). Por outro lado, o transplante local pode resultar em morbidez significativa causando lesões adicionais na região a ser tratada (Morikawa et al., 2009). Em relação à via intraperitoneal, esta possui velocidade de absorção semelhante à intravenosa; entretanto, pode acarretar maior probabilidade de infecções (peritonite) e perigo de perfuração de alças intestinais.

Para que a terapia celular nas DIIs possa ser realizada com sucesso, a compreensão sobre como as MSCs alcançam os benefícios terapêuticos e qual o destino destas células após o transplante deve ser estudada já que a via de administração pode definir o sucesso de um transplante celular, uma vez que interfere diretamente no fornecimento eficiente de células para o sítio inflamado (Zonta et al., 2010; Zhao et al., 2012).

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente, os métodos terapêuticos consistem principalmente na utilização de fármacos que visam produzir e manter estados de remissão da colite ulcerativa e, muitas vezes, apresentam efeitos colaterais. Tendo em vista a necessidade de novos métodos de tratamento, torna-se necessário o estudo de outras estratégias terapêuticas, como a terapia celular. Considerando a capacidade de imunomodular células do sistema imune e de regenerar tecidos doentes, as MSCs podem ser consideradas uma alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais, como a colite ulcerativa. Além disso, muito se tem investigado a respeito do *homing* das MSCs exógenas infundidas por diversas vias em resposta a um insulto isquêmico/inflamatório e se tem visto a capacidade de migração para tecidos afetados. Entretanto, não há na literatura nenhum estudo que demonstre a melhor via de transplante no tratamento da colite ulcerativa para que as MSCs possam migrar para o cólon inflamado e diminuir a inflamação mucosal. Portanto, o uso de terapia celular com MSCs apresenta-se como uma ferramenta para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na colite ulcerativa, podendo promover o desenvolvimento futuro de terapias que visem a minimizar ou prevenir esse problema.

4. HIPÓTESE

O transplante de MSCs pelas diferentes vias de infusão possibilitará que as células diminuam a inflamação do cólon, sendo que a via intravenosa a mais eficiente e menos invasiva para o tratamento da colite experimental.

5. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar o efeito do transplante de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo em diferentes vias de infusão em modelo murino experimental de colite ulcerativa aguda.

Objetivos Específicos

- Extrair, isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de camundongos C57BL/6 saudáveis;
- Estabelecer o modelo de colite ulcerativa aguda por dextran sulfato de sódio (DSS);
- Induzir colite ulcerativa aguda em camundongos C57BL/6 com dextran sulfato de sódio e realizar o transplante de células-tronco mesenquimais por duas diferentes vias de infusão;
- Avaliar os animais dos diferentes grupos experimentais quanto:
 - À atividade clínica da doença
 - À histopatologia
 - À quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias
 - Às taxas de apoptose na mucosa do cólon
 - Aos parâmetros de estresse oxidativo

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Locais de realização

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular e na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Houve participação e apoio do Departamento de Bioquímica da UFRGS, do Laboratório de Psiquiatria Molecular do HCPA, da Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) e da Unidade de Patologia Experimental do CPE do HCPA.

6.2 Animais do estudo

Camundongos machos C57BL/6 (idades 8-12 semanas) foram adquiridos por intermédio da UEA. Os camundongos foram mantidos em instalações com no máximo 6 animais por gaiola, com umidade e temperatura controladas (20-22°C), ciclos claro-escuro (12-12h), dieta padrão e água potável *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes da UFRGS para experimentação animal e com a Lei Federal 11.794/08 que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e regula o registro dos centros de experimentação animal. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa CEUA-HCPA e está registrado sob o número 11-0244.

4.3 Isolamento e caracterização das MSCs

Isolamento e Cultura das MSCs

A gordura epididimal de camundongos machos C67BL/6 foi assepticamente removida e processada em capela de fluxo laminar. O tecido foi enzimaticamente digerido a 37°C, em 1mg/ml de colagenase tipo I (Sigma, MO, EUA) em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, CA, EUA) com baixa concentração de glicose, e incubado por 30min. Após a completa digestão, a enzima foi inativada pela adição de

DMEM suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB; Gibco, CA, USA). Após, a suspensão celular foi submetida à centrifugação a 600 x g por 10min, o *pellet* foi ressuspenso em DMEM suplementado com 20% SFB e 100un/ml de penicilina e 100mg/ml de estreptomicina (Gibco, CA, EUA). As células foram semeadas em placas de cultura de 6 poços (TPP, Trasadingen, CH) e incubadas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% CO₂. Transcorridas 72h de cultivo, as células não aderentes foram removidas e meio fresco foi adicionado. Quando a cultura apresentava 80% de confluência, as células aderentes eram removidas com solução de 0.25% Tripsina-EDTA (Gibco, CA, EUA) e mantidas em DMEM suplementado com 20% SFB e penicilina/estreptomicina. Foram utilizadas nos experimentos culturas de MSCs frescas entre as passagens 3-6.

Ensaio de Diferenciação Celular

A fim de caracterizar as MSCs de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (Horwitz et al., 2005), três diferentes procedimentos experimentais foram empregados seguindo o protocolo de Gonçalves e colaboradores (2012). Os protocolos de diferenciação consistem na adição de reagentes específicos ao meio de cultivo por 21 dias. A diferenciação adipogênica foi induzida pela cultura de MSCs em DMEM com 10% SFB, 15mmol/L HEPES (Sigma, MO, EUA), suplementado com 10⁻⁸ mol/L dexametasona (Sigma, MO, EUA), 5 µg/mL insulina e 50 µg/mL indometacina (Sigma, MO, EUA). Os adipócitos foram facilmente discernidos de células indiferenciadas em microscópio de contraste de fase. Para confirmar sua identidade, ao final do protocolo de diferenciação, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% e coradas com *Oil Red* (Sigma, MO, EUA). Para induzir diferenciação osteogênica, MSCs foram cultivadas em DMEM com 10% SFB, 15 mmol/L HEPES, suplementado com 10⁻⁸ mol/L dexametasona, 5 µg/mL ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma, MO, EUA) e 10 mmol/L β-glicerolfosfato (Sigma, MO, EUA). Para observar a deposição de cálcio, as culturas foram fixadas e coradas com o corante *Alizarin Red* (Sigma, MO, EUA). Por fim, a diferenciação condrogênica foi induzida pela cultura de MSCs em DMEM com 15 mmol/L HEPES, suplementado com 6,25µg/ml insulina, 5 µg/mL ácido ascórbico 2-fosfato e 10ng/ml TGF-β (Sigma, MO, EUA). Com o objetivo de verificar a presença de

proteoglicanos, as células foram fixadas e coradas com o corante *Alcian Blue* (Vetec, RJ, BR).

Citometria de fluxo

Com o objetivo de caracterizar a população celular de acordo com os marcadores moleculares de superfície, foi realizado o ensaio de imunofenotipagem. Aproximadamente 1×10^6 MSCs foram preparadas. A suspensão celular foi colocada em tubos estéreis e lavada duas vezes por centrifugações a $600 \times g$ por 5min em temperatura ambiente. MSCs foram ressuspensas em solução tamponada fosfatada (*phosphate-buffered saline*-PBS) e incubadas por 30min em temperatura ambiente com anticorpo para marcadores CD34, CD11bc, CD44 e CD90 (BD, NJ, EUA) conjugados à ficoeritrina (PE). Todos os ensaios foram conduzidos utilizando-se concentrações de anticorpos recomendadas pelo fabricante. As células foram então coletadas e lavadas com PBS por centrifugação a $400 \times g$ por 10min à temperatura ambiente, e as análises de fluorescência foram realizadas com citômetro de fluxo BD FACS-Calibur (Becton-Dickinson, NJ, EUA). Os dados das amostras foram analisados utilizando-se o programa Cellquest e PAINTA-GATE.

6.4 Caracterização do modelo murino de colite aguda induzida por DSS

Inicialmente, para a caracterização do modelo de colite aguda induzida por DSS, foram testados diferentes pesos moleculares e diferentes concentrações de DSS adicionados à água de beber dos animais. DSS de dois diferentes pesos moleculares, 36 000 – 50 000 Da (MpBio, OH, EUA) e 10 000 Da (Sigma, MO, EUA) foram utilizados no estudo, de acordo com o artigo do Anexo I. Camundongos C57BL/6 foram divididos em 4 grupos com 5-6 animais cada. Os animais que receberam 2% DSS de alto peso molecular (36 000 – 50 000 Da) na água de beber foram nomeados grupo HDSS2%; o grupo que recebeu 5% do DSS de mesmo peso molecular foi nomeado HDSS5%. Animais que receberam 5% de DSS de baixo peso molecular (10 000 Da) foram chamados LDSS5%. O grupo controle consistiu em animais que receberam água sem adição de DSS e foi denominado grupo saudável (Figura 4).

A colite ulcerativa aguda foi induzida em camundongos pela administração de DSS do dia 0 ao dia 7 na água de beber *ad libitum*. A solução de DSS era preparada com água autoclavada e trocada a cada 48h. O grupo controle recebeu água autoclavada pura (Wirtz et al., 2007).

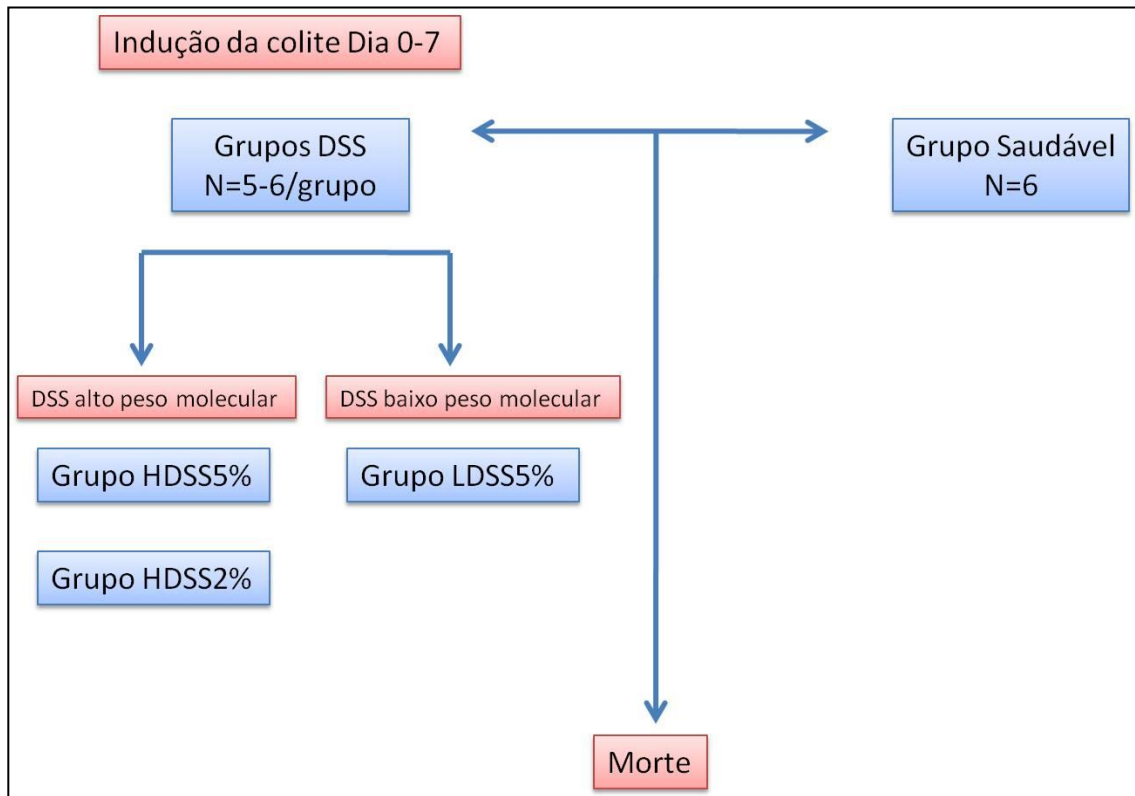


Figura 4: Delineamento experimental de caracterização do modelo murino de colite ulcerativa. Camundongos C57BL/6 foram administrados com diferentes pesos moleculares e concentrações de DSS do dia 0 ao dia 7 na água de beber. Os grupos foram divididos entre animais administrados com alto e baixo peso molecular de DSS. Dentro do grupo de alto peso molecular houve uma subdivisão de concentrações de DSS, 2 e 5%. O grupo saudável recebeu apenas água pura para beber.

6.5 Transplantes de MSCs

O modelo experimental que recebeu 2% do DSS de alto peso molecular foi utilizado nos estudos que envolveram tratamento com MSCs (artigos do Anexo II e III). Dessa forma, nos dias 2 e 5 do protocolo de indução da lesão, as MSCs (1×10^6 células/120 μ l PBS) foram injetadas via intraperitoneal (DSS-MSc IP) ou intravenosa (DSS-MSc IV) pela veia da cauda (n = 5/grupo). O grupo salina recebeu injeção PBS de

acordo com o mesmo protocolo pela via intravenosa (n = 5). Na Figura 5 encontra-se o delineamento do estudo.

