

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS**

**CIRÚRGICAS**

**Terapia celular no tratamento da bronquiolite obliterante em  
modelo murino**

**Julio de Oliveira Espinel**

**ORIENTADOR: PROF. Maurício Guidi Saueressig**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Novembro 2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS**

**CIRÚRGICAS**

**Terapia celular no tratamento da bronquiolite obliterante em  
modelo murino**

**Julio de Oliveira Espinel**

**ORIENTADOR: PROF. Maurício Guidi Saueressig**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Novembro 2013**

CIP - Catalogação na Publicação

Espinel, Julio de Oliveira  
Terapia celular no tratamento de bronquiolite  
obliterante em modelo murino / Julio de Oliveira  
Espinel. -- 2013.  
78 f.

Orientador: Maurício Guidi Saueressig.

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

1. Terapia celular. 2. Bronquiolite obliterante.  
3. Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido  
adiposo. 4. Transplante pulmonar. 5. Transplante  
traqueal heterotópico murino. I. Saueressig, Maurício  
Guidi, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo de busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.*

*Paulo Freire*

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus 4 pais: Julio Héctor Espinel Copello (in memorian), Irma Ardohain Rodrigues, Elizete de Oliveira Royer, Laurindo Royer.

Dedico à Bianca, minha querida companheira.

Dedico também à Dr. Cristiano Feijó Andrade e Dr. Luis Fernando Moreira – meus mentores na cirurgia e na pesquisa.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, O Grande Arquiteto do Universo, pela minha vida.

Agradeço à minha família pelo apoio e por entender os momentos de ausência.

Agradeço à Bianca Bacchieri, minha querida companheira, pelo suporte emocional e carinho incondicional.

Agradeço ao meu orientador Prof. Maurício Guidi Saueressig, que com sua amizade, dedicação e paciência, viabilizou a conclusão deste trabalho.

Agradeço à enfermeira Marta, à médica veterinária Fabíola Schons Meyer, ao biólogo Eduardo pelo apoio, pela amizade, pelas risadas na UEA, que sempre com extrema competência permitiram o desenvolvimento dos experimentos com muita qualidade e segurança.

Agradeço à Dra. Ursula Matte, à Carolina Uribe, ao Dr. Guilherme Baldo pelo apoio no Laboratório de Terapia Gênica, fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço à Professora Jane K. Ulbrich, ao Dr. Pedro e ao Dr. Rafael Bringheti pela dedicação na análise histopatológica.

Agradeço ao Dr. Cléber Dario Kruehl e ao Dr. José Fraga pela confiança depositada, pela compreensão das dificuldades enfrentadas durante esse processo de Pós-graduação.

Agradeço ao Dr. Luis Fernando Moreira pela amizade, paciência e carinho com este seu eterno aluno.

Agradeço ao Dr. Cristiano Feijó Andrade, grande amigo, grande professor e que tantas portas abriu-me profissionalmente e como quem tenho a honra de trabalhar. Todos agradecimentos seriam poucos.

Agradeço à secretária do PPG-Ciências Cirúrgicas, Estela Maris Emer Araripe, por todo auxílio a mim dispensado em todos os momentos deste curso.

Agradeço à funcionaria Flávia Rejane Giusti sempre pronta, solícita.

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me permitir produzir uma contribuição ao mundo da ciência.

Agradeço aos membros da banca, pela disponibilidade de participar desta defesa.

Enfim, agradeço a todos que se fizeram presente nesta etapa tão importante de minha vida.

## Sumário

1. Lista de abreviaturas.....	10
2. Introdução da dissertação.....	11
3. Revisão da literatura.....	15
3.1. Transplante pulmonar.....	15
3.2. Rejeição aguda no transplante de pulmão.....	17
3.3. Bronquiolite obliterante.....	18
3.4. O modelo experimental de bronquiolite obliterante.....	20
3.5. Terapias para bronquiolite obliterante em modelo murino	
TTH.....	25
3.6. Terapia celular.....	30
3.7. Células-tronco mesenquimais.....	34
3.8. Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido	
adiposo.....	36
4. Bibliografia da revisão da literatura.....	38
5. Hipóteses.....	48
6. Objetivos.....	48
7. Resumo.....	50
8. Introdução.....	51
9. Materiais e métodos.....	53
9.1. Animais.....	53
9.2. Obtenção de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido	
adiposo.....	53
9.3. Experimento.....	54
9.4. Formas de administração.....	56



9.5. Análise histológica.....	57
9.6. Morfometria digital.....	57
9.7. Análise estatística.....	58
10. Resultados.....	59
10.1. Análise histológica semiquantitativa.....	59
10.2. Morfometria digital.....	60
11. Discussão.....	63
12. Conclusão.....	70
13. Financiamento.....	70
14. Bibliografia.....	71
15. Anexo 1.....	75
16. Artigo em inglês.....	80

## 1. Lista de abreviaturas

ABTO – Associação Brasileira de Transplante de Órgãos

BO – bronquiolite obliterante

CT – células-tronco

CTM – células-tronco mesenquimais

CTMA – células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica

FIPE – Fundo de incentivo à pesquisa e eventos

ISHLT – International Society of Heart and Lung Transplantation

MHC – Major histocompatibility complex

NIH – National Institutes of Health, USA

SARA – Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto

TNF $\alpha$  – tumor necrosis factor  $\alpha$

TGF – tumor growth factor

TTH – Transplante traqueal heterotópico

UEA – Unidade de Experimentação Animal

## 2. Introdução

O transplante pulmonar tornou-se uma alternativa viável para muitas doenças pulmonares em estágio avançado. No mundo, até 2011, foram realizados 41615 transplantes pulmonares, sendo que em 2011 foram 3239, segundo a ISHLT (1). No Brasil, há 9 centros credenciados junto à Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), tendo realizado no ano de 2012 69 transplantes pulmonares; os centros mais ativos são Porto Alegre e São Paulo.

As principais indicações de transplante pulmonar são doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose pulmonar idiopática, fibrose cística, deficiência de alfa-1 antitripsina e hipertensão arterial pulmonar idiopática (1).

A rejeição aguda permanece sendo um problema significativo em transplante pulmonar, apesar dos avanços nas medicações imunossupressoras. O risco é maior nos primeiros meses após o transplante e diminui com o tempo. A maioria dos pacientes apresenta pelo menos um episódio de rejeição aguda. A evidência atualmente disponível sugere que a rejeição aguda, especialmente quando recorrente, é um fator de risco para o desenvolvimento de bronquiolite obliterante (BO), que é encarado como uma manifestação de rejeição crônica. Nos últimos anos, houve melhoras na técnica cirúrgica e na farmacologia da imunossupressão; isso melhorou as taxas de rejeição aguda, porém não houve melhora expressiva da sobrevida a longo prazo (2).

A rejeição crônica é classificada patologicamente como rejeição crônica vascular e rejeição crônica das vias aéreas (3). Rejeição vascular crônica, a manifestação menos comum da rejeição, tem a forma de aterosclerose em desenvolvimento na vasculatura pulmonar. Rejeição crônica das vias aéreas, que pode ser identificada histologicamente pela presença de BO, é a mais comum e mórbida dos dois tipos de rejeição (4).

A BO é a principal causa da limitada sobrevida a longo prazo nos transplantes pulmonares. Múltiplas condições contribuem para o desenvolvimento dessa condição: episódios repetidos de rejeição aguda, infecções pelo citomegalovírus, doença do refluxo gastroesofágico, disfunção primária do enxerto, tipo de transplante realizado – unilateral ou bilateral, aspectos relacionados à autoimunidade. As alternativas terapêuticas para BO são limitadas. Uma variedade de terapias têm sido propostas para BO, mas não existe um protocolo bem estabelecido. Escolhas possíveis incluem alterar a medicação imunossupressora, fotoférese, irradiação linfóide total, azitromicina a longo prazo, plasmaférese e ciclosporina inalada (5-10).

Uma dificuldade que se impõe ao estudo da rejeição crônica ao transplante pulmonar é o modelo experimental a ser usado. Há modelos de transplante pulmonar completo em animais de grande porte, que são adequados para estudar aspectos de técnica cirúrgica e fisiopatologia da disfunção primária do enxerto; todavia, não são adequados para estudar rejeição crônica. O modelo mais simples para estudar BO (rejeição crônica) é o modelo de transplante traqueal heterotópico alogênico. O animal mais usado é o roedor de pequeno porte – camundongos e ratos. Esse modelo mostra-se robusto para estudos sobre imunogênese, do ponto de vista genético e

molecular, e para avaliação de novas terapêuticas imunossupressoras em fases iniciais. Os riscos do uso prolongado de terapias imunossupressoras, como nefrotoxicidade e maior susceptibilidade à infecção, estão bem documentados. Portanto, há grande necessidade de imunossupressores ou alternativas farmacológicas melhores.

As células-tronco (CT) são as que têm a capacidade de auto-renovação e diferenciação. Tem-se testado o papel dessas células em diferentes patologias, inaugurando um novo ramo do conhecimento, a medicina regenerativa. A evolução do papel das CT desenvolve-se ao longo de pelo menos três linhas: CT como terapia (substituir linhas celulares que foram perdidas ou destruídas, ou para modificar o comportamento de outras células); CT como alvos da terapia medicamentosa; CT para gerar tecidos diferenciados para estudo *in vitro* de modelos de doença, a fim de o desenvolvimento de drogas.

Sabe-se que células-tronco mesenquimais (CTM) têm propriedades imunomoduladoras. Tem sido proposto que a população de CTM seja capaz de alterar a função imune e possa, portanto, modular respostas de lesão como isquemia ou mesmo atenuar os efeitos das doenças imunomediadas. As CTM foram testadas em ensaios clínicos em humanos em cenários de doença do enxerto contra hospedeiro após transplante de CT hematopoéticas alogênicas e na doença inflamatória intestinal. Há controvérsias sobre o impacto das células e o mecanismo pelo qual as células podem estar atuando.

As CTM tem a capacidade de chegar aos locais lesados e fornecer sinais parácrinos. Grove et al. avaliaram o papel das células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea na imunomodulação no modelo de

transplante traqueal heterotópico alogênico; detectaram uma expressiva redução na BO de 60% (11).

Considerando que a BO limita a sobrevida do transplante pulmonar e que as opções terapêuticas são limitadas, elaboramos um estudo experimental para avaliar o papel das células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTMA) na prevenção do desenvolvimento de BO em modelo de transplante traqueal heterotópico alogênico em modelo murino.

### **3. Revisão da literatura**

#### **3.1. Transplante pulmonar**

Nos últimos 25 anos, o transplante de pulmão tornou-se uma opção viável de tratamento para pacientes com uma variedade de doenças pulmonares em fase terminal. O primeiro transplante de pulmão humano foi realizado em 1963, e o receptor sobreviveu 18 dias, vindo a falecer devido à insuficiência renal, à desnutrição e a uma fístula broncopleural (12). Apesar do resultado, esse primeiro procedimento demonstrou que o transplante pulmonar era tecnicamente viável e que a rejeição poderia ser evitada com os agentes imunossupressores disponíveis, pelo menos por curto período.

Ao longo dos 15 anos que se seguiram, a maioria dos receptores de transplante de pulmão que foram realizados morreu por complicações no período perioperatório devido a problemas na anastomose brônquica. Em 1981, o primeiro transplante de coração-pulmão bem sucedido foi realizado para a hipertensão arterial pulmonar idiopática (13). Isso foi seguido, em 1983, pelo primeiro transplante de pulmão unilateral com sucesso para fibrose pulmonar idiopática (14) e em 1986 pelo primeiro transplante pulmonar bilateral para enfisema (15). O melhor resultado foi atribuído aos avanços das técnicas cirúrgicas e ao advento da ciclosporina. Nos anos seguintes, o número de transplantes pulmonares realizados aumentou rapidamente tornando-se um tratamento aceito para doenças pulmonares terminais. Entre 1988 e 1993, o número de transplantes realizados em todo o mundo aumentou

dramaticamente de 83 para 1089 por ano (1). No mundo, até 2011, foram realizados 41.615 transplantes pulmonares, sendo que em 2011 foram 3.239, segundo a *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT). No Brasil, há nove centros credenciados junto à Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), que realizaram em conjunto 69 transplantes no ano de 2012; os centros mais ativos são Porto Alegre e São Paulo.

A doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose pulmonar idiopática, fibrose cística, deficiência de alfa-1 antitripsina e hipertensão arterial pulmonar idiopática são, nessa ordem, as doenças mais frequentemente indicadas para o transplante de pulmão (1).

A escassez de doadores tem sido o principal fator limitante para o aumento do número de transplantes realizados. A taxa de obtenção de pulmões é consistentemente menor do que as de rins, fígado e coração. Enquanto rins e fígados são colhidos em 88% e corações em 30% dos doadores falecidos, pulmões são aproveitados em apenas 15% dos casos; muito provavelmente devido à vulnerabilidade dos pulmões às possíveis complicações antes e depois da morte encefálica do doador, tais como traumas torácicos, aspiração, lesão pulmonar associada à ventilação mecânica, pneumonia e edema pulmonar neurogênico; embora, cerca de 40% dos pulmões rejeitados poderiam ter sido aproveitados (16). Alguns estudos, todavia, tem sugerido que a perfusão pulmonar *ex-vivo* e condicionamento podem melhorar as lesões pulmonares, e em alguns casos permitir o transplante de órgãos anteriormente considerados inadequados (17, 18).



Em geral, os receptores de pulmão bilateral parecem ter uma sobrevida mediana maior quando comparados com os unilaterais, sendo 6,6 x 4,6 anos (ISHLT, 2011).

Muito precocemente, nas primeiras horas ou dias após transplante, a falência do enxerto, uma forma de Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (SARA) e dano alveolar difuso são as principais causas de óbito (aproximadamente 30%) nos primeiros 30 dias (1); as complicações infecciosas tornam-se a principal causa de morte no primeiro ano pós-transplante, 35% e nos anos subsequentes, 20% (19). Traqueobronquite bacteriana e pneumonia são as infecções mais comuns, embora fungos, citomegalovírus, infecções virais adquiridas na comunidade e micobactérias, possam contribuir para a morbidade geral (20-23); tumores malignos são responsáveis por uma pequena porcentagem de óbitos no primeiro ano e acometem 7-10% dos transplantados após o primeiro ano.

### 3.2. Rejeição Aguda no Transplante de Pulmão

A rejeição aguda permanece um problema significativo em transplante pulmonar, tendo sido o grande desafio dos primeiros transplantes em humanos na década de 60. O advento da ciclosporina reduziu as complicações decorrentes da rejeição aguda, permitindo o sucesso dos primeiros transplantes pulmonares na década de 1980. Mesmo assim, ainda é um problema, afetando mais de um terço dos pacientes transplantados.

O risco de rejeição aguda do enxerto é maior nos primeiros meses. Prevenir episódios de rejeição evita a doença clínica que pode acompanhar

rejeição aguda e reduz a chance de desenvolver síndrome da bronquiolite obliterante – rejeição crônica.

### 3.3. Bronquiolite obliterante

Dados de sobrevivência da última década demonstram uma melhoria significativa da sobrevivência até um ano, porém a sobrevivência a partir do primeiro ano segue bastante reduzida devido à BO.

A síndrome clínica de rejeição crônica e as complicações infecciosas relacionadas ao seu tratamento são as principais fontes de morbidade e mortalidade tardias após o transplante (24).

A rejeição crônica é classificada patologicamente como sendo vascular ou das vias aéreas (3); a rejeição vascular é menos comum e manifesta-se como aterosclerose na vasculatura pulmonar. Já a rejeição das vias aéreas, é mais comum e com maior gravidade e pode ser identificada histologicamente pela presença de BO (4).

As lesões iniciais da BO incluem a inflamação linfocítica submucosa e a ruptura do epitélio das pequenas vias aéreas, seguindo-se pelo crescimento de tecido de granulação fibromixóide luminal, que, uma vez organizado em um padrão típico de fibrose cicatricial, resulta em obstrução parcial ou completa dos bronquíolos terminais. Em alguns casos, a única evidência histológica de doença, restringe-se a traços quase indetectáveis de anéis circunferenciais de elastina nas vias aéreas menores (25).

A etiologia da BO ainda é desconhecida. Algumas evidências sugerem que ela deveria ser considerada o resultado final comum de uma série de agressões teciduais, imunológicas ou não, como episódios de rejeição aguda

recorrente, bem como de infecção por citomegalovírus (CMV) (26-28). A gravidade da disfunção primária do enxerto (PGD) parece correlacionar-se com o risco de desenvolver BO (29-31). Adicionalmente, refluxo gastroesofágico (RGE) e o transplante unilateral, pelo menos entre os pacientes com DPOC, parecem contribuir para a rejeição crônica do enxerto (32-37). Mais recentemente, admite-se ainda ser a BO uma doença autoimune (em vez de aloimune) para epítomos de colágeno tipo V, habitualmente ocultos, que presumivelmente expõem-se como resposta tecidual a isquemia-reperfusão do enxerto ou por outras agressões que danifiquem o epitélio das vias aéreas no aloenxerto (38).

Três padrões de história natural da BO têm sido descritos: 1) declínio rápido após início do processo; 2) deterioração inicial rápida seguida de estabilização e 3) início sutil e progressão lenta e inexorável (39-41). As etapas finais da BO são caracterizadas por sintomas de bronquiectasias e podem ser complicadas por infecção na vigência de imunossupressão.

A taxa de mortalidade associada à BO varia de 25 a 56%, sendo que o risco aumenta com o passar do tempo após o diagnóstico (39, 42-45), comportando-se, para muitos pacientes, como uma recapitulação da doença de base do pulmão que os levou a indicação de transplante.

Uma variedade de tratamentos tem sido aventada para BO, sem, todavia, ter-se estabelecido até o momento um protocolo adequado de manejo. As alterações da medicação imunossupressora, fotofereze, irradiação linfóide total, azitromicina a longo prazo, plasmaferese e inalação de ciclosporina (5-10) podem ser citadas como opções. Destacam-se a substituição de ciclosporina para tacrolimus ou uso de micofenolato, que demonstraram a estabilização

espirométrica por mais de 12 meses (46-49). Do mesmo modo, várias experiências de centros isolados com fotoforese extracorpórea sugeriram redução do declínio da função pulmonar (6-8). Irradiação linfóide total também foi avaliada em pequenos estudos observacionais e sugeriram retardo no declínio na função pulmonar após irradiação (9, 10). Outros estudos sugeriram que a terapia prolongada com azitromicina oral pode parar ou reverter o declínio da função pulmonar associada à BO em até 40% dos pacientes (36, 50-56), todavia sem repercussão significativa na sobrevida global entre os grupos (56).

O retransplante após o desenvolvimento de BO é controverso. A experiência sugere que o resultado não foi tão bom como com o primeiro transplante, uma vez que a BO tenderia a se repetir no novo enxerto de forma acelerada. O risco, no entanto, não parece ser significativamente diferente do primeiro transplante (4, 26, 44).

Dessa forma, a melhor estratégia é a prevenção, isto é, imunossupressão agressiva precoce para eliminar os primeiros episódios de rejeição aguda. Também é razoável recomendar a azitromicina como profilaxia contra a rejeição crônica. (36, 50-56).

#### 3.4. O modelo experimental de bronquiólite obliterante

O desenvolvimento de modelos experimentais *in vitro* e principalmente *in vivo* é fundamental para o progresso do conhecimento sobre as doenças. Permite avançar a compreensão desde as áreas de etiologia, fiopatogenia até a terapêutica.

As principais preocupações quando se avalia a metodologia nestes modelos são quais espécies utilizar; o que usar como doador e receptor e em que ponto do tempo avaliar a progressão da lesão e o efeito de qualquer tratamento sobre a lesão.

A maioria dos trabalhos, até essa data, foram realizados em ratos e camundongos. É importante selecionar doador e receptor que sejam incompatíveis em termos de histocompatibilidade, porque, na clínica, tem sido demonstrado que antígenos MHC classe I e II são hiperexpressos em enxertos que desenvolvem BO (57-59).

Os modelos animais de transplante de pulmão “completo”, que teoricamente seriam os ideais, têm sido usados para estudar os processos envolvidos na rejeição crônica do enxerto (60, 61). No entanto, este modelo tem a desvantagem de ser tecnicamente difícil, especialmente em pequenos roedores, limitando sua aplicabilidade. Outra desvantagem é o tempo excessivamente longo para o desenvolvimento das lesões obliterantes, as quais nem sempre são evidentes (62, 63).

Realizando uma pesquisa no Pubmed com os termos “*heterotopic tracheal transplantation*” encontramos 200 artigos publicados desde 1977 até outubro de 2013.

O modelo de aloenxerto traqueal heterotópico em pequenos roedores parece ser o método experimental mais publicado para simular BO. É tecnicamente menos exigente do que o transplante de pulmão, e permite que um maior número de procedimentos sejam realizados em um curto espaço de tempo, o que permite reduzir os custos e a variabilidade entre os estudos.

Inicialmente, o local escolhido para o transplante heterotópico era o omento (64). Seu uso foi limitado por haver a necessidade de violar a cavidade abdominal, o que não era necessário no modelo que implanta o enxerto em uma bolsa dorsal subcutânea.

Hertz *et al.* (65), descreveram, em 1993, um modelo murino em que a traquéia e os brônquios principais de um camundongo BALB/c eram transplantados em uma bolsa subcutânea no dorso de um camundongo C3H. O modelo empregado mostrou-se simples e resultou em lesões histologicamente indistinguíveis das observadas em humanos. Também definiram a dinâmica da alteração estrutural do enxerto: em 10 dias após o transplante alogênico, demonstraram inflamação subepitelial e peritraqueal, necrose epitelial e fibropoliferação incipiente. Em 21 dias, demonstraram progressão do processo de fibroplasia na parede de aloenxertos, bem como metaplasia epitelial. Essas alterações não foram demonstradas em enxertos singênicos.

A perda do epitélio e o desenvolvimento de lesões obliterantes nos aloenxertos, mas não nos isoenxertos, corrobora a hipótese de que pelo menos parte dessa patologia é mediada por mecanismos imunes. O desnudamento do epitélio resulta provavelmente de uma resposta aloimune, mediada por células T contra os antígenos classe II do MHC, que se encontram com expressão aumentada.

Huang *et al.* (66), em 1995, também demonstraram que o desenvolvimento da lesão obliterante independe do local do transplante. O estudo também mostrou um aumento das células T e de antígenos classe II do MHC, apoiando a hipótese de lesão imunomediada.

Boehler *et al.* (67) publicaram, em 1997, um estudo em ratos, examinando o desenvolvimento de BO em 14 períodos de tempo, de 1 dia a 1 ano. Estudando dois locais diferentes de transplante: o omento e a bolsa subcutânea dorsal. Demonstraram três fases para o desenvolvimento de BO: 1) fase isquêmica inicial (do dia 1 ao dia 7, com um pico no dia 2) foi observada em aloenxertos e isoenxertos; uma segunda fase isquêmica foi vista somente nos aloenxertos, culminando no dia 21; 2) fase de infiltração linfocítica (do dia 3, com pico no dia 7, até a resolução no dia 14) e desnudação epitelial completa (nos aloenxertos apenas durante o dia 9); 3) fase de obliteração fibrosa da luz das vias aéreas, vistas apenas em aloenxertos (em muitos casos, completa no dia 21). Todos os aloenxertos mostraram obliteração fibrótica completa no dia 28. Este estudo confirmou a natureza imunomediada dessas lesões, porque só os aloenxertos apresentaram as alterações. Estas fases sugerem a ocorrência de uma patologia progressiva em que uma lesão epitelial imunomediada leva à infiltração linfocítica, que então desencadeia a resposta fibroproliferativa.

