

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE  
DO SUL PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
GERONTOLOGIA BIOMEDICA**

PAULA MÜSSNICH DE FREITAS

**APLICAÇÃO DA TERAPIA CELULAR EM  
MODELO EXPERIMENTAL  
DE ENFISEMA PULMONAR**

**PORTO ALEGRE  
2009**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA**

**APLICAÇÃO DA TERAPIA CELULAR EM MODELO EXPERIMENTAL  
DE ENFISEMA PULMONAR**

Paula Müssnich de Freitas

Porto Alegre, março de 2009.

PAULA MÜSSNICH DE FREITAS

**APLICAÇÃO DA TERAPIA CELULAR EM MODELO EXPERIMENTAL  
DE ENFISEMA PULMONAR**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado

Porto Alegre

2009

F866a Freitas, Paula Müssnich de.

Aplicação da terapia celular em modelo experimental de enfisema pulmonar / Paula Müssnich de Freitas ; orient. Denise Cantarelli Machado. Porto Alegre: PUCRS, 2009.  
40 f.: gráf. il.

Dissertação(Mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Instituto de Geriatria e Gerontologia. Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica.

1. Enfisema Pulmonar. 2. Terapia Tissular. 3. Células Tronco. 4. Modelos Animais. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Título

CDD 616.248  
NLM WF 648

Bibliotecária Responsável:  
Sabrina Caimi Silva da Costa  
CRB10/1606

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Paulo César e Cristina sem os quais nada disso teria sido possível, muito obrigado por tudo que vocês me proporcionaram e pelo amor incondicional.

A toda minha família em especial aos meus irmãos e avós pelo constante estímulo a minha formação profissional e pessoal, pela amizade e carinho.

A minha orientadora, Dra. Denise Cantarelli Machado, sem a qual esta dissertação não teria sido possível, por ter aberto para mim as portas para o caminho da ciência, pela amizade e reconhecida competência como orientadora.

Ao meu colega Christian Viezzer, que me apresentou para a Dra. Denise, tornando tudo isso possível, pela amizade, pelos conselhos e todas as suas colaborações.

Ao meu colega Gustavo Leivas Barbosa pela amizade e indispensável apoio técnico.

Aos professores do programa de Pós-Graduação pelos ensinamentos.

A todas minhas amigas que ouviram minhas reclamações e me deram força sempre.

Ao CNPq pela bolsa concedida me disponibilizando a oportunidade de realizar este trabalho.

## RESUMO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma importante causa de mortalidade em todo mundo. No Brasil, a cada ano, são hospitalizados 280 mil pacientes com DPOC. Como o pulmão adulto não pode ter um crescimento espontâneo ou regenerar-se, o enfisema pulmonar é considerado uma doença progressiva e irreversível. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito do transplante de células mononucleares de medula óssea na regeneração do tecido pulmonar enfisematoso de animais experimentais. O modelo experimental de enfisema pulmonar foi induzido em camundongos através de instilação intranasal de 3,5 mL/kg de papaína em solução de NaCl<sub>2</sub> a 0,9%. Os animais foram divididos em dois grupos, sendo um controle (n=8) que recebeu somente soro, e o grupo experimental (n=8), cujos animais receberam  $1 \times 10^7$  células de medula óssea EGFP+ através da veia caudal. Os animais foram sacrificados 45 dias após o transplante e os pulmões foram removidos e perfundidos com formol tamponado a 10%. Os fragmentos pulmonares foram incluídos em parafina para obtenção de cortes seriados de 3  $\mu$ m. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina para avaliar a morfologia pulmonar e com Azul de Evans 0,1% e DAPI para a confirmação da presença de células EGFP+ no epitélio pulmonar. As análises demonstraram a presença de células alveolares EGFP+ sugerindo que as células de medula óssea dos animais doadores estão envolvidas no processo de reparo do tecido pulmonar.

Palavras-chave: Enfisema pulmonar, terapia celular, células tronco.

## ABSTRACT

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major cause of mortality worldwide. In Brazil, every year 280 thousand patients are hospitalized with COPD. Since the adult lung cannot have a spontaneous growth or regenerate itself, the pulmonary emphysema is considered a progressive and irreversible disease. The aim of this study was to evaluate the effect of bone marrow mononuclear cells transplantation in the regeneration of emphysematous lung tissue in mice. The experimental model of pulmonary emphysema was induced in mice by intranasal instillation of 3.5 mL/kg of papain in 0.9% NaCl<sub>2</sub> solution. The animals were divided into 2 groups: one control (n=8) that received normal saline, and the experimental group (n=8) that received 1x10<sup>7</sup> EGFP+ bone marrow cells through the tail vein. The animals were killed 45 days after transplant, and lungs were removed and perfused with 10% buffered formalin. The lungs were embedded in paraffin to obtain serial sections of 3 µm. Slides were stained with hematoxylin-eosin to evaluate lung morphology and with 0.1% Evans Blue and DAPI to confirm the presence of EGFP+ cells in the lung epithelia. The analyses showed the presence of alveolar EGFP+ cells suggesting that the donors bone marrow cells are involved in the repair of lung tissue.