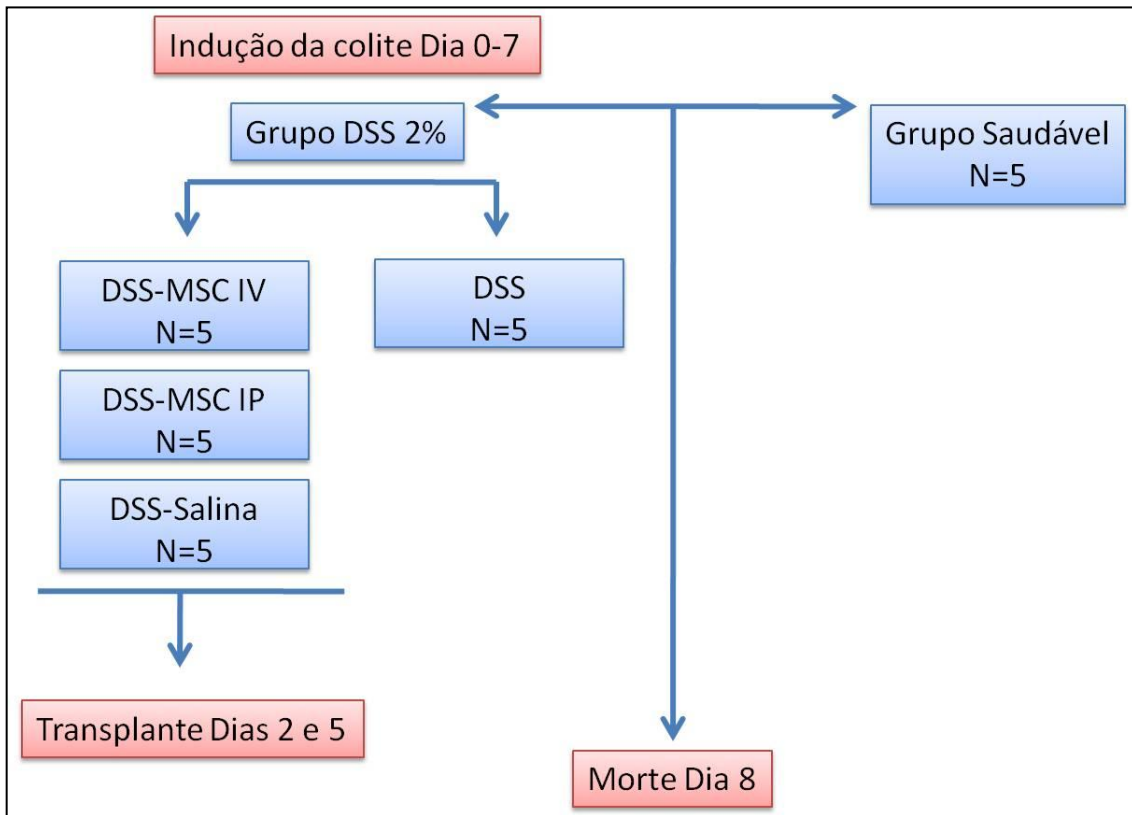


Figura 5: Delineamento experimental do tratamento com MSCs. Camundongos C57BL/6 foram administrados com 2% DSS do dia 0 ao dia 7 na água de beber. Nos dias 2 e 5, MSCs foram transplantadas via intraperitoneal ou intravenosa. Dia 8, os animais foram eutanasiados e as coletas das amostras para análise foram realizadas.

6.6 Avaliações clínicas

O índice de atividade da doença (IAD) foi determinado por investigadores que desconheciam a composição dos grupos experimentais. Diariamente, os animais foram observados em relação à perda de peso, consistência das fezes, e presença de sangue nas fezes e no ânus (Gonçalves et al., 2013). Para cada parâmetro foi atribuído um escore de 0 a 4, resultando na pontuação total de IAD de 0 (não afetado) a 12 (colite severa) (Tabela 1).

Tabela 1. Índice de Atividade da Doença (IAD)

Escore	Perda de Peso	Consistência das fezes	Sangramento
0	0	normal	sem sangramento
1	1-5%	-	-
2	5-10%	fezes moles	sangramento leve
3	10-15%	-	-
4	mais que 15%	diarreia aquosa	sangramento bruto

Fonte: Alex et al., 2009.

6.7 Avaliações macroscópicas do cólon

Ao fim do protocolo de indução, os animais foram mortos por deslocamento cervical. Em seguida, foram posicionados ventralmente, e uma incisão abdominal foi realizada expondo o conteúdo abdominal. Cuidadosamente, os cólons foram removidos do ceco até o ânus. Com auxílio de uma agulha 20G e uma seringa 20ml, as amostras foram lavadas com água de injeção até que o material ficasse livre de fezes. Após, os fragmentos foram medidos e pesados como marcadores indiretos do grau de inflamação.

6.8 Avaliações histológicas do cólon

Após limpeza, com o auxílio de uma tesoura, os cólons foram abertos longitudinalmente da região distal à proximal, formando uma folha plana. Iniciando-se da parte distal, os intestinos foram rolados de forma a gerar um espiral. Após a preparação, os cólons foram fixados em 10% formalina tamponada por 24h, processados e embebidos em parafina para a obtenção de cortes mediais longitudinais. Secções do cólon (4µm) foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) e analisadas utilizando-se microscópio óptico (Whittem et al., 2010). O escore histológico foi determinado por patologista que desconhecia a composição dos grupos experimentais, conforme Dieleman e colaboradores (1998) (Tabela 2). Cada parâmetro histológico, como severidade da inflamação (0-3), profundidade da inflamação (0-3), regeneração (0-4) e dano à cripta (0-4), foi multiplicado pela porcentagem de

comprometimento do tecido (1 ponto para 1-25%, 2 pontos para 26-50%, 3 pontos para 51-75%, 4 pontos para 76-100%). Portanto, a severidade e a profundidade da inflamação tiveram uma escala de pontuações de 0 a 12, a regeneração e o dano à cripta de 0 a 16. O índice histológico da doença foi calculado como a soma dos produtos de todos os parâmetros.

Tabela 2. Graduação histológica da colite

Características	Grau	Descrição
Inflamação	0	Nenhum
	1	Leve
	2	Moderado
	3	Severo
Extensão	0	Nenhum
	1	Mucosa
	2	Mucosa e submucosa
	3	Transmural
Regeneração	4	Nenhuma reparação tecidual
	3	Superfície epitelial não intacta
	2	Regeneração com depleção de cripta
	1	Regeneração quase completa
	0	Completa regeneração ou tecido normal
Dano à cripta	0	Nenhum
	1	Basal 1/3 danificado
	2	Basal 2/3 danificado
	3	Apenas a superfície do epitélio intacta
	4	Cripta inteira e epitélio perdido
Percentual de Envolvimento	1	1-25%
	2	26-50%
	3	51-75%
	4	76-100%

Fonte: Dieleman et al., 1998.

6.9 Determinação de citocinas no soro

Após a anestesia induzida por isoflurano, amostras de sangue foram coletadas por punção retro-orbital para a separação do soro. As amostras foram coletadas em tubos de coleta de sangue contendo coagulante (BD Vacutainer, NJ, EUA), centrifugadas a 4000 x g por 20min. Após separação, o soro foi armazenado a -80°C até

a determinação das citocinas. Níveis de citocinas no soro foram determinados pelo Kit CBA Th1/Th2/Th17 (BD, NJ, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A análise de citocinas foi realizada no citômetro de fluxo BD FACS-Calibur (Becton-Dickinson, NJ, EUA), e os dados foram lidos por *software* específico.

6.10 Avaliação da apoptose no cólon

Para determinar a apoptose, o DNA fragmentado foi corado pelo ensaio *terminal deoxinucleotidil transferase (TdT)-mediated dUDP-biotin nick end labelling* (TUNEL) com o kit *In situ Cell Death Detection* (Roche, CA, EUA). Após desparafinização das amostras, as secções foram incubadas com proteinase K 20 µg/ml durante 30min a 37°C. Seguido de lavagem, as lâminas foram incubadas durante 1h a 37°C em atmosfera úmida, no escuro, com *labelling reaction Mix* contendo a enzima TdT. As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência usando comprimento de onda de excitação de 450-500nm e de detecção de 515-565nm (verde). Nove campos microscópicos (aumento 200x) foram fotografados e quantificados em pixels. O *Software ImageJ* (*National Institute of Health*, MA, EUA) foi utilizado para a análise semi-quantitativa da apoptose.

6.11 Avaliação do estresse oxidativo

Preparação do Tecido

Os cólons foram homogeneizados (1:10 m/v) em 20mM de tampão fosfato de sódio, pH 7.4, contendo 140 mM KCl. O homogeneizado foi centrifugado a 3000 x g por 20min a 4°C. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante, uma suspensão de organelas incluindo mitocôndrias, foi separado e utilizado para as medidas de estresse oxidativo. Os efeitos da colite ulcerativa experimental foram investigados medindo parâmetros intestinais de estresse oxidativo, incluindo substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e a influência do transplante de MSCs no tratamento da colite, medindo níveis de glutatona reduzida (GSH).

Parâmetros de estresse oxidativo

A. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

Os níveis de TBA-RS foram medidos de acordo com os métodos descritos por Yagi e colaboradores (1998) e Seminotti e colaboradores (2013). Resumidamente, 200µl de 10% ácido tricloroacético e 300µl de 0.67% TBA em 7.1% sulfato de sódio foram adicionados em 100µl do sobrenadante do tecido contendo 0.5mg de proteína e incubado por 2h em banho de água fervente. As amostras foram esfriadas em água corrente durante 5min. O resultado de coloração rosa foi obtido com 400µl de butanol. A fluorescência foi lida a 515nm e 553nm, comprimento de onda de excitação e emissão, respectivamente. A curva de calibração foi realizada utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano, submetido ao mesmos tratamentos. Os níveis de TBA-RS foram calculados como nmol TBA-RS/mg de proteína.

B. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade de SOD foi realizada de acordo com Marklund e colaboradores (1985), e baseia-se na capacidade de pirogalol se auto-oxidar, um processo altamente dependente de O_2^- , que é substrato para a SOD. A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser então indiretamente testada espectrofotometricamente a 420 nm. O meio da reação continha 50mM de tampão Tris com 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético, pH 8.2, 80 U/mL de catalase, 0.38 mM de pirogalol e sobrenadantes de tecidos (cerca de 1 µg de proteína). Uma curva de calibração foi realizada com a SOD purificada como padrão para calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Os resultados foram calculados em U/mg de proteína.

C. Atividade da catalase (CAT)

A atividade de CAT foi realizada de acordo com Aebi e colaboradores (1984), medindo a diminuição da absorvância a 240nm na reação do meio contendo 20mM de H_2O_2 , 0.1% de tampão Triton X-100, 10mM de fosfato de potássio, pH 7.0, e os sobrenadantes de tecidos (cerca de 1 µg de proteína). Uma unidade (U) de enzima é

definida como 1 μ mol de H₂O₂ consumido por minuto. A atividade específica foi calculada como U/mg de proteína.

D. Níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram medidos de acordo com Browne e Armstrong (1998) com algumas modificações. Cento e oitenta e cinco microlitros de tampão de fosfato de sódio 100mM, pH 8.0, contendo EDTA 5mM, e 15 μ L de o-ftaldialdeído (1mg/ml metanol) foram adicionados a 30 μ L de amostra (0.5mg de proteína) que foram previamente desproteinizado com ácido metafosfórico . Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente em quarto escuro durante 15min. A fluorescência foi medida utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 350nm e 420nm, respectivamente. A curva de calibração foi realizada com o padrão de GSH (0,001-0,1 mM), e as concentrações de GSH foram calculadas em nmol/mg de proteína.

E. Concentrações de Proteínas

As concentrações de proteína foram medidas pelo método de Lowry e colaboradores (1951) utilizando albumina de soro bovino como padrão.

6.12 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) para cada grupo. A análise estatística foi realizada com o programa estatístico SPSS (versão 18.0). Equações estimadas generalizadas (*Generalized Estimated Equations-GEE*) foram utilizadas na avaliação do IAD e da perda de peso. Para comparações múltiplas (peso e comprimento do cólon, análise histológica, quantificação de citocinas e apoptose), foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. No caso de diferenças significativas, a análise *post-hoc* foi realizada com o teste de Bonferroni. Os dados dos parâmetros de estresse oxidativo foram analisados utilizando análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan de intervalos múltiplos quando o valor de F era significativo ou o teste t de Student para amostras independentes. $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

7. RESULTADOS

Caracterização das MSCs do tecido adiposo

MSCs foram obtidas a partir do plaqueamento da suspensão celular de tecido adiposo em placas de cultura e da consequente propagação de células aderentes. A cultura celular apresentou colônias de células aderentes com morfologia fibroblástica entre 5 e 7 dias após o isolamento. As células tornaram-se morfologicamente homogêneas com o passar do tempo da cultura pela depleção de outras células estromais (Figura 6A). Pela análise de citometria de fluxo, identificou-se que a maioria das células preservou o fenótipo característico CD44+, CD90+, CD11bc- e CD34- (Figura 7) e foi capaz de conservar a capacidade de diferenciação. Para avaliar o potencial de diferenciação, MSCs foram cultivadas com fatores específicos de indução. Conforme demonstrado na Figura 6B, um claro potencial para a diferenciação adipogênica foi detectado através da coloração com *Oil Red*, que cora vacúolos lipídicos, enquanto que na Figura 6C é demonstrada a diferenciação osteogênica detectada por *Alizarin Red* que cora depósitos de cálcio. A diferenciação condrogênica foi confirmada pela coloração de *Alcian Blue* que cora proteoglicanos (Figura 6D). A população celular utilizada está de acordo com os critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular, podendo ser dessa forma corretamente denominada células-tronco mesenquimais.

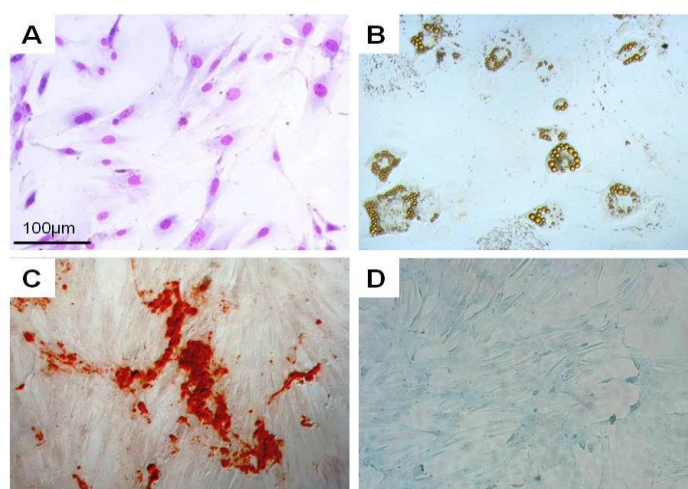


Figura 6: Caracterização das MSCs quanto à morfologia e diferenciação celular. (A) Morfologia das MSCs, coloração de H&E. (B) Diferenciação em adipócitos, corante *Oil Red*. (C) Diferenciação em osteócitos, corante *Alizarin Red*. (D) Diferenciação em condrócitos, corante *Alcian Blue*. (Barra = 100µm).