Em relação ao local de enxerto traqueal, não foram observadas diferenças nos aloenxertos e isoenxertos quando foram implantados em omento e bolsa subcutânea dorsal. Esperaria-se que a traquéia posta no omento fosse revascularizada mais facilmente que a implantada no dorso; isso indicou que, pelo menos neste modelo, isquemia não pareceu ser um fator importante no desenvolvimento de BO. Este fato valida o uso da via subcutânea para o estudo de BO como um método menos traumático para o animal e tecnicamente mais fácil de executar.

Além disso, Boehler et al. (67) mostraram que, além dos 28 dias, o tecido de granulação luminal tornou-se menos celular e menos vascular, e com deposição crescente de colágeno por até 1 ano.

Brazelton *et al.* (68), em 1997, eliminaram a fonte de reatividade imunológica, retransplantando a traquéia alogênica em um receptor isogênico em 7 e 14 dias após o transplante. As traquéias retransplantadas em 7 dias não se obliteraram, enquanto aquelas transplantadas em 14 dias obliteraram-se, mostrando que, depois de um certo ponto do processo, a lesão vai progredir apesar da remoção do estímulo aloimune.

Os trabalhos que se seguiram foram distribuídos uniformemente entre aqueles que utilizavam o omento e aqueles que utilizavam a via subcutânea dorsal como um local para o implante. O omento foi realizado exclusivamente em rato (68-84), enquanto a região dorsal subcutânea foi usada em camundongos (85-92) e ratos (67, 93-96).

O camundongo tem algumas vantagens. É possível realizar experimentos com animais cuja expressão de determinados genes está suprimida, animais transgênicos ou com imunodeficiência grave combinada (SCID), proporcionando a oportunidade de analisar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de BO. Além disso, o camundongo, com seu menor tamanho, permite o uso de uma quantidade menor de compostos a serem testados (97).

Os dados publicados tendem a concordar que nos ratos (66, 67, 72, 82) e nos camundongos (86, 89) o tempo para completar a obliteração luminal da traquéia, independentemente do local escolhido para o aloenxerto, é de cerca



de 28 dias. Os dados publicados também concordam que, na maioria dos casos, a obliteração parcial ocorre em 21 dias.

O transplante heterotópico no subcutâneo também foi realizado em porcos (98-100) e primatas (101). Nesses animais, foi transplantado tecido brônquico no subcutâneo. O emprego de animais de maior porte possibilita o estudo de eventos em vias aéreas menores, como os bronquíolos (102). Estes modelos podem ser úteis, entretanto, os custos maiores dificultam seu uso mais frequente na investigação de BO.

Reichenspurner *et al.* (72), em 1997, 14 dias após o transplante, encontraram perda epitelial, infiltração neutrofílica da mucosa e submucosa e um intenso infiltrado mononuclear misto com plasmócitos e eosinófilos. Identificou-se completa obliteração fibrótica nos aloenxertos no dia 28.

Adams *et al.* (81), em 2000, demonstraram a importância do epitélio no desenvolvimento de BO. Usando um transplante traqueal isogênico no omento, removeram o epitélio por digestão com protease antes da enxertia. Os isoenxertos desenvolveram oclusão luminal, um efeito que foi inibido por reposição das células epiteliais.

### 3.5. Terapias para bronquiolite obliterante em modelo murino TTH

Diversas terapias foram testadas em modelos de transplante traqueal heterotópico alogênico, em roedores, ao longo das últimas duas décadas. Alguns foram aplicados à clínica, outros permanecem como alvos de estudos.

King *et al.* em 1997, utilizaram esse modelo murino para testar a eficácia da ciclosporina em prevenir rejeição crônica (85); demonstraram que altas

doses de ciclosporina reduziram o processo de fibroplasia nos aloenxertos, fato esse que corrobora a importância da aloimunidade na patogênese da bronquiolite obliterante.

Fahrni *et al.* testaram rapamicina nesse mesmo modelo (86). Após injetar o imunossupressor via intraperitoneal, verificaram diminuição nas alterações dos aloenxertos.

Boehler *et al.* testaram interleucina 10 aplicada via vetor adenoviral, nesse mesmo modelo, e verificaram a prevenção do desenvolvimento de fibrobliteração (93). Foi o primeiro grupo a discutir os tempos críticos para a administração de uma terapia nesse modelo.

Neuringer *et al.*, já nos anos 2000, estudaram o papel das citocinas de linfócitos T na bronquiolite obliterante, nesse mesmo modelo (89). Constataram um aumento de 2 a 10 vezes na expressão gênica de citocinas de linfócitos Th1, Th2 e citotóxicos. Yamada *et al.* dissecaram a imunogênese da bronquiolite obliterante e definiram que há fases da rejeição dependentes e independentes da via CD28/B7. Constataram isso devido à inibição seletiva de algumas fases da rejeição através da injeção intraperitoneal de CTLA4IgG, um inibidor da via CD28/B7 (91). Smith *et al.* avançaram no estudo da imunogênese dessa patologia, identificando o papel crucial do TNF (tumor necrosis factor) (103). Rumbley *et al.*, definiram que o processo de bronquiolite obliterante é primariamente dependente de CD40L. Smith *et al.*, também avançaram na imunogênese da patologia (104). Konishi *et al.*, demonstraram que a combinação de FTY720 e CTLA4IgG previnem a bronquiolite obliterante (105). O primeiro é um agente indutor de apoptose de células T e sequestra linfócitos maduros circulantes; o segundo é um inibidor da via CD28/B7.

Neuringer *et al.*, em 2002, analisaram a cinética do epitélio de aloenxertos em modelo de transplante de transplante traqueal murino (106). Identificaram fases específicas: injúria isquêmica inicial, regeneração das células epiteliais da via aérea e eventual morte celular. A elucidação dessas fases orienta as análises do epitélio de enxertos submetidos a tratamentos.

Aris *et al.* analisaram a hiperexpressão de fatores de crescimento, especificamente TNF alfa. Quando este fator de crescimento é bloqueado, há menor progressão da bronquiolite obliterante (107).

Higuchi *et al.* estudaram a imunogênese da bronquiolite obliterante, desvendando o papel importante dos linfócitos T CD4 e CD8 e o papel mais discreto de aloanticorpos e das células natural killer (108).

Em 2002, Leonard *et al.*, testaram o papel de uma nova classe de imunossuppressores – PG490-88, nesse modelo murino de rejeição crônica, e verificaram sua eficácia (109). Visner *et al.*, estudaram o papel de uma proteína citoprotetora de enxertos – heme oxigenase 1 (HO-1) nesse modelo murino de rejeição crônica. Conseguiram correlacionar HO-1 com interleucina 10 na proteção contra o desenvolvimento de bronquiolite obliterante (110). McKane *et al.*, em 2004, testaram um novo agente antifibrótico, pirfenidona, nesse mesmo modelo de rejeição crônica, e observaram a efetividade dessa droga quando administrada precocemente aos animais (111).

Chalermkulrat *et al.*, testaram um novo agente imunossupressor, derivado de uma mistura de ervas tradicionais chinesas. Verificaram a eficácia desse agente em prevenir BO, todavia demonstraram uma toxicidade dose dependente às células epiteliais da via aérea (112).

Andrew *et al.*, estudando a imunogênese da BO, identificaram o papel do Smad3, um transdutor do sinal para TGF beta, na gênese da doença (113). Suemitsu *et al.*, estudando a imunogênese da BO através de pré-tratamento ao transplante, sugerem que um mecanismo de resposta não-alóimune também tenha papel importante no desenvolvimento da BO (114). Fernandez *et al.*, analisando o papel das metaloproteinases na gênese da BO, sugerem que MMP-9 possa ser um alvo terapêutico importante para essa doença (115). Fernandez *et al.*, testaram o papel dos regimes de indução de tolerância imunológica, associando anticorpo monoclonal ligante anti-CD40 (MR-1) e células de medula óssea derivadas do doador. Obtiveram resultados positivos na prevenção da BO(115).

Lade *et al.*, em 2005, estudaram o perfil de expressão gênica da bronquiolite obliterante em modelo murino através da análise de *microarray* e estabeleceram correlação entre os passos observados na patologia (lesão da via aérea – resposta imune inata – resposta imune adaptativa, incluindo resposta celular e humoral – perda do epitélio da via aérea) e a expressão gênica sequencial desse modelo, tornando-o ainda mais robusto para estudo de imunogênese e terapêuticas (116).

Zhou *et al.*, estudaram a pirfenidona, novamente, e identificou papel protetor contra a BO. Correlacionaram o efeito da pirfenidona com os níveis séricos de TGF beta (117).

Chalermkulrat *et al.*, estudaram um novo protocolo de indução de tolerância imunológica. Associaram uma transfusão específica do doador com anticorpo anti-CD154 em múltiplas doses e conseguiram sucesso na indução de tolerância (118).

Nusair *et al.*, testaram uma forma de condicionamento pré-transplante que incluiu irradiação linfóide total, infusão de medula óssea do doador e ciclofosfamida e obtiveram sucesso na prevenção de BO (119).

KleinJan *et al.*, investigaram o papel das células apresentadoras de antígenos tipo células dendríticas e documentaram que o bloqueio da molécula coestimuladora na via B7RP1-ICOS previne a bronquiolite obliterante (120). Xu *et al.*, avançaram na imunogênese da BO estudando um possível novo alvo terapêutico – a via SDF-1/CXCR4. Utilizaram o inibidor dessa via TN14003 e diminuíram a incidência de BO (121). Mitchell *et al.*, estudaram o papel do álcool na BO. Identificaram um aumento na taxa de fibrose induzida pelo álcool através de interleucina 13 e de STAT6 (122).

Lau *et al.*, em 2009, estudaram uma nova estratégia anti-inflamatória em modelo de BO. Usou agonista A(2A)R e verificaram diminuição na taxa de BO (123). Khatwa *et al.*, estudaram o papel da collagenase neutrofílica MMP-8 na BO. Usando um inibidor de MMP-8 – GM-6001, constataram a diminuição na BO (124). Shah *et al.*, definiram o papel da via CD154/CD40 na BO. Quando essa via é bloqueada, a BO não se estabelece (125). Lemaître, em 2010., estudou o papel da interleucina 17 na BO e seu papel nas células tronco CK-14+ e correlacionou a inibição da interleucina com proteção dessas células e manutenção de sua capacidade de regenerar epitélio lesado (126). Zhao *et al.*, estudaram o papel de outro receptor de adenosina – A(2B)R que teria um papel pró-inflamatório e pró-fibrótico. Documentaram o aumento na BO pela estimulação desse receptor, processo esse mediado pela inibição de células T reguladoras CD4+/CD25+/Foxp3+ (127).

Em 2011, Grove *et al.*, testaram uma nova forma de imunomodulação com células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea. Injetaram  $5 \times 10^5$  células por via retro ocular de camundongos alogênicos. Observaram uma diminuição de 60% da obstrução intraluminal, quando compararam animais tratados e não-tratados em 7 e 14 dias. Isso sugere uma forma de terapia celular para a rejeição crônica de transplante pulmonar (11).

Liang *et al.*, em 2011, estudaram o chá verde – epigallo-catechin-galleate (EGCG), uma substância com poder antiinflamatório documentado em outras patologias. Obtiveram sucesso em diminuir a BO com esse tratamento (128).

Harris *et al.*, em 2012, estudaram uma nova via de sinalização envolvida na gênese da BO – CXCR4/CXCL12. A inibição dessa via por anticorpos específicos resultou em diminuição da fibrose em aloenxertos (129). Lee *et al.*, avançaram no estudo da BO, documentando o papel de amplificadores de interleucina 6 na gênese desse processo (130).

Zhao *et al.*, estudaram uma nova forma de diminuir a BO em modelo murino. Injetaram células epiteliais e células progenitoras do receptor no aloenxerto traqueal. Dessa forma, diminuiram o processo de BO por alterar o processo de perda e renovação do epitélio do aloenxerto (131).

### 3.6. Terapia Celular

Célula-tronco (CT) tem a capacidade de auto-renovação ilimitada ou prolongada, capaz de produzir, pelo menos, um tipo de célula altamente diferenciada, ou seja, a que tem a capacidade de se dividir em células idênticas

a ela ou em diferentes tipos de células. As CT são distintas no tocante à origem e ao potencial de diferenciação.

As CT foram primeiro identificadas no sistema hematopoiético, mas são encontradas em muitos outros tecidos.

As possíveis aplicações de CT para a medicina passa pela idéia de células-tronco como peças de reposição.

A utilização das CT compreende três objetivos: 1) terapia de substituição de linhas celulares que foram perdidas ou destruídas, ou de modificação do comportamento de outras células; 2) alvo de terapia medicamentosa; 3) geração de tecidos diferenciados para estudo *in vitro* de modelos de doença e desenvolvimento de drogas.

Todas as CT partilham duas características: auto-renovação e diferenciação. Auto-renovação é a capacidade de proliferar sem a perda do potencial de diferenciação e sem passar por senescência (envelhecimento biológico). Não implica que cada divisão da célula resulte em duas réplicas exatas da CT; as células podem ser CT ou mais diferenciadas. É sugerido que elas sejam capazes de se dividir simetricamente (as duas células-filhas são CT ou células diferenciadas) ou assimetricamente (gerando uma CT e uma célula mais diferenciada) (132, 133).

A potência de uma CT é definida pelos tipos de células mais diferenciadas que podem ser produzidas a partir delas. Elas podem ser totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes. As totipotentes têm a capacidade de produzir todos os tipos de células do organismo, incluindo tecidos embriônicos e extraembriônicos, como a placenta. As pluripotentes só

geram as células embriônicas; todas as células do embrião incluindo germinativas e de qualquer uma das camadas germinativas; portanto, podem fazer qualquer célula do corpo. As multipotentes só produzem as células de uma determinada camada germinativa, como por exemplo, as CT do tecido mesodérmico como o sangue podem fazer somente as células do sangue. As unipotentes podem formar células de um único tipo, como óvulo ou espermatozoides (132, 134-136).

Classicamente, a potência das células foi ligada ao momento do desenvolvimento embrionário do organismo. Ou seja, células que surgem das primeiras divisões após a fertilização do óvulo são, geralmente, as células que tem totipotência. Células pluripotentes são limitadas àquelas derivadas da massa celular interna do blastocisto (7 a 10 dias após a fertilização no ser humano) ou células germinativas do embrião. Células cultivadas e linhagens celulares estabelecidas a partir delas, são chamadas, respectivamente, de CT embrionárias (ES) e CT germinativas embrionárias. Sabe-se, atualmente, que células pluripotentes surgem também de outros tipos de células.

Uma vez que a linha primitiva forma-se no desenvolvimento embrionário, 10 a 14 dias após a fertilização no ser humano, cogita-se que a maioria das células-tronco são somente multipotentes ou unipotentes, chamadas células-tronco 'adultas'. Se elas são derivadas de tecidos que não sejam as células germinativas, eles são chamadas células-tronco somáticas.

As CT adultas estariam presentes na maioria dos tecidos e persistem ao longo da vida. Elas fornecem a base para a manutenção do tecido e para as respostas a lesões. Isto é particularmente verdadeiro para os tecidos em que há alta renovação, tais como o sangue, pele e intestino. (137-139). Há também



evidências de uma população de CT em tecidos onde a taxa de renovação é mais baixa, como o músculo, cérebro, pulmão e rim (140-143).

Divisão de células maduras pode ser a base para substituição após a perda de algumas células em outros tecidos. As implicações disso são que células maduras têm apenas um número limitado de divisões celulares, ao contrário de células-tronco. Portanto, em situações de lesão extensa, um tecido que depende de células maduras residuais para substituir as células lesionadas, pode ser mais limitado em sua capacidade regenerativa do que tecidos que podem contar com células-tronco residentes.

As CT transplantadas necessitam integrar-se no tecido alvo para conseguir um efeito fisiológico. Isto é de particular relevância, em locais onde a coordenação das redes complexas de células é essencial, como coração e cérebro, onde os circuitos aberrantes podem resultar em graves efeitos adversos. Algumas células parecem ter capacidade inerente para incorporar-se em tecidos. Um exemplo do complexo processo de interação tecido-CT seria a organização de estruturas tubulares compostas por células endoteliais derivadas de CT embrionárias, a fim de integrar-se à vasculatura do tecido alvo (144).

Existe potencial de CT transplantadas originarem tumores. Isto é particularmente importante quando se utiliza células pluripotentes, posto que elas se caracterizam pela capacidade de originar teratomas (neoplasias contendo células correspondentes a todas as três camadas embrionárias) em modelos animais (145, 146). Assim, o estado de diferenciação das células transplantadas precisará ser definido com alta precisão para evitar a entrega de células pluripotentes residuais que possam diferenciar-se de forma aberrante *in*

*vivo*. A oncogênese não está restrita a células pluripotentes. O processo de cultura pode permitir o desenvolvimento de tipos de células geneticamente anormais que podem ser um perigo potencial. A questão do potencial maligno das CT é de maior preocupação em células pluripotentes induzidas. Os métodos de maior eficácia para reprogramar células atualmente são baseados em retrovírus ou lentivírus; portanto, correm o risco de mutagênese em virtude da integração do genoma viral no receptor. Além disso, alguns dos genes utilizados para induzir a reprogramação têm conhecido potencial oncogênico (por exemplo, c-Myc) (147).

Dirigir o estado de diferenciação das células para serem usadas é um problema. Gerar o tipo de célula adequada a partir de pluripotentes é um desafio para alguns tipos de células. Atingir o estágio correto de diferenciação é outra consideração no desenvolvimento das terapias de células derivadas de CT. O objetivo é gerar progenitores, ao invés de células totalmente maduras e diferenciadas em alguns tecidos, para que elas não entrem rapidamente em processos de senescência e morte. Finalmente, a uniformidade e a consistência do produto celular podem ser difíceis de conseguir em fontes diferentes de doação de células.

Além do uso de CT para substituição de células, a capacidade de certas CT de alterar doenças sem sua incorporação no tecido-alvo tem sido explorada como um meio de modificar a resposta celular às lesões. Sugere-se que CT que não se fixam ao tecido sejam capazes de fornecer sinais complexos, afetando o resultado de doença sem substituir diretamente células lesadas.

As CT já foram testadas em várias patologias pulmonares, como lesão pulmonar aguda, doença pulmonar obstrutiva crônica, hipertensão pulmonar, asma e fibrose pulmonar entre outras (11, 148, 149).

### 3.7. Células-tronco mesenquimais

A identificação de uma população de células na medula óssea que poderiam originar células mesenquimais *ex-vivo* levou ao surgimento do conceito de uma célula-tronco mesenquimal (CTM) (135, 150). Esta população é definida pela sua capacidade de formar colônias em cultura de tecidos e pela habilidade de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos ou condrócitos *in vitro*.

A identificação destas células no corpo e o entendimento de como funcionam *in vivo*, permanece controversa. Quando se estudou o uso de CTM em lesão isquêmica do coração, houve indicações de que as células contribuíam diretamente para a geração de células novas na área da lesão, porém, não se implantam localmente (151). Propuseram que elas forneciam sinais complexos, de forma parácrina, que podem alterar a capacidade do coração (e outros tecidos) para responder à isquemia (136, 152). Este conceito permanece controverso, em parte porque os mecanismos pelos quais as CT executam essa função não estão claros. As populações de CTM estudadas são altamente variáveis, assim como os fatores secretados, como indoleamina 2,3-dioxigenase, prostaglandinas, interleucina-6, fator de crescimento de hepatócitos, óxido nítrico sintase induzível e fator de crescimento tumoral (TGF)- $\beta$ 1 (134).

Tem sido proposto que as CTM sejam capazes de alterar a função imunológica e possam, portanto, modular respostas de lesão isquêmica ou mesmo atenuar os efeitos das doenças imunomediadas. As CTM foram testadas em ensaios clínicos em humanos em diversos cenários clínicos: coronariopatias, doença vascular periférica, fístula gastrintestinais, cirrose hepática, diabetes melito, lipodistrofia, doença de Bueger, lesões da medula espinhal, incontinência fecal, reconstrução de mama, úlceras secundárias à radiação, doença do exerto contra o hospedeiro entre outras (153).

### 3.8. Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo

O tecido adiposo, que era visto no passado, como um reservatório passivo de energia, atualmente é considerado um importante órgão endócrino que modula o metabolismo e a imunidade. Além disso, é uma fonte de fácil e abundante obtenção de CT. Há muitos estudos sobre a aplicabilidade das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTMA). As CTMA são multipotentes e de interesse para a medicina regenerativa, pois elas podem não apenas reparar gordura, osso, músculo e cartilagem, como também secretam citocinas como VEGF, HGF e SDF-19, que estimulam a angiogênese (149, 153, 154).

A CTMA destaca-se nos estudos de terapia celular, devido a: 1) serem de fácil obtenção; 2) poderem ser obtidas do próprio paciente; 3) número adequado para transplante, devido à alta capacidade de proliferação celular *in vitro*; 4) terem capacidade multipotente de diferenciação celular; 5) serem de

fácil manipulação no laboratório; 6) pouco imunogênicas e 7) possuírem habilidade de integração no tecido hospedeiro e interação com o tecido circunjacente (149, 153).

As análises comparativas das CTM derivadas do estroma da medula óssea, das CTMA e das CTM do cordão umbilical demonstraram que as CTMA não são diferentes quanto à morfologia e ao fenótipo imunológico, comparativamente às outras. Tais características tornam o tecido adiposo fonte de muito interesse de CTM, em relação à obtenção de outras fontes. O uso das CTMA é visto em coronariopatias, doença do enxerto contra o hospedeiro, diabetes melito, cirrose hepática entre outros (153).

O Hospital de Clínicas de Porto Alegre iniciou a pouco tempo seu programa de transplante pulmonar. Desde 2007, foram realizados 5 transplantes de pulmão e, atualmente, há 10 pacientes listados aguardando o procedimento.

Tendo em vista a relevância dos transplantes em nosso meio e a necessidade de evolução tecnológica, criou-se uma linha de pesquisa no Serviço de Cirurgia Torácica, cujo tema central é terapia celular em modelo experimental de bronquiólite obliterante.

O transplante pulmonar em nosso meio, a exemplo do que acontece na literatura, tem sua sobrevida limitada pela rejeição crônica, ou seja, a bronquiólite obliterante.

A BO tem natureza inflamatória e não dispomos de protocolos de tratamento eficazes em sua fase avançada. Nosso grupo se propôs a replicar o

modelo clássico de transplante traqueal heterotópico murino e testar uma nova forma de imunomodulação, as células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, com objetivo de amenizar o processo inflamatório que está intrinsecamente ligado à fisiopatologia dessa doença.

#### 4. Bibliografia da revisão da literatura

1. Christie J, Edwards L, Kucheryavaya A. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult lung and heart-lung transplant report - 2010. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2010;29:1104.
2. Chakinala MM, Trulock EP. Acute allograft rejection after lung transplantation: diagnosis and therapy. *Chest Surg Clin N Am*. 2003;13(3):525-42.
3. Yousem S, Berry G, Cagle P. Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection: Lung Rejection Study Group. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 1996;15:1.
4. Boehler A, Kesten S, Weder W, Speich R. Bronchiolitis obliterans after lung transplantation: a review. *Chest*. 1998;114:1441.
5. Iacono A, Corcoran T, Griffith B. Aerosol cyclosporin therapy in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans. *European Respiratory Journal*. 2004;23:384.
6. O'Hagan A, Stillwell P, Arroliga A, Koo A. Photopheresis in the treatment of refractory bronchiolitis obliterans complicating lung transplantation. *Chest*. 1999;115:1459.
7. Morrel M, Despotis G, Lublin D. efficacy of photopheresis for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2010;29:424.
8. Benden C, Speich R, Hofbauer G. Extracorporeal photopheresis after lung transplantation: a 10 year single center experience. *Transplantation*. 2008;86:1625.
9. Verderlen G, Lievens Y, Dupont L. Efficacy of total lymphoid irradiation in azithromycin nonresponsive chronic allograft rejection after lung transplantation. *Transplant Procedure*. 2009;41:1816.
10. Fisher A, Rutherford R, Bozzino J. The safety and efficacy of total lymphoid irradiation in progressive bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2005;5:537.
11. Grove DA, Xu J, Joodi R, Torres-Gonzales E, Neujahr D, Mora AL, et al. Attenuation of early airway obstruction by mesenchymal stem cells in a murine model of heterotopic tracheal transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30(3):341-50.
12. Hardy J, Webb W, Dalton MJ, Walker GJ. Lung homotransplantation in man. *JAMA*. 1963;186:1065.
13. Reitz B, Wallwork J, Hunt S. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *New England Journal of Medicine*. 1982;306:557.
14. Group Tlt. Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 1986;314:1140.