Key words: pulmonary emphysema, cell therapy, stem cells.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Fotomicrografia de um pulmão com enfisema aumento 400x.....	06
Figura 2. Fotomicrografia de um pulmão normal aumento 400x.....	06
Figura 3: Câmara de anestesia geral com medicação inalatória.....	15
Figura 4: Instilação intranasal de papaína.....	16
Figura 5: Procedimentos para obtenção das células de medula óssea.....	17
Figura 6. Indução do enfisema pulmonar e transplante de células.....	18
Figura 7. Fotomicrografia de um corte histológico do pulmão de camundongo corado com HE. As setas indicam as alterações morfológicas que confirmam a presença de enfisema pulmonar.....	24
Figura 8. Fotomicrografia de um pulmão de camundongo do grupo controle, corado com azul de evans + DAPI. ....	26
Figura 9. Fotomicrografia de pulmão de camundongo corado com azul de evans + DAPI evidenciando a presença e células EGFP+ no parênquima pulmonar do grupo 1.....	27
Figura 10. Fotomicrografia de pulmão de camundongo utilizando a técnica de Imunofluorescência com o anticorpo Sca-1.....	28
Figura 11. Percentagem da área do parênquima pulmonar dos animais tratados com células mononucleares de medula óssea (grupo 1) e não tratados (grupo 2).....	29



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- BAL = Lavado broncoalveolar  
CEUA = Comitê de Ética para o Uso de Animais  
CVF = Capacidade Vital Forçada  
DPBS = Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines  
DPOC = Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica  
ES = Célula tronco embrionária  
HE = Hematoxilina-eosina  
IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IN = Intranasal  
i.p. = intraperitoneal  
 $\mu\text{m}$  = micrômetro  
 $\mu\text{L}$  = microlitro  
PBS = salina tamponada com fosfato  
PPGGB = Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica  
Sca-1 = Antígeno de células tronco ( Stem Cell Antigen 1)  
OMS = Organização Mundial de saúde  
cm = centímetros  
LVRS = cirurgia de redução volumétrica dos pulmões  
SUS = Sistema Único de Saúde  
VEF100 = Volume Expiratório Forçado em 100 milisegundos  
VEFPFE = Volume Expiratório Forçado no Pico de Fluxo Expiratório

## SUMARIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 ENVELHECIMENTO.....	1
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA DPOC.....	2
1.3 <i>Enfisema pulmonar</i> .....	4
1.3.1 <i>Fisiologia do enfisema pulmonar</i> .....	7
1.3.2 <i>Tratamento do enfisema pulmonar</i> .....	7
1.4 CÉLULAS TRONCO ADULTAS.....	8
1.4.1 <i>Terapia com células tronco adultas</i> .....	9
1.4.2 <i>Células tronco adultas no tratamento de enfisema pulmonar</i> .....	11
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
3.1 ANIMAIS .....	14
3.2 INDUÇÃO DE ENFISEMA PULMONAR COM PAPAÍNA .....	15
3.3 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA.....	16
3.4 TRANSPLANTE DAS CÉLULAS .....	18
3.5 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO TECIDO PULMONAR .....	18
3.6 COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA-EOSINA (HE).....	19
3.7 IMUNOFLOURESCÊNCIA.....	20
ÉTICA.....	21
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	21
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>32</b>
<b>6. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>33</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>34</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>41</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## **1.1 Envelhecimento**

O crescente aumento da população idosa, principalmente em países em desenvolvimento, tem gerado grandes desafios médicos e sócios econômicos, tornando extremamente necessário o estudo das causas das condições de saúde e de vida dos idosos para que se possa compreender melhor o complexo processo do envelhecimento.<sup>1</sup>

No Brasil, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE),<sup>2</sup> a proporção do número de pessoas com mais de 60 anos vem aumentando significativamente a cada década, desde 1950. Estima-se que, no ano de 2025, o Brasil possuirá 32 milhões de pessoas com idade superior a 60 anos, representando 15% da população total. Dentro desse contexto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) faz uma projeção que, entre 1950 e 2025, a população de idosos crescerá 16 vezes contra o aumento de 5 vezes da população total, e o Brasil será apontado como o 6º país do mundo em população idosa.

A transição demográfica que vem ocorrendo em todo mundo demonstra o grande crescimento do número de idosos em relação às outras faixas etárias, devido à queda da fecundidade, que faz com que diminua a faixa etária mais jovem e a queda da mortalidade, responsável pelo aumento da população idosa, bem como o aumento considerável da expectativa de vida dos brasileiros.

Devido a estes fatos estão ocorrendo mudanças no perfil de saúde do idoso, como por exemplo, no lugar das doenças infecciosas estamos nos deparando com as doenças crônicas não transmissíveis, e entre as mais freqüentes estão a hipertensão, diabetes, artrite, insuficiência renal e respiratória, osteoporose e demência.<sup>3</sup> Estudos demonstraram que a maior parte dos idosos apresenta pelo menos uma enfermidade crônica. No sudeste do Brasil, 86% dos idosos relataram possuir alguma doença crônica e 46% precisam de ajuda de outra pessoa para realizar pelo menos uma atividade básica da vida diária.<sup>4</sup>

Dentro desse quadro, é importante salientar que, embora a maioria dos idosos apresente pelo menos uma doença crônica, é possível viver com qualidade, desde que as doenças sejam controladas.<sup>1,5</sup> Por isso, é de suma importância que se estude os múltiplos aspectos que envolvem o idoso, a velhice e o processo de envelhecimento, para que se possa viver a fase de senescência com qualidade, preservando a autonomia e independência do idoso no maior grau possível.