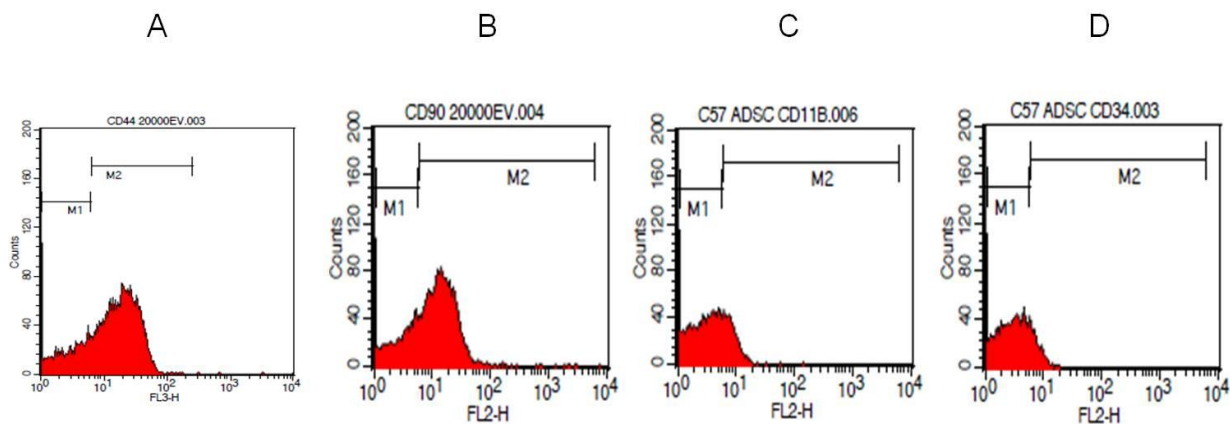


Figura 7: Imunofenotipagem das MSCs. A maioria das células apresentou-se positiva para os marcadores de MSCs CD44 e CD90 (A e B) e negativas para os marcadores que não são característicos de MSCs CD11bc e CD34 (C e D).

Estabelecimento do modelo experimental de colite aguda induzida por DSS

Durante a administração de DSS, o IAD apresentou diferentes graus de severidade entre os três grupos tratados com diferentes doses e concentrações de DSS (HDSS2%, HDSS5% e LDSS5%). Como esperado, todos os animais que receberam DSS apresentaram um aumento significativo do IAD (caracterizado por diarreia com sangue, sangue retal e perda de peso) comparados ao grupo saudável.

O Grupo HDSS5% começou a apresentar sinais clínicos significativos em relação ao grupo saudável a partir do dia 1 (0.5 ± 0.2 saudável e 1.58 ± 0.14 HDSS5%, $P < 0.001$); HDSS2% começou a diferir do grupo saudável no dia 2 (0.5 ± 0.31 saudável e 2.2 ± 0.33 HDSS2%, $P = 0.001$); e LDSS5% apresentou diferença no dia 3 (0.17 ± 0.15 saudável e 1.75 ± 0.34 LDSS5%, $P < 0.001$) (Figura 8A). A partir do dia 3, o grupo HDSS5% apresentou IAD significativamente maior que os grupos HDSS2% e LDSS5% ($P < 0.001$). Além disso, a administração de DSS demonstrou estar associada com uma significativa mudança de peso corporal nos camundongos ($P < 0.05$). O grupo HDSS2% apresentou uma perda de $23.8\% \pm 3.0$, e os grupos HDSS5% e LDSS5%, $32.65\% \pm 0.0$ e $8.7\% \pm 1.7$, respectivamente. A partir do dia 6, o grupo HDSS5% mostrou uma perda de peso significativamente maior que os grupos HDSS2% e LDSS5% ($P < 0.05$) (Figura 8B).

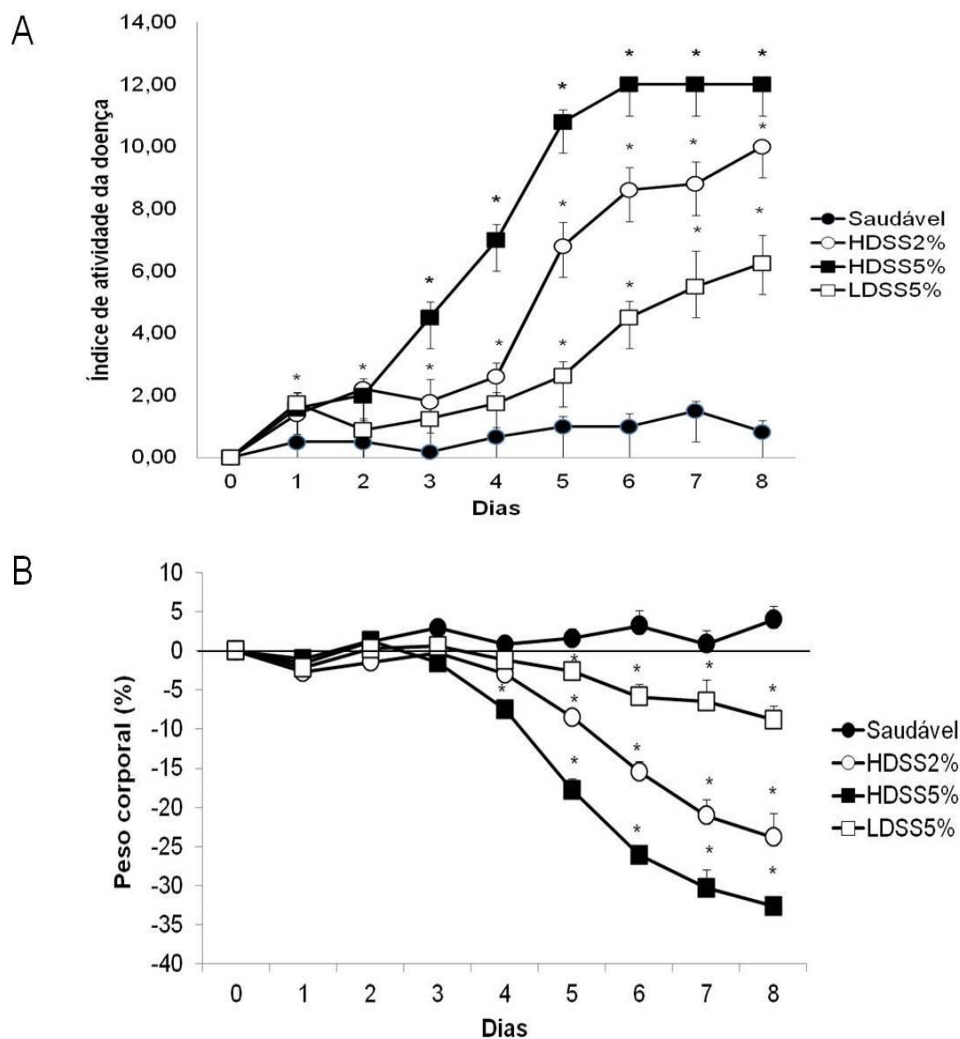


Figura 8: Análise clínica dos animais tratados com diferentes concentrações e pesos moleculares de DSS. (A) Atividade clínica na doença. O grupo HDSS5% começou a demonstrar sinais clínicos significativos a partir do dia 1, o grupo HDSS2% no dia 2 e LDSS5% no dia 3 (* $P < 0.05$ vs grupo saudável). A partir do dia 3, o grupo HDSS5% apresentou IAD significativamente maior que os grupos HDSS2% e LDSS5%. (B) Perda de peso corporal. A administração de DSS resultou numa significativa mudança no peso corporal (* $P < 0.05$ vs grupo saudável). A partir do dia 6, o grupo HDSS5% apresentou uma perda de peso significativamente maior que os grupos HDSS2% e LDSS5%. (n = 5-6 animais/grupo).

As mudanças macroscópicas do cólon também estão associadas ao modelo induzido por DSS. Essas mudanças incluem diminuição do comprimento e redução do peso do cólon. Os grupos HDSS2% e HDSS5% apresentaram comprimento e peso do cólon estatisticamente menor que o grupo saudável ($P = 0.001$ e $P = 0.045$,

respectivamente) (Figura 9). Camundongos do grupo LDSS5% não apresentaram diferença macroscópica significativa quando comparados ao grupo saudável.

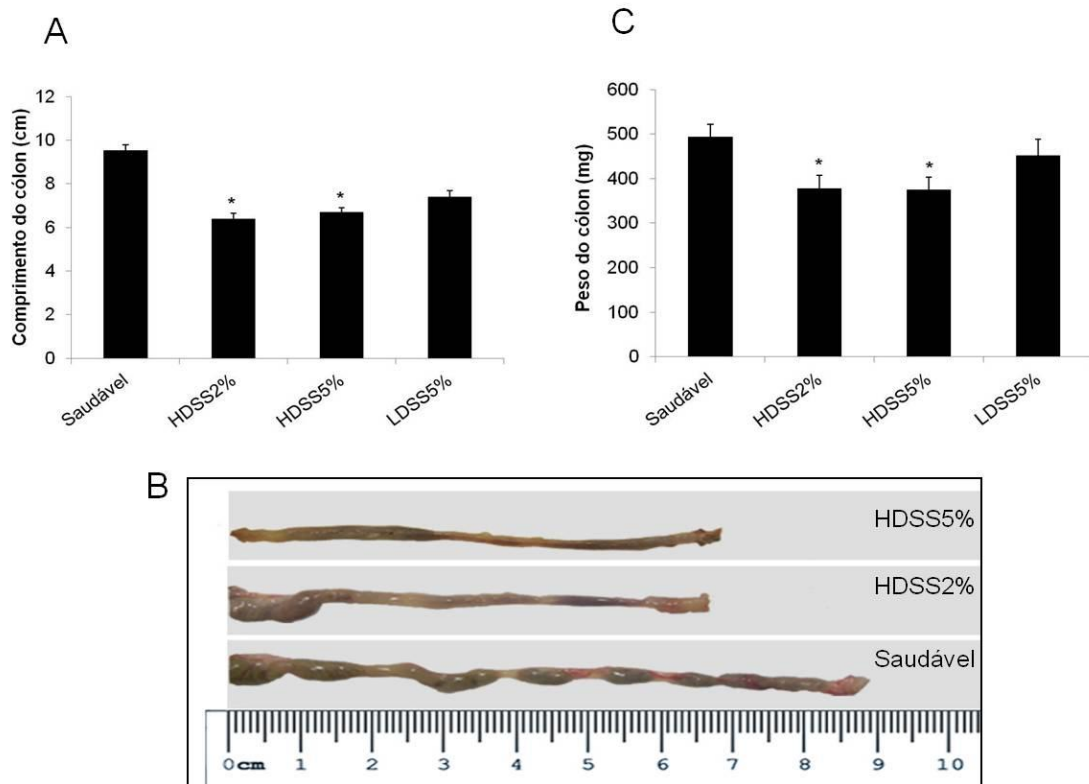


Figura 9: Análise macroscópica do cólon de animais administrados com DSS de diferentes pesos moleculares e concentrações. (A) Os grupos HDSS2% e HDSS5% apresentaram significativa diminuição do comprimento do cólon comparado com o grupo saudável ($*P = 0.001$). (B) Fotografia representativa demonstrando o encurtamento dos cólons dos animais administrados com DSS. (C). Peso do cólon. Os grupos HDSS2% e HDSS5% apresentaram uma significativa diminuição do peso do cólon em relação ao grupo saudável ($*P = 0.045$). (n = 5-6 animais/grupo).

Na avaliação histológica, os grupos HDSS2% e HDSS5% apresentaram padrão histológico semelhante à colite aguda, diferindo do grupo saudável ($P < 0,001$) (Figura 10A). Camundongos do grupo LDSS5% não demonstraram sinais de colite na análise histológica. Dados do escore histológico dos diferentes grupos estão apresentados na Figura 10B.

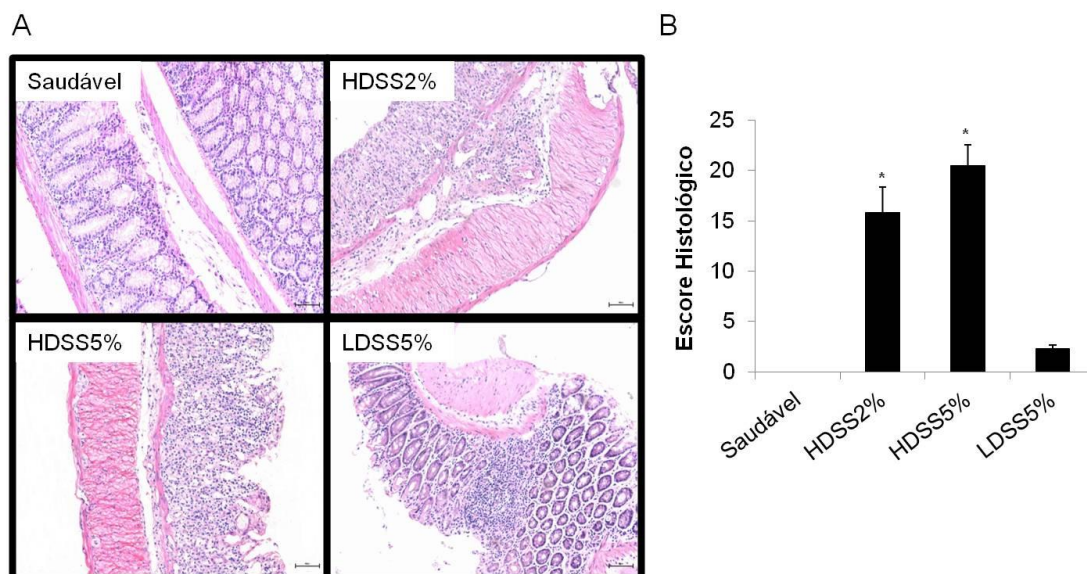


Figura 10: Características histológicas de colite induzida por DSS de diferentes pesos moleculares e concentrações. (A) Histologia de secções do cólon corado com H&E (x100) (Barra= 100µm). (B) Escore histológico. Os grupos HDSS2% e HDSS5% apresentaram um escore histológico maior em relação ao cólon normal (* $P < 0.001$). O grupo LDSS5% não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo saudável. (n = 5-6 animais/ grupo).