15. Cooper J, Patterson G, Grossman R, Maurer J. Double lung transplant for advanced chronic obstructive lung disease. *American Review of Respiratory Disease*. 1989;139:303.
16. Ware L, Wang Y, Fang X. Assessment of lungs rejected for transplantation and implications for donor selection. *Lancet*. 2002;360:619.
17. Ingemansson R, Eyjolfsson A, Mared L. Clinical transplantation of initially rejected donor lungs after reconditioning ex vivo. *Annals of Thoracic Surgery*. 2009;87:255.
18. Cypel M, Hirayama S, Rubacha M, Fischer S, Yeung J, Anraku M, et al. Ex-vivo normothermic lung perfusion (EVLV) interrupts ischemic injury and restores cellular metabolism. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2008;27(2):385.
19. Trulock E, Edwards L, Taylor D. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-second official adult lung and heart-lung transplant report - 2005. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2005;24:956.
20. Lehto J, Koskinen P, Anttila V. Bronchoscopy in the diagnosis and surveillance of respiratory infections in lung and heart-lung transplant recipients. *Transplant International*. 2005;18:562.
21. Solé A, Morant P, Salavert M. Aspergillus infections in lung transplant recipients: risk factors and outcome. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005;11:359.
22. Malouf M, Glanville A. The spectrum of mycobacterial infection after lung transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999;160:1611.
23. Glanville A, AI S, Morton J. Intravenous ribavirin is a safe and cost-effective treatment for respiratory syncytial virus infection after lung transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2004;23:1041.
24. Boehler A, Estenne M. Post-transplant bronchiolitis obliterans. *European Respiratory Journal*. 2003;22:1007.
25. Yousem S, Duncan S, Griffith B. Interstitial and airspace granulation tissue reaction in lung transplant recipients. *American Journal of Surgical Pathology*. 1992;16:877.
26. Kroshus T, Kshetry V, Savik K. Risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1997;114:195.
27. Smith M, Sundaresan S, Mohanakumar T. Effect of development of antibodies to HLA and cytomegalovirus mismatch on lung transplantation survival and development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1998;116:812.
28. Keenan R, Lega M, Dummer J. Cytomegalovirus serologic status and postoperative infection correlated with risk of developing chronic rejection after pulmonary transplantation. *Transplantation*. 1991;51:433.
29. Fiser S, Tribble C, Long S. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Annals of Thoracic Surgery*. 2002;73:1041.
30. Whitson B, Prekker M, Herrington C. Primary graft dysfunction and long-term pulmonary function after lung transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2007;26:1004.
31. Daud S, Yusef R, Meyers B. Impact of immediate primary lung allograft dysfunction on bronchiolitis obliterans syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007;175:507.

32. Davis RJ, Lau C, Eubanks S. Improved lung allograft function after fundoplication in patients with gastroesophageal reflux disease undergoing lung transplantation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2003;125:533.
33. Cantu E<sup>f</sup>, Appel Jr, Hartwig M. Early fundoplication prevents chronic allograft dysfunction in patients with gastroesophageal reflux disease. *Annals of Thoracic Surgery*. 2004;78:1142.
34. King B, Iyer H, Leidi A, Carby M. Gastroesophageal reflux in bronchiolitis obliterans syndrome: a new perspective. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2009;28:870.
35. Bobadilla J, Jankowska-Gan E, Xu Q. Reflux-induced collagen type V sensitization: potential mediator of bronchiolitis obliterans syndrome. *Chest*. 2010;138:363.
36. Verleden S, Vos R, Mertens V. Heterogeneity of chronic lung allograft dysfunction: insights from protein expression in broncho alveolar lavage. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2011;30:667.
37. Hadjiliadis D, Chaparro C, Gutierrez C. Impact of lung transplant operation on bronchiolitis obliterans syndrome in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Transplantation*. 2006;6:183.
38. Sumpter T, Wilkes D. Role of autoimmunity in organ allograft rejection: a focus on immunity to type V collagen in the pathogenesis of lung transplant rejection. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004;286:L1129.
39. Nathan S, Ross D, Belman M. Bronchiolitis obliterans in single-lung transplant recipients. *Chest*. 1995;107:967.
40. Levine S, Bryan C. Bronchiolitis obliterans in lung transplant recipients. The Thorn in the side of lung transplantation. *Chest*. 1995;107(894).
41. Finlen Copeland C, Snyder L, Zaas D. Survival after bronchiolitis obliterans syndrome among bilateral lung transplant recipients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010;182:784.
42. Keller C, Cagle P, Brown R. Bronchiolitis obliterans in recipients of single, double and heart-lung transplantation. *Chest*. 1995;107:973.
43. Bando K, Paradis I, Similo S. Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation. Na analysis of risk factors and management. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1995;110:4.
44. Sundaresan S, Trulock E, Mohanakumar T. Prevalence and outcome of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Annals of Thoracic Surgery*. 1995;60:1341.
45. Burton C, Carlsen J, Mortensen J. Long-term survival after lung transplantation depends on development and severity of bronchiolitis obliterans syndrome. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2007;26:681.
46. Verleden G, Dupont L, Van Raemdonck D, Vanhaecke J. Effect of switching from cyclosporine to tacrolimus on exhaled nitric oxide and pulmonary function in patients with chronic rejection after lung transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2003;22:908.
47. Cairn J, Yek T, Banner N. Time-related changes in pulmonary function after conversion to tacrolimus in bronchiolitis obliterans syndrome. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2003;22:50.
48. Whyte R, Rossi S, Mulligan M. Mycophenolate mofetil for obliterative bronchiolitis syndrome after lung transplantation. *Annals of Thoracic Surgery*. 1997;64:945.



49. Revell M, Lewis M, Llewellyn-Jones C. Conservation of small-airway function by tacrolimus/cyclosporine conversion in the management of bronchiolitis obliterans following lung transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2000;19:1219.
50. Yates B, Murphy D, Forrest I. Azithromycin reverses airflow obstruction in established bronchiolitis obliterans syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005;172:772.
51. Gerhardt S, McDyer J, Girgis R. Maintenance azithromycin therapy for bronchiolitis obliterans syndrome: results of a pilot study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003;168:121.
52. Verdelen G, Dupont L. Azithromycin therapy for patients with bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation*. 2004;77:1465.
53. Gottlieb J, Szangolies J, Koehnlein T. Long-term azithromycin for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation*. 2008;85:36.
54. Jain R, Hachem R, Morrel M. Azithromycin is associated with increased survival in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2010;29:531.
55. Vos R, Vanaudenaerde B, Verleden S. A randomised controlled trial of azithromycin to prevent chronic rejection after lung transplantation. *European Respiratory Journal*. 2011;37:164.
56. Vos R, Vanaudenaerde B, Ottevaere A. Long-term azithromycin therapy for bronchiolitis obliterans syndrome: divide and conquer? *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2010;29:1358.
57. Hasegawa S, Okner D, Ritter J, Patterson G, Trulock E, Cooper J, et al. Expression of class II major histocompatibility complex antigens (HLA-DR) and lymphocyte subset immunotyping in chronic pulmonary transplant rejection. 1995.
58. Taylor P, Rose M, Yacoub M. Role of MHC antigens in normal human lungs and transplanted lungs with obliterative bronchiolitis. *Transplantation*. 1989;48:506.
59. Milne D, Gascoigne A, Wilkes J, Sviland L, Ashcroft T, Malcolm A, et al. MHC class II and ICAM-1 expression and lymphocyte subsets in transbronchial biopsies from lung transplant recipients. *Transplantation*. 1994;57:1762.
60. Marck K, Prop J, Wildevuur C, Nieuwenhuis P. Lung transplantation in the rat: histopathology of left lung isograft and allograft. *Journal of Heart Transplantation*. 1985;4.
61. Hausen B, Demertzis S, Schoroder F, Beuke M, Schafers H. Double lung transplantation in the rat: an acute syngeneic in situ model. *Annals of Thoracic Surgery*. 1996;61:184.
62. Uyama T, Winter J, Groen G, Wildevuur C, Monden Y, Prop J. Late airway changes caused by chronic rejection in rat lung allograft. *Transplantation*. 1992;54:809.
63. Al-Dossari G, Kshetry V, Jessurun J, Bolman Rr. Experimental large animal model of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Annals of Thoracic Surgery*. 1994;58:34.
64. Mayer E, Cardoso P, Puskas J, De Kampos K, Oka T, Dardick I, et al. The effect of basic fibroblast growth factor and omentopexy on revascularisation and epithelial regeneration of heterotopic rat tracheal isograft. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1992;104:180.
65. Hertz I, Jessurun J, King M, Savik S, Murray J. Reproduction of the obliterative bronchiolitis lesion after heterotopic transplantation of the mouse airway. *American Journal of Pathology*. 1993;142:1945.
66. Huang X, Reichenspurner H, Shorthouse R, Cao W, Berry G, Morris R. Heterotopic tracheal allograft transplantation: a new model to study the cellular and

- molecular events causing obliterative airway disease (OAD) in rats. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 1995;14(S49).
67. Boehler A, Chamberlain D, Kesten S, Slutsky A, Liu M, Keshavjee S. Lymphocytic airway infiltration as a precursor to fibrous obliteration in a rat model of bronchiolitis obliterans. *Transplantation*. 1997;64:311.
  68. Brazelton T, Adams B, Cheung A, Morris R. Progression of obliterative airway disease occurs despite the removal of immune reactivity by retransplantation. *Transplantation Procedure*. 1997;29:2613.
  69. Morris R, Huang X, Gregory C, Billingham M, Rowan R, Shorthouse R, et al. Studies in experimental models of chronic rejection: use of rapamycin (sicrolimus) and isoxazole derivatives (leflunomide and its analogue) for the suppression of graft vascular disease and obliterative bronchiolitis. *Transplant Procedure*. 1995;27:2068.
  70. Morris R, Huang X, Shorthouse R, Reichenspurner H, Adams B, Berry G. Use of cyclosporin (Csa), mycophenolic acid (MPA), rapamycin (RPM), leflunomide (LFM), or deoxyspergualin (DSG) for prevention and treatment of obliterative airway disease (OAD) in new animal models. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 1995;14(S65).
  71. Reichenspurner H, Huang X, Soni V, Shorthouse R, Berry G, Morris R. Pathogenesis and treatment of obliterative airway disease after heterotopic tracheal allograft and xenograft transplantation. *Surgical Forum*. 1995;XLVI:456.
  72. Reichenspurner H, Soni V, Nischke M, Berry G, Brazelton T, Shorthouse R, et al. Obliterative airway disease after heterotopic tracheal xenotransplantation: pathogenesis and prevention using new immunosuppressive agents. *transplantation*. 1997;64:373.
  73. Lemstrom K, Kalio E, Krebs R, Bruggeman C, Hayry P, Koskinen P. Cytomegalovirus infection accelerates obliterative bronchiolitis of rat tracheal allograft. *Transplant International*. 1996;9(1):S221.
  74. Reichenspurner H, Soni V, Nischke M, Berry G, Brazelton T, Shorthouse R, et al. Enhancement of obliterative airway disease in rat tracheal allograft infected with recombinant rat cytomegalovirus. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 1998;17:439.
  75. Koskinen P, Kallio E, Krebs R, Lemstrom K. A dose-dependent inhibitory effect of cyclosporin A on obliterative bronchiolitis of tracheal allograft. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1997;155:303.
  76. Kallio E, Koskinen P, Aavik E, Vaali K, Lemstrom K. Role of nitric oxide in experimental obliterative bronchiolitis (chronic rejection) in the rat. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;100:2984.
  77. Gammie J, Li S, Kawaharada N, Colson Y, Yousem S, Ildstad S, et al. Mixed allogeneic chimerism prevents obstructive airway disease in a rat heterotopic tracheal transplant model. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 1998;17:801.
  78. Ikonen T, Romanska H, Bishop A, Berry G, Polak J, Morris R. Alterations in inducible nitric oxide synthetase (iNOS) and nitrotyrosine (NitroY) during re-epithelialization of heterotopic rat tracheal composite grafts. *Transplant Procedure*. 1999;31:182.
  79. Takao M, Gu Y, Shimamoto A, Adachi K, Namikawa S, Yada I. Administration of exogenous interleukin-2 enhances obliterative airway disease in cyclosporin-treated rats following tracheal allografts. *Transplant Procedures*. 1999;31:180.
  80. Brazelton T, Adams B, Shorthouse R, Morris R. Chronic rejection: results of uncontrolled remodelling of graft tissue by recipient mesenchymal cells? Data from two

- rodent models and the effects of immunosuppressive therapies. *Inflammation Research*. 1999;48(2):S134.
81. Adams B, Brazelton T, Berry G, Morris R. The role of respiratory epithelium in a rat model of obliterative airway disease. *Transplantation*. 2000;69:661.
  82. BF A, Berry G, Huang X, Shorthouse R, Brazelton T, Morris R. Immunosuppressive therapies for the prevention and treatment of obliterative airway disease in heterotopic rat trachea allograft. *Transplantation*. 2000;69:2260.
  83. Romanska H, Ilkonen T, Bishop A, Morris A, Polak J. Upr-regulation of inducible nitric oxide synthetase in fibroblasts parallels the onset and progression of fibrosis in an experimental model of post-transplant obliterative airway disease. *Journal of Pathology*. 2000;191:71.
  84. Hashimoto M, Nakanishi R, Muranaka H, Umesue M, Eifuku R, Yasumoto K. Short course immunosuppression using FK 506 for rat tracheal allografts. *Journal of Cardiovascular Surgery*. 2000;41:487.
  85. King MB, Jessurun J, Savik SK, Murray JJ, Hertz MI. Cyclosporine reduces development of obliterative bronchiolitis in a murine heterotopic airway model. *Transplantation*. 1997;63(4):528-32.
  86. Fahrni JA, Berry GJ, Morris RE, Rosen GD. Rapamycin inhibits development of obliterative airway disease in a murine heterotopic airway transplant model. *Transplantation*. 1997;63(4):533-7.
  87. Kelly K, Hertz M, Mueller D. T-cell and major histocompatibility complex requirements for obliterative airway disease in heterotopically transplanted murine tracheas. *Transplantation*. 1998;66:764.
  88. Neuringer IP, Mannon RB, Coffman TM, Parsons M, Burns K, Yankaskas JR, et al. Immune cells in a mouse airway model of obliterative bronchiolitis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1998;19(3):379-86.
  89. Neuringer IP, Walsh SP, Mannon RB, Gabriel S, Aris RM. Enhanced T cell cytokine gene expression in mouse airway obliterative bronchiolitis. *Transplantation*. 2000;69(3):399-405.
  90. Boehler A, Sandera P, Hilinger S, Schmid R, Eugster H, Speich R, et al. Prevention of post-transplant airway obliteration in knock out mice: inhibition of TNF alpha alone as effective as combined inhibition of TNF alpha, TNF beta and IL-6. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000;161:A508.
  91. Yamada A, Konishi K, Cruz GL, Takehara M, Morikawa M, Nakagawa I, et al. Blocking the CD28-B7 T-cell costimulatory pathway abrogates the development of obliterative bronchiolitis in a murine heterotopic airway model. *Transplantation*. 2000;69(5):743-9.
  92. Szeto W, Krasinskas A, Kreisel D, Popma S, Rosengard B. Donor antigen presenting cells are important in the development of obliterative airway disease. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2000;120:1070.
  93. Boehler A, Chamberlain D, Xing Z, Slutsky AS, Jordana M, Gauldie J, et al. Adenovirus-mediated interleukin-10 gene transfer inhibits post-transplant fibrous airway obliteration in an animal model of bronchiolitis obliterans. *Hum Gene Ther*. 1998;9(4):541-51.
  94. Boehler A, Bai X, Liu M, Cassivi S, Chamberlain D, Slutsky A, et al. Upregulation of T-helper 1 cytokines and chemokine expression in post-transplant airway obliteration. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999;159:1910.

95. MacLean A, Liu M, Fischer S, Suga M, Keshavjee S. Targeting the angiotensin system in post transplant airway obliteration. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000;162:310.
96. Suga M, MacLean A, Keshavjee S, Fischer S, Moreira J, Liu M. RANTES plays an important role in the evolution of allograft transplant-induced fibrous airway obliteration. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000;162:1940.
97. Hele DJ, Yacoub MH, Belvisi MG. The heterotopic tracheal allograft as an animal model of obliterative bronchiolitis. *Respir Res*. 2001;2(3):169-83.
98. Ikonen T, Uusitalo M, Taskinen E, Korpela A, Salminen U, Morris R. Small airway obliteration in a new swine heterotopic lung and bronchial allograft model. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 1998;17:945.
99. Salminen U, Ikonen I, Uusitalo M, Taskinen E, Korpela A, Maasilta P, et al. Obliterative lesion in small airways in an immunosuppressed porcine heterotopic bronchial allograft model. *Transplant International*. 1998;11(Suppl 1):S515.
100. Uusitalo M, Salminen U, Ikonen T, Taskinen E, Lautenschlager I, Maasilta P, et al. Alloimmune injury preceding airway obliteration in porcine heterotopic lung implants: a histologic and immunohistologic study. *Transplantation*. 1999;68:970.
101. Hausen B, Berry G, Dagum P, Ikonen T, Christians U, Briffa N, et al. The histology of subcutaneous implanted donor bronchial rings correlates with rejection scores of lung allografts in a primate lung transplant model. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 1999;18:714.
102. Kelly K, Hertz M. Obliterative bronchiolitis. *Clinics in Chest Medicine*. 1997;18:319.
103. Smith CR, Jaramillo A, Lu KC, Higuchi T, Kaleem Z, Mohanakumar T. Prevention of obliterative airway disease in HLA-A2-transgenic tracheal allografts by neutralization of tumor necrosis factor. *Transplantation*. 2001;72(9):1512-8.
104. Smith MA, Jaramillo A, SivaSai KS, Naziruddin B, Kaleem Z, Patterson GA, et al. Indirect recognition and antibody production against a single mismatched HLA-A2-transgenic molecule precede the development of obliterative airway disease in murine heterotopic tracheal allografts. *Transplantation*. 2002;73(2):186-93.
105. Konishi K, Inobe M, Yamada A, Murakami M, Todo S, Ueda T. Combination treatment with FTY720 and CTLA4IgG preserves the respiratory epithelium and prevents obliterative disease in a murine airway model. *J Heart Lung Transplant*. 2002;21(6):692-700.
106. Neuringer IP, Aris RM, Burns KA, Bartolotta TL, Chalermkulrat W, Randell SH. Epithelial kinetics in mouse heterotopic tracheal allografts. *Am J Transplant*. 2002;2(5):410-9.
107. Aris RM, Walsh S, Chalermkulrat W, Hathwar V, Neuringer IP. Growth factor upregulation during obliterative bronchiolitis in the mouse model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(3):417-22.
108. Higuchi T, Jaramillo A, Kaleem Z, Patterson GA, Mohanakumar T. Different kinetics of obliterative airway disease development in heterotopic murine tracheal allografts induced by CD4+ and CD8+ T cells. *Transplantation*. 2002;74(5):646-51.
109. Leonard CT, Soccia PM, Berry GJ, Doyle RL, Theodore J, Duncan SR, et al. PG490-88, a derivative of triptolide, attenuates obliterative airway disease in a mouse heterotopic tracheal allograft model. *J Heart Lung Transplant*. 2002;21(12):1314-8.
110. Visner GA, Lu F, Zhou H, Latham C, Agarwal A, Zander DS. Graft protective effects of heme oxygenase 1 in mouse tracheal transplant-related obliterative bronchiolitis. *Transplantation*. 2003;76(4):650-6.

111. McKane BW, Fernandez F, Narayanan K, Marshbank S, Margolin SB, Jendrisak M, et al. Pirfenidone inhibits obliterative airway disease in a murine heterotopic tracheal transplant model. *Transplantation*. 2004;77(5):664-9.
112. Chalermkulrat W, Neuringer IP, Park RC, Brickey WJ, Braeckman RA, Randell SH, et al. PX3.102, a novel chinese herb extract, diminishes chronic airway allograft rejection. *Transplantation*. 2004;78(1):158-61.
113. Ramirez AM, Takagawa S, Sekosan M, Jaffe HA, Varga J, Roman J. Smad3 deficiency ameliorates experimental obliterative bronchiolitis in a heterotopic tracheal transplantation model. *Am J Pathol*. 2004;165(4):1223-32.
114. Suemitsu R, Yoshino I, Shoji F, Yamaguchi M, Tomita Y, Maehara Y. The effects of pretreatment with donor antigen and immunosuppressive agents on fully allogenic tracheal graft. *J Surg Res*. 2004;122(1):8-13.
115. Fernández FG, McKane B, Marshbank S, Patterson GA, Mohanakumar T. Inhibition of obliterative airway disease development following heterotopic murine tracheal transplantation by costimulatory molecule blockade using anti-CD40 ligand alone or in combination with donor bone marrow. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(7 Suppl):S232-8.
116. Lande JD, Dalheimer SL, Mueller DL, Hertz MI, King RA. Gene expression profiling in murine obliterative airway disease. *Am J Transplant*. 2005;5(9):2170-84.
117. Zhou H, Latham CW, Zander DS, Margolin SB, Visner GA. Pirfenidone inhibits obliterative airway disease in mouse tracheal allografts. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(10):1577-85.
118. Chalermkulrat W, McKinnon KP, Brickey WJ, Neuringer IP, Park RC, Sterka DG, et al. Combined donor specific transfusion and anti-CD154 therapy achieves airway allograft tolerance. *Thorax*. 2006;61(1):61-7.
119. Nusair S, Or R, Junadi S, Amir G, Breuer R. Simultaneous donor marrow cell transplantation with reduced intensity conditioning prevents tracheal allograft obliteration in a bronchiolitis obliterans murine model. *Chest*. 2005;128(6):4024-9.
120. KleinJan A, Willart MA, Kuipers H, Coyle AJ, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Inducible costimulator blockade prolongs airway luminal patency in a mouse model of obliterative bronchiolitis. *Transplantation*. 2008;86(10):1436-44.
121. Xu J, Torres E, Mora AL, Shim H, Ramirez A, Neujahr D, et al. Attenuation of obliterative bronchiolitis by a CXCR4 antagonist in the murine heterotopic tracheal transplant model. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27(12):1302-10.
122. Mitchell PO, Jensen JS, Ritzenthaler JD, Roman J, Pelaez A, Guidot DM. Alcohol primes the airway for increased interleukin-13 signaling. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009;33(3):505-13.
123. Lau CL, Zhao Y, Kron IL, Stoler MH, Laubach VE, Ailawadi G, et al. The role of adenosine A2A receptor signaling in bronchiolitis obliterans. *Ann Thorac Surg*. 2009;88(4):1071-8.
124. Khatwa UA, Kleibrink BE, Shapiro SD, Subramaniam M. MMP-8 promotes polymorphonuclear cell migration through collagen barriers in obliterative bronchiolitis. *J Leukoc Biol*. 2010;87(1):69-77.
125. Shah PD, West EE, Whitlock AB, Orens JB, McDyer JF. CD154 deficiency uncouples allograft CD8+ T-cell effector function from proliferation and inhibits murine airway obliteration. *Am J Transplant*. 2009;9(12):2697-706.
126. Lemaitre P. [Study of mechanisms dependent on interleukin-17 and their modulation in development of bronchiolitis obliterans after experimental transplantation]. *Bull Mem Acad R Med Belg*. 2010;165(7-9):367-71.