## ***1.2 Epidemiologia da DPOC***

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma importante causa de morbidade e mortalidade no mundo. Muitas pessoas sofrem dessa doença durante anos e morrem prematuramente por causa dela ou de suas complicações. O Brasil passou por um aumento do número de óbitos por DPOC nos últimos 20 anos, tanto em homens como em mulheres. A taxa de mortalidade passou de 7,88 a cada 100.000 habitantes, na década de 1980,

para 19,04 a cada 100.000 habitantes, na década de 1990. Ao mesmo tempo, houve um crescimento do número de óbitos por DPOC de 1980 para 2001 de 340%, tendo sido ajustado para o crescimento populacional deste período.<sup>6</sup>

Pelos dados do Ministério da Saúde (DATASUS), a cada ano são hospitalizados 280 mil pacientes com DPOC, sendo a quinta maior causa de internação no sistema único de saúde (SUS) do Brasil. Em indivíduos acima de 40 anos, foram notificadas 196.698 internações em 2003, com um gasto aproximado de 72 milhões de reais, o que coloca a DPOC entre as principais doenças consumidoras de recursos do SUS.<sup>7</sup> No Brasil, morrem 85 pessoas por dia em função da DPOC e sete milhões de brasileiros sofrem desta doença.<sup>8</sup> Segundo Cecil, após os 65 anos, 80% das pessoas relatam uma ou mais doenças crônicas e quase todas aumentam com a idade.<sup>9</sup>

A DPOC é atualmente a quarta causa principal de morte no mundo e o aumento na sua prevalência deve-se a exposição a fatores de risco tais como: tabagismo, exposição ocupacional a sílica e ao cádmio, poluição atmosférica, entre outros que, associados ao aumento da expectativa de vida da população, fizeram com que a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerasse a DPOC uma epidemia, prevendo sua eclosão para o ano 2020, quando poderá se tornar a terceira maior causa de mortalidade e a quinta doença em prevalência.<sup>10</sup>

A OMS estima que a DPOC tenha sido responsável por mais de 2,74 milhões de mortes em todo mundo em 2000 e que uma pessoa morre a cada 11 segundos por DPOC no mundo. A incidência é maior em homens que em mulheres e aumenta acentuadamente com a idade.<sup>11</sup>

Devido ao seu caráter progressivo e incapacitante, o enfisema pulmonar acarreta um impacto econômico considerável, tanto pelo absenteísmo e aposentadorias precoces, como pelo alto custo do tratamento.

### **1.3 Enfisema pulmonar**

O enfisema pulmonar descreve apenas uma das várias anomalias estruturais presente em pacientes portadores de DPOC. É caracterizado pela dilatação anormal e permanente dos espaços aéreos distais, chegando até o bronquíolo terminal,<sup>12</sup> e pela destruição do tecido pulmonar, decorrente de processos inflamatórios, que levam a perda das conexões alveolares, reduzindo a elasticidade pulmonar. Como conseqüência, tais alterações reduzem a capacidade de manter as vias aéreas abertas durante a expiração, reduzem a área de trocas gasosas, resultando em oxigenação inadequada.

O enfisema é classificado em quatro tipos, de acordo com o padrão de alteração anatômica dos ácinos pulmonares, indicando a etiologia e o comportamento fisiopatológico da doença.<sup>12</sup>

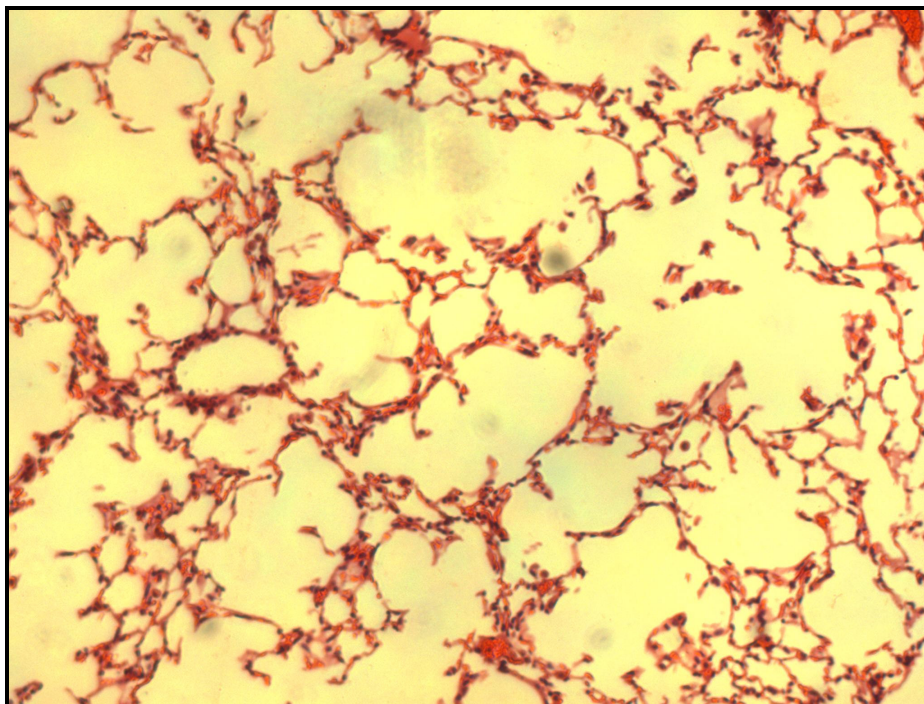
1. Enfisema centroacinar (centrolobular): Esse tipo de enfisema envolve os lóbulos, as partes proximais ou centrais dos ácinos, formadas pelos bronquíolos respiratórios, os quais estão dilatados e destruídos. Os alvéolos distais são preservados, existindo assim espaços aéreos normais e enfisematosos dentro do mesmo ácino e lóbulo. Esse tipo de enfisema é mais comum no lóbulo superior, mas pode se espalhar à medida que a doença progride, sendo que na maioria dos casos encontra-se uma associação com o hábito de fumar.