Efeito do transplante intravenoso de MSCs na colite experimental induzida por DSS

Para avaliar o efeito do tratamento de MSC na colite experimental, utilizamos o modelo exposto à administração de 2% de DSS de alto peso molecular (HDSS2%) por ser esse o modelo mais fidedigno das alterações clínicas e histológicas da colite humana. A figura 11 representa o transplante de MSCs pelas duas vias de infusão do estudo: intraperitoneal e intravenosa. Como visto nos dados anteriores, os animais administrados com essa dose de DSS apresentaram aumento do IAD, sangue nas fezes e perda de peso. Entretanto, a partir do dia 5 do protocolo, o grupo DSS-MSC IV apresentou uma pontuação de IAD significativamente inferior ao grupo DSS não tratado ($P < 0.001$) (Figura 12A). Além disso, a partir do dia 6, a perda de peso diminuiu significativamente com a administração intravenosa de MSCs em comparação ao grupo DSS não tratado ($P < 0,001$) (Figura 12B).

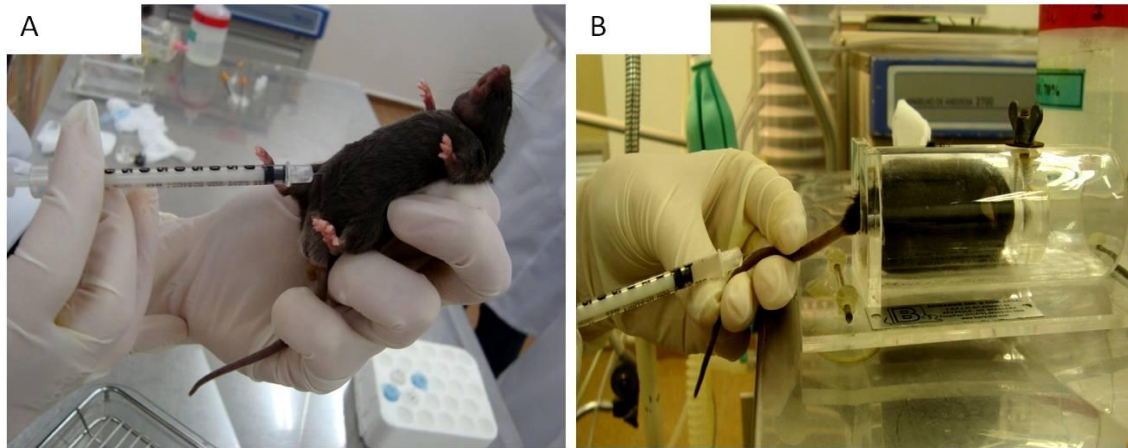


Figura 11: Transplante de MSCs via intraperitoneal e intravenosa nos dias 2 e 5 do protocolo de indução de colite aguda induzida por DSS. (A) Transplante celular via intraperitoneal. (B) Transplante celular via intravenosa.

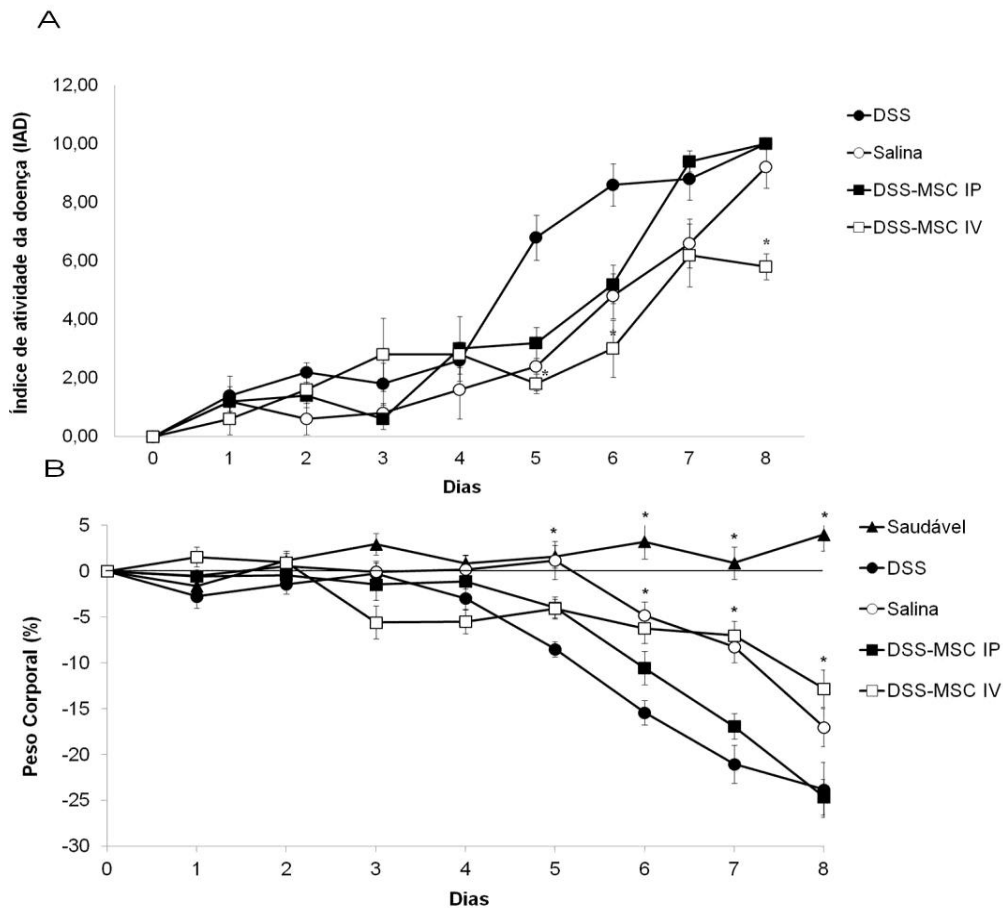


Figura 12: Análise clínica de animais dos diferentes grupos experimentais. O transplante intravenoso de MSCs protege contra a colite aguda induzida por DSS. (A) Escore da atividade da doença. A partir do dia 5, o grupo DSS-MSC IV apresentou IAD significativamente menor que o grupo DSS não tratado. (B) Peso corporal. A partir do dia 6, a perda de peso diminuiu significativamente após a administração intravenosa de MSCs em relação ao grupo DSS não tratado. (* $P < 0.001$). (n = 5 animais/grupo).

Em relação à avaliação macroscópica do cólon, os grupos DSS não tratado, Salina e DSS-MSC IP demonstraram comprimento do cólon significativamente inferior ao grupo saudável ($P < 0.001$). Camundongos do grupo DSS-MSC IV não apresentaram alterações macroscópicas significativas em relação ao grupo saudável; no entanto, apresentaram diferença estatística no peso cólon em comparação com camundongos DSS não tratados ($P = 0.009$) (Figura 13).

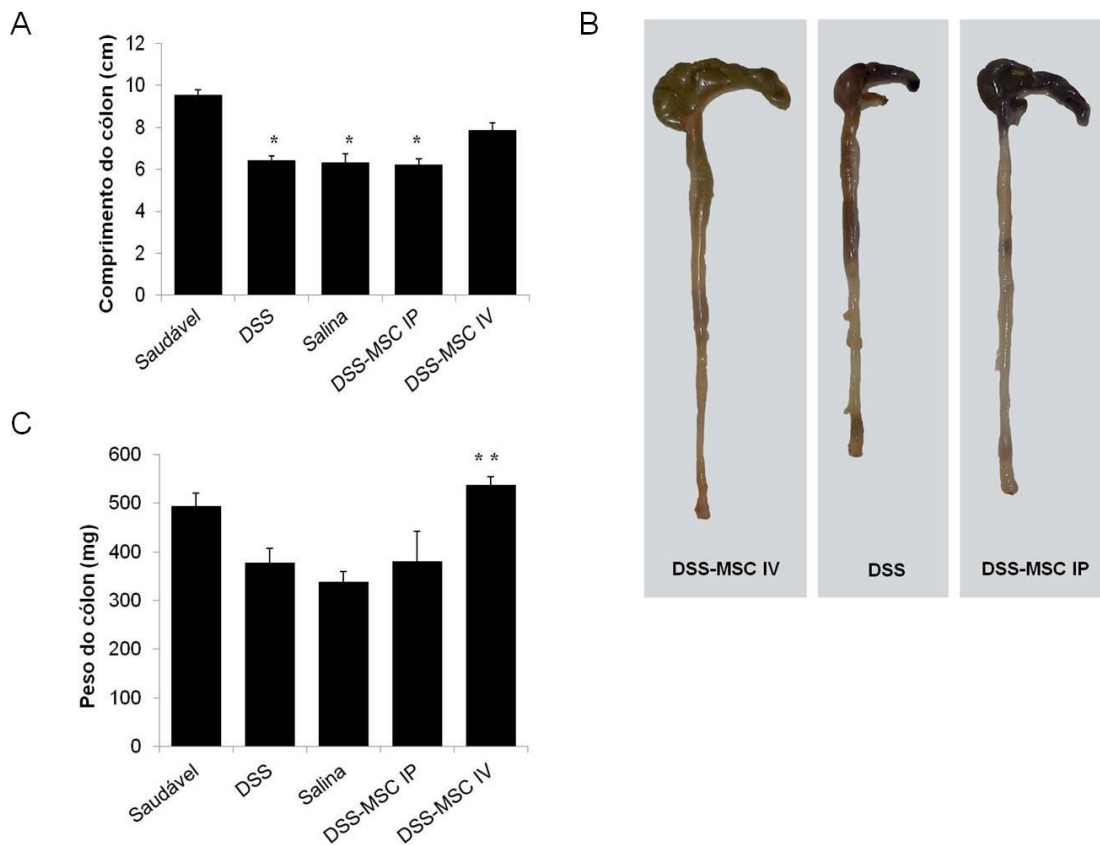


Figura 13: Avaliação macroscópica do cólon de animais dos diferentes grupos experimentais. (A) Comprimento do cólon. Os grupos DSS, Salina e DSS-MSC IP apresentaram comprimento de cólon significativamente menor do que o grupo saudável. (B) Fotografia de cólons mostrando a diferença de comprimento dos animais tratados pelas duas vias de terapia celular. (C) Peso do cólon. O Grupo DSS-MSC IV apresentou diferença estatística no peso do cólon em comparação ao grupo DSS não tratado. (* $P < 0.001$; ** $P = 0.009$). ($n = 5$ animais/grupo).

A análise histológica mostrou padrão similar para os grupos DSS não tratado, salina e DSS-MSC IP, porém houve diferença destes grupos em relação aos grupos DSS-MSC IV e saudável ($P < 0,05$). A intensa inflamação do cólon foi observada na camada mucosa e submucosa, com a perda de células caliciformes, dano a criptas, e extensa

ulceração da mucosa, além de áreas de edema na submucosa. Infiltração de células inflamatórias incluindo neutrófilos e células mononucleares também foi observada (Figura 14). Em contraste, o grupo DSS-MSV IV apresentou níveis inferiores de inflamação, que foi confinada à camada mucosa e à presença de mínima ulceração. Dados da pontuação histológica dos diferentes grupos estão apresentados na Figura 15.

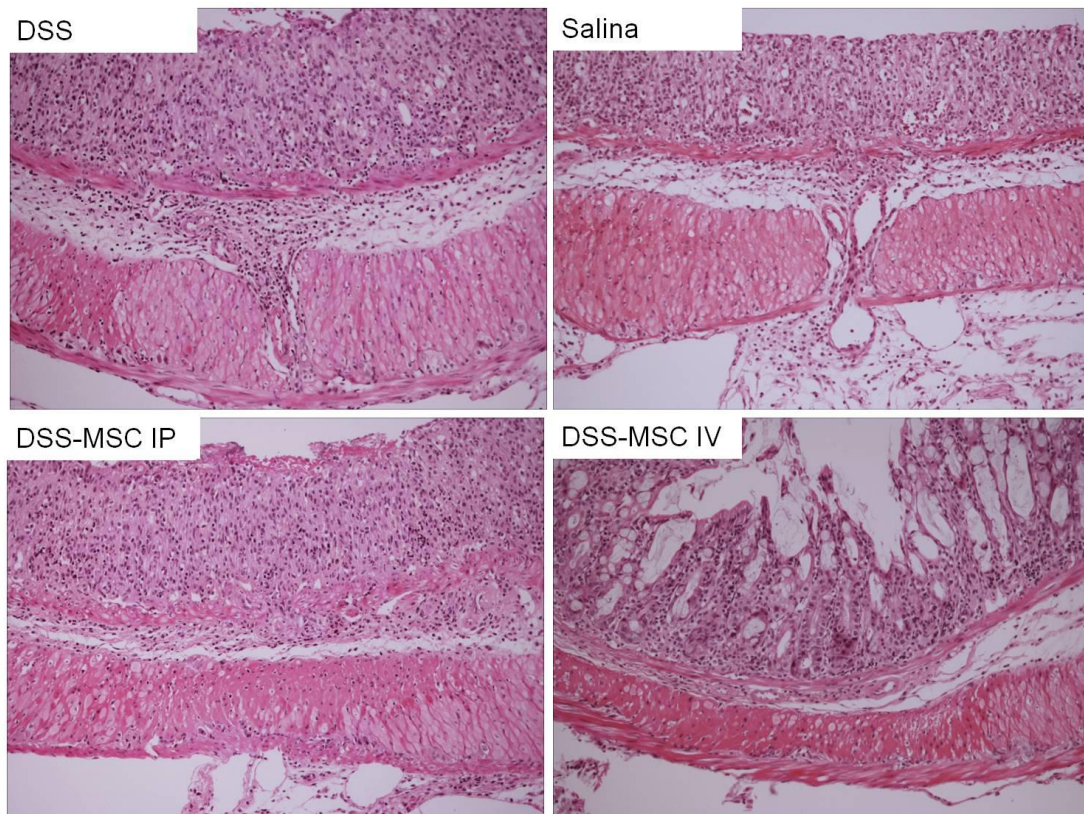


Figura 14: Fotomicrografia de cortes histológicos do cólon de animais dos diferentes grupos experimentais. O tratamento com MSCs via intravenosa promove a melhora histológica dos animais com colite induzida por DSS. A histologia do cólon demonstrou que o transplante intravenoso de MSC reduziu a extensão da área inflamada, dano à cripta e a infiltração de células inflamatórias. Coloração de H&E. (Barra= 200 μ m). (n = 5 animais/grupo).