127. Zhao Y, LaPar DJ, Steidle J, Emaminia A, Kron IL, Ailawadi G, et al. Adenosine signaling via the adenosine 2B receptor is involved in bronchiolitis obliterans development. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29(12):1405-14.
128. Liang OD, Kleibrink BE, Schuette-Nuetgen K, Khatwa UU, Mfarrej B, Subramaniam M. Green tea epigallo-catechin-galleate ameliorates the development of obliterative airway disease. *Exp Lung Res*. 2011;37(7):435-44.
129. Harris DA, Zhao Y, Lapar DJ, Emaminia A, Steidle JF, Stoler M, et al. Inhibiting CXCL12 blocks fibrocyte migration and differentiation and attenuates bronchiolitis obliterans in a murine heterotopic tracheal transplant model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;145(3):854-61.
130. Lee J, Nakagiri T, Oto T, Harada M, Morii E, Shintani Y, et al. IL-6 amplifier, NF- $\kappa$ B-triggered positive feedback for IL-6 signaling, in grafts is involved in allogeneic rejection responses. *J Immunol*. 2012;189(4):1928-36.
131. Zhao Y, Steidle JF, Upchurch GR, Kron IL, Lau CL. Prevention of the second stage of epithelial loss is a potential novel treatment for bronchiolitis obliterans. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012.
132. Morrison S, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006;441:1068.
133. Tajbakhsh S, Rocheteau P, Le Roux I. Asymmetric cell divisions and symmetric cell fates. *Annual Review of Cell Developmental and Biology*. 2009;25:671.
134. Phinney D, Prockop D. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair - current views. *Stem Cells*. 2007;25:2896.
135. Pittenger M, Mackay A, Beck S. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143.
136. Uccelli A, Moreta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews of Immunology*. 2008;8:726.
137. Tumber T, Guasch G, Greco V. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science*. 2004;303:359.
138. Gong J. Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells. *Science*. 1978;199:1443.
139. Barker N, Van Es J, Kuipers J. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*. 2007;449:1003.
140. Montarras D, Morgan J, Collins C. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science*. 2005;309:2064.
141. Reynolds B, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255:1707.
142. Kajstura J, Rota M, Hall S. Evidence for human lung stem cells. *New England Journal of Medicine*. 2011;364:1795.
143. Song B, Niclis J, Alikhan M. Generation of induced pluripotent stem cells from human kidney mesangial cells. *Journal of American Society of Nephrology*. 2011;22:1213.
144. Wang Z, Au P, Chen T. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells from durable blood vessels in vivo. *Nature Biotechnology*. 2007;25:317.
145. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663.
146. Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S. Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145.
147. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-component induced pluripotent stem cell. *Nature*. 2007;448:313.

148. Iyer SS, Co C, Rojas M. Mesenchymal stem cells and inflammatory lung diseases. *Panminerva Med.* 2009;51(1):5-16.
149. Weiss DJ, Ortiz LA. Cell therapy trials for lung diseases: progress and cautions. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(2):123-5.
150. Friedenstein A, Petrakova K, Kurolesova A, Frolova G. Heterotopic of boné marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6:230.
151. Iso Y, Spees J, Serrano C. Multipotent human stromal cell improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2007;354:700.
152. Burt R, Loh Y, Pearce W. Clinical applications of blood-derived stem cells for nonmalignant diseases. *JAMA.* 2008;299:925.
153. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells.* 2012;30(5):804-10.
154. Plock JA, Schnider JT, Schweizer R, Gorantla VS. Are cultured mesenchymal stromal cells an option for immunomodulation in transplantation? *Front Immunol.* 2013;4:41.

## **5. Hipóteses e objetivos**

### ***Hipótese Nula***

As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo não reduzem o processo inflamatório no enxerto em modelo experimental murino de bronquiolite obliterante.

### ***Hipótese Operacional***

As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo reduzem o processo inflamatório no enxerto em modelo experimental murino de bronquiolite obliterante.

## **6. Objetivos**

### **Objetivo Geral**

Determinar a eficácia de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, em modelo murino de bronquiolite obliterante, na redução do processo inflamatório do enxerto.

### **Objetivos Secundários**

Relacionar a terapia celular nos animais receptores com os seguintes aspectos no aloenxerto:

- (1) obliteração intraluminal por colágeno,
- (2) preservação do epitélio,
- (3) processo inflamatório linfoplasmocitário;
- (4) presença de alterações vasculares e extravasculares.



**ARTIGO**

**TERAPIA CELULAR NO TRATAMENTO DA BRONQUIOLITE OBLITERANTE  
EM MODELO MURINO**

Cabeçalho: Terapia celular e bronquiolite obliterante

Julio de Oliveira Espinel, M.Ch.\*

Carolina Uribe, MSC.

Fabíola Schons Meyer, MSc.

Rafael Bringheti, M.D., MSc..

Jane Ulbricht Kulczynski, M.D., PhD.

Maurício Guidi Saueressig, M.D., PhD.

Artigo: 2 tabelas, 11 figuras, 5798 palavras e 54 referências

Sem conflitos de interesse a declarar

\*Separatas e correspondência para:

Praça Dom Feliciano 78 sala 503

Centro – Porto Alegre - Brasil

CEP:90020-160

julioespinel@gmail.com

Porto Alegre, novembro 2013

## 7. Resumo

**Introdução:** O transplante pulmonar consolidou-se como terapia de escolha para pneumopatias terminais. A bronquiolite obliterante limita a sobrevida dos pacientes transplantados e não tem um tratamento definido e eficaz. Células-tronco têm propriedades imunomoduladoras.

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi investigar o papel das células tronco mesenquimais na diminuição do processo inflamatório do aloenxerto em modelo murino de bronquiolite obliterante.

**Material e Métodos:** Trabalho desenvolvido na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Realizado alotransplante traqueal heterotópico em bolsa dorsal subcutânea e injetado  $5 \times 10^5$  células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo sistemicamente. Procedida a análise em HE, picrossírius e morfometria digital.

**Resultados:** Os animais foram divididos em 2 grupos, conforme o tempo de sacrifício: T7 e T21. Os T7 tratados com terapia celular apresentaram mediana de área obstruída do enxerto de 0 contra 0,54 dos controles ( $p = 0,635$ ). Os T21 tratados apresentaram mediana de área obstruída da luz do enxerto de 0,25 nos tratados e 0 nos controles ( $p = 0,041$ ).

**Conclusão:** A terapia celular injetada sistemicamente em modelo experimental murino de bronquiolite obliterante não reduziu a gravidade do processo inflamatório no aloenxerto de forma estatisticamente significativa em 7 dias; de modo contrário, em 21 dias, aumentou o processo inflamatório no aloenxerto.

Palavras-chave: transplante traqueal heterotópico, bronquiolite obliterante, terapia celular, células-tronco mesenquimais.

## 8. Introdução

O transplante pulmonar tornou-se uma alternativa viável para muitas doenças pulmonares terminais.

A bronquiolite obliterante (BO) é o principal limitante à sobrevida em longo prazo no transplante pulmonar. Apresenta etiologia inflamatória. Múltiplos fatores contribuem para o desenvolvimento dessa condição: episódios repetidos de rejeição aguda, infecções pelo citomegalovírus, doença do refluxo gastroesofágico, disfunção primária do enxerto, tipo de transplante realizado, se unilateral ou bilateral, e ainda, aspectos relacionados à autoimunidade.

As alternativas terapêuticas para BO são limitadas e sem um protocolo claramente estabelecido. Entre os possíveis tratamentos, incluem-se alterar a medicação imunossupressora, fotoferese, irradiação linfóide total, azitromicina, plasmaferese e ciclosporina inalada (1-6)

O modelo experimental mais simples para estudar BO (rejeição crônica) é do transplante traqueal heterotópico alogênico com roedores de pequeno porte. Esse modelo mostra-se robusto para estudos sobre imunogênese, do ponto de vista genético e molecular, e para avaliação de novas terapêuticas imunossupressoras em fases iniciais.

As células-tronco (CT) são aquelas com capacidade de auto-renovação e diferenciação e há um volume crescente de estudo destas células. Tem-se testado o seu papel em diferentes doenças, criando-se um novo ramo do conhecimento – a medicina regenerativa.

Sabe-se que as células-tronco mesenquimais (CTM) têm propriedades imunomoduladoras. Tem sido proposto que sejam capazes de modular a

resposta à lesão isquêmica ou mesmo atenuar os efeitos das doenças imunomediadas. As CTM já foram testadas em ensaios clínicos em humanos em cenários de doença do enxerto contra hospedeiro após transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas e na doença inflamatória intestinal (7, 8). Em modelo de experimental de transplante traqueal heterotópico, Grove et al. avaliaram o papel das CTM derivadas de medula óssea e detectaram expressiva redução de 60% na ocorrência da BO (9).

Considerando-se que a BO é uma doença de natureza inflamatória, limita a sobrevida do transplante pulmonar e que as opções terapêuticas são limitadas, elaborou-se um estudo experimental para avaliar o papel das células-tronco derivadas de tecido adiposo na redução do processo inflamatório no enxerto em modelo murino de transplante traqueal heterotópico alogênico.

## 9. Materiais e métodos

Este trabalho experimental, randomizado, cego e controlado foi desenvolvido no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelos seguintes laboratórios: Unidade de Experimentação Animal, Centro de Terapia Gênica, Laboratório de Patologia Experimental e Laboratório de Vias Aéreas e Pulmão.

O estudo foi aprovado no comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 100524.

### 9.1 Animais

A manipulação e o alojamento dos camundongos estiveram de acordo com a Resolução Normativa No. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do *United State National Institute of Health* (NIH publicação nº 85-23, revisada em 1996).

Os camundongos foram adquiridos de centros especializados em animais de experimentação. Ao todo, utilizou-se 90 camundongos, sendo 37 animais BALBc (receptores) e 37 animais C57BL6 (doadores). Usou-se 16 camundongos C57BL6 para extração de células-tronco mesenquimais. Todos os animais foram tratados conforme a norma vigente para animais de experimentação.

### 9.2 Obtenção de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo

Camundongos C57BL6 foram sacrificados por deslocamento cervical na Unidade de Experimentação Animal (UEA). Retirou-se o tecido adiposo epididimal e colocado em meio de cultura constituído por *Dulbecco's Modified Eagle Medium* suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de Penicilina/Estreptomicina. Essa amostra foi transportada ao Centro de Terapia Gênica e colocada em ambiente estéril dentro de capela de exaustão.

O tecido foi submetido à digestão mecânica com bisturi e, logo após, à digestão enzimática com Colagenase Tipo I (1mg/ml) durante 30 minutos a 37°C agitando a cada 10 minutos. A suspensão celular retirada foi centrifugada e semeada em placa de 6 poços. A cultura celular manteve-se com meio de cultivo. Após duas semanas de cultivo e sucessivas trocas de meio, as células obtidas foram chamadas células tronco mesenquimais. Quando a cultura chegou à confluência, tratou-se com tripsina e transferidas para garrafas de cultura.

As células foram cultivadas até serem obtidas alíquotas de  $5 \times 10^5$  células por animal a ser tratado. Cada alíquota foi diluída em 100µl de solução salina tamponada para injeção no camundongo.

### 9.3 Experimento

Os procedimentos cirúrgicos experimentais foram realizados na Unidade de Experimentação Animal (UEA).

Realizou-se o transplante traqueal heterotópico alogênico em bolsa dorsal subcutânea. Os animais doadores foram anestesiados com xilazina 10mg/kg e cetamina 100mg/kg. Após o animal não apresentar mais reflexo doloroso ao estímulo das patas traseiras, realizou-se incisão longitudinal desde

o apêndice xifoide até a região cervical do animal. Foi ressecada a parede torácica anterior para facilitar o acesso e dissecação da traquéia, desde a laringe até a carina principal. Dissecou-se a traquéia, liberando-a do esôfago, e posteriormente era retirada a laringe, restos de tireóide e de tecidos linfoides adjacentes através de microdissecação com instrumental adequado. Após, a traquéia inteira era mantida em solução salina tamponada gelada (entre 4 e 10°C) até seu implante no camundongo receptor.

O receptor era submetido à anestesia inalatória com isoflurano em dose titulada para obter analgesia com ventilação espontânea. Quando em plano anestésico adequado, era ofertado oxigênio por meio de campânula. Procedeu-se a uma incisão longitudinal de 1 cm no dorso do animal, a 5 mm caudal da ponta escápula na linha média dorsal. Foi confeccionada uma bolsa subcutânea cranial à incisão por meio de dissecação roma para colocar o enxerto (traquéia inteira esticada) a pelo menos 1 cm cranial à incisão. A síntese cirúrgica foi realizada com fio cirúrgico de nylon 6.0 com pontos separados e nós sepultados. Foi administrado tramadol, 10mg/kg, no pós-operatório imediato e em seguida retornavam às gaiolas e mantidos com água e ração *ad libitum*.

Os animais foram sacrificados no 7º e 21º dias pós-transplante em câmara de gás CO<sub>2</sub>. Após o sacrifício, procedeu-se a uma nova incisão no animal receptor há 3 cm caudal da incisão prévia e era invertida a pele do dorso do animal. Após a identificação do enxerto, este era dissecado dos tecidos adjacentes e imerso em formol.

Cada doador, camundongo C57BL6, tinha sua traquéia retirada e implantada em 1 receptor, camundongo BALBc. No momento do implante, os



animais recebiam pela veia da cauda, 100µl de terapia celular ou de solução salina tamponada.

Os grupos experimentais receberam os seguintes nomes de acordo com o tratamento e o tempo para o sacrifício: T7cel (10 animais sacrificados em 7 dias, com terapia celular), T7con (5 animais sacrificados em 7 dias, com solução salina tamponada), T21cel (12 animais sacrificados em 21 dias, com terapia celular) e T21con (10 animais sacrificados em 21 dias, com solução salina normal). Ver figura 1.

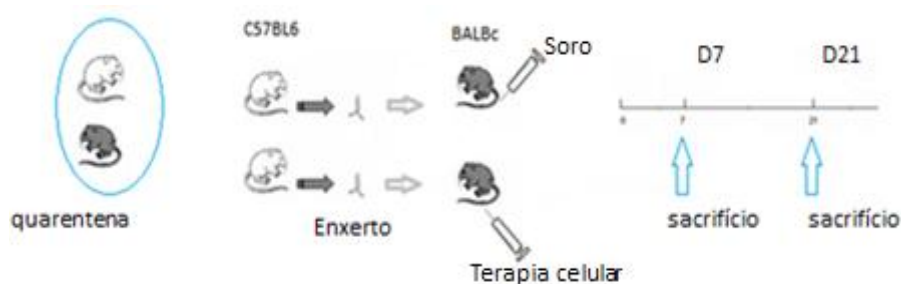


Figura 1 – Desenho experimental

#### 9.4 Forma de administração

A terapia celular foi administrada aos animais por meio de injeção de 100 µl de solução salina tamponada com  $10^5$  células-tronco mesenquimais na veia da cauda com agulha de 30G. A injeção da solução de terapia celular foi administrada, lentamente, durante 1 minuto. Caso fosse verificado extravasamento do conteúdo, avaliado pela inspeção visual da cauda, nova alíquota padrão de  $5 \times 10^5$  células era administrada. Os animais que morreram após a injeção da terapia celular foram excluídos da análise.

#### 9.5 Análise histológica

As traquéias retiradas nos tempos específicos foram imersas em formol. As traquéias foram cortadas em sua porção média. Foram obtidos cortes com 5µm de espessura. Após fixação, foram coradas pelo método da hematoxilina e eosina (HE). Avaliou-se as lâminas semiquantitativamente quanto a: 1) obliteração intraluminal, classificada como maior ou menor de 50% (obliteração intraluminal grave se >50%); 2) grau de preservação do epitélio, classificada como perda maior ou menor de 50% da integridade do epitélio (perda epitelial grave se > 50%); 3) presença de inflamação linfocítica ou plasmocítica, classificada como leve (infiltrado esparso envolvendo vasos ou permeando tecido conjuntivo adjacente) ou grave (infiltrado difuso, com envolvimento transmural); 4) alterações circulatórias (vasculares e extravasculares), classificada como leve ou grave de acordo com presença de edema local ou infiltração de polimorfonucleares envolvendo vasculatura. Classificação adaptada de Boehler (10).

As lâminas também foram coradas com picosirius coloração específica para distinguir fibrilas de colágeno, a fim de identificar se a obliteração luminal dos enxertos é causada por tecido rico em colágeno ou não.

#### 9.6 Morfometria Digital

A avaliação morfométrica digital (Image J – versão 1.45s) foi aplicada aos cortes histológicos dos enxertos corados por picosirius e HE e digitalizados por software de captura de imagens (Image-Pro Express). Manualmente, definiu-se a área de obstrução luminal (A2) e a área de luz original do enxerto (A1). Calculou-se a razão de A2/A1 que resultou na área obstruída do enxerto.

## 9.7 Análise estatística

Foi realizado cálculo do tamanho da amostra com base no desfecho primário – avaliação do processo inflamatório através da obstrução luminal, com base em um estudo piloto. Foi considerado um poder de 80% para detectar uma redução da obstrução luminal de 60% - com base em trabalhos prévios (9), e um erro alfa de 5% bicaudal. Obteve-se uma amostra necessária de 5 animais por grupo.

Foi realizado teste de normalidade para a variável contínua “área obstruída do enxerto”. Verificou-se que o desvio padrão excedia a metade da média da amostra; tinha uma distribuição assimétrica positiva. Logo, os dados serão apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Foi utilizado, para análise estatística, teste de Fisher, para as variáveis que foram consideradas categóricas. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para variáveis contínuas, pois não apresentaram distribuição normal e exigiram tratamento não paramétrico. Utilizou-se o software SPSS 21.0.

Foram utilizados na análise estatística os animais que sobreviveram até o dia programado para o sacrifício. Os animais mortos antes desse período foram excluídos da análise.

## 10 Resultados

### 10.1 Análise histológica semiquantitativa

A análise da obliteração intraluminal dos enxertos heterotópicos de animais sacrificados em 7 dias demonstrou obliteração grave (para um ponto de corte de 50% de obliteração) em 40% dos animais tratados com terapia celular e em 50% dos animais controle ( $p = 1$ ). Ver tabela 1.

A análise da integridade do epitélio dos enxertos heterotópicos demonstrou que em 50% dos animais dos grupos T7cel e T7con apresentaram perda da integridade epitelial grave (perda de > 50% de integridade epitelial) ( $p = 1$ ). Analisando o processo inflamatório linfoplasmocitário, verificou-se que o processo inflamatório grave ocorreu apenas no grupo T7con (em 16,67% dos animais) ( $p = 0,38$ ). Em relação às alterações circulatórias (vasculares e extravasculares), obteve-se o seguinte: 60% de alterações circulatórias graves no T7cel e 100% no T7con ( $p = 0,23$ ). Ver tabela 1. Figuras 2 a 5.

Tabela 1. Análise histológica dos animais sacrificados em 7 dias

	<b>T7 con</b>	<b>T7cel</b>	<b>P</b>
<b>Obliteração intraluminal grave</b>	50%	40%	1
<b>Perda da integridade epitelial grave</b>	50%	50%	1
<b>Inflamação linfoplasmocitária grave</b>	16,67%	0%	0,38
<b>Alterações circulatórias graves</b>	100%	60%	0,23

Aos 21 dias, a obliteração intraluminal grave foi de 41,67% no grupo T21cel contra 20% no T21con ( $p = 0,38$ ). Ver tabela 2.

A análise da resposta inflamatória em 21 dias revelou o seguinte: 75% de perda da integridade epitelial grave no T21cel e 90% no T21con ( $p = 0,59$ ). Ao examinar-se processo inflamatório linfoplasmocitário, obteve-se 75% de inflamação grave no T21cel contra 50% no T21con ( $p = 0,38$ ). Quanto às alterações circulatórias, constatou-se 25% de alterações circulatórias graves no T21cel contra 40% T21con. ( $p = 0,65$ ). Esses achados são apresentados na tabela 2. Figuras 6 a 9.

Tabela 2. Análise histológica dos animais sacrificados em 21 dias

	<b>T21 con</b>	<b>T21cel</b>	<b>P</b>
<b>Obliteração intraluminal grave</b>	20%	41,67%	0,38
<b>Perda da integridade epitelial grave</b>	90%	75%	0,59
<b>Inflamação linfoplasmocitária grave</b>	50%	75%	0,38
<b>Alterações circulatórias graves</b>	40%	25%	0,65

## 10.2 Morfometria digital

A avaliação morfométrica digital, aplicando Image J nos cortes histológicos digitalizados, revelou que, nos enxertos de 7 dias, a mediana (percentil 25 – percentil 75) da razão A2/A1 (área obstruída do enxerto) no T7con foi de 0,54 (0 – 0,71); já no T7cel, a mediana foi de 0 (0 - 0,65)  $p = 0,635$ . Esses achados estão da figura 10.

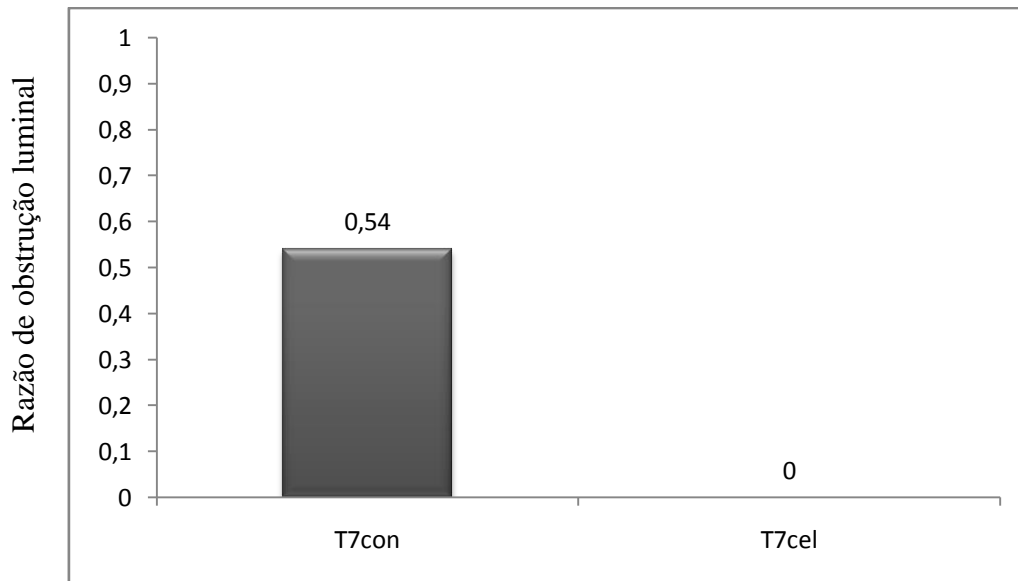


Figura 10. Medianas das áreas obstruídas em enxertos (A2/A1) de 7 dias;  $p = 0,635$ . A1: área da luz original do enxerto; A2: área de obstrução luminal do enxerto. A2/A1: área obstruída do enxerto.

Nos animais sacrificados em 21 dias, a mediana (percentil 25 – percentil 75) das áreas obstruídas no T21con foi de 0 (0 - 0,09) e no T21cel de 0,25 (0,05 – 1)  $p = 0,041$ . Dados demonstrados na figura 11.