2. Enfisema Panacinar (panlobular): Neste tipo de enfisema, os ácinos estão uniformemente dilatados desde o nível do bronquíolo respiratório até o alvéolo terminal. Tende a afetar mais as regiões inferiores e margens anteriores dos pulmões e em geral é mais grave nas bases. Está associado à deficiência de alfa1-antitripsina. Ao contrário do centroacinar o volume pulmonar está nitidamente aumentado.<sup>5</sup>

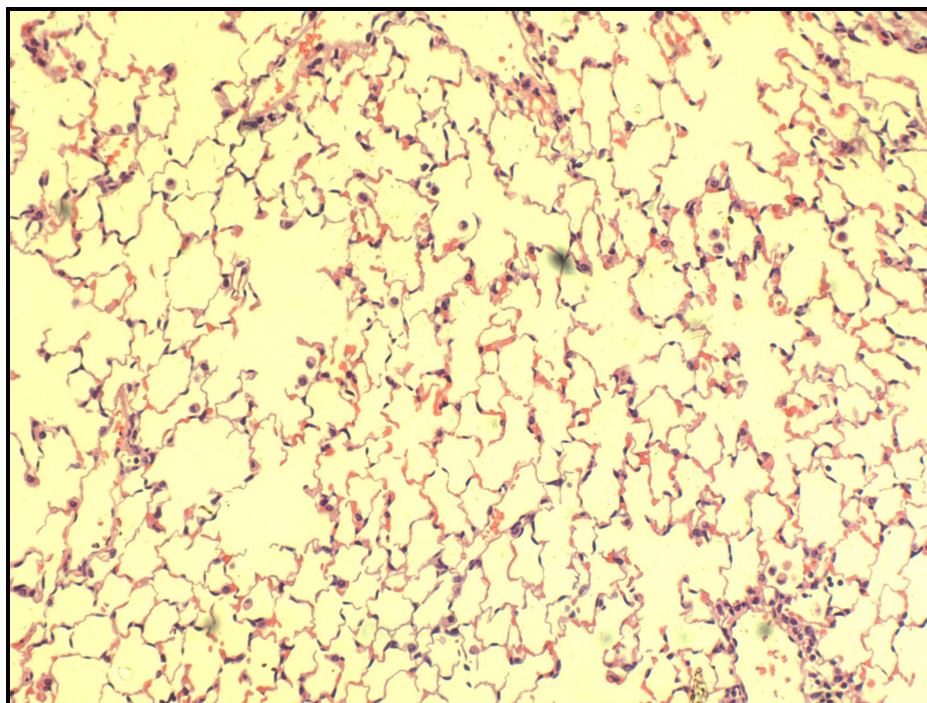
3. Enfisema Acinar Distal (Parasseptal): A porção proximal do ácino está normal, mas a parte distal está predominantemente envolvida, é mais notável na região ao longo do septo de tecido conjuntivo lobular e nas margens dos lóbulos. Costuma ser mais grave na metade superior dos pulmões e tem como características a presença de espaços aéreos múltiplos, contínuos e dilatados, que variam entre 0,5 a 2 cm de diâmetro.

4. Dilatação dos Espaços Aéreos com Fibrose (Enfisema irregular): Este tipo de enfisema é sempre secundário a uma doença específica, o ácino está envolvido de forma irregular, resulta da distensão, ruptura e abundante proliferação fibrosa das estruturas parenquimatosas próximas às lesões cicatriciais. A maioria dos casos deste tipo de enfisema é assintomática e clinicamente insignificante.

As diferenças morfológicas existentes entre um pulmão com enfisema e um pulmão normal podem ser observadas nas figuras 1 e 2, respectivamente.