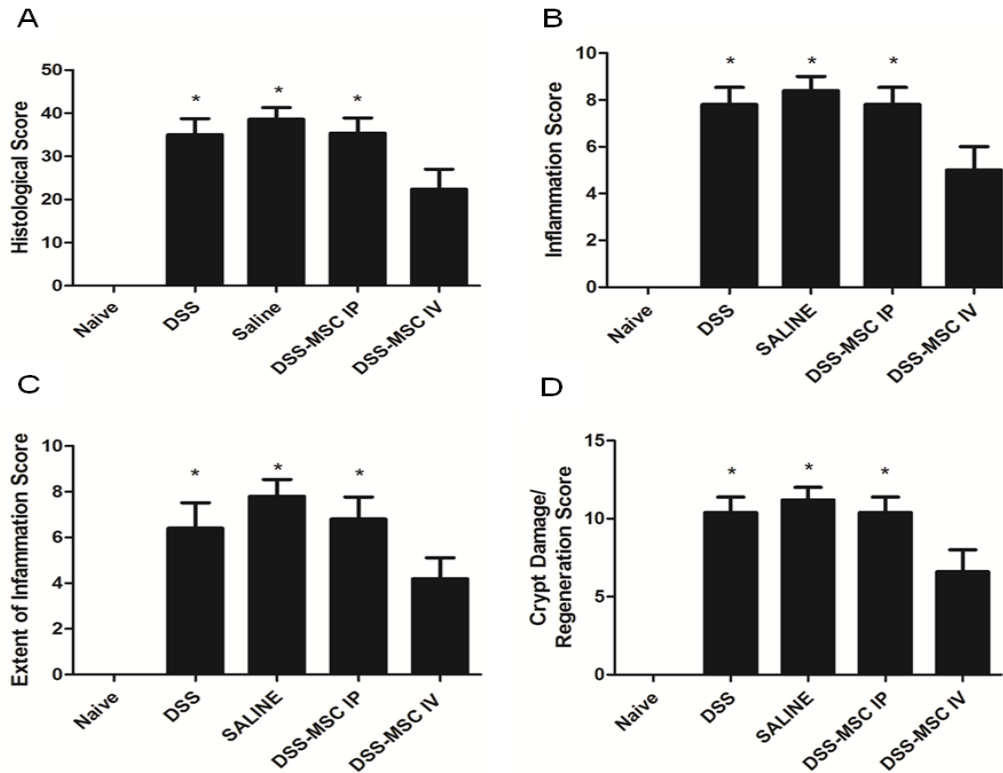


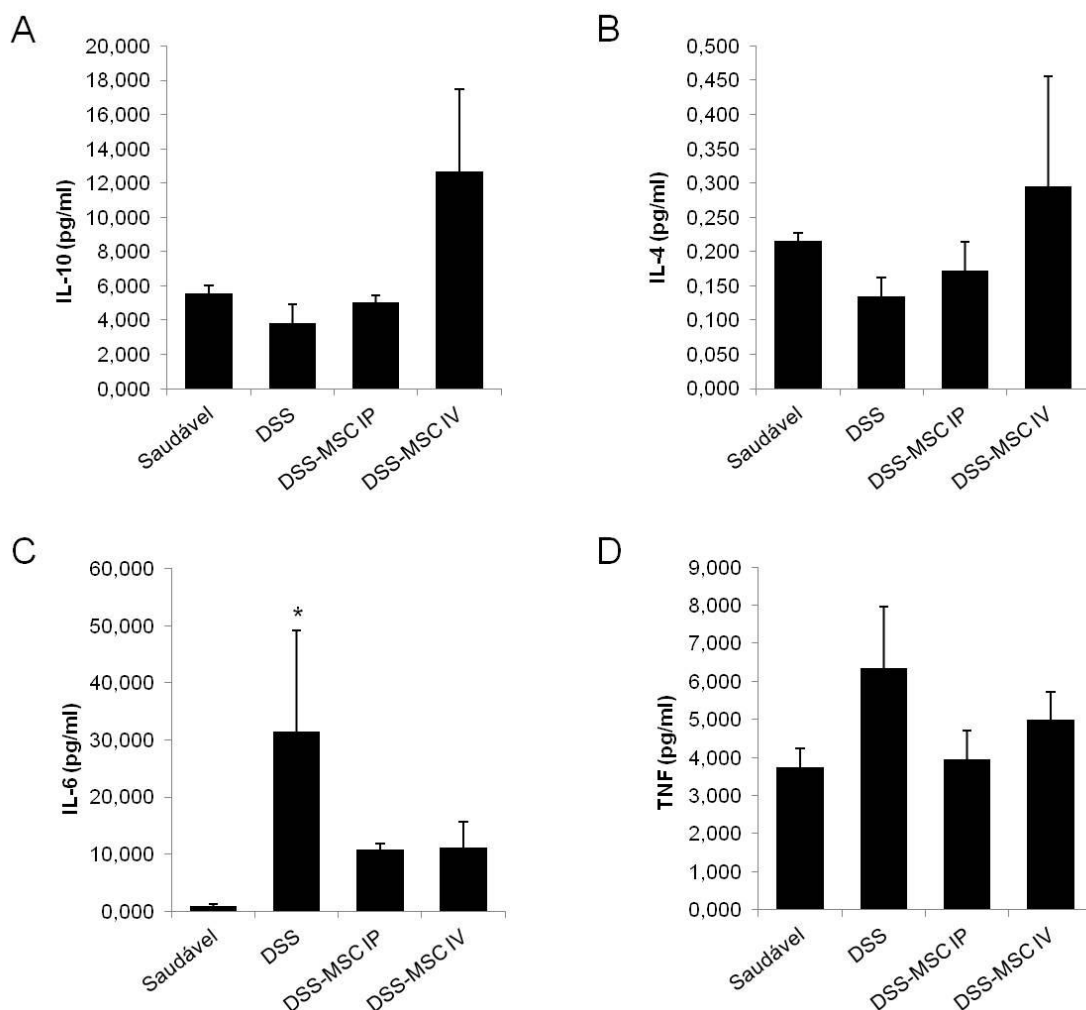
Figura 15: Escore histológico da colite dos animais tratados com MSCs. (A) Escore total. A análise histológica mostrou padrão semelhante para os grupos DSS não tratado, Salina e DSS-MSC IP, mas diferente para DSS-MSC IV e saudável. (B) Escore da inflamação. (C) Escore da extensão da inflamação. (D) Escore de danos a criptas e regeneração. (* $P < 0.05$). (n = 5 animais/grupo).

Influência do transplante de MSCs nos valores séricos de citocinas na colite aguda experimental

As citocinas são os principais mediadores da resposta imune inata e adaptativa na inflamação da mucosa. Para analisar o efeito de MSCs na produção de mediadores inflamatórios envolvidos na colite aguda, foi analisado o perfil sérico de citocinas. Citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 são conhecidas como mediadores dos processos inflamatórios crônicos. Os níveis de IL-10 e IL-4 nos animais induzidos com DSS não diferiram estatisticamente do grupo saudável, embora o grupo DSS-MSC IV tenha demonstrado maiores níveis destas citocinas (Figura 16A e 16B).

Citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF desempenham papéis fundamentais na mediação de reações inflamatórias agudas. Como esperado, a colite aguda por DSS aumentou os níveis de IL-6 significativamente quando comparados ao grupo saudável

($P = 0.013$). Apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa, os grupos tratados com MSCs apresentaram menores níveis de IL-6 que o grupo DSS não tratado (Figura 16C). Os níveis de TNF foram maiores no grupo DSS não tratado; entretanto, os dados não foram estatisticamente significativos (Figura 16D). As citocinas pró-inflamatórias IL-2 e IFN estão relacionadas com a inflamação crônica. Portanto, o nível de IL-2 entre os grupos não diferiu estatisticamente; mesmo assim, houve uma redução desta citocina em animais tratados com MSCs (Figura 16E). Os níveis de IFN no grupo DSS-MSC IV foram significativamente mais elevados do que no grupo saudável ($P = 0.022$) (Figura 16F). Os níveis de IL-17A, citocina pró-inflamatória, foram semelhantes entre os grupos DSS não tratado e saudável, sugerindo que o modelo de colite aguda por DSS não exibe um perfil Th17 (Figura 16G).



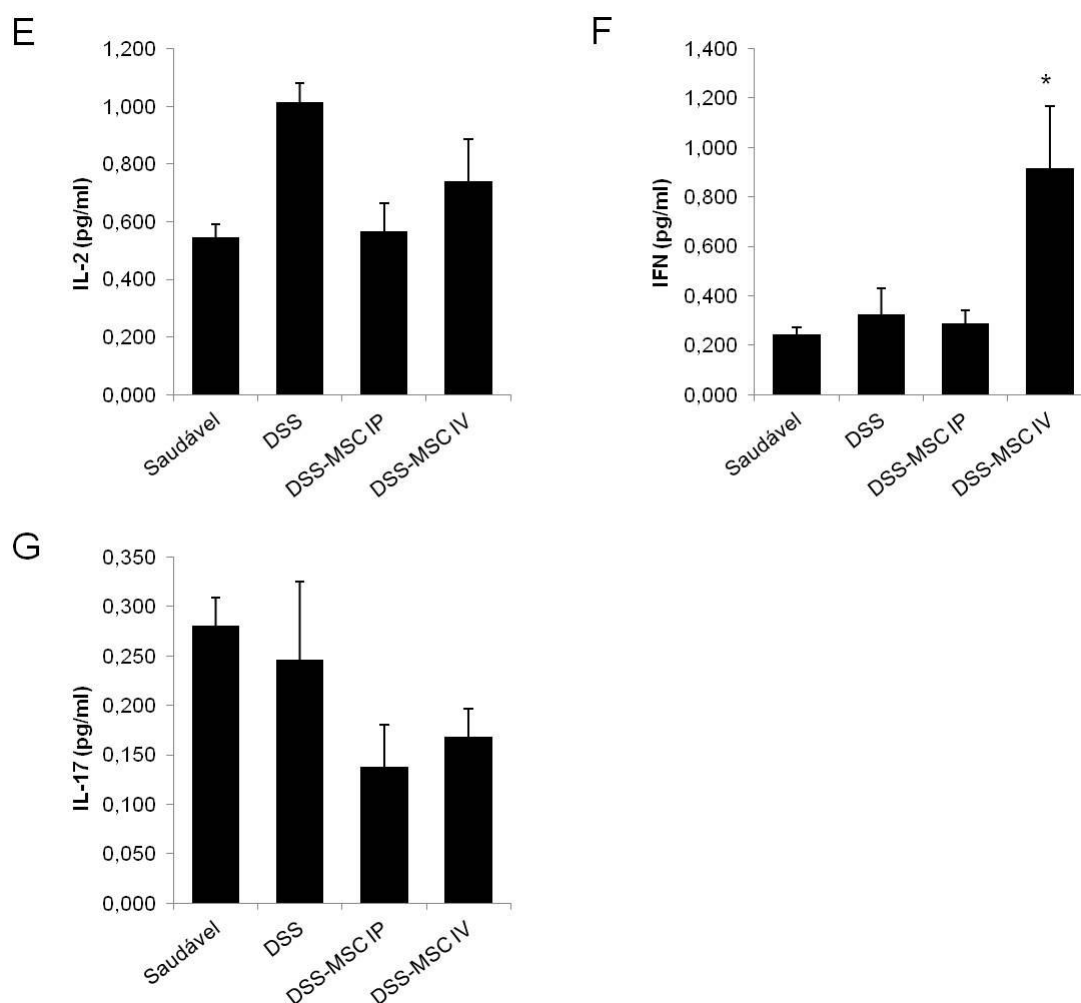


Figura 16: Efeito do transplante de MSC nos níveis séricos de citocinas pró e anti-inflamatórias. (A e B) Níveis de IL-10 e IL-4 de animais administrados com DSS não diferem destas citocinas. (C) A colite aguda por DSS demonstrou níveis de IL-6 significativamente elevados quando comparados ao grupo saudável. Apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa, os grupos tratados com MSCs apresentaram menores níveis de IL-6 que o grupo DSS não tratado. (D) Os níveis de TNF foram maiores no grupo de DSS não tratado, porém não foi estatisticamente significativo. (E) Os níveis de IL-2 não diferem estatisticamente entre os grupos; mesmo assim, houve uma redução desta citocina em animais tratados com MSCs. (F) Os níveis de IFN no grupo DSS-MSC IV foram significativamente maiores do que o grupo saudável. (G) Os níveis de IL-17 foram semelhantes entre os grupos. (* $P < 0.005$). (n = 5 animais/grupo).