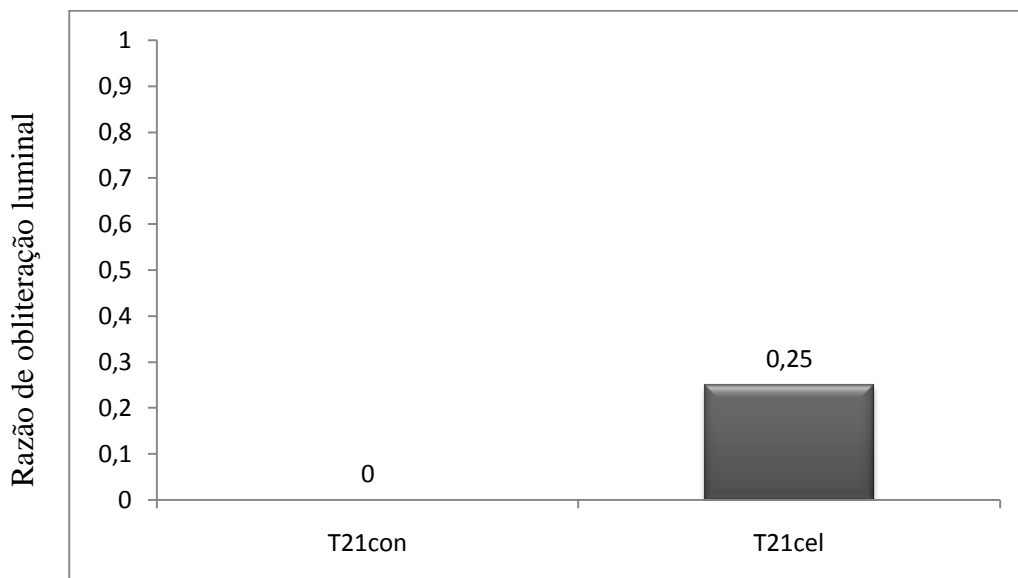


Figura 11. Medianas das áreas obstruídas em enxertos ( $A2/A1$ ) de 21 dias;  $p = 0,041$ . A1: área da luz original do enxerto; A2: área de obstrução luminal do enxerto.  $A2/A1$ : área obstruída do enxerto.

## 11 Discussão

A terapia celular com células-tronco mesenquimais (CTM) demonstra propriedades imunomoduladoras em diversos estudos (9, 11-18). A bronquiolite obliterante, que é a expressão patológica da rejeição crônica do transplante pulmonar, tem tratamentos com eficácia limitada. A BO tem natureza inflamatória, e para testar a eficácia das CTM nesse cenário, emprega-se o modelo experimental murino de transplante traqueal heterotópico, que é simples e rápido para se estudar novas terapias.

Nosso estudo não demonstrou diminuição do processo inflamatório nos enxertos heterotópicos dos animais tratados com terapia celular e sacrificados em 7 ou 21 dias. Observamos uma discreta tendência à diminuição do processo inflamatório em 7 dias, mas não foi estatisticamente significativa.

Na análise morfométrica digital em 21 dias, percebe-se que os camundongos tratados desenvolveram maior obliteração luminal que o grupo controle, de forma estatisticamente significativa. De outra parte, em 21 dias, a análise demonstrou resultados conflitantes quanto à avaliação semiquantitativa do processo inflamatório. Houve menor perda grave da integridade epitelial e menos alterações vasculares e extravasculares no grupo tratado, mas maior obliteração luminal grave e maior infiltrado linfoplasmocitário. Devem-se considerar as limitações próprias de uma análise semiquantitativa e o fato dessas diferenças não terem atingido significância estatística.

É importante ressaltar que se verificaram reduzidas taxas de inflamação da parede traqueal nos controles em 21 dias. A taxa de obliteração luminal em 21 dias nos aloenxertos controles foi baixa, quando comparada à literatura. Houve 20% de obliteração grave (>50% de obstrução da luz do enxerto)



observado em nosso estudo contra até 75-90% referido na literatura (19, 20). Apesar de seguirmos todos os passos cirúrgicos estabelecidos na literatura (10), e aumentarmos o número de camundongos do experimento (dobramos a amostra calculada inicialmente), a intensidade da obliteração luminal foi consistentemente menor do que o descrito na literatura.

Cabe destacar que o modelo de alotransplante traqueal murino demonstra variabilidade na obliteração luminal entre experimentos, de 30% a 100% de obliteração luminal. Isso pode justificar os dados divergentes entre diferentes grupos de pesquisa (21), principalmente no que tange a obliteração luminal em 21 dias (20).

A explicação para a escolha dos tempos para análise histológica dos aloenxertos deriva de estudos prévios, onde fica claro que o 7º dia após o transplante heterotópico é o ápice do infiltrado linfocítico na superfície epitelial (intraepitelial e subepitelial), análogo à bronquite ou bronquiolite linfocítica vista em humanos transplantados. Esse tempo constitui uma das fases mais precoces do processo de rejeição pulmonar, a fase linfocítica (10). No 7º dia, também nota-se vasculite linfocítica, que é uma manifestação de rejeição direcionada ao endotélio. A análise no 21º dia pós-transplante foi escolhida por representar a fase obliterativa da rejeição, ou seja, a fase terminal (9).

Até 2011, não havia na literatura nenhum dado de CTM aplicadas em modelo murino de BO, que fosse do nosso conhecimento. Um estudo, publicado em 2011 por Grove *et al.*, testou uma nova forma de imunomodulação com CTM derivadas de medula óssea. Injetou-se  $5 \times 10^5$  células por via retro ocular em camundongos alogênicos. Observou-se diminuição de 60% da obstrução intraluminal, quando compararam animais

tratados e controles, em grupos sacrificados em 7 e 14 dias. Isso sugere que a terapia celular pode ser efetiva em evitar obstrução da via aérea heterotópica (9).

As CTM demonstraram propriedades imunomoduladoras importantes, inclusive em doenças pulmonares como doença pulmonar obstrutiva crônica, hipertensão pulmonar, asma e fibrose pulmonar (22). Os mecanismos de imunomodulação ainda não foram completamente compreendidos, mas envolvem a inibição da proliferação de células T e a modulação da função das células B (23). Já foi demonstrado, também, que não há necessidade das CTM integrarem-se aos tecidos lesados para produzirem efeito; efeitos parácrinos explicam esse fenômeno (24).

Ainda sobre a forma de ação das CTM, alguns autores conseguiram demonstrar que CTM injetadas sistemicamente, além de migrarem para os tecidos lesados através de um efeito “*homing*”, permanecem viáveis e mescladas com as células nativas por alguns meses (25-27).

Apesar da maior parte dos dados da literatura apontarem para um efeito imunomodulador das CTM, há autores que demonstraram um efeito pró-fibrótico da terapia celular com CTM (28, 29). A realidade é que há um papel duplo das CTM: elas podem exercer uma função imunossupressora, protegendo contra a BO através de IL-8 e IL-10; ou podem ter um efeito pró-fibrótico, mediado por endotelina-1, TGF- $\beta$  e IL-13 (30). O microambiente local onde as CTM estão expostas determina o perfil predominante da sua ação. Em nosso estudo, nos animais dos grupos T21con e T21cel, houve uma obliteração luminal do enxerto inferior à da literatura; possivelmente, a dosagem das citocinas envolvidas no processo inflamatório poderia auxiliar no

entendimento dos nossos resultados, o que não foi realizado. Isso poderá ser explorado nos próximos trabalhos do nosso grupo.

Devemos ainda considerar que a forma de obtenção das CTM pode modificar suas propriedades imunomoduladoras. Nosso estudo obteve as células tronco mesenquimais a partir de tecido adiposo epididimal, ao contrário de Grove *et al.*, que as obtiveram de medula óssea. Esse fato, muito provavelmente, influenciou os nossos resultados. Sabe-se que células obtidas de fontes distintas tem potência imunomoduladora diferentes, provavelmente, devido ao padrão de produção de interleucina e fatores de crescimento. O perfil de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias podem auxiliar a desvendar os efeitos verificados em nosso estudo (31).

As CTM podem ser obtidas de diversos tecidos: osso trabecular, periosteio, membrana sinovial, músculo esquelético, pele, pericitos, sangue periférico, dente, ligamento periodontal, cordão umbilical (7). As CTM derivadas de tecido adiposo são muito estudadas, pois esse tecido é abundante e passível de ser acessado com baixa morbidade. Há relatos de que CTMA tem características diferentes entre si dependendo do local de onde foram extraídas (7). Nosso estudo obteve CTM de tecido adiposo epididimal. A escolha baseou-se na experiência do grupo de terapia gênica e na facilidade de acesso a esse tecido.

Outro ponto relevante para administração de CTM é a fonte de obtenção das células: autóloga versus alogênica; de uma única fonte ou de várias fontes. Isso parece influir nos efeitos da terapia celular (8). Grove obteve as CTM de forma alogênica e de animais de 3 raças diferentes, fato que pode ter influenciado os resultados .

Há ensaios clínicos demonstrando, em alguns cenários, que um número menor de células pode produzir efeitos mais consistentes em termos de recuperação de tecidos lesados (32). Optamos por utilizar  $5 \times 10^5$  células, pois a maior parte dos estudos em camundongos usa essa dose, embora também possa ser usada a dose  $10^6$  células.

A fim de analisar nossos resultados, questionamos se uma única injeção no tempo escolhido (no momento do transplante) é o mais adequado. O uso de terapia celular implica testes de momento de infusão e de número de injeções. Nesse contexto, talvez, possa-se obter resultados diferentes aplicando de forma repetida o tratamento – o que não foi testado até o presente momento nesse modelo, que seja do nosso conhecimento.

Sabe-se, ainda, que a administração tardia de terapia celular, quando o processo fibrótico já está estabelecido, não agrega benefícios (8). Todavia, há autores que conseguiram reversão do processo fibrótico inicial (8) após terapia celular, em modelo de fibrose pulmonar.

A idade da cultura das CTM, bem como o número de expansões das células determinam mudanças em sua morfologia, capacidade de diferenciação, viabilidade, eficiência de migração e competência para produzir citocinas (33-36). Em nosso experimento, tomamos o cuidado de usar cultura de células de mesma idade e expandidas o mesmo número de vezes (4 vezes). Assim, não nos parece que essa tenha sido a causa determinante da divergência entre os nossos resultados e a literatura.

A via de infusão utilizada na terapia celular em modelos murinos é variável. São utilizadas injeções intraperitoneais, loco-regionais e sistêmicas através da veia da cauda, do plexo venoso retrocular e por dissecação da veia

jugular interna (20). Essas diferentes formas podem ditar resultados diversos, como o obtido pelo presente estudo. Alguns estudos demonstram que a metabolização de primeira passagem pelos sinusóides hepáticos podem alterar a morfologia e fisiologia das células injetadas, o que não parece ter afetado esse estudo, já que a veia da cauda drena para o sistema cava e não portal.

Além disso, alguns grupos advogam a via intra-arterial como opção para terapia celular. Dessa forma, uma maior quantidade de células pode chegar ao tecido alvo, diminuindo os efeitos sistêmicos (37).

Em uma fase preliminar em nosso estudo, testamos diferentes vias de infusão: injeção sistêmica através da veia da cauda, do plexo venoso retrocular e da jugular interna. Os resultados não foram diferentes em nosso estudo piloto. Optamos pela injeção através da veia da cauda por praticidade em realizar uma injeção lenta, tecnicamente mais fácil.

Em nosso estudo, ainda na fase piloto, um dos limitantes para o desenvolvimento do experimento foi a alta mortalidade dos animais durante a fase de injeção da terapia celular. Testamos diferentes diluições de terapia celular (as mesmas  $5 \times 10^5$  células) diluídas em 50 $\mu$ l, 100 $\mu$ l e 200 $\mu$ l de solução salina tamponada. Não encontramos diferenças na mortalidade entre os grupos. Optamos por usar 100 $\mu$ l, pois é o volume mais usado na literatura. Por outro lado, quando injetávamos rapidamente as CTM, elas desencadeavam um quadro de insuficiência respiratória grave nos animais, que era seguido, em alguns casos, por hemiplegias e até mesmo parada cardiorrespiratória – algumas vezes reversível. Verificamos isso em nosso estudo, quando, em alguns experimentos com injeção de CTM, a mortalidade variou de 50 a 100%, quando injetamos as CTM em bolus (entre 10 a 20 segundos). Considera-se

que isso seja decorrente de embolização das células injetadas no coração direito e nas artérias cerebrais. Essa constatação não se mantém quando a terapia celular é injetada lentamente – 100 µl ao longo de 1 a 2 minutos – método desenvolvido pelo nosso grupo. Plock *et al.*, fizeram um comentário de dados não publicados de seu grupo, enfatizando a importância de administrar lentamente a terapia celular (15).

O modelo aplicado nesse experimento tem muitas semelhanças com o transplante pulmonar humano, porém, alguns aspectos devem sempre ser considerados: o aloenxerto transplantado não é funcional, portanto, não mimetiza o real ambiente do tecido transplantado por estar desconectado da via aérea do receptor; o aloenxerto não tem suprimento vascular primário próprio, o que pode impactar na dinâmica da resposta imune (9).

As associações de desfecho patológico com desfechos de biologia molecular podem determinar um melhor entendimento da dinâmica do processo inflamatório e do impacto da terapia. Deve-se considerar a análise das citocinas já implicadas na imunogênese da bronquiolite obliterante, bem como tentar associar a expressão gênica com a histopatologia (19, 38-52).

Observa-se grande número de publicações envolvendo o modelo de transplante traqueal heterotópico alogênico murino. Diversos passos da imunogênese foram desvendados por esse modelo. Ao avançar na imunogênese, alternativas terapêuticas também foram testadas ao longo dos últimos 20 anos, sendo algumas delas implementadas clinicamente, como ciclosporina, tacrolimus entre outros (53, 54).

Este estudo, nesse contexto, aumenta as informações acerca da terapia celular com CTM nesse modelo, sendo até o presente momento, que seja do

nosso conhecimento, o primeiro experimento a empregar CTM derivadas de tecido adiposo com esse objetivo.

Como perspectivas, poder-se-ia testar injeções seriadas de terapia celular nos animais, a fim de verificar se uma exposição repetitiva poderia resultar em efeitos maximizados em termos de diminuição do processo inflamatório.

Muitos alvos terapêuticos foram identificados na última década, o que aumenta a importância de realizarem-se testes de imunomoduladores associados à aferição do processo inflamatório, dosando citocinas envolvidas no processo, bem como utilizar painéis de expressão gênica.

## **12 Conclusão**

A terapia celular injetada sistemicamente em modelo experimental murino de bronquiolite obliterante não reduziu a gravidade do processo inflamatório no aloenxerto de forma estatisticamente significativa em 7 dias; de modo contrário, em 21 dias, aumentou o processo inflamatório no aloenxerto.

## **13 Financiamento**

Este trabalho foi financiado pelo FIPE-HCPA.

## 14 Bibliografia

1. Iacono A, Corcoran T, Griffith B. Aerosol cyclosporin therapy in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans. *European Respiratory Journal*. 2004;23:384.
2. O'Hagan A, Stillwell P, Arroliga A, Koo A. Photopheresis in the treatment of refractory bronchiolitis obliterans complicating lung transplantation. *Chest*. 1999;115:1459.
3. Morrell MR, Despotis GJ, Lublin DM, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR. The efficacy of photopheresis for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29(4):424-31.
4. Benden C, Speich R, Hofbauer G. Extracorporeal photopheresis after lung transplantation: a 10 year single center experience. *Transplantation*. 2008;86:1625.
5. Verderlen G, Lievens Y, Dupont L. Efficacy of total lymphoid irradiation in azithromycin nonresponsive chronic allograft rejection after lung transplantation. *Transplant Procedure*. 2009;41:1816.
6. Fisher A, Rutherford R, Bozzino J. The safety and efficacy of total lymphoid irradiation in progressive bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2005;5:537.
7. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*. 2012;30(5):804-10.
8. Weiss DJ, Ortiz LA. Cell therapy trials for lung diseases: progress and cautions. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(2):123-5.
9. Grove DA, Xu J, Joodi R, Torres-Gonzales E, Neujahr D, Mora AL, et al. Attenuation of early airway obstruction by mesenchymal stem cells in a murine model of heterotopic tracheal transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30(3):341-50.
10. Boehler A, Chamberlain D, Kesten S, Slutsky A, Liu M, Keshavjee S. Lymphocytic airway infiltration as a precursor to fibrous obliteration in a rat model of bronchiolitis obliterans. *Transplantation*. 1997;64:311.
11. Uccelli A, Moreta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews of Immunology*. 2008;8:726.
12. Burt R, Loh Y, Pearce W. Clinical applications of blood-derived stem cells for nonmalignant diseases. *JAMA*. 2008;299:925.
13. Phinney D, Prockop D. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the etate of transdifferentiation and modes of tissue repair - current views. *Stem Cells*. 2007;25:2896.
14. Guo Z, Zhou X, Li J, Meng Q, Cao H, Kang L, et al. Mesenchymal stem cells reprogram host macrophages to attenuate obliterative bronchiolitis in murine orthotopic tracheal transplantation. *Int Immunopharmacol*. 2013;15(4):726-34.
15. Plock JA, Schnider JT, Schweizer R, Gorantla VS. Are cultured mesenchymal stromal cells an option for immunomodulation in transplantation? *Front Immunol*. 2013;4:41.
16. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol*. 2013;91(1):19-26.
17. English K, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(5):a015560.
18. English K, Mahon BP, Wood KJ. Mesenchymal Stromal Cells; Role in Tissue Repair, Drug Discovery and Immune Modulation. *Curr Drug Deliv*. 2013.



19. Lau CL, Zhao Y, Kron IL, Stoler MH, Laubach VE, Ailawadi G, et al. The role of adenosine A2A receptor signaling in bronchiolitis obliterans. *Ann Thorac Surg.* 2009;88(4):1071-8.
20. Hele DJ, Yacoub MH, Belvisi MG. The heterotopic tracheal allograft as an animal model of obliterative bronchiolitis. *Respir Res.* 2001;2(3):169-83.
21. Neuringer IP, Aris RM, Burns KA, Bartolotta TL, Chalermkulrat W, Randell SH. Epithelial kinetics in mouse heterotopic tracheal allografts. *Am J Transplant.* 2002;2(5):410-9.
22. Iyer SS, Co C, Rojas M. Mesenchymal stem cells and inflammatory lung diseases. *Panminerva Med.* 2009;51(1):5-16.
23. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med.* 2009;15(1):42-9.
24. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol.* 2012;3:297.
25. Pan H, Zhao K, Wang L, Zheng Y, Zhang G, Mai H, et al. Mesenchymal stem cells enhance the induction of mixed chimerism and tolerance to rat hind-limb allografts after bone marrow transplantation. *J Surg Res.* 2010;160(2):315-24.
26. Kuo YR, Goto S, Shih HS, Wang FS, Lin CC, Wang CT, et al. Mesenchymal stem cells prolong composite tissue allotransplant survival in a swine model. *Transplantation.* 2009;87(12):1769-77.
27. Kuo YR, Chen CC, Shih HS, Goto S, Huang CW, Wang CT, et al. Prolongation of composite tissue allotransplant survival by treatment with bone marrow mesenchymal stem cells is correlated with T-cell regulation in a swine hind-limb model. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(2):569-79.
28. Salama M, Andrukhova O, Jaksch P, Taghavi S, Kelpetko W, Dekan G, et al. Endothelin-1 governs proliferation and migration of bronchoalveolar lavage-derived lung mesenchymal stem cells in bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation.* 2011;92(2):155-62.
29. Walker N, Badri L, Wettlaufer S, Flint A, Sajjan U, Krebsbach PH, et al. Resident tissue-specific mesenchymal progenitor cells contribute to fibrogenesis in human lung allografts. *Am J Pathol.* 2011;178(6):2461-9.
30. Hardy J, Webb W, Dalton MJ, Walker GJ. Lung homotransplantation in man. *JAMA.* 1963;186:1065.
31. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Front Immunol.* 2013;4:201.
32. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *Jama.* 2012;308(22):2369-79.
33. Banfi A, Bianchi G, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng.* 2002;8(6):901-10.
34. Hematti P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? *Cytotherapy.* 2012;14(5):516-21.

35. Vacanti V, Kong E, Suzuki G, Sato K, Canty JM, Lee T. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol.* 2005;205(2):194-201.
36. Wagner W, Ho AD, Zenke M. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(4):445-53.
37. Zonta S, De Martino M, Bedino G, Piotti G, Rampino T, Gregorini M, et al. 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.* 2010;42(4):1336-40.
38. Lemaître PH, Vokaer B, Charbonnier LM, Iwakura Y, Field KA, Estenne M, et al. Cyclosporine a drives a th17- and th2-mediated posttransplant obliterative airway disease. *Am J Transplant.* 2013;13(3):611-20.
39. Lee J, Nakagiri T, Oto T, Harada M, Morii E, Shintani Y, et al. IL-6 amplifier, NF- $\kappa$ B-triggered positive feedback for IL-6 signaling, in grafts is involved in allogeneic rejection responses. *J Immunol.* 2012;189(4):1928-36.
40. Harris DA, Zhao Y, Lapar DJ, Emaminia A, Steidle JF, Stoler M, et al. Inhibiting CXCL12 blocks fibrocyte migration and differentiation and attenuates bronchiolitis obliterans in a murine heterotopic tracheal transplant model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;145(3):854-61.
41. Lemaître P. [Study of mechanisms dependent on interleukin-17 and their modulation in development of bronchiolitis obliterans after experimental transplantation]. *Bull Mem Acad R Med Belg.* 2010;165(7-9):367-71.
42. Khatwa UA, Kleibrink BE, Shapiro SD, Subramaniam M. MMP-8 promotes polymorphonuclear cell migration through collagen barriers in obliterative bronchiolitis. *J Leukoc Biol.* 2010;87(1):69-77.
43. Xu J, Torres E, Mora AL, Shim H, Ramirez A, Neujahr D, et al. Attenuation of obliterative bronchiolitis by a CXCR4 antagonist in the murine heterotopic tracheal transplant model. *J Heart Lung Transplant.* 2008;27(12):1302-10.
44. Liu HX, Li Y, Zhao CH, Liu Y, Zhang QG, Cong W, et al. [The role of transforming growth factor-beta1/Smad3 signaling in bronchiolitis obliterans following lung transplantation]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2007;87(29):2069-73.
45. Lande JD, Patil J, Li N, Berryman TR, King RA, Hertz MI. Novel insights into lung transplant rejection by microarray analysis. *Proc Am Thorac Soc.* 2007;4(1):44-51.
46. Lande JD, Dalheimer SL, Mueller DL, Hertz MI, King RA. Gene expression profiling in murine obliterative airway disease. *Am J Transplant.* 2005;5(9):2170-84.
47. Chalermkulrat W, McKinnon KP, Brickey WJ, Neuringer IP, Park RC, Sterka DG, et al. Combined donor specific transfusion and anti-CD154 therapy achieves airway allograft tolerance. *Thorax.* 2006;61(1):61-7.
48. Zhou H, Latham CW, Zander DS, Margolin SB, Visner GA. Pirfenidone inhibits obliterative airway disease in mouse tracheal allografts. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24(10):1577-85.
49. Fernández FG, McKane B, Marshbank S, Patterson GA, Mohanakumar T. Inhibition of obliterative airway disease development following heterotopic murine tracheal transplantation by costimulatory molecule blockade using anti-CD40 ligand alone or in combination with donor bone marrow. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24(7 Suppl):S232-8.
50. Fernández FG, Campbell LG, Liu W, Shipley JM, Itohara S, Patterson GA, et al. Inhibition of obliterative airway disease development in murine tracheal allografts by matrix metalloproteinase-9 deficiency. *Am J Transplant.* 2005;5(4 Pt 1):671-83.