**Figura 1. Fotomicrografia de um pulmão com enfisema aumento 400x.**



**Figura 2. Fotomicrografia de um pulmão normal aumento 400x.**



### **1.3.1 Fisiologia do enfisema pulmonar**

O enfisema pulmonar é caracterizado pela dilatação dos espaços alveolares, com leve inflamação crônica, por todas as vias aéreas, parênquima e vasculatura pulmonar (espessamento da parede dos vasos), com conseqüente destruição de partes do leito capilar em casos mais graves. As pequenas vias aéreas (com menos de 2 mm de diâmetro) estão estreitadas, tortuosas e reduzidas em número, além de possuírem paredes finas e atrofiadas.<sup>12,13</sup>

Como o pulmão adulto não apresenta um crescimento espontâneo ou regeneração, o enfisema pulmonar é considerado uma doença progressiva e irreversível, como descrito por Ishizawa e colaboradores.<sup>14</sup>

### **1.3.2 Tratamento do enfisema pulmonar**

O tratamento do enfisema ainda não está bem definido, sendo indicado à cirurgia quando existem bolhas insufladas que ocupam grande espaço da cavidade pleural e comprimem o parênquima normal. Também se sugere a cirurgia de redução volumétrica dos pulmões (LVRS), proposta por Brantigan,<sup>15</sup> bem como o transplante pulmonar. A LVRS consiste na redução de aproximadamente 30% do tamanho do pulmão em cada lado. Essa técnica tem provocado enorme impacto e aceitação no meio médico e, segundo Gaensler, “é difícil acreditar que uma doença caracterizada por perda difusa do parênquima pulmonar possa ser tratada de forma eficiente pela ressecção de pulmão

funcionante”.<sup>16</sup> Apesar dos enormes avanços das técnicas cirúrgicas de transplante pulmonar e LVRS, é grande o índice de morbidade e mortalidade dos pacientes, como foi observado por Fishman e colaboradores, onde eles constataram que a taxa de mortalidade, 30 dias após a cirurgia, foi de 16%, em comparação com uma taxa de 0% entre os 70 pacientes tratados clinicamente.<sup>17</sup>

Para os pacientes com deficiência de alfa1-antitripsina e DPOC estabelecida, é recomendada a chamada terapia de aumento da concentração intravenosa com infusão periódica de concentrados da proteína purificada a partir do sangue de doadores humanos. O tabagismo é reconhecido como o principal fator de risco e, por isso, é conveniente sua interrupção.<sup>18,19,20</sup>

O avanço da medicina influenciou na diminuição das taxas de mortalidade com a prevenção de patologias, a incorporação de procedimentos diagnósticos precoces e tratamentos mais sofisticados.<sup>20</sup> As técnicas de terapia celular abrem uma nova perspectiva para o tratamento do enfisema pulmonar, uma vez que se demonstrou que células tronco de medula óssea podem se diferenciar em diversos tipos celulares como, por exemplo, células endoteliais, células epiteliais, miócitos e neurônios, possibilitando seu uso na medicina regenerativa.

#### **1.4 Células tronco adultas**

As células tronco possuem duas importantes características que as distinguem dos outros tipos celulares. Primeiro, elas são células indiferenciadas e não especializadas, com capacidade de se renovar por longos períodos, através da divisão celular. A segunda é que, sob certas condições fisiológicas ou

experimentais, elas podem ser induzidas a se tornar células com funções específicas.

As células tronco são fundamentais não somente para coordenar a formação de órgãos, desde a fase embrionária até o indivíduo adulto, mas também pelo seu papel fundamental na regeneração e reparo de tecidos, tendo como características principais a capacidade de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens<sup>21</sup>.

Acreditava-se que elas possuíam uma desvantagem em relação as células tronco embrionárias (ES), que seria uma menor capacidade de transformação. No entanto, hoje isso é discutível, pois já existem estudos que admitem que células de determinada linhagem podem se transdiferenciar em células com diferente origem germinativa como, por exemplo, os estudos de Bjornson e colaboradores onde células isoladas de encéfalos de camundongos podem se diferenciar em células hematopoiéticas.<sup>22</sup>

As células tronco adultas estão presentes em todos os tecidos e são responsáveis pelo reabastecimento tecidual durante toda a vida. São células indiferenciadas, encontradas em tecidos diferenciados (especializados), como o sangue, podendo gerar tipos de células especializadas do tecido do qual se origina, assim como pode renovar-se a si mesma.

#### **1.4.1 Terapia com células tronco adultas**

O uso da terapia celular, com células tronco e suas progenitoras para o tratamento de “doenças” têm se tornado um avanço na medicina regenerativa e

é uma realidade clínica, permitindo que médicos e pacientes disponham de novos métodos para terapias efetivas<sup>23</sup>.

As células tronco podem ser encontradas no micro ambiente de diversos tipos de tecidos como o hematopoiético, neural, gastrointestinal, epidérmico e outros. Estudos recentes demonstraram que o organismo adulto possui uma reserva de células tronco-progenitoras pluripotentes.

Até recentemente, achava-se que as células tronco tecido-específicos poderiam somente se diferenciar em células do seu tecido de origem. Entretanto, estudos recentes sugerem que elas podem também se diferenciar em outros tipos de linhagens fora do seu ambiente de origem.

Devido as dificuldade práticas de obtenção de células-tronco embrionárias, e considerando os aspectos éticos e legais, inúmeros pesquisadores têm realizado seus estudos com células-tronco adultas, principalmente aquelas derivadas do estroma da medula óssea. A medula óssea, aparentemente, é a fonte com maior abundância de células tronco adultas, as quais possuem uma plasticidade de se diferenciar em diversos tipos celulares de origem mesenquimal, endodérmica e ectodérmica bem como, fundir-se com as células de um determinado tecido assumindo seu fenótipo<sup>24-26</sup>.