Efeito da administração intravenosa de MSCs na apoptose de linfócitos

Sabe-se que a presença de células T resistentes à apoptose na colite ulcerativa contribui para a inadequada acumulação e perpetuação da inflamação do cólon. Neste

modelo de colite induzida por DSS, o número de células mononucleares TUNEL-positivas foi significativamente maior em animais do grupo DSS-MSC IV, em comparação com o grupo DSS não tratado ($P = 0.027$). Observaram-se fragmentação de DNA nos grupos DSS não tratado e DSS-MSC IP; entretanto, este comportamento foi mais proeminentes no epitélio e na lâmina própria dos animais do grupo DSS-MSC IV.

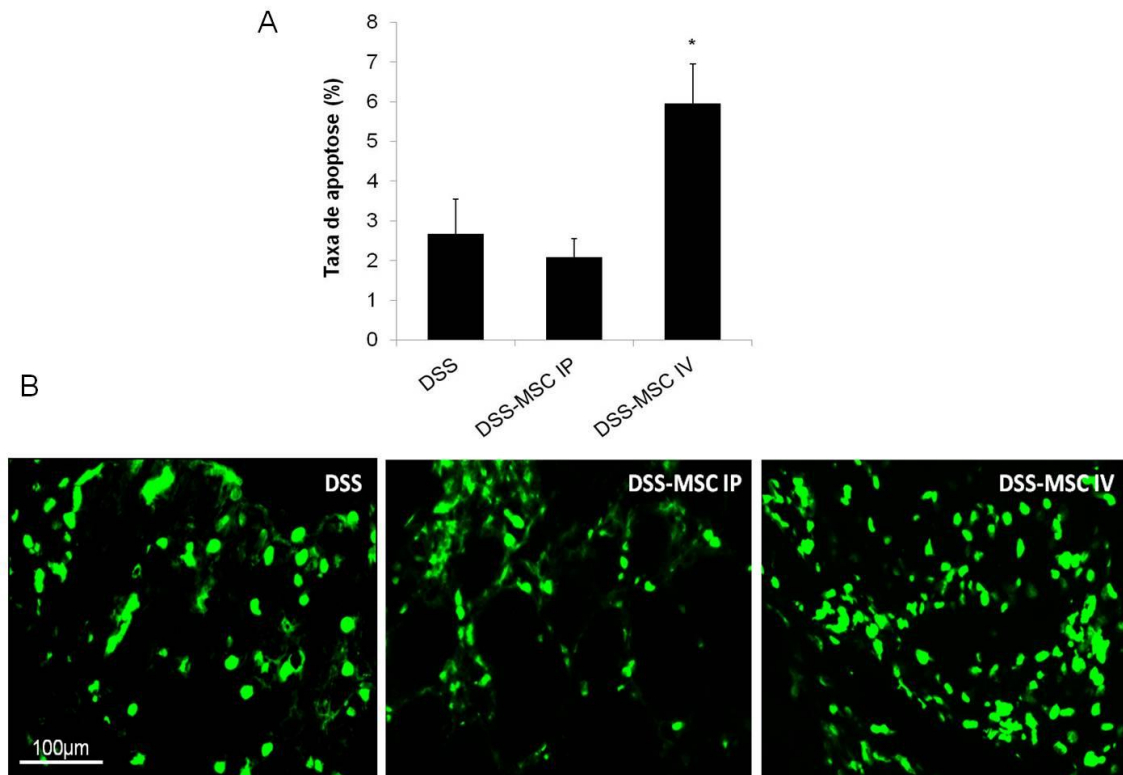


Figura 17: Apoptose de células T nos animais com colite induzida por DSS. (A) Taxa de apoptose. O número de células mononucleares TUNEL-positivas foi significativamente maior em animais do grupo DSS-MSC IV, em comparação com o grupo DSS não tratado. (B) Fotomicrografia do ensaio de TUNEL mostrando células em apoptose fluorescentes. Células em apoptose foram mais proeminentes no epitélio e na lâmina própria do grupo DSS-MSC IV. (* $P = 0.027$). (Barra = 100 μm).

Análise dos parâmetros de estresse oxidativo e das propriedades antioxidantes das MSCs

Primeiramente, foi investigado o papel da colite experimental na peroxidação lipídica. A administração de 2% DSS resultou no aumento significativo dos níveis de TBA-RS do cólon quando comparado ao grupo saudável (naive) [$t_{(11)} = -4.384$, $P <$

0.001] (Figura 18). Posteriormente, foram determinados os efeitos da administração de DSS na atividade da enzima antioxidante SOD. Observou-se que a colite induzida por DSS diminuiu significativamente a atividade da SOD no cólon, em comparação com o grupo saudável (naive) [$t_{(6)} = 2.745, P < 0.05$] (Figura 19A). Por outro lado, não houve nenhuma alteração da CAT (Figura 19B). O passo seguinte foi investigar o efeito da colite experimental sobre as concentrações de GSH no cólon. Verificou-se que a colite induzida por DSS diminuiu os níveis de GSH quando comparado ao grupo saudável. Em seguida, avaliou-se o papel do transplante de MSCs nos níveis de GSH diminuídos pela colite experimental. Pode-se observar que as MSCs foram capazes de reverter a diminuição nos níveis de GSH causada pela colite induzida por DSS [$F_{(2,13)} = 10.890, P < 0.01$] (Figura 20).

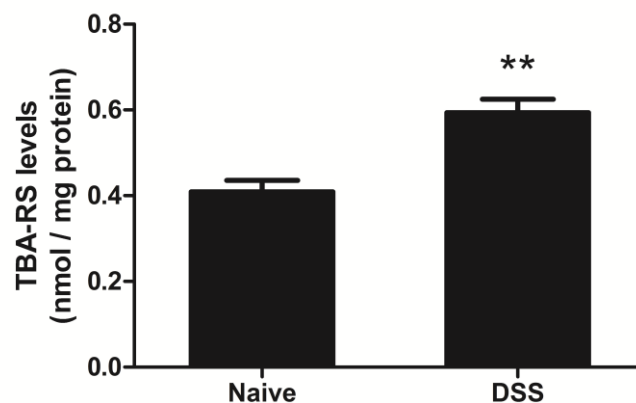


Figura 18: Efeito da colite induzida por DSS nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) no cólon inflamado. Os valores estão expressos em médias \pm erro padrão de 3-7 experimentos independentes (animais), realizados em triplicata. ** $P < 0.001$, em comparação ao grupo saudável (naive) (teste t de Student).

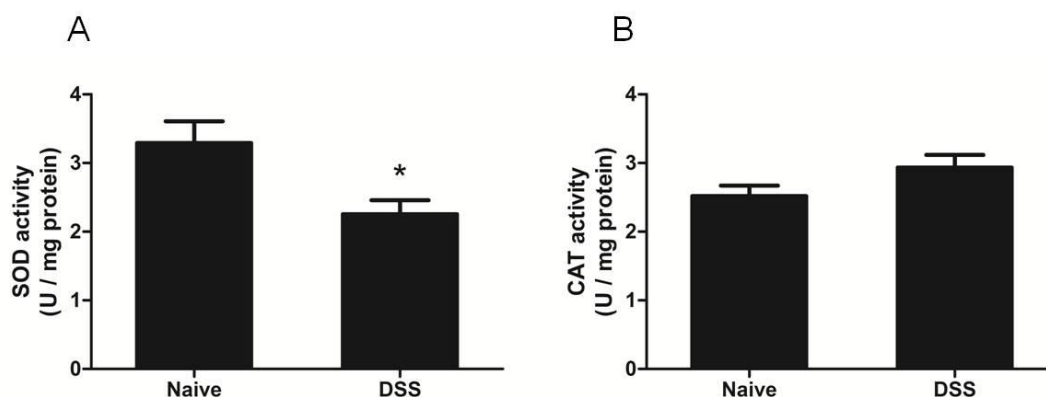


Figura 19: Efeito da colite induzida por DSS na atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT). Atividade da SOD (A). Atividade da CAT (B). Os valores são expressos em médias \pm erro padrão de

3-7 experimentos independentes (animais), realizados em triplicata. * $P < 0.05$, em comparação com o grupo saudável (naive) (teste t de Student).

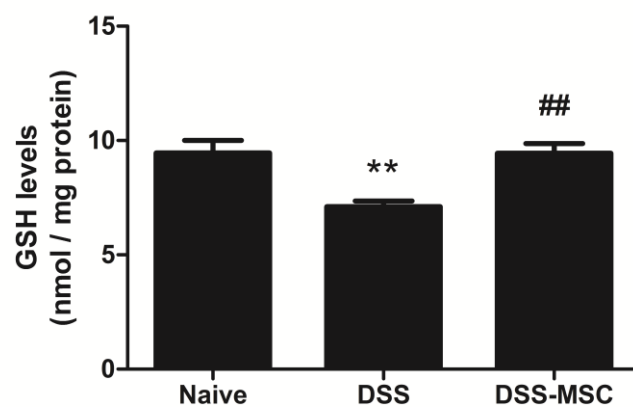


Figura 20: Efeito de MSCs nos níveis de glutathiona reduzida (GSH). Os valores estão expressos em médias \pm erro padrão de 3-7 experimentos independentes (animais), realizados em triplicata. ** $P < 0.001$, em relação ao grupo saudável (naive), # $P < 0.001$, em relação ao grupo DSS (teste de Duncan).

8. DISCUSSÃO

O modelo experimental de colite induzida por DSS tem sido amplamente utilizado para melhorar a compreensão no tratamento das DIIs. Esse modelo tem algumas vantagens quando comparado a outros modelos experimentais de colite, devido à facilidade de indução da inflamação intestinal, como a adição de DSS em água potável *ad libitum*, a baixa taxa de mortalidade e a alta reprodutibilidade (Bauer et al., 2010; He et al., 2012; Yazbeck et al., 2011). Além disso, modelos de colite aguda e crônica podem ser induzidos alterando a concentração e o ciclo de administração de DSS (Gonzalez-Rey, et al., 2009). No entanto, o mecanismo exato de indução da colite neste modelo ainda é desconhecido. Alguns autores sugerem que o aumento da apoptose e a diminuição da proliferação de células epiteliais podem levar a uma ruptura da função da barreira epitelial, facilitando assim a invasão de micro-organismos na mucosa intraluminal (Araki, et al., 2010).

Estudos de colite induzida por DSS sugerem que a gravidade da inflamação é dependente da concentração, do peso molecular, e da duração da suplementação de DSS, além da linhagem consanguínea dos animais (Vowinkel, et al., 2004). No presente estudo, a administração oral de DSS de alto peso molecular induziu sinais clínicos como diarreia e perda de peso, também alterações histológicas da mucosa do cólon, especialmente no cólon distal. Somado a isso, foi demonstrada a gravidade da colite com alterações macroscópicas do cólon quando administrados DSS de alto peso molecular em diferentes concentrações (HDSS2% e HDSS5%). Em contraste, nos animais que receberam DSS de baixo peso molecular (LDSS5%) não houve diferença significativa nos parâmetros macroscópicos (em comparação com o grupo saudável), além de manifestar sinais menos severos da doença em relação aos outros grupos experimentais. O que está de acordo com o trabalho de Kitajima e colaboradores (2000) que compararam DSS de diferentes pesos moleculares (5 e 40 kD). A colite induzida por DSS de 40 kD apresentou-se mais severa do que a de 5 kD. Dessa forma, o peso molecular de DSS é uma consideração importante para a indução reproduzível da colite experimental neste modelo. Ainda, no nosso modelo de colite induzido por DSS de elevado peso molecular, a fase aguda foi caracterizada por danos a criptas e inflamação da mucosa e submucosa com células inflamatórias, que se prolongaram ao

longo do cólon. O grupo HDSS2% apresentou inflamação aguda do cólon, seguido por uma lenta regeneração do epitélio. No entanto, o grupo HDSS5% não demonstrou nenhuma capacidade de regeneração do epitélio. Esse resultado vai ao encontro do trabalho de Egger e colaboradores (2000) que testaram quatro concentrações diferentes de DSS (0, 2.5, 5 e 7.5%), durante 7 dias. Seus resultados demonstraram que a lesão aguda da mucosa do cólon induzida por DSS é diretamente dependente da concentração deste, uma vez que foi observado um aumento nos danos à cripta e nas citocinas pró-inflamatórias.

Outra questão importante a respeito do desenvolvimento do modelo animal de colite é a linhagem dos camundongos. Alguns autores demonstraram que a linhagem C57BL/6 é resistente à inflamação no ceco, porém mais suscetíveis no cólon; em contraste com outras linhagens testadas como DBA/2J, que demonstraram suscetibilidade intermediária no ceco, sendo mais resistente no cólon (Mahler et al., 1998). Essas alterações na expressão da doença têm sido atribuídas a diferenças genéticas na capacidade da mucosa para resistir a danos inflamatórios.

Assim, a identificação de diferenças na resposta dos camundongos ao DSS pode fornecer a base para investigações da suscetibilidade ou resistência à colite. Uma vez que a lesão gerada no cólon de camundongos C57BL/6 tem uma capacidade de regeneração tecidual no modelo de HDSS2%, este se torna mais adequado para o estudo de alternativas terapêuticas na colite ulcerativa.

Estudos anteriores com evidências das propriedades regenerativas das MSCs indicam que estas podem promover a regeneração de lesões teciduais. Após receber sinais biológicos apropriados durante a lesão ou inflamação dos tecidos, as MSCs podem migrar para locais afetados e ajudar na sua recuperação, tendo um alto potencial terapêutico no reparo tecidual e no controle da inflamação local (Abdi et al., 2008).