51. Chalermkulrat W, Neuringer IP, Park RC, Brickey WJ, Braeckman RA, Randell SH, et al. PX3.102, a novel chinese herb extract, diminishes chronic airway allograft rejection. *Transplantation*. 2004;78(1):158-61.
52. Yamada A, Konishi K, Cruz GL, Takehara M, Morikawa M, Nakagawa I, et al. Blocking the CD28-B7 T-cell costimulatory pathway abrogates the development of obliterative bronchiolitis in a murine heterotopic airway model. *Transplantation*. 2000;69(5):743-9.
53. Baughman RP, Meyer KC, Nathanson I, Angel L, Bhorade SM, Chan KM, et al. Executive summary: monitoring of nonsteroidal immunosuppressive drugs in patients with lung disease and lung transplant recipients: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2012;142(5):1284-8.
54. Baughman RP, Meyer KC, Nathanson I, Angel L, Bhorade SM, Chan KM, et al. Monitoring of nonsteroidal immunosuppressive drugs in patients with lung disease and lung transplant recipients: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2012;142(5):e1S-e111S.

15 Anexo 1

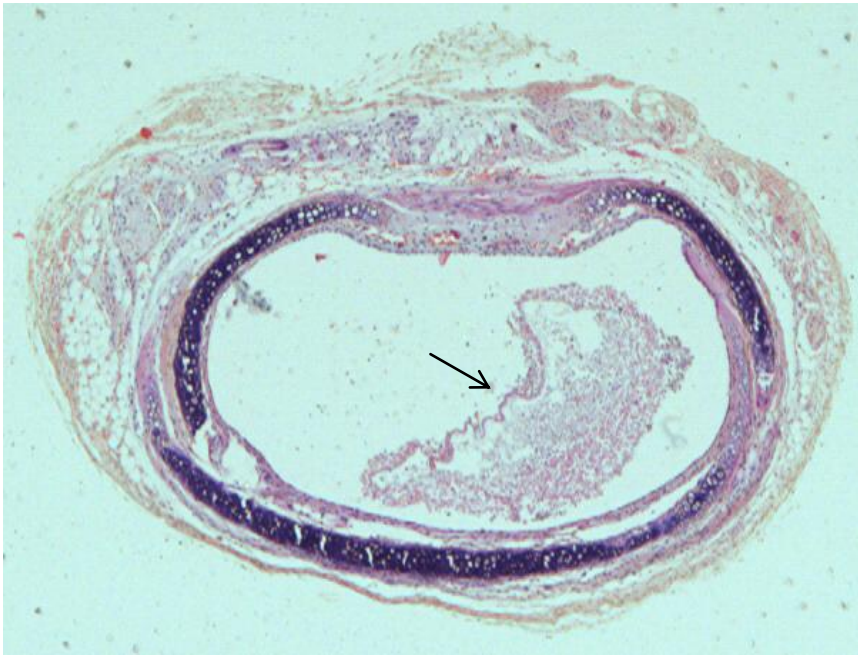


Figura 2. Fotomicrografia 40x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T7cel em HE. Luz parcialmente obstruída, ver seta.

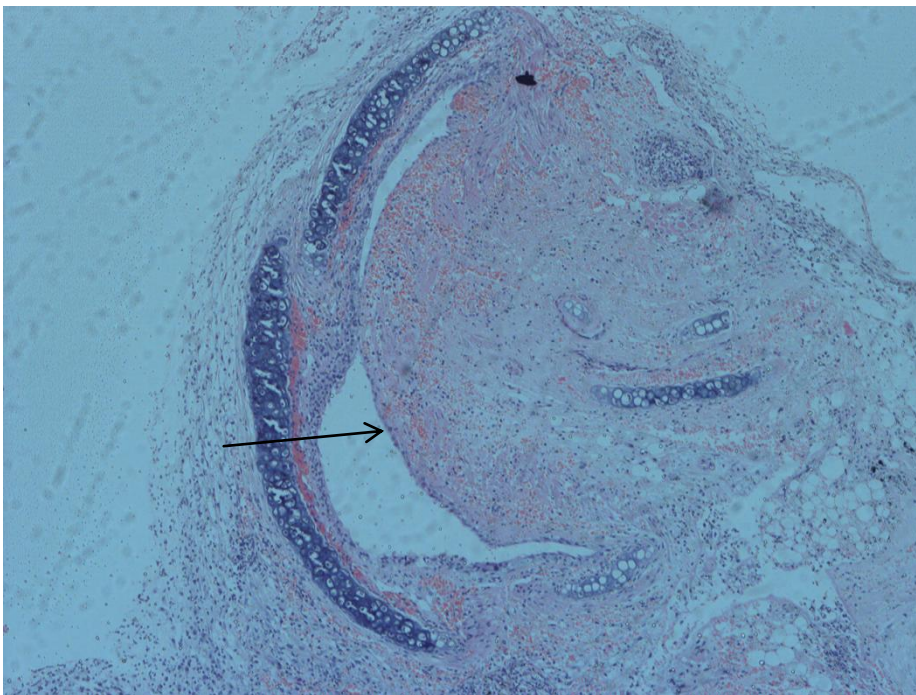


Figura 3. Fotomicrografia 100x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T7con em HE. Enxerto com obliteração luminal grave (>50%), ver seta.



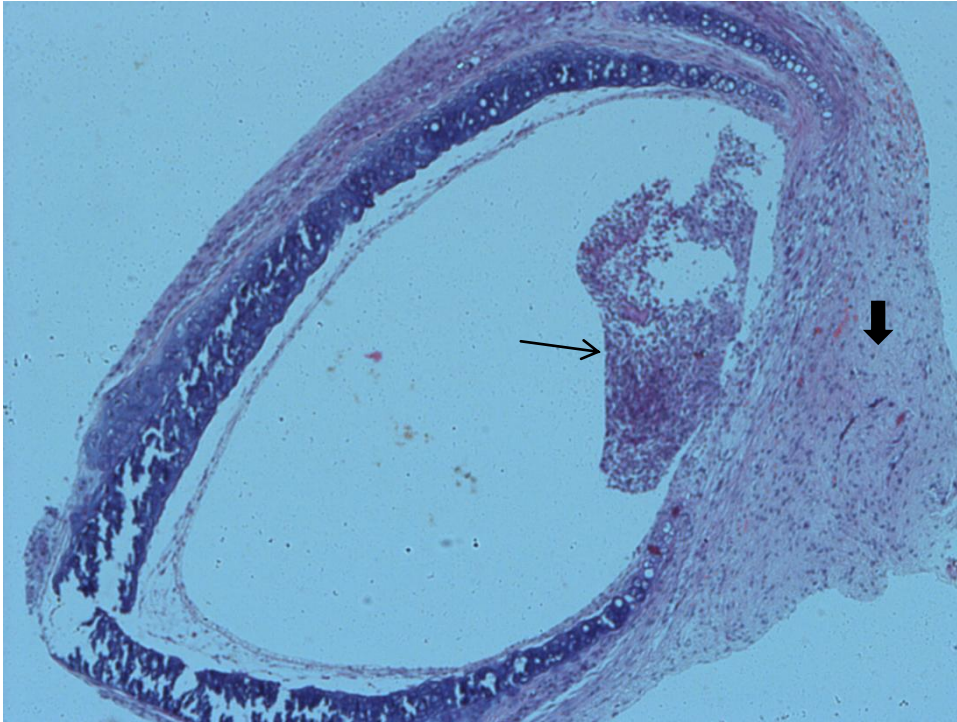


Figura 4. Fotomicrografia 100x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T21cel em HE. Enxerto sem obliteração luminal grave (<50%), ver seta fina. Seta grossa demonstra infiltrado linfoplasmocitário.

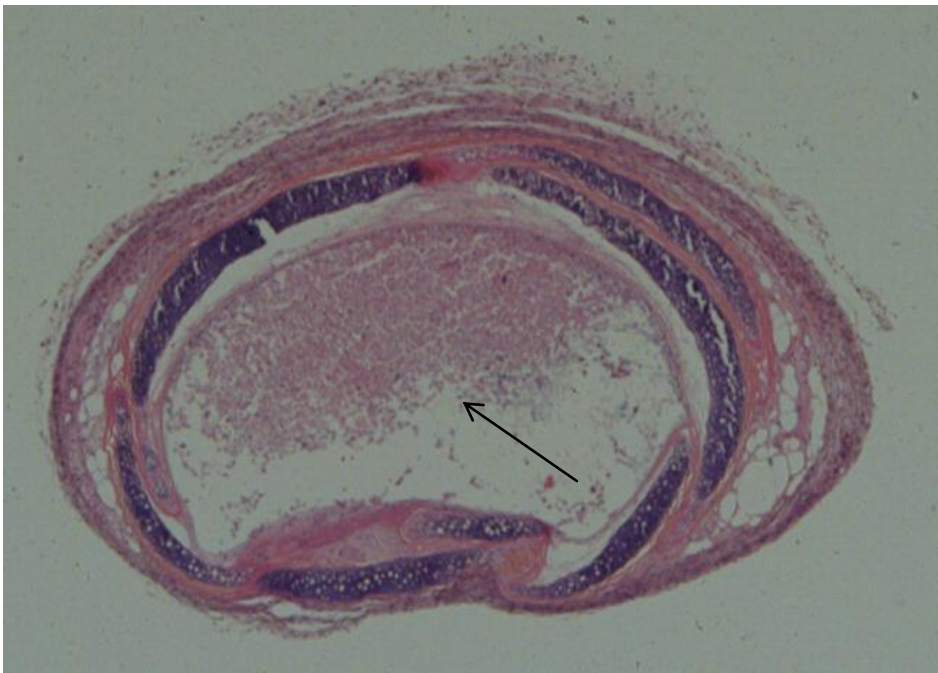


Figura 5. Fotomicrografia 40x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T21con em HE. Enxerto com obliteração luminal grave (<50%), ver seta.

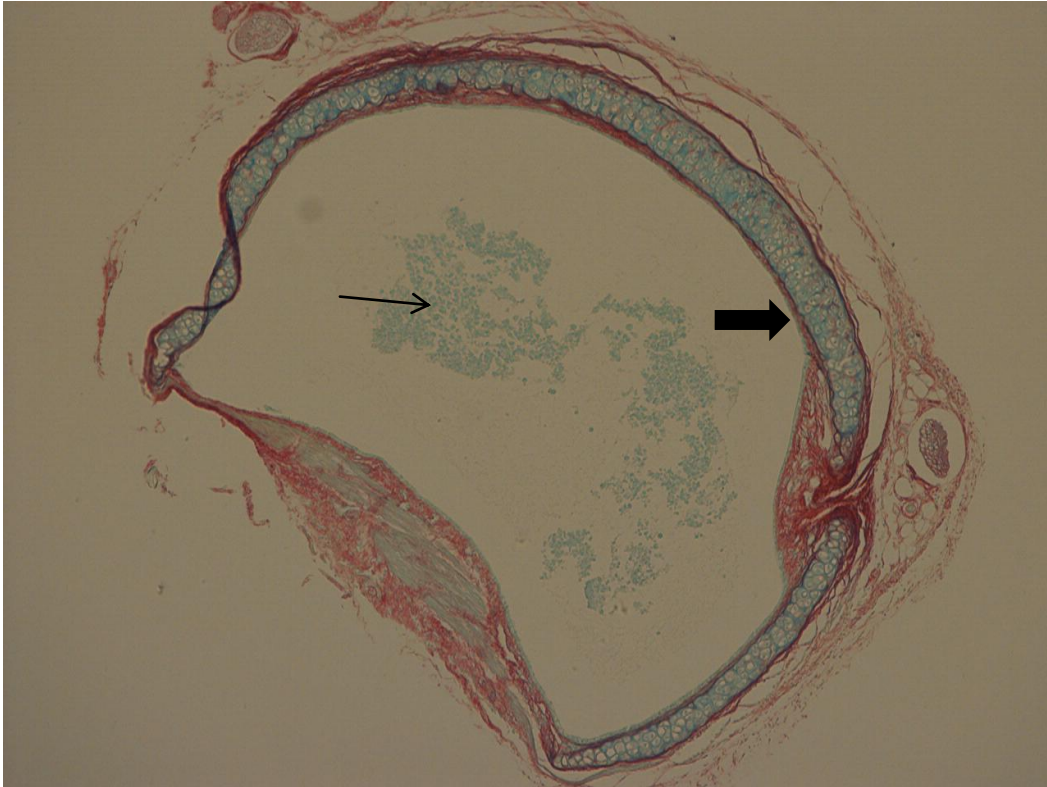


Figura 6. Fotomicrografia 100x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T7cel em picosirius. Enxerto sem obliteração luminal grave (<50%), ver seta fina. Seta grossa demonstra epitélio preservado.

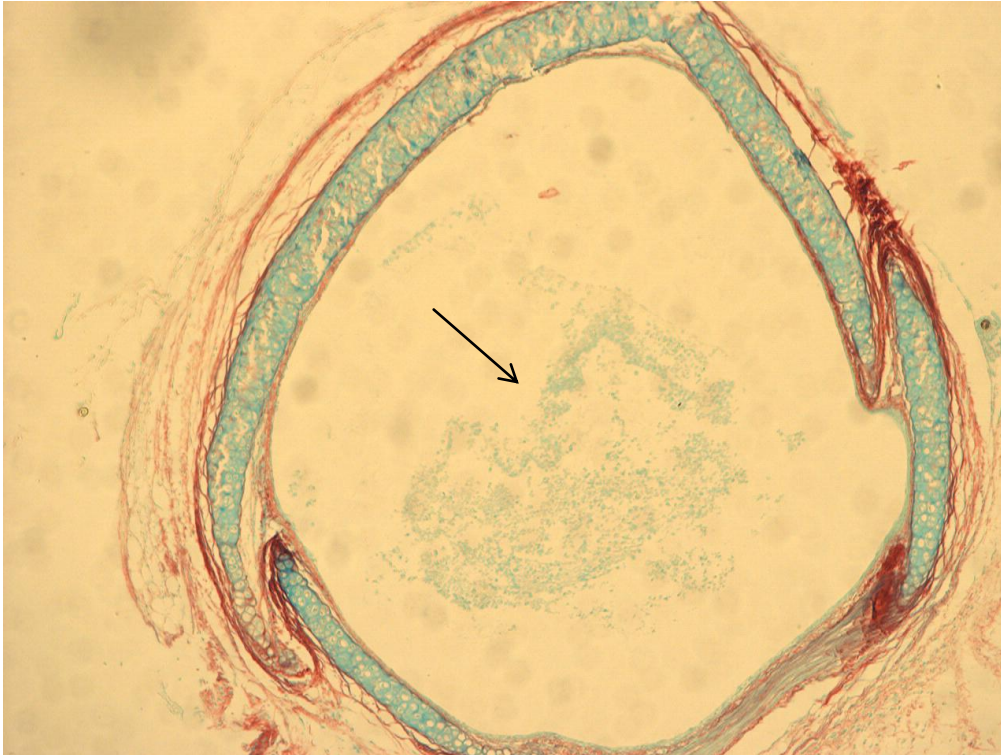


Figura 7. Fotomicrografia 100x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T7con em picosirius. Enxerto sem obliteração luminal grave (<50%), ver seta.





Figura 8. Fotomicrografia 100x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T21cel em picosirius. Enxerto sem obliteração luminal grave (<50%), ver seta.

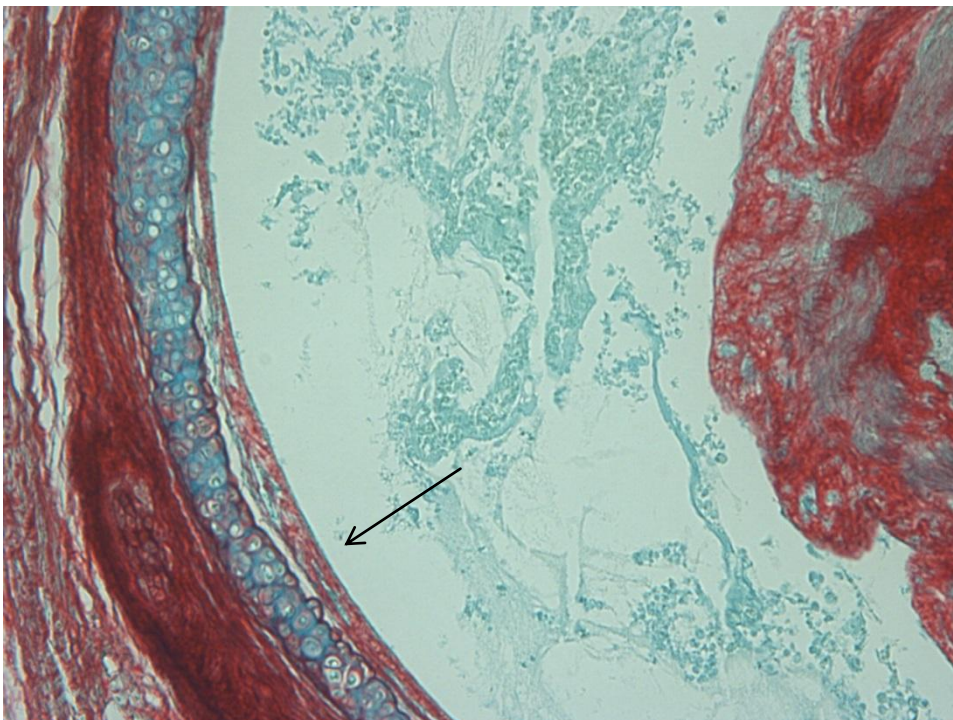


Figura 9. Fotomicrografia 200x. Corte transversal de enxerto traqueal do grupo T21con em picosirius. Epitélio íntegro, ver seta.

**ARTICLE**

**CELL THERAPY IN THE TREATMENT OF BRONCHIOLITIS OBLITERANS IN  
A MURINE MODEL**

Heading: Cell therapy and bronchiolitis obliterans

Julio de Oliveira Espinel, MCh\*

Carolina Uribe, MSc

Fabíola Schons Meyer, MSc

Rafael Bringheti, MSc

Jane Ulbricht Kulczynski, MD

Maurício Guidi Saueressig, MD

Article: 2 tables, 11 figures, 5754 words and 54 references

No conflicts of interest to declare

\*Reprints and correspondence to:

Praça Dom Feliciano 78 sala 503

Centro – Porto Alegre - Brasil

CEP:90020-160

julioespinel@gmail.com

Porto Alegre, November 2013



## Abstract

**Introduction:** Lung transplantation has established itself as therapy of choice for end-stage lung disease. Bronchiolitis obliterans limits transplant patient survival and has no specific and effective treatment. Stem cells have immunomodulatory properties.

**Aim:** The aim of this study was to investigate the role of mesenchymal stem cells as a protection against bronchiolitis obliterans in a murine model.

**Materials and Methods:** A heterotopic tracheal allotransplant was performed in the dorsal subcutaneous space and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells  $5 \times 10^5$  injected systemically. Analysis by digital morphometry was conducted with hematoxylin-eosin and picosirius staining.

**Results:** Mice were divided into 2 groups according to day of sacrifice: T7 and T21. The T7 group treated with cell therapy presented a median luminal obliteration rate of 0 versus 0.54 for the controls ( $p=0.635$ ). The treated T21 group presented a median obliteration rate of 0 versus 0.25 for the controls ( $p=0.041$ ).

**Conclusion:** Cell therapy administered to animals submitted to tracheal allotransplant in a murine model increased the area of luminal obstruction in mice sacrificed at 21 days, but had no statistically significant impact on animals sacrificed at 7 days.

Keywords: heterotopic tracheal transplant, bronchiolitis obliterans, cell therapy, mesenchymal stem cells.

## Introduction

Lung transplantation has become a viable alternative for many end-stage lung diseases.

Bronchiolitis obliterans (BO) is the main limiting factor for long-term survival in lung transplant. It presents an inflammatory etiology. Multiple factors contribute to the development of this condition: repeated episodes of acute rejection, cytomegalovirus infections, gastroesophageal reflux disease, primary graft dysfunction, type of transplant performed (unilateral or bilateral), and also aspects related to autoimmunity.

Therapeutic alternatives for BO are limited and without a clearly established protocol. Possible treatments include a change of immunosuppressive medication, photopheresis, total lymphoid irradiation, azithromycin, plasmapheresis, and inhaled cyclosporine (1-6).

The simplest experimental model for studying BO (chronic rejection) is allogeneic heterotopic tracheal transplant in small rodents. This model is shown to be robust for studies on immunogenesis, from a molecular and genetic viewpoint, and for early phase evaluation of new immunosuppressive therapies.

Stem cells (SC) are those with the capacity for self-renewal and differentiation and there is an increasing volume of study regarding these cells. Their role in different diseases has been tested, creating a new branch of knowledge - regenerative medicine.

It is known that mesenchymal stem cells (MSCs) have immunomodulatory properties and has been suggested they are capable of

modulating the response to ischemic injury or even to mitigate the effects of immune-mediated diseases. MSCs have already been tested in human clinical trials in scenarios of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, and in inflammatory bowel disease (7, 8). In an experimental heterotopic tracheal transplantation model, Grove et al. evaluated the role of bone marrow-derived MSCs and detected a significant 60% reduction in the occurrence of BO (9).

Considering that BO is a disease of an inflammatory nature that limits lung transplantation survival and has few therapeutic options, an experimental study was designed to evaluate the role of adipose tissue-derived stem cells in reducing the graft inflammatory process in an allogeneic heterotopic tracheal transplant in a murine model.

## MATERIALS AND METHODS

This experimental, randomized, blind and controlled study was developed at the Research Center of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* involving the following laboratories: Animal Experimentation Unit, Gene Therapy Center, Experimental Pathology Laboratory, and Airways and Lung Laboratory.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* under number 100524.

### 1. Animals

The handling and housing of the mice was in accordance with Normative Resolution No. 196/96 of the National Health Council, with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the *United States National Institute of Health* (NIH publication nº 85-23, revised 1996).

The mice were acquired from centers specialized in experimental animals. A total of 90 mice were used: 37 BALBc animals (recipients), 37 C57BL6 animals (donors), and a further 16 C57BL6 mice for extraction of the MSCs. All animals were treated according to current practice for animal experimentation.

### 2. Obtaining the adipose tissue-derived mesenchymal stem cells

C57BL6 mice were sacrificed through cervical dislocation at the Animal Experimentation Unit (AEU). Epididymal adipose tissue was removed and placed in a culture of Dulbecco's Modified Eagle Medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. This sample was taken

to the Gene Therapy Center and placed in a sterile environment inside a laminar flow hood.

The tissue was submitted to mechanical digestion with a scalpel and, soon after, to enzymatic digestion with Collagenase Type I (1mg/ml) for 30 minutes at 37°C with gentle agitation every 10 minutes. The removed cell suspension was centrifuged and seeded in a 6-well plate. The cell culture was maintained with culture medium. After two weeks of cultivation and successive medium changes, the obtained cells were called mesenchymal stem cells. When the culture reached confluence, it was treated with trypsin and transferred to culture bottles.

The cells were cultured until aliquots of  $5 \times 10^5$  cells per animal to be treated were obtained. Each aliquot was diluted in 100µl of buffered saline solution for injection into the mouse.

### 3. Experiment

The experimental surgical procedures were performed at the AEU.

The allogeneic heterotopic tracheal transplant was carried out in the dorsal subcutaneous space. Donor animals were anesthetized with 10 mg/kg xylazine and 100 mg/kg ketamine. Once the animal presented no further pain reflex to stimulation of the hind legs, a longitudinal incision was made from the xiphoid process to the cervical region of the animal. Resection of the anterior chest wall was carried out to facilitate access to and dissection of the trachea from the larynx to the carina. The trachea was dissected, freeing it from the esophagus and subsequently removing the larynx, thyroid remains and adjacent lymphoid tissues through microdissection with appropriate instruments. The

entire trachea was then kept in a cold buffered saline solution (4 - 10°C) until implanted into the recipient mouse.

The recipient mouse underwent inhalation anesthesia with isoflurane in a titrated dose to obtain analgesia with spontaneous ventilation. Oxygen through the hood was offered when in an adequate plane of anesthesia. A 1cm longitudinal incision was performed on the back of the animal, at 5mm below the edge of the scapula at the dorsal midline. A subcutaneous pocket was made cranial to the incision by means of a blunt surgical dissection in which to locate the graft (stretched out trachea) at least 1cm cranial to the incision. Surgical closure was performed using 6.0 nylon sutures with interrupted stiches and buried knots. Tramadol was administered, 10mg/kg, in the immediate post-operative period and they were then returned to the cages and maintained with water and food *ad libitum*.