Wang et al., transplantando células de medula em camundongos mutantes com deficiência em fumarilacetoacetato hidrolase (FAH), demonstraram que ocorre uma repopulação das células derivadas do doador, se diferenciando em hepatócitos morfológicamente normais, expressando a enzima FAH.<sup>27</sup>

Krause et al., estudando a autorenovação, diferenciação e o fenótipo de células derivadas da medula óssea, transplantando células de medula de camundongos machos doadores em fêmeas, constaram por imunofluorescência a presença do cromossomo Y em diversos tipos de tecido diferenciados em células epiteliais de fígado, pulmão, trato gastrointestinal e pele.<sup>28</sup>

Kocher et al., em modelo experimental de infarto por ligadura da artéria coronária, transplantando células tronco hematopoiéticas retiradas de medula óssea de adultos humanos, mostraram que essas foram capazes de dar origem a células endoteliais vasculares quando transplantadas em ratos *nude*. A angiogênese resultante do transplante celular levou à prevenção da apoptose dos cardiomiócitos, reduzindo o remodelamento ventricular com melhora da função cardíaca.<sup>29</sup>

Jiang et al. mostraram que células da medula se diferenciaram *in vitro* nas três camadas germinativas (mesenquimal, endodérmica e ectodérmica) na presença de fatores de diferenciação específicos. E que essas células contribuíam com a maioria dos tecidos somáticos quando injetadas em blastocisto e transplantadas *in vivo*.<sup>30</sup>

#### **1.4.2 Células tronco adultas no tratamento de enfisema pulmonar**

Danos devido a doenças agudas e crônicas excedem a capacidade de reparo no tecido pulmonar, resultando em alterações patológicas incluindo a destruição do tecido. Devido à resposta inflamatória, as células da medula óssea podem ser recrutadas e mobilizadas até a região da injúria possibilitando um

envolvimento no reparo do tecido lesado. Danos inflamatórios induzidos por lipopolisacarídeos causam alterações no parênquima pulmonar, resultando em apoptose e necrose do tecido.

As células progenitoras de medula óssea transplantadas em camundongos apresentam capacidade de diferenciação e podem assumir o fenótipo de células do epitélio e endotélio pulmonar, sendo indispensáveis no reparo da injúria, como descrito por Yamada e colaboradores.<sup>31</sup>

Zhang et al. demonstraram que, durante as inflamações alérgicas pulmonares, fator de células tronco (SCF) e outras citocinas (IL-6, IL-8, GM-CSF) são secretadas pelos miofibroblastos do subepitélio bronquiolar. O SCF é a citocina necessária para a diferenciação dos mastócitos e das células da medula óssea, bem como a sobrevivência dos mastócitos na periferia e ativação da degranulação dos mesmos.<sup>32</sup>

As células tronco adultas podem ser encontradas em diversas partes do organismo. Pelo fato de serem retiradas do próprio paciente, oferecem baixo risco de rejeição nos tratamentos médicos.

Não há muitos estudos utilizando células tronco no tratamento do enfisema pulmonar. Assim, o objetivo principal deste trabalho é verificar se há uma melhora no parênquima pulmonar associada ao transplante de células de medula óssea em camundongos com enfisema pulmonar induzido por papaína em relação a um grupo controle não tratado.

## **2. OBJETIVOS**

### ***2.1 Objetivo Geral***

Verificar se há uma melhora no parênquima pulmonar associada ao transplante de células de medula óssea em camundongos com enfisema pulmonar induzido por papaína em relação a um grupo controle não tratado.

### ***2.2 Objetivos Específicos***

1. Verificar se há células transplantadas no parênquima pulmonar de camundongos com enfisema após tratamento com células mononucleares de medula óssea.
2. Verificar se a área de parênquima pulmonar dos camundongos transplantados é diferente da dos camundongos do grupo controle.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Animais

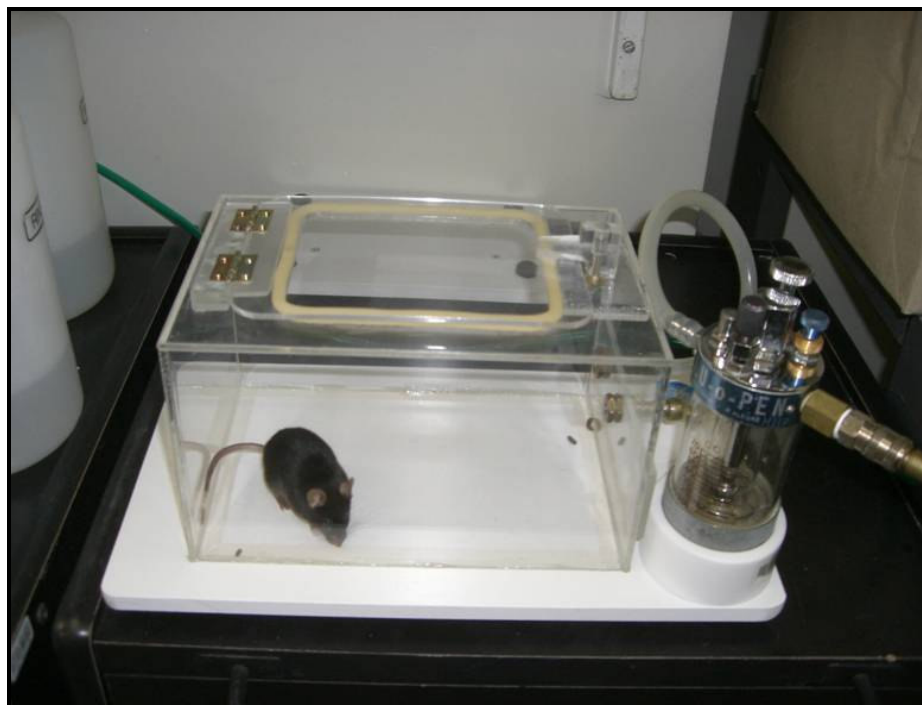
Durante este estudo foram utilizados 8 camundongos doadores de células de medula óssea da linhagem C57BL/6 transgênicos para a proteína EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), machos, com doze meses de vida, pesando entre 25 e 35 gramas, provenientes do biotério do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da PUCRS. Os 8 animais que receberam células eram camundongos C57BL/6, machos, com doze meses de vida, provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEEPS). Durante os experimentos, todos os camundongos foram mantidos no biotério do IPB, com iluminação (ciclo claro-escuro de 12 horas) e temperatura controlados (22°C), além de ração e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em dois grupos (n=8 em cada grupo), sendo um grupo controle e o outro que recebeu células mononucleares de medula óssea.