Diversos estudos pré-clínicos utilizaram as MSC no tratamento da colite induzida por DSS, e as vias de transplante variaram entre: intraperitoneal (Gonzalez-Rey et al., 2009; Anderson et al., 2012), intravenosa (Tanaka et al., 2008; He et al., 2012, Wei et al., 2009) e intracolônica (Zhou et al., 2009; Hayashi et al., 2010). Nestes estudos, animais tratados com MSCs por diferentes vias demonstraram melhora clínica e histopatológica significativas quando comparados com animais não tratados. Os

mecanismos direcionados ao *homing in vivo* e a enxertia das MSCs não estão bem descritos na literatura e dependem da interação complexa entre vários eventos de sinalização celular. Portanto, é importante elucidar a melhor via de transplante para promover uma eficaz migração celular ao cólon inflamado. No presente estudo, foram testadas duas diferentes vias de transplante de MSCs em modelo murino de colite ulcerativa, a fim de avaliar a sua funcionalidade e o efeito de seu potencial terapêutico. Nossos resultados mostraram que o tratamento intravenoso de MSCs diminui a atividade da doença e a perda de peso corporal. Além disso, os animais tratados com MSCs via intravenosa não apresentaram alterações macroscópicas significativas do cólon em relação ao grupo saudável. A avaliação histopatológica apresentou níveis inferiores de inflamação que foi confinada à camada mucosa com mínima presença de ulceração. Entretanto, o tratamento por via intraperitoneal de MSCs não demonstrou melhora na colite induzida por DSS. Os resultados obtidos aqui diferem dos dados de Castelo-Branco e colaboradores (2012), que investigaram o recrutamento de MSCs para a mucosa intestinal após administração intraperitoneal e intravenosa na colite induzida por TNBS e demonstraram que MSCs injetadas pela via intraperitoneal migram e colonizam o cólon inflamado, comportamento não observado nas células transplantadas por via intravenosa. A diferença entre nossos resultados e os resultados de Castelo-Branco está provavelmente associada aos diferentes modelos experimentais de DII. A colite induzida por TNBS é semelhante à DC em humanos; em contraste, o modelo de colite induzido por DSS é semelhante à colite ulcerativa. É sabido que a DC e a colite ulcerativa experimental apresentam diferenças patológicas e, conseqüentemente, perfil de citocinas distinto (Alex et al., 2009). Portanto, as vias de administração de MSCs e a migração para o cólon inflamado podem variar de acordo com o modelo experimental realizado. Dessa forma, em resposta aos fatores secretados durante a inflamação e às características histopatológicas e fisiológicas em nosso modelo de colite aguda experimental, o transplante intravenoso demonstrou ser a melhor via para que as células possam exercer seu potencial de reparação tecidual e imunomodulatório na mucosa inflamada.

MSCs exógenas têm a capacidade de regular a resposta imune envolvida na patogênese das DIIs. As MSCs reduzem a inflamação do cólon pela baixa regulação da

produção de mediadores inflamatórios a partir de células do sistema imune das mucosas e através do aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (Gonzalez-Rey et al., 2009). As citocinas produzidas por infiltrados celulares e macrófagos residentes desempenham um papel crítico na destruição do tecido do cólon, pois modulam funções celulares biológicas importantes e medeiam a proliferação e diferenciação de células do sistema imune. Na DII, a resposta imunológica desregulada é refletida pelo desequilíbrio de células T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2), e pelo perfil de produção de citocinas em diferentes fases do processo da doença. Neste sentido, a colite ulcerativa foi primeiramente associada com a resposta de Th2 (Alex et al., 2009; Bamias et al., 2011). Entretanto, estudos têm indicado um perfil Th1 para a colite ulcerativa e Th17 para as manifestações crônicas da inflamação intestinal (Yen et al., 2006; Fuss et al., 2008; Feng et al., 2011). Observamos que os níveis de citocinas Th17 do soro dos animais DSS não tratados foram semelhantes aos níveis de animais saudáveis. Estes resultados sugerem que, no modelo de colite aguda induzida por DSS, as células Th do cólon exibem um perfil de citocinas Th1 e Th2, mas não um perfil Th17 (Kim et al., 2011). O tratamento intravenoso de MSCs aumentou os níveis de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4, e diminuiu o nível da citocina pró-inflamatória IL-6, embora essas diferenças não sejam significativas. Os níveis de IFN no grupo tratado por MSCs via intravenosa foram significativamente elevados. Sheng e colaboradores (2008) demonstraram que níveis elevados de IFN produzido pelas células T conduzem a ativação das MSCs, aumentando o seu efeito imunossupressor.

Neste estudo, foi analisada a taxa de apoptose no cólon inflamado. Sabe-se que há uma redução da apoptose de células T em pacientes com DII (Bu et al., 2001). O aumento de IL-10 e/ou o bloqueio da sinalização de IL-6 pode induzir a apoptose em células T resistentes à apoptose (Atreya et al., 2000; Bailey et al., 2006). Embora os mecanismos exatos da supressão mediada pelas MSC na proliferação de linfócitos permaneçam praticamente desconhecidos, é possível que as MSCs possam acelerar a apoptose de células inflamatórias ativas. Akiyama e colaboradores (2012) mostraram que a infusão sistêmica de MSCs induz a apoptose das células T via ligante Fas (FasL)-dependente de Fas e pode melhorar a colite induzida por DSS. Nossos dados estão de acordo com esse estudo, pois se verificou menos células em apoptose presentes no

grupo DSS não tratado. Estas células foram mais proeminentes no epitélio e na lâmina própria do grupo MSC tratado via intravenosa.

O presente estudo investigou os efeitos de MSCs no tratamento da colite induzida por DSS, medindo parâmetros intestinais de estresse oxidativo. Os resultados proporcionaram evidência experimental de que o modelo de colite induzida por DSS é particularmente susceptível ao estresse oxidativo. Dessa forma, os níveis de TBA-RS, um marcador de peroxidação lipídica, aumentaram significativamente no cólon de camundongos com colite. Os níveis de TBA-RS refletem principalmente a formação de malondialdeído (MDA), um produto tóxico que leva ao dano oxidativo lipídico (Halliwell and Gutteridge, 2007). Isto está de acordo com estudos anteriores que mostraram um aumento nos níveis de TBA-RS em modelos experimentais de colite (Fillmann et al., 2007; Damiani et al., 2007). Tem sido sugerido que uma diminuição da atividade de SOD é devido as ROS que provocam uma modificação específica de aminoácidos. Dessa forma, a redução da atividade da SOD pode levar ao excesso de ânions superóxido que normalmente gera outras formas de radicais que poderiam contribuir para o dano oxidativo lipídico e de proteína (Fernandes et al., 2013). Os parâmetros de GSH avaliam a capacidade antioxidante não enzimática tecidual (Halliwell and Gutteridge, 2007). Nesse sentido, os baixos níveis de GSH, nos animais com colite, demonstraram comprometimento dessa defesa natural. Tem-se observado que as MSCs têm um efeito antioxidante, reduzindo o stress oxidativo (Eirin et al., 2012; Uccelli et al., 2012) em outros modelos experimentais. Nossos resultados sugerem que as MSCs desempenham um papel importante na reversão de danos oxidativos no cólon de animais com colite induzida por DSS, já que aumentaram os níveis de GSH diminuídos durante a colite experimental. Entretanto, estudos adicionais realizados nos cólons desses animais são necessários para confirmar o papel de MSCs no estresse oxidativo.

De nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia diferentes vias de transplante de MSCs e o seu potencial antioxidante para o modelo experimental de colite induzida por DSS. Verificamos que a administração intravenosa é a melhor via de infusão de MSCs por melhorar os sinais de inflamação do cólon. Ao contrário, a via intraperitoneal não demonstrou nenhuma melhora em qualquer dos parâmetros avaliados. Isso pode estar relacionado às propriedades celulares migratórias,

capacidade imunomoduladora e de reparação tecidual. Ensaio *in vitro* utilizando culturas organotípicas e experimentos com medicamentos e MSCs estão sendo desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa na tentativa de fornecer mais subsídios para a compreensão dos mecanismos celulares, moleculares e imunológicos envolvidos na terapia celular para a colite experimental.

9. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho nos permitem concluir que:

1. Foi possível isolar, expandir e caracterizar células-tronco mesenquimais de camundongos C57BL/6 de acordo com as normas da Sociedade Internacional de Terapia Celular.
2. Foi possível induzir colite experimental aguda em camundongos C57B/6, considerando-se que os diferentes pesos moleculares e concentrações de DSS influenciam na severidade da colite experimental e são parâmetros importantes para o desenvolvimento de um modelo adequado para estudos que visam a regeneração da mucosa do cólon inflamado.
3. O transplante de células-tronco mesenquimais foi realizado com sucesso, ressaltando-se que a via intravenosa foi a mais efetiva, sendo observada a diminuição da atividade clínica da doença, reversão da perda ponderal, assim como as alterações histopatológicas.
4. O modelo murino de colite induzida por DSS parece apresentar um perfil de citocinas Th1 e Th2, e o transplante de células-tronco mesenquimais alterou esse perfil, embora nem todas as quantificações tenham apresentado diferenças estatísticas.
5. O transplante intravenoso de células-tronco mesenquimais estimulou células T da mucosa do cólon a entrarem em apoptose.
6. O modelo induzido por DSS é suscetível ao estresse oxidativo, e as MSCs apresentam um potencial antioxidante no cólon inflamado.

10. REFERÊNCIAS

1. ABDI, R., P. FIORINA, C. N. ADRA, M. ATKINSON and M. H. SAYEGH, 2008 Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes* 57: 1759-1767.
2. AEBI, H., 1984 Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126.
3. ACTIS, C. G., P. ROSINA, F., 2013 Inflammatory bowel disease: An acheatype disorder of outer environment sensor systems. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 4(3): 41-46.
4. AGGARWAL, S., and M. F. PITTENGER, 2005 Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105: 1815-1822.
5. AKIYAMA, K., C. CHEN, D. WANG, X. XU, C. QU *et al.*, 2012 Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* 10: 544-555.
6. ALEX, P., N. C. ZACHOS, T. NGUYEN, L. GONZALES, T. E. CHEN *et al.*, 2009 Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* 15: 341-352.
7. ANDERSON, P., L. SOUZA-MOREIRA, M. MORELL, M. CARO, F. O'VALLE *et al.*, 2013 Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut* 62: 1131-1141.
8. ARAKI, Y., K. MUKAISYO, H. SUGIHARA, Y. FUJIYAMA and T. HATTORI, 2010 Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Oncol Rep* 24: 869-874.
9. ATREYA, R., J. MUDTER, S. FINOTTO, J. MULLBERG, T. JOSTOCK *et al.*, 2000 Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 6: 583-588.
10. BAILEY, D. P., M. KASHYAP, L. A. BOUTON, P. J. MURRAY and J. J. RYAN, 2006 Interleukin-10 induces apoptosis in developing mast cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 80: 581-589.

11. BAMIAS, G., G. KALISA and S. D. LADAS, 2011 Cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Discov Med* 11: 459-467.
12. BARBASH, I. M., P. CHOURAQUI, J. BARON, M. S. FEINBERG, S. ETZION *et al.*, 2003 Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108: 863-868.
13. BAUER, C., P. DUEWELL, C. MAYER, H. A. LEHR, K. A. FITZGERALD *et al.*, 2010 Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut* 59: 1192-1199.
14. BEYER NARDI, N., and L. DA SILVA MEIRELLES, 2006 Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*: 249-282.
15. BIELBY, R., E. JONES and D. MCGONAGLE, 2007 The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury* 38 Suppl 1: S26-32.
16. BOUMA, G., and W. STROBER, 2003 The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3: 521-533.
17. BROWNE, R. W., and D. ARMSTRONG, 1998 Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108: 347-352.
18. BU, P., A. KESHAVARZIAN, D. D. STONE, J. LIU, P. T. LE *et al.*, 2001 Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system. *J Immunol* 166: 6399-6403.
19. CAPLAN, A. I., 2005 Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11: 1198-1211.
20. CASTELO-BRANCO, M. T., I. D. SOARES, D. V. LOPES, F. BUONGUSTO, C. A. MARTINUSO *et al.*, 2012 Intraperitoneal but not intravenous cryopreserved mesenchymal stromal cells home to the inflamed colon and ameliorate experimental colitis. *PLoS One* 7: e33360.
21. COSNES, J., C. GOWER-ROUSSEAU, P. SEKSIK and A. CORTOT, 2011 Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140: 1785-1794.

22. DA SILVA MEIRELLES, L., P. C. CHAGASTELLES and N. B. NARDI, 2006 Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119: 2204-2213.
23. DAMIANI, C. R., C. A. BENETTON, C. STOFFEL, K. C. BARDINI, V. H. CARDOSO *et al.*, 2007 Oxidative stress and metabolism in animal model of colitis induced by dextran sulfate sodium. *J Gastroenterol Hepatol* 22: 1846-1851.
24. DI NICOLA, M., C. CARLO-STELLA, M. MAGNI, M. MILANESI, P. D. LONGONI *et al.*, 2002 Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838-3843.
25. DIELEMAN, L. A., M. J. PALMEN, H. AKOL, E. BLOEMENA, A. S. PENA *et al.*, 1998 Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 114: 385-391.
26. DUIJVESTEIN, M., I. MOLENDIJK, H. ROELOFS, A. C. VOS, A. P. VERHAAR *et al.*, 2011 Mesenchymal stromal cell function is not affected by drugs used in the treatment of inflammatory bowel disease. *Cytotherapy* 13: 1066-1073.
27. DUIJVESTEIN, M., A. C. VOS, H. ROELOFS, M. E. WILDENBERG, B. B. WENDRICH *et al.*, 2010 Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut* 59: 1662-1669.
28. EGGER, B., M. BAJAJ-ELLIOTT, T. T. MACDONALD, R. INGLIN, V. E. EYSSELEIN *et al.*, 2000 Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* 62: 240-248.
29. EIRIN, A., X. Y. ZHU, J. D. KRIER, H. TANG, K. L. JORDAN *et al.*, 2012 Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve revascularization outcomes to restore renal function in swine atherosclerotic renal artery stenosis. *Stem Cells* 30: 1030-1041.
30. ELSHEIKH, W., K. L. FLANNIGAN, W. MCKNIGHT, ET AL., 2012 Dextran sulfate sodium induces pan-gastroenteritis in rodents: implication for studies of colitis. *Journal of Physiology and Pharmacology* 63(5): 463-469.
31. ENGLISH, K., 2013 Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 91: 19-26.