The animals were sacrificed at 7 days and 21 days post-transplant in a CO<sub>2</sub> gas chamber. After sacrifice, a new incision was made in the recipient animal 3cm caudal to the previous incision and the skin inverted from the back of the animal. After identification of the graft, it was dissected from the surrounding tissues and immersed in formol

Each C57BL6 donor mouse had its trachea removed and implanted in a BALBc recipient mouse. The receiving animals were given 100µl of cell therapy or buffered saline solution via the tail vein at the time of implant.

The experimental groups were named as follows according to treatment and time of sacrifice: T7cel (10 animals given cell therapy and sacrificed at 7 days), T7con (5 animals given buffered saline solution and sacrificed at 7 days),

T21cel (12 animals given cell therapy and sacrificed at 21 days), and T21con (10 animals given normal saline and sacrificed at 21 days). See figure 1

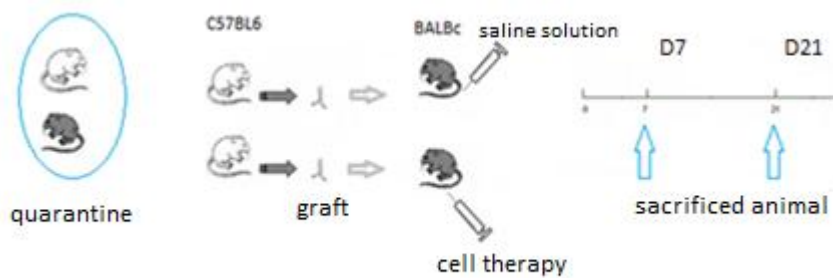


Figure 1 – Experimental design

#### 4. Administration method

Cell therapy was administrated to the animals via  $10^5$  mesenchymal stem cells suspended in 100  $\mu$ l buffered saline solution and injected into the tail vein using a 30G needle. The cell therapy solution injection was administered slowly over 1 minute. Visual inspection of the tail verified if content leakage occurred and if so, a new standard aliquot of  $5 \times 10^5$  was administered. Animals that died after injection of cell therapy were excluded from analysis.

#### 5. Histological analysis

Tracheas removed after the set time periods were immersed in formol. After fixation, they were stained using hematoxylin and eosin. The slides were evaluated semiquantitatively for: 1) intraluminal obliteration, classified as greater or less than 50% (severe intraluminal obliteration if  $>50\%$ ); 2) degree of preservation of the epithelium, classified as a loss greater or less than 50% of epithelial integrity (severe epithelial loss if  $>50\%$ ); 3) presence of lymphocytic or plasmacytic inflammation, classified as mild (sparse infiltration involving vessels

or permeating adjacent connective tissue) or severe (diffuse infiltration with transmural involvement); 4) vascular and extravascular alterations, classified as mild or severe according to the presence of local edema or polymorphonuclear infiltration involving vasculature. Classification adapted from Boehler (10).

The slides were also stained with picosirius, a specific staining method to distinguish collagen fibrils in order to identify if the luminal obliteration in the grafts is caused or not by collagen-rich tissue.

## 6. Digital morphometry

Digital morphometric evaluation (ImageJ - version 1.45s) was applied to the picosirius stained histological sections of the grafts and scanned by image capture software (Image Pro-Express). The area between the original lumen of the graft (A1) and the area of luminal obstruction (A2) was manually defined. The percentage of lumen obstructed through luminal obstruction was calculated:  $A2/A1$ , ratio between the area of luminal obstruction and the total area of the graft, called the graft obstructed area

## 7. Statistical analysis

Calculation of the sample size was performed based on the primary outcome - evaluation of the inflammatory process through luminal obstruction, based on a pilot study. A power of 80% was considered to detect a reduction in luminal obstruction of 60% - based on previous studies (9), and a two-tailed 5% alpha error. A required sample of 5 animals per group was obtained.



Fisher's exact test was adopted for statistical analysis of categorical variables and the Mann-Whitney test for continuous variables. The statistics software SPSS 21.0 was used.

Animals that survived until the scheduled day of sacrifice were used in the statistical analysis, whilst animals that died prior to this period were excluded.

## RESULTS

### 1. Semiquantitative histological analysis

Analysis of the intraluminal obliteration of the heterotopic grafts in animals sacrificed at 7 days, for a cutoff point of 50% obliteration, demonstrated a serious obliteration rate of 40% in animals treated with cell therapy and 50% in the control animals ( $p=1$ ). See Table 1.

Analysis of the epithelium integrity of the heterotopic grafts demonstrated a 50% rate of severe loss of epithelial integrity (loss >50% of epithelial integrity) in the T7cel group and also in the T7con group ( $p = 1$ ). Analysis of the lymphoplasmacytic inflammatory process verified a severe inflammatory process rate of 0% in the T7cel group versus 16.67% in the T7con group ( $p = 0.38$ ). In relation to circulatory alterations (vascular and extravascular) the following results were obtained: 60% rate of severe alterations in the T7cel group and 100% in the T7con group ( $p = 0.23$ ). See Table 1 and Figures 1 to 4.

Table 1. Histological analysis of animals sacrificed at 7 days

	<b>T7con</b>	<b>T7cel</b>	<b>P</b>
<b>Severe intraluminal obliteration</b>	50%	40%	1
<b>Severe loss of epithelial integrity</b>	50%	50%	1
<b>Severe lymphoplasmacytic inflammation</b>	16.67%	0%	0.38
<b>Severe circulatory alterations</b>	100%	60%	0.23

At 21 days, the severe obliteration rate was 41.67% in the T21cel group versus 20% in the T21con group ( $p = 0.38$ ). See Table 2.

Analysis of the inflammatory response at 21 days revealed the following: 75% severe loss of epithelial integrity in the T21cel group and 90% in the

T21con group ( $p = 0.59$ ). When examining the lymphoplasmacytic inflammatory process, 75% severe inflammation was found in the T21cel group versus 50% in the T21con group ( $p = 0.38$ ). In relation to circulatory changes, 25% severe alterations were observed in the T21cel group versus 40% for T21con ( $p = 0.65$ ). These findings are presented in Table 2 and Figures 5 to 8.

Table 2. Histological analysis of animals sacrificed at 21 days

	<b>T21 con</b>	<b>T21cel</b>	<b>P</b>
<b>Severe intraluminal obliteration</b>	20%	41.67%	0.38
<b>Severe loss of epithelial integrity</b>	90%	75%	0.59
<b>Severe lymphoplasmacytic inflammation</b>	50%	75%	0.38
<b>Severe circulatory alterations</b>	40%	25%	0.65

## 2. Digital morphometry

Digital morphometric evaluation of the grafts at 7 days, applying ImageJ to the digital histological sections, revealed that the median (25<sup>th</sup> - 75<sup>th</sup> percentile) of the ratio A2/A1 (graft obstructed area) for T7con was 0.54 (0 - 0.71); in the T7cel the median was 0 (0 - 0.65),  $p = 0.635$ . The data are presented as medians as the standard deviation of the samples is greater than half the calculated mean, that is, the data does not present a normal distribution. These findings are shown in Figure 1.

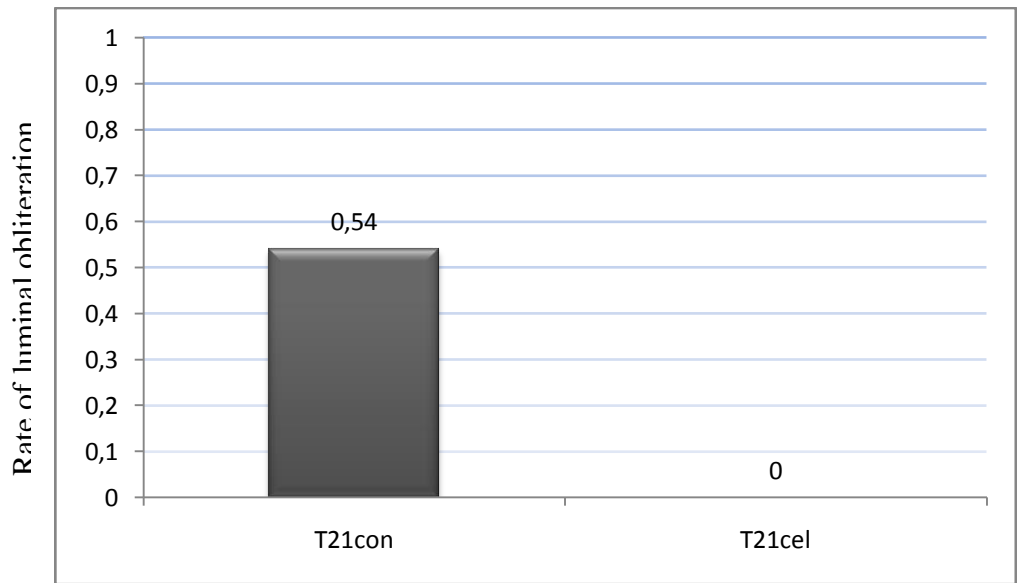


Figure 1. Medians of the obstructed areas in grafts at 7 days;  $p = 0.635$ .

The median (25<sup>th</sup> - 75<sup>th</sup> percentile) of obstructed areas for animals sacrificed at 21 days was 0.25 (0.05 – 1) in group T21con and 0 (0 – 0.09) in group T21cel ( $p = 0.041$ ). Data demonstrated in Figure 2

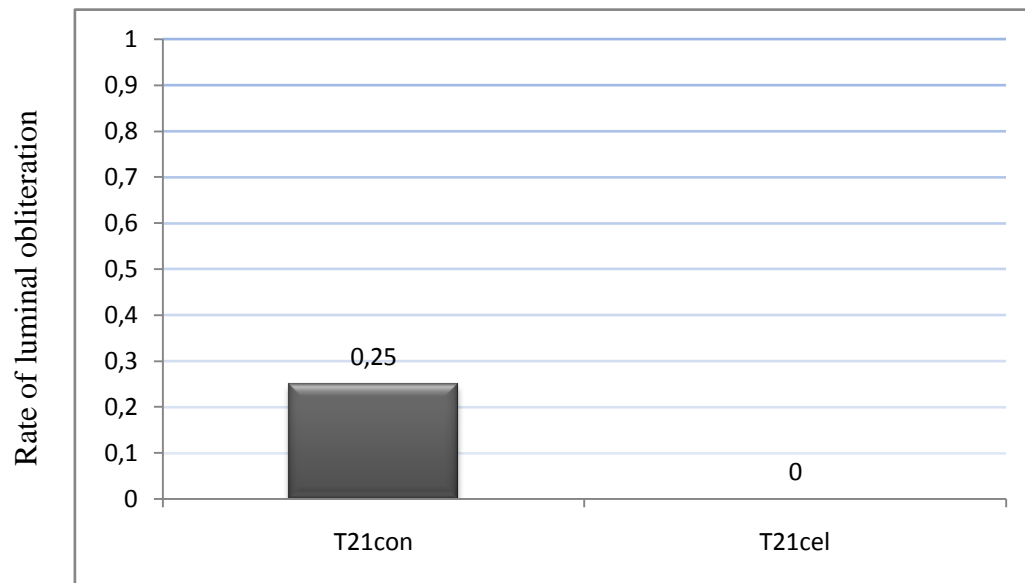


Figure 2. Medians of the obstructed areas in grafts at 21 days;  $p = 0.041$ .

## DISCUSSION

Cell therapy using mesenchymal stem cells (MSCs) has demonstrated immunomodulatory properties in several studies (9, 11-18). Bronchiolitis obliterans, which is the pathological expression of chronic rejection in lung transplantation, has treatments with limited effectiveness. The heterotopic tracheal transplant model is simple and quick for the study of new therapies.

Our study showed no decrease of the inflammatory process in the heterotopic grafts of animals treated with cell therapy and sacrificed at 7 or 21 days. We observed a tendency of a decreasing inflammatory process at 7 days, but it was not statistically significant.

On the other hand, analysis at 21 days demonstrated conflicting results regarding the semiquantitative evaluation of the inflammatory process; there was a reduction in severe loss of epithelial integrity and fewer vascular and extravascular alterations in the treated group, but greater severe luminal obliteration and increased lymphoplasmacytic infiltration. It was seen from the morphometric analysis at 21 days that the treated group developed a statistically significant increase in luminal obliteration in comparison to the control group.

It is important to highlight the reduced rates of inflammation of the tracheal wall observed at 21 days. The rate of luminal obliteration at 21 days in the control allografts was low compared to the literature: 20% severe obliteration (>50% obstruction of the graft lumen) observed in our study versus up to 75-90% reported in the literature (19, 20). Despite following all the surgical steps established in the literature (10) and increasing the number of mice in the

experiment (we doubled the n calculated), luminal obliteration was consistently lower than reported in the literature.

The murine tracheal allotransplant model demonstrates great variability in luminal obliteration between experiments, which can generate widely diverging data between research groups (21). This may explain the perceived differences in this study, especially with regard to the luminal obliteration rate at 21 days in comparison with other authors (20).

The manner of obtaining the MSCs can modify its immunomodulatory properties. Unlike Grove et al. (9), this study obtained the MSCs from epididymal adipose tissue, whereas Grove et al. obtained theirs from bone marrow. This is most likely to have influenced the different results obtained as it is known that cells derived from different sources have different immunomodulatory effects (22).

MSCs can be extracted from a variety of tissues: trabecular bone, periosteum, synovial membrane, skeletal muscle, skin, pericytes, peripheral blood, teeth, periodontal ligament, and the umbilical cord (7). MSCs derived from adipose tissue are widely studied as this tissue is abundant and can be accessed with a low morbidity rate. There are reports that MSCs have different characteristics depending on the location from which they were extracted (7). Our study used epididymal adipose tissue-derived MSCs with this choice being based on the experience of the gene therapy group and the ease of access to this tissue.

The time chosen for histological analysis of the allografts was derived from previous studies where it is clear that the 7<sup>th</sup> day after heterotopic transplantation is the peak of lymphocytic infiltrate in the epithelial surface

(intraepithelial and subepithelial). This is analogous to the bronchitis or lymphocytic bronchiolitis seen in human transplants, which constitutes one of the earliest phases in the lung rejection process, the lymphocytic phase (10). Lymphocytic vasculitis is also noted on the 7<sup>th</sup> day, which is a manifestation of rejection directed at the endothelium. Analysis at 21<sup>st</sup> days post-transplant was chosen to represent the obliterative phase of rejection, namely, the terminal phase (9).

MSCs have demonstrated important immunomodulatory properties, including in lung disease, such as chronic obstructive pulmonary disease, pulmonary hypertension, asthma and pulmonary fibrosis (23). The immunomodulatory mechanisms are not yet fully understood but involve the inhibition of T cell proliferation and modulation of B cell function (24). It has been shown also that there is no need for the MSCs to integrate into the injured tissues to have an effect; paracrine effects explain this phenomenon (25).

A 2011 study tested a new form of immunomodulation with bone marrow-derived MSCs. Allogeneic mice were injected with  $5 \times 10^5$  cells retro-ocularly. A 60% decrease of intraluminal obstruction was observed, when comparing treated and non-treated animals at 7 and 14 days. This suggests that cell therapy can be effective in preventing heterotopic airway obstruction and motivates further studies in order to establish a greater level of evidence for this therapy (9).

In our study, the cell therapy was not successful in preventing the progression of luminal obliteration of the heterotopic graft in a murine model. One can question whether a single injection given at a chosen time (the moment of transplantation) is the most appropriate course. The use of cell



therapy involves tests for moment of infusion and number of injections. In this context, perhaps, different results can be obtained by repeatedly applying the treatment - which, to our knowledge, has not been tested to date in this model. This could increase the tissue exposure to the effects of cell therapy.

It is known that delayed administration of cell therapy when the fibrotic process is already established does not bring benefits (8). However, there are authors who have managed to reverse the initial fibrotic process (8) after cell therapy, in a pulmonary fibrosis model.

Some authors were able to demonstrate that MSCs systemically injected, in addition to migrating to damaged tissues through the "*homing*" effect, remained viable and merged with native cells for some months (26-28).

Another relevant point for administration of MSCs is the source of the obtained cells: autologous versus allogeneic, which seems to influence the effects of cell therapy (8).

There are clinical trials demonstrating that, in some scenarios, a smaller number of cells can produce more consistent effects in terms of the recuperation of damaged tissues (29).

The age of the MSC culture, as well as the number of cell expansions determines changes in morphology, differentiation capacity, viability, and migration efficiency. The ability to produce cytokines is also influenced (30-33). In our experiment, we took care to use cell cultures of the same age and expanded the same number of times - 4 times. As such, it does not seem to us that this was the determining cause of the discrepancy between our results and the scientific literature.

The model used in this experiment has many similarities with that of human lung transplantation, however, some aspects should always be considered: the transplanted allograft is not functional and so it does not simulate the true environment of the transplanted tissue as it is disconnected from the airway of the recipient; the allograft does not have its own primary vascular supply, which can impact on the immune response dynamics. (9)

The MSC cell therapy injected systemically presented a problem: when injected rapidly it triggered severe respiratory insufficiency in the animals, followed in some cases by hemiplegia and even cardiac arrest - sometimes reversible. This was noted in our pilot study when the mortality rate in some experiments with injection of SC varied from 50% to 100%, when we injected the SC in bolus (between 10-20 seconds). It is considered that this is caused by embolization of the injected cells in the right side of the heart and in the cerebral arteries. This finding is not maintained when the cell therapy is injected slowly - 100  $\mu$ l over 1-2 minutes - a method developed by our group. In a commentary made by Plock et al. on unpublished data from their group, they emphasized the importance of the slow administration of cell therapy. (15)

Different dilutions of cell therapy were also tested in our pilot study, with the same  $5 \times 10^5$  cells diluted in 50 $\mu$ l, 100 $\mu$ l and 200 $\mu$ l solutions. We found no differences between these solutions but opted to use 100 $\mu$ l as this volume is the most cited in the literature.

The route of infusion used in cell therapy in murine models is variable. Intraperitoneal and locoregional injections are used, and systemic through application via a tail vein, the retro-ocular venous plexus, or by dissection of the internal jugular vein (20). These different ways may lead to varying results, such

as obtained in the present study. Some studies have shown that first-pass metabolism by the liver sinusoids can alter the morphology and physiology of the injected cells, which does not seem to have affected this study as the tail vein drains to the cava and not portal system.

In addition, some groups advocate the intra-arterial route as an option for cell therapy. Thus, a greater quantity of cells can reach the target tissue, reducing the systemic effects (34).

Different routes of infusion were tested in a preliminary phase of our study: systemic injection via the tail vein, the retro-ocular venous plexus, and the internal jugular. The pilot study showed no differences in results and thus, we opted to use the technically easier injection via the tail vein for reasons of practicality in carrying out a slow injection.

While most of the literature data points towards an immunomodulatory effect of MSCs, there are authors who have demonstrated a pro-fibrotic effect of MSC cell therapy (35, 36). The reality is that MSCs have a dual role: they may exert an immunosuppressive function, protecting against BO through IL-8 and IL-10; or they may have a pro-fibrotic effect, mediated by endothelin-1, TGF- $\beta$  and IL-13 (37). The microenvironment site to which MSCs are exposed determines the predominant profile of their action. In our study, lower rates of obliteration in the animals in groups T21con and T21cel occurred than found in the literature. It is possible that examining the dosage of cytokines involved in the inflammatory process could help in understanding our study results. This was not done in this present study and is something that could be explored in future studies by our group.

The association of pathological outcomes with molecular biology outcomes may provide a better understanding of the dynamics of the inflammatory process and therapy impact. The analysis of cytokines already involved in the immunogenesis of BO should be considered, as well as trying to associate the gene expression with the histopathology (19, 38-52).

A large number of publications can be seen involving the murine allogeneic heterotopic tracheal transplantation model. Many steps in the immunogenesis process have been revealed by this model. In advancing immunogenicity studies, alternative therapies have also been tested over the past 20 years with some of them being clinically implemented, such as cyclosporine and tacrolimus, among others (53, 54).

In this context, this present research adds to the information regarding MSC cell therapy in this model, being to date and to our knowledge, the first experiment to use adipose tissue-derived MSCs for this purpose.

Future prospects could involve the testing of serial injections of cell therapy in animals in order to verify if repeated exposure could result in a maximized effect in terms of decreasing the inflammatory process.

Many therapeutic targets have been identified in the last decade, enhancing the importance of conducting immunomodulatory testing associated with assessing the inflammatory process, measuring cytokines involved in the process, as well as using gene expression panels.

## CONCLUSION

Cell therapy administered to animals that had undergone tracheal allotransplantation in a murine model increased the area of luminal obstruction

in those animals sacrificed at 21 days, but had no statistically significant impact on animals sacrificed at 7 days.

## References

1. Iacono A, Corcoran T, Griffith B. Aerosol cyclosporin therapy in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans. *European Respiratory Journal*. 2004;23:384.
2. O'Hagan A, Stillwell P, Arroliga A, Koo A. Photopheresis in the treatment of refractory bronchiolitis obliterans complicating lung transplantation. *Chest*. 1999;115:1459.
3. Morrell MR, Despotis GJ, Lublin DM, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR. The efficacy of photopheresis for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29(4):424-31.
4. Benden C, Speich R, Hofbauer G. Extracorporeal photopheresis after lung transplantation: a 10 year single center experience. *Transplantation*. 2008;86:1625.
5. Verderlen G, Lievens Y, Dupont L. Efficacy of total lymphoid irradiation in azithromycin nonresponsive chronic allograft rejection after lung transplantation. *Transplant Procedure*. 2009;41:1816.
6. Fisher A, Rutherford R, Bozzino J. The safety and efficacy of total lymphoid irradiation in progressive bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2005;5:537.
7. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*. 2012;30(5):804-10.
8. Weiss DJ, Ortiz LA. Cell therapy trials for lung diseases: progress and cautions. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(2):123-5.
9. Grove DA, Xu J, Joodi R, Torres-Gonzales E, Neujahr D, Mora AL, et al. Attenuation of early airway obstruction by mesenchymal stem cells in a murine model of heterotopic tracheal transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30(3):341-50.
10. Boehler A, Chamberlain D, Kesten S, Slutsky A, Liu M, Keshavjee S. Lymphocytic airway infiltration as a precursor to fibrous obliteration in a rat model of bronchiolitis obliterans. *Transplantation*. 1997;64:311.
11. Uccelli A, Moreta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews of Immunology*. 2008;8:726.
12. Burt R, Loh Y, Pearce W. Clinical applications of blood-derived stem cells for nonmalignant diseases. *JAMA*. 2008;299:925.
13. Phinney D, Prockop D. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the etate of transdifferentiation and modes of tissue repair - current views. *Stem Cells*. 2007;25:2896.
14. Guo Z, Zhou X, Li J, Meng Q, Cao H, Kang L, et al. Mesenchymal stem cells reprogram host macrophages to attenuate obliterative bronchiolitis in murine orthotopic tracheal transplantation. *Int Immunopharmacol*. 2013;15(4):726-34.
15. Plock JA, Schnider JT, Schweizer R, Gorantla VS. Are cultured mesenchymal stromal cells an option for immunomodulation in transplantation? *Front Immunol*. 2013;4:41.
16. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol*. 2013;91(1):19-26.
17. English K, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(5):a015560.
18. English K, Mahon BP, Wood KJ. Mesenchymal Stromal Cells; Role in Tissue Repair, Drug Discovery and Immune Modulation. *Curr Drug Deliv*. 2013.
19. Lau CL, Zhao Y, Kron IL, Stoler MH, Laubach VE, Ailawadi G, et al. The role of adenosine A2A receptor signaling in bronchiolitis obliterans. *Ann Thorac Surg*. 2009;88(4):1071-8.

20. Hele DJ, Yacoub MH, Belvisi MG. The heterotopic tracheal allograft as an animal model of obliterative bronchiolitis. *Respir Res.* 2001;2(3):169-83.
21. Neuringer IP, Aris RM, Burns KA, Bartolotta TL, Chalermkulrat W, Randall SH. Epithelial kinetics in mouse heterotopic tracheal allografts. *Am J Transplant.* 2002;2(5):410-9.
22. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Front Immunol.* 2013;4:201.
23. Iyer SS, Co C, Rojas M. Mesenchymal stem cells and inflammatory lung diseases. *Panminerva Med.* 2009;51(1):5-16.
24. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med.* 2009;15(1):42-9.
25. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol.* 2012;3:297.
26. Pan H, Zhao K, Wang L, Zheng Y, Zhang G, Mai H, et al. Mesenchymal stem cells enhance the induction of mixed chimerism and tolerance to rat hind-limb allografts after bone marrow transplantation. *J Surg Res.* 2010;160(2):315-24.
27. Kuo YR, Goto S, Shih HS, Wang FS, Lin CC, Wang CT, et al. Mesenchymal stem cells prolong composite tissue allotransplant survival in a swine model. *Transplantation.* 2009;87(12):1769-77.
28. Kuo YR, Chen CC, Shih HS, Goto S, Huang CW, Wang CT, et al. Prolongation of composite tissue allotransplant survival by treatment with bone marrow mesenchymal stem cells is correlated with T-cell regulation in a swine hind-limb model. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127(2):569-79.
29. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transcatheter injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *Jama.* 2012;308(22):2369-79.
30. Banfi A, Bianchi G, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng.* 2002;8(6):901-10.
31. Hematti P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? *Cytotherapy.* 2012;14(5):516-21.
32. Vacanti V, Kong E, Suzuki G, Sato K, Canty JM, Lee T. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol.* 2005;205(2):194-201.
33. Wagner W, Ho AD, Zenke M. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(4):445-53.
34. Zonta S, De Martino M, Bedino G, Piotti G, Rampino T, Gregorini M, et al. 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.* 2010;42(4):1336-40.
35. Salama M, Andrukhova O, Jaksch P, Taghavi S, Kelpetko W, Dekan G, et al. Endothelin-1 governs proliferation and migration of bronchoalveolar lavage-derived lung mesenchymal stem cells in bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation.* 2011;92(2):155-62.

36. Walker N, Badri L, Wettlaufer S, Flint A, Sajjan U, Krebsbach PH, et al. Resident tissue-specific mesenchymal progenitor cells contribute to fibrogenesis in human lung allografts. *Am J Pathol.* 2011;178(6):2461-9.
37. Hardy J, Webb W, Dalton MJ, Walker GJ. Lung homotransplantation in man. *JAMA.* 1963;186:1065.
38. Lemaître PH, Vokaer B, Charbonnier LM, Iwakura Y, Field KA, Estenne M, et al. Cyclosporine a drives a th17- and th2-mediated posttransplant obliterative airway disease. *Am J Transplant.* 2013;13(3):611-20.
39. Lee J, Nakagiri T, Oto T, Harada M, Morii E, Shintani Y, et al. IL-6 amplifier, NF-κB-triggered positive feedback for IL-6 signaling, in grafts is involved in allogeneic rejection responses. *J Immunol.* 2012;189(4):1928-36.
40. Harris DA, Zhao Y, Lapar DJ, Emaminia A, Steidle JF, Stoler M, et al. Inhibiting CXCL12 blocks fibrocyte migration and differentiation and attenuates bronchiolitis obliterans in a murine heterotopic tracheal transplant model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;145(3):854-61.
41. Lemaître P. [Study of mechanisms dependent on interleukin-17 and their modulation in development of bronchiolitis obliterans after experimental transplantation]. *Bull Mem Acad R Med Belg.* 2010;165(7-9):367-71.
42. Khatwa UA, Kleibrink BE, Shapiro SD, Subramaniam M. MMP-8 promotes polymorphonuclear cell migration through collagen barriers in obliterative bronchiolitis. *J Leukoc Biol.* 2010;87(1):69-77.
43. Xu J, Torres E, Mora AL, Shim H, Ramirez A, Neujahr D, et al. Attenuation of obliterative bronchiolitis by a CXCR4 antagonist in the murine heterotopic tracheal transplant model. *J Heart Lung Transplant.* 2008;27(12):1302-10.
44. Liu HX, Li Y, Zhao CH, Liu Y, Zhang QG, Cong W, et al. [The role of transforming growth factor-beta1/Smad3 signaling in bronchiolitis obliterans following lung transplantation]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2007;87(29):2069-73.
45. Lande JD, Patil J, Li N, Berryman TR, King RA, Hertz MI. Novel insights into lung transplant rejection by microarray analysis. *Proc Am Thorac Soc.* 2007;4(1):44-51.
46. Lande JD, Dalheimer SL, Mueller DL, Hertz MI, King RA. Gene expression profiling in murine obliterative airway disease. *Am J Transplant.* 2005;5(9):2170-84.
47. Chalermkulrat W, McKinnon KP, Brickey WJ, Neuringer IP, Park RC, Sterka DG, et al. Combined donor specific transfusion and anti-CD154 therapy achieves airway allograft tolerance. *Thorax.* 2006;61(1):61-7.
48. Zhou H, Latham CW, Zander DS, Margolin SB, Visner GA. Pirfenidone inhibits obliterative airway disease in mouse tracheal allografts. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24(10):1577-85.
49. Fernández FG, McKane B, Marshbank S, Patterson GA, Mohanakumar T. Inhibition of obliterative airway disease development following heterotopic murine tracheal transplantation by costimulatory molecule blockade using anti-CD40 ligand alone or in combination with donor bone marrow. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24(7 Suppl):S232-8.
50. Fernández FG, Campbell LG, Liu W, Shipley JM, Itohara S, Patterson GA, et al. Inhibition of obliterative airway disease development in murine tracheal allografts by matrix metalloproteinase-9 deficiency. *Am J Transplant.* 2005;5(4 Pt 1):671-83.
51. Chalermkulrat W, Neuringer IP, Park RC, Brickey WJ, Braeckman RA, Randell SH, et al. PX3.102, a novel chinese herb extract, diminishes chronic airway allograft rejection. *Transplantation.* 2004;78(1):158-61.
52. Yamada A, Konishi K, Cruz GL, Takehara M, Morikawa M, Nakagawa I, et al. Blocking the CD28-B7 T-cell costimulatory pathway abrogates the development of



obliterative bronchiolitis in a murine heterotopic airway model. *Transplantation*. 2000;69(5):743-9.

53. Baughman RP, Meyer KC, Nathanson I, Angel L, Borade SM, Chan KM, et al. Executive summary: monitoring of nonsteroidal immunosuppressive drugs in patients with lung disease and lung transplant recipients: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2012;142(5):1284-8.

54. Baughman RP, Meyer KC, Nathanson I, Angel L, Borade SM, Chan KM, et al. Monitoring of nonsteroidal immunosuppressive drugs in patients with lung disease and lung transplant recipients: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2012;142(5):e1S-e111S.

Annex 1

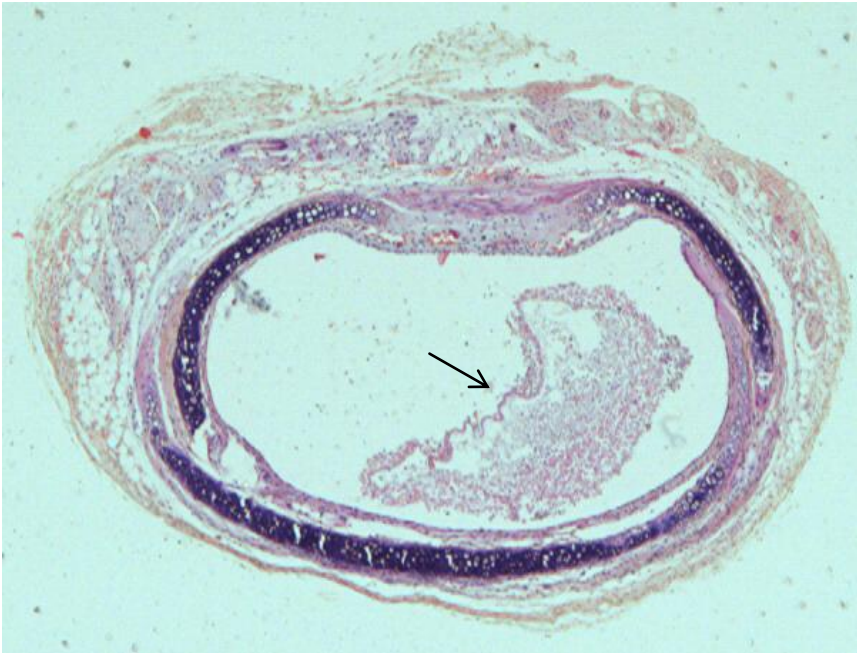


Figure 2. Photomicrograph 40x. Cross-section of group T7cel tracheal graft in HE. Lumen partially obstructed, see arrow

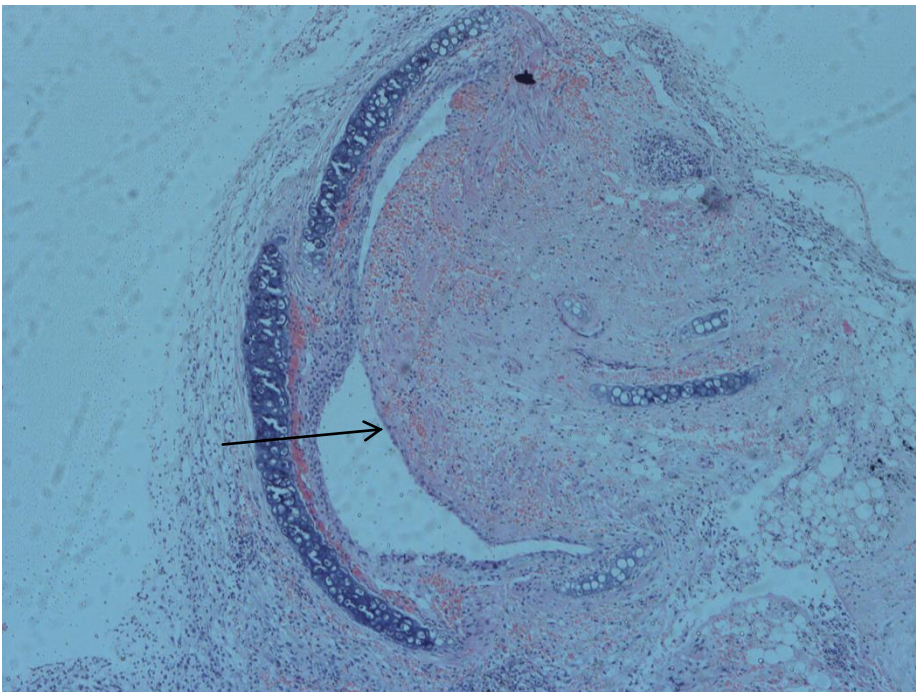


Figure 3. Photomicrograph 100x. Cross-section of group T7con tracheal graft in HE. Graft with severe luminal obliteration (>50%), see arrow.

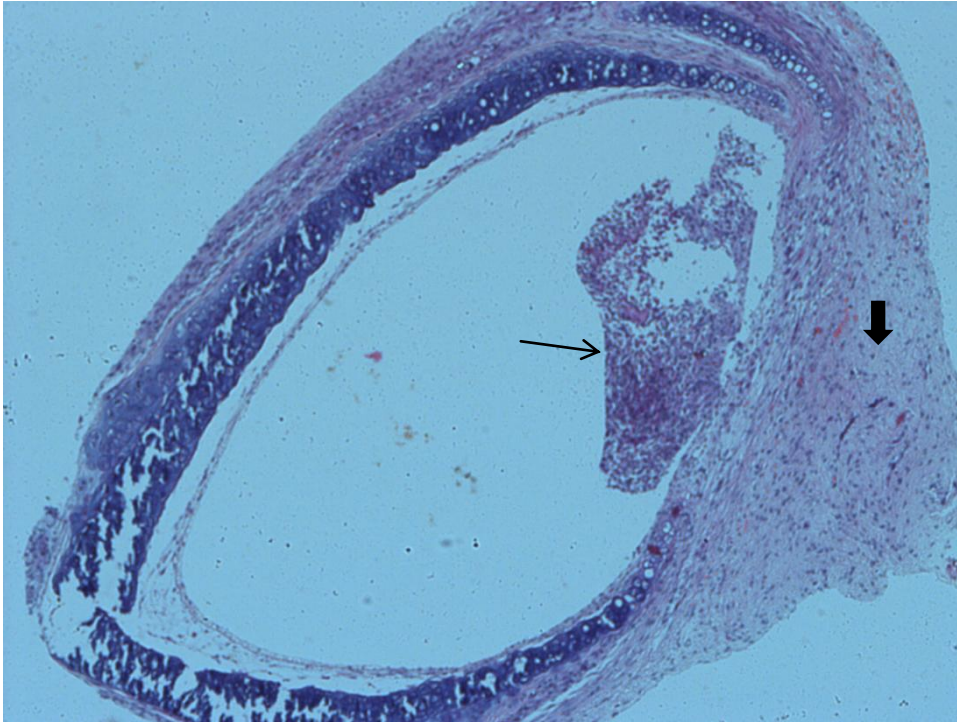


Figure 4. Photomicrograph 100x. Cross-section of group T21cel tracheal graft in HE. Graft without severe luminal obliteration (<50%), see thin arrow. Thick arrow shows lymphoplasmacytic infiltration.

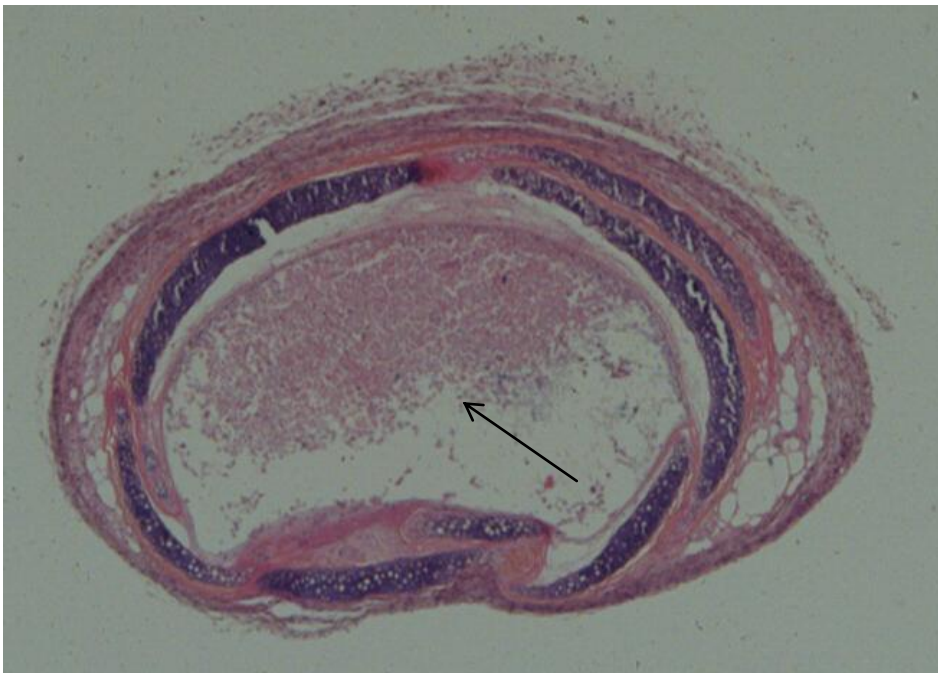


Figure 5. Photomicrograph 40x. Cross-section of group T21con tracheal graft in HE. Graft with severe luminal obliteration (>50%), see arrow.



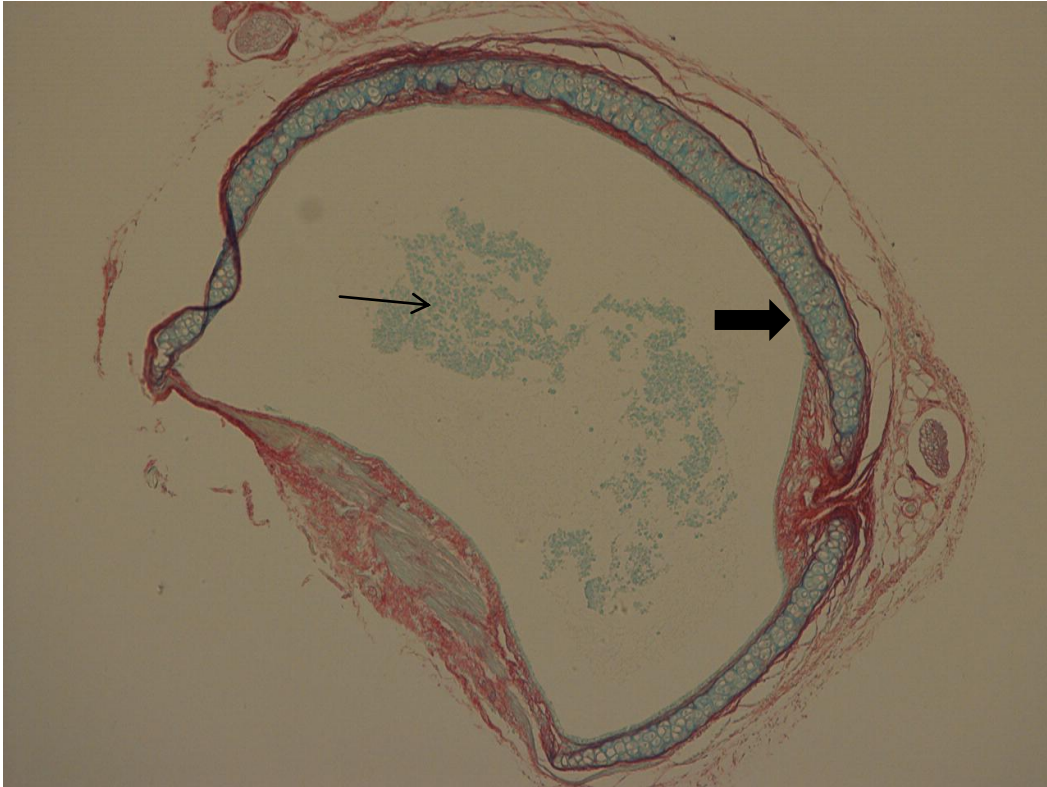


Figure 6. Photomicrograph 100x. Cross-section of group T7cel tracheal graft in picrosirius. Graft without severe luminal obliteration (<50%), see thin arrow. Thick arrow shows preserved epithelium.

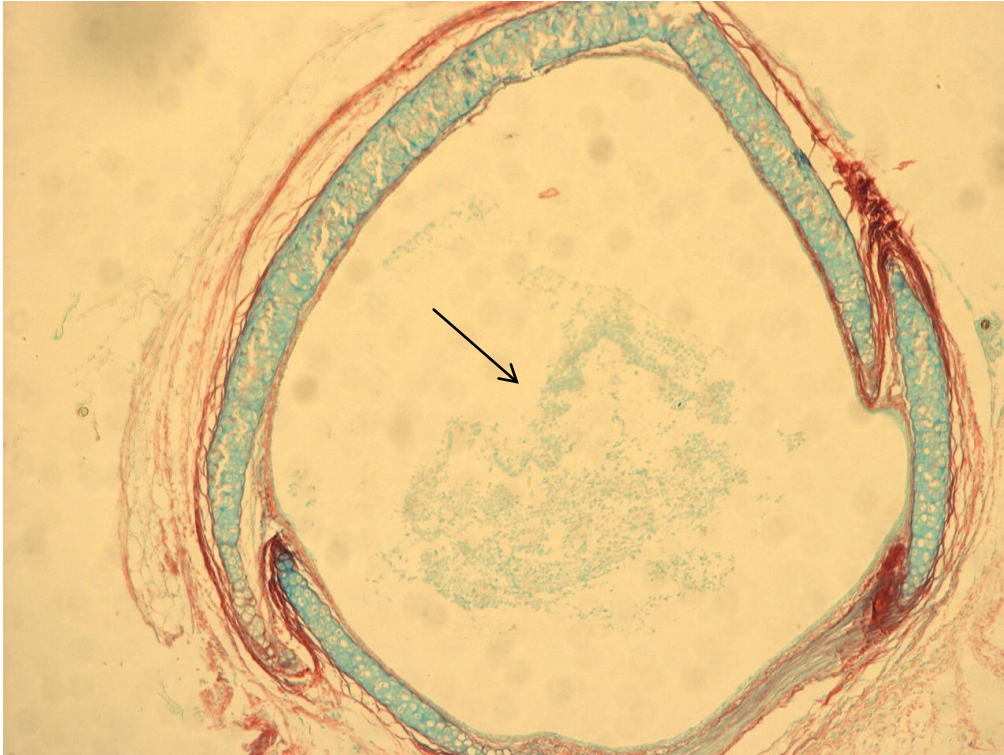


Figure 7. Photomicrograph 100x. Cross-section of group T7con tracheal graft in picrosirius. Graft without severe luminal obliteration (<50%), see arrow.



Figure 8. Photomicrograph 100x. Cross-section of group T21cel tracheal graft in picosirius. Graft without severe luminal obliteration ( $< 50\%$ ), see arrow.

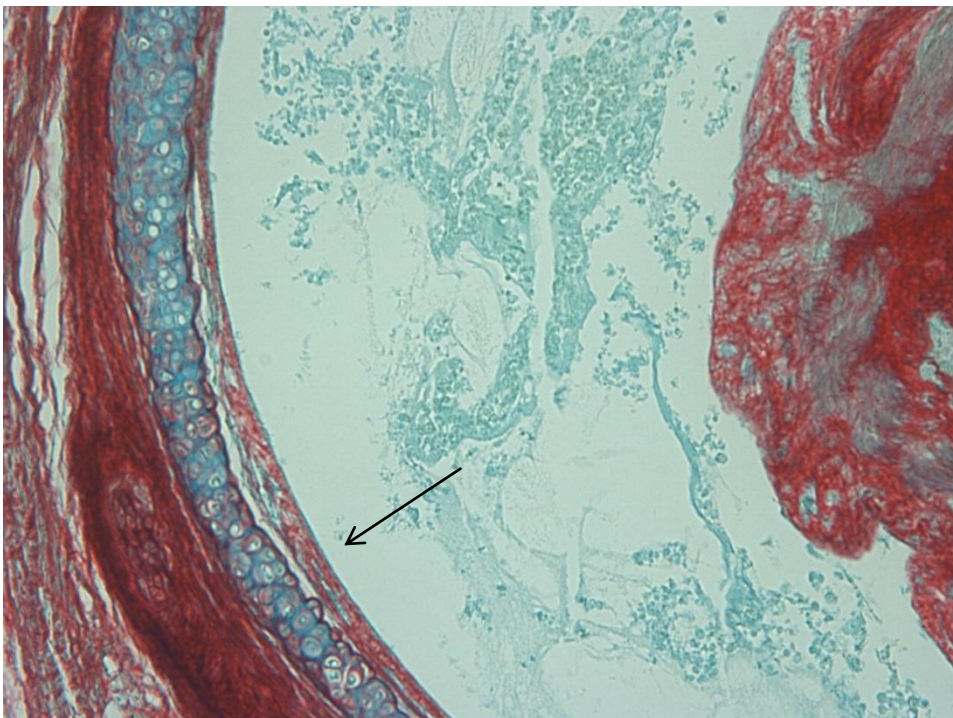


Figure 9. Photomicrograph 200x. Cross-section of group T21con tracheal graft in picosirius. Intact epithelium, see arrow.