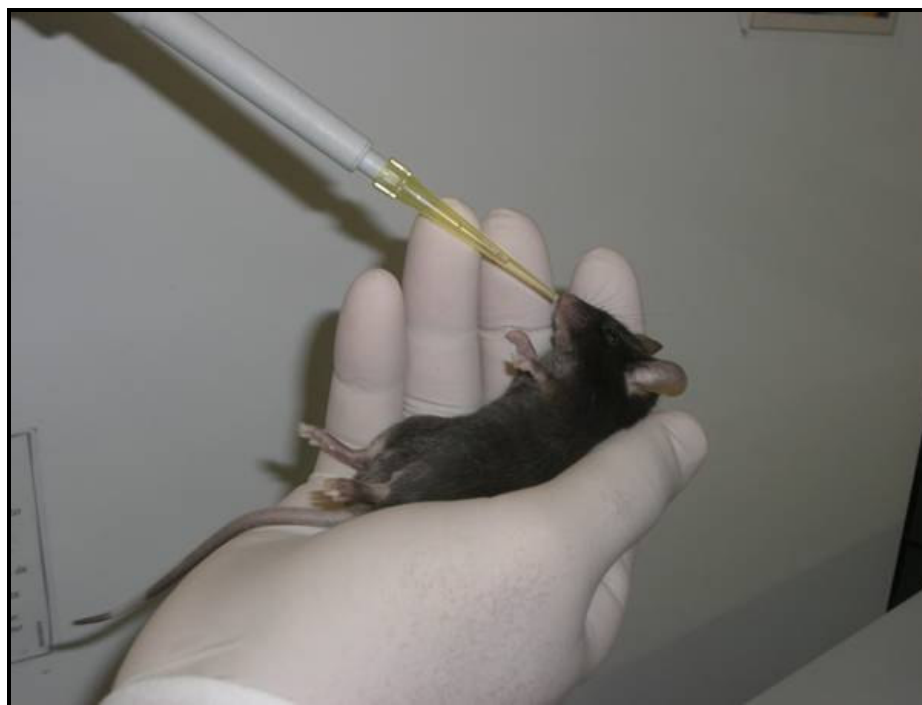


### **3.2 Indução de enfisema pulmonar com papaína**

Para a indução do enfisema pulmonar todos os animais foram sedados em câmara de anestesia geral com halotano inalatório (Figura 3) por aproximadamente 1 minuto, para facilitar a aspiração da papaína, logo em seguida foram submetidos à instilação intranasal de 3,5 mL/kg de solução de papaína (Figura 4) em solução fisiológica isotônica a 0,9% (Sigma® - Aldrich Co. St Louis, USA ), em 100  $\mu$ L, correspondente a cerca de 6 mg de papaína por animal, de acordo com procedimentos padrões já descritos na literatura.



**Figura 3: Câmara de anestesia geral com medicação inalatória.**



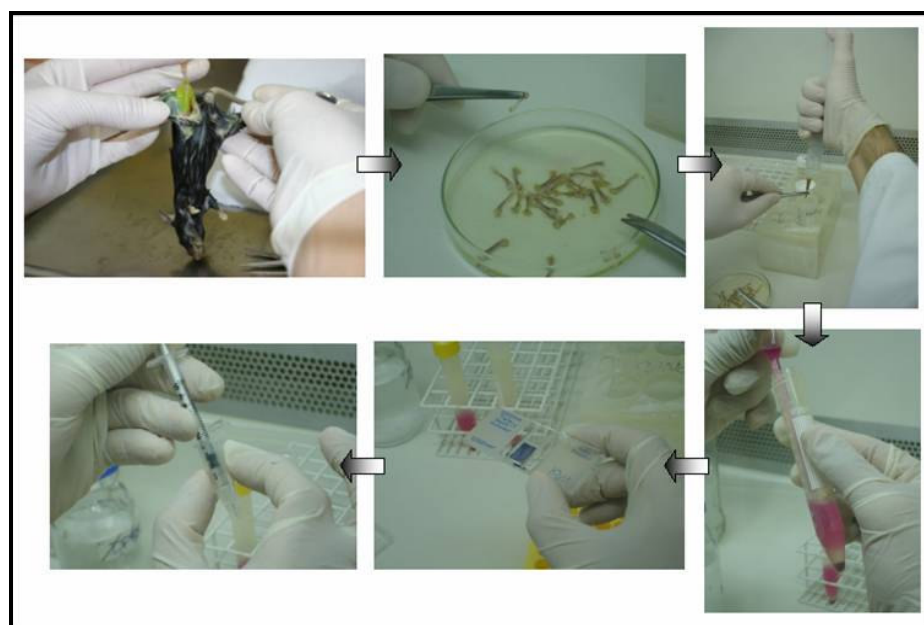
**Figura 4: Instilação intranasal de papaína.**

### ***3.3 Obtenção das células da medula óssea***

Para obtenção das células de medula óssea, os animais transgênicos EGFP+ foram sacrificados, com injeção letal via intraperitoneal (i.p.), contendo solução com 150  $\mu$ l de cloridrato de cetamina (50mg/mL) e 150  $\mu$ l de xilazina 2% (20mg/mL).

A seguir, foram retirados a tíbia, o fêmur e o úmero, e realizados cortes nas regiões das epífises, removendo-as para a entrada da agulha na cavidade medular, seguido de extração das células por um fluxo de DPBS com 1% de heparina sódica e por uma centrifugação em gradiente de densidade usando

Histopaque® (Sigma Diagnostics, USA). As células foram ressuspensas com 4 mL de meio de cultura D-MEM (Invitrogen, USA), colocadas sobre 2 mL de Histopaque® e centrifugadas a 400 g durante 30 minutos. A camada de células mononucleares foi retirada e lavada com 1 mL de DPBS e centrifugada a uma velocidade de 1.500 rpm por 3 minutos. A contagem e a viabilidade celular foram avaliadas pelo método de exclusão com Azul de Tripán em câmara de Neubauer (Figura 5).



**Figura 5: Procedimentos para obtenção das células de medula óssea.**

### **3.4 Transplante das células**

Três semanas após a indução do enfisema pulmonar, os camundongos do grupo 1 receberam aproximadamente  $1 \times 10^7$  células de medula óssea, enquanto o grupo 2 (controle) recebeu apenas solução de cloreto de sódio 0,9%, ambos em volume 100  $\mu$ L, por via intravenosa, através da veia caudal.

Passados 15 dias do primeiro transplante, o processo foi repetido nos dois grupos e decorrido 30 dias, os animais foram sacrificados e os pulmões removidos, para a análise e quantificação do enfisema pulmonar (Figura 6).

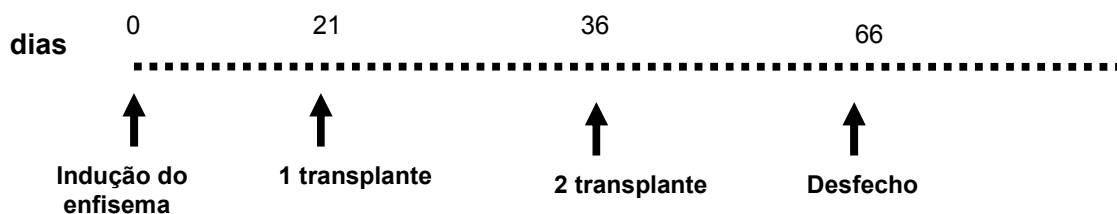


Figura 6. Indução do enfisema pulmonar e transplante de células

### **3.5 Obtenção e processamento do tecido pulmonar**

Os animais foram sacrificados 45 dias após o transplante e os pulmões removidos e instilados com formalina tamponada a 10% e pressão

transpulmonar de 20cm/H<sub>2</sub>O seguido de incubação na mesma solução durante 24 horas, a 4° C, para total fixação da peça e posterior processamento. Os pulmões foram desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados em xilol, incluídos em parafina para obtenção de cortes seriados.

Cerca de 10 lâminas foram preparadas, com amostras pulmonares de cada animal experimental. Foram realizadas, aproximadamente 30 fotografias por lâmina, utilizando um aumento de 400 X.

Uma série de lâminas foi corada com Hematoxilina-eosina (HE) para análise qualitativa e quantitativa da morfologia pulmonar, alteração decorrente da ação da papaína, bem como para caracterização do enfisema pulmonar. Outra série de 10 lâminas foi corada com Azul de Evans 0,1% e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) para a verificação da presença de células EGFP+ no epitélio pulmonar, indicativo de regeneração decorrente das células dos animais doadores.

Outra série de 5 lâminas foi utilizada para imunofluorescência como descrito em 3.7 para confirmar a presença de células indiferenciadas.

### **3.6 Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)**

As amostras foram coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE) e examinadas ao microscópio para análise da eficácia do tratamento, confirmação do enfisema, bem como para caracterização das diferenças morfológicas entre

os dois grupos experimentais e para realização do cálculo da área do parênquima que foi feita através do programa Image Pro-Plus versão 4.7.1.

### **3.7 Imunofluorescência**

A imunofluorescência do tecido pulmonar foi realizada para avaliar a migração das células tronco da medula óssea para a região do enfisema. Cortes histológicos de 3 µm de espessura foram obtidos com