32. FENG, T., H. QIN, L. WANG, E. N. BENVENISTE, C. O. ELSON *et al.*, 2011 Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. *J Immunol* 186: 6313-6318.
33. FERNANDES, C. G., M. S. DA ROSA, B. SEMINOTTI, P. PIEROZAN, R. W. MARTELL *et al.*, 2013 In vivo experimental evidence that the major metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency induce oxidative stress in striatum of developing rats: a potential pathophysiological mechanism of striatal damage in this disorder. *Mol Genet Metab* 109: 144-153.
34. FILLMANN, H., N. A. KRETZMANN, B. SAN-MIGUEL, S. LLESUY, N. MARRONI *et al.*, 2007 Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology* 236: 217-226.
35. FISCHER, U. M., M. T. HARTING, F. JIMENEZ, W. O. MONZON-POSADAS, H. XUE *et al.*, 2009 Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev* 18: 683-692.
36. FUSS, I. J., 2008 Is the Th1/Th2 paradigm of immune regulation applicable to IBD? *Inflammatory Bowel Diseases* 14 Suppl 2: S110-112.
37. GARCIA-OLMO, D., D. HERREROS, I. PASCUAL, J. A. PASCUAL, E. DEL-VALLE *et al.*, 2009 Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 52: 79-86.
38. GEBLER, A., O. ZABEL and B. SELIGER, 2012 The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med* 18: 128-134.
39. GONCALVES FDA, C., A. H. PAZ, P. S. LORA, E. P. PASSOS and E. O. CIRNE-LIMA, 2012 Dynamic culture improves MSC adhesion on freeze-dried bone as a scaffold for bone engineering. *World J Stem Cells* 4: 9-16.
40. Goncalves F. C., N Schneider, H. F. Mello, E. P. Passos, L Meurer, E Cirne-Lima, A. H. R Paz, 2013 Characterization of acute murine dextran sodium sulfate (DSS) colitis: severity of inflammation is dependent on the DSS molecular weight and concentration. *Acta Scientiae Veterinariae* 41:1142.
41. GONZALEZ-REY, E., P. ANDERSON, M. A. GONZALEZ, L. RICO, D. BUSCHER *et al.*, 2009 Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 58: 929-939.

42. GONZALEZ, M. A., E. GONZALEZ-REY, L. RICO, D. BUSCHER and M. DELGADO, 2009 Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology* 136: 978-989.
43. GRIFFIN, M. D., T. RITTER and B. P. MAHON, 2010 Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. *Hum Gene Ther* 21: 1641-1655.
44. HALLIWELL B AND J. M. C. GUTTERIDGE 2007 Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death, in: B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press Inc., Oxford, pp. 187–340.
45. HALLIWELL B AND J. M. C. GUTTERIDGE 2007 Measurement of reactive species. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, pp 268–340.
46. HAO, L., H. SUN, J. WANG, T. WANG, M. WANG *et al.*, 2012 Mesenchymal stromal cells for cell therapy: besides supporting hematopoiesis. *Int J Hematol* 95: 34-46.
47. HAWKEY, C. J., 2012 Stem cells as treatment in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 30(suppl 3): 134-139.
48. HAYASHI, Y., S. TSUJI, M. TSUJII, T. NISHIDA, S. ISHII *et al.*, 2008 Topical implantation of mesenchymal stem cells has beneficial effects on healing of experimental colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 326: 523-531.
49. HE, X. W., X. S. HE, L. LIAN, X. J. WU and P. LAN, 2012 Systemic infusion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of experimental colitis in mice. *Dig Dis Sci* 57: 3136-3144.
50. HEAD, K. A., and J. S. JURENKA, 2003 Inflammatory bowel disease Part 1: ulcerative colitis--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* 8: 247-283.
51. HISAMATSU, T., Y. MIKAMI, K. MATSUOKA, T. KANAI, T. Hibi., 2012 Immunological abnormalities in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intestinal Research* 10(4): 317-323.
52. HISAMATSU, T., T. KANAI, T. Hibi., 2013 Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacology & Therapeutics* 137 (3): 283

53. HOENTJEN, F., A. SAKURABA, S. HANAUER, 2011 Update on the management of ulcerative colitis. *Curr Gastroenterology Rep* 13(5): 475-85.
54. HORWITZ, E. M., K. LE BLANC, M. DOMINICI, I. MUELLER, I. SLAPER-CORTENBACH *et al.*, 2005 Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7: 393-395.
55. IVANOVA-TODOROVA, E., I. BOCHEV, M. MOURDJEVA, R. DIMITROV, D. BUKAREV *et al.*, 2009 Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 126: 37-42.
56. JORGENSEN, C., F. DJOUAD, F. APPARAILLY and D. NOEL, 2003 Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy. *Gene Ther* 10: 928-931.
57. KIM, Y. S., M. H. LEE, A. S. JU and K. J. RHEE, 2011 Th17 responses are not induced in dextran sodium sulfate model of acute colitis. *Immune Netw* 11: 416-419.
58. KITAJIMA, S., S. TAKUMA and M. MORIMOTO, 2000 Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp Anim* 49: 9-15.
59. KRAMPERA, M., A. PASINI, G. PIZZOLO, L. COSMI, S. ROMAGNANI *et al.*, 2006 Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 6: 435-441.
60. LICHTENSTEIN, G. R., M. T. ABREU, R. COHEN and W. TREMAINE, 2006 American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 130: 940-987.
61. LIH-BRODY, L., S. R. POWELL, K. P. COLLIER, G. M. REDDY, R. CERCHIA *et al.*, 1996 Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 41: 2078-2086.
62. LOPEZ-IGLESIAS, P., A. BLAZQUEZ-MARTINEZ, J. FERNANDEZ-DELGADO, J. REGADERA, M. NISTAL *et al.*, 2011 Short and long term fate of human AMSC subcutaneously injected in mice. *World J Stem Cells* 3: 53-62.
63. LÖWENBERG, M., G. D'HAENS, 2013 Novel target for inflammatory bowel disease therapeutics. *Curr Gastroenterology Rep* 15(2): 311.

64. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
65. MACCARIO, R., M. PODESTA, A. MORETTA, A. COMETA, P. COMOLI *et al.*, 2005 Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 90: 516-525.
66. MAHLER, M., I. J. BRISTOL, E. H. LEITER, A. E. WORKMAN, E. H. BIRKENMEIER *et al.*, 1998 Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am J Physiol* 274: G544-551.
67. MARKLUND, S., 1985 Pyrogallol autoxidation. In: Greenwald RA (Editor), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 243-247.
68. MEYERROSE, T. E., M. ROBERTS, K. K. OHLEMILLER, C. A. VOGLER, L. WIRTHLIN *et al.*, 2008 Lentiviral-transduced human mesenchymal stem cells persistently express therapeutic levels of enzyme in a xenotransplantation model of human disease. *Stem Cells* 26: 1713-1722.
69. MONTEIRO, B. S., N. M ARGÔLO-NETO, R. J. DEL CARLO, 2008 Cellular therapy on bone repair – clinical application of mesenchymal stem cell. *Ciências veterinárias nos Trópicos* 11(2): 95-100.
70. MORIKAWA, S., Y. MABUCHI, Y. KUBOTA, Y. NAGAI, K. NIIBE *et al.*, 2009 Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* 206: 2483-2496.
71. MOWAT, C., C. ANDREW, A. WINDSOR, T. AHMAD ET AL., 2011 Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Journal of Physiology and Pharmacology* 63(5): 463-469. *Gut* 60: 571-607.
72. MUZES, G., B. MOLNÁR, F. SIPOS, 2012 Regulatory T cells in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *World J Gastroenterology* 18(40): 5688-5694.
73. MUZES, G., B. MOLNÁR, Z. HULASSAY, F. SIPOS, 2013 Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterology* 18 (41): 5848-5861.
74. NAUTA, A. J., and W. E. FIBBE, 2007 Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110: 3499-3506.

75. NAUTA, A. J., A. B. KRUISSELBRINK, E. LURVINK, R. WILLEMZE and W. E. FIBBE, 2006 Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 177: 2080-2087.
76. OLIVEIRA, F. M., A. P. C. EMERICK, E. G. SOARES, 2010 Epidemiology aspects of inflammatory bowel disease in the east region of Minas Gerais. *Cien Saud Colet* 15: S1:1031-1037.
77. PAZ, A. H., G. D. SALTON, A. AYALA-LUGO, C. GOMES, P. TERRACIANO *et al.*, 2011 Betacellulin overexpression in mesenchymal stem cells induces insulin secretion in vitro and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia in rats. *Stem Cells Dev* 20: 223-232.
78. PONDER, A., M. D. LONG, F. SIPOS, 2013 A Clinical review of recent finding in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clinical Epidemiology* 5: 237-247.
79. REN, G., L. ZHANG, X. ZHAO, G. XU, Y. ZHANG *et al.*, 2008 Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2: 141-150.
80. ROESSNER, A., D. KUESTER, P. MALFERTHEINER and R. SCHNEIDER-STOCK, 2008 Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathol Res Pract* 204: 511-524.
81. SALAS, A., E. RICART and J. PANES, 2009 Cell therapies for inflammatory bowel diseases. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 3: 321-324.
82. SANDBORN, W., 2012 The future of inflammatory bowel disease therapy: Where do we go from here? in rodents: implication for studies of colitis. *Dig Dis* 30(suppl 3): 140-144.
83. SEMINOTTI, B., A. U. AMARAL, M. S. DA ROSA, C. G. FERNANDES, G. LEIPNITZ *et al.*, 2013 Disruption of brain redox homeostasis in glutaryl-CoA dehydrogenase deficient mice treated with high dietary lysine supplementation. *Mol Genet Metab* 108: 30-39.
84. SHENG, H., Y. WANG, Y. JIN, Q. ZHANG, Y. ZHANG *et al.*, 2008 A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res* 18: 846-857.

85. SINGH, U. P., N. P. SINGH, B. SINGH, M. K. MISHRA, M. NAGARKATTI *et al.*, 2010 Stem cells as potential therapeutic targets for inflammatory bowel disease. *Front Biosci (Schol Ed)* 2: 993-1008.
86. SOUZA C. F., P NAPOLI, S. W. HAN, V.C. LIMA, A. C. C. CARVALHO, 2010 Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? *Revista Brasileira Cardiologia Invasiva* 18 (3): 344-53.
87. STROBER, W., I. J. FUSS and R. S. BLUMBERG, 2002 The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 20: 495-549.
88. SYDORA, B. C., E. J. ALBERT, R. R. FOSHAUG, J. S. DOYLE, T. A. CHURCHILL *et al.*, 2012 Intravenous injection of endogenous microbial components abrogates DSS-induced colitis. *Dig Dis Sci* 57: 345-354.
89. TANAKA, F., K. TOMINAGA, M. OCHI, T. TANIGAWA, T. WATANABE *et al.*, 2008 Exogenous administration of mesenchymal stem cells ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis via anti-inflammatory action in damaged tissue in rats. *Life Sci* 83: 771-779.
90. TRIVEDI, P. P., and G. B. JENA, 2012 Dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis leads to increased hematopoiesis and induces both local as well as systemic genotoxicity in mice. *Mutat Res* 744: 172-183.
91. UCCELLI, A., M. MILANESE, M. C. PRINCIPATO, S. MORANDO, T. BONIFACINO *et al.*, 2012 Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Med* 18: 794-804.
92. VICTORIA, C. R., L. Y. SASSAK and H. R. NUNES, 2009 Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil. *Arq Gastroenterol* 46: 20-25.
93. VILALTA, M., I. R. DEGANI, J. BAGO, D. GOULD, M. SANTOS *et al.*, 2008 Biodistribution, long-term survival, and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells transplanted in nude mice by high sensitivity non-invasive bioluminescence imaging. *Stem Cells Dev* 17: 993-1003.
94. VOWINKEL, T., T. J. KALOGERIS, M. MORI, C. F. KRIEGLSTEIN and D. N. GRANGER, 2004 Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis. *Dig Dis Sci* 49: 556-564.

95. WEI, Y., Y. NIE, J. LAI, Y. J. WAN and Y. LI, 2009 Comparison of the population capacity of hematopoietic and mesenchymal stem cells in experimental colitis rat model. *Transplantation* 88: 42-48.
96. WHITTEM, C. G., A. D. WILLIAMS and C. S. WILLIAMS, 2010 Murine Colitis modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS). *J Vis Exp*.
97. WIRTZ, S., C. NEUFERT, B. WEIGMANN and M. F. NEURATH, 2007 Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2: 541-546.
98. YAGI, K., 1998 Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* 108: 107-110.
99. YAZBECK, R., G. S. HOWARTH, R. N. BUTLER, M. S. GEIER and C. A. ABBOTT, 2011 Biochemical and histological changes in the small intestine of mice with dextran sulfate sodium colitis. *J Cell Physiol* 226: 3219-3224.
100. YEN, D., J. CHEUNG, H. SCHEERENS, F. POULET, T. MCCLANAHAN *et al.*, 2006 IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 116: 1310-1316.
101. Yi, T., and S. U. SONG, 2012 Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res* 35: 213-221.
102. ZHANG, Q., S. SHI, Y. LIU, J. UYANNE, Y. SHI *et al.*, 2009 Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol* 183: 7787-7798.
103. ZHAO, W., J. J. LI, D. Y. CAO, X. LI, L. Y. ZHANG *et al.*, 2012 Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 18: 1048-1058.
104. ZHENG, Z. H., X. Y. LI, J. DING, J. F. JIA and P. ZHU, 2008 Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 47: 22-30.
105. ZHOU, Q., D. D. PRICE, K. L. DREHER, B. PRONOLD, C. S. CALLAM *et al.*, 2012 Localized colonic stem cell transplantation enhances tissue regeneration in murine colitis. *J Cell Mol Med* 16: 1900-1915.

106. ZONTA, S., M. DE MARTINO, G. BEDINO, G. PIOTTI, T. RAMPINO *et al.*, 2010 Which is the most suitable and effective route of administration for mesenchymal stem cell-based immunomodulation therapy in experimental kidney transplantation: endovenous or arterial? *Transplant Proc* 42: 1336-1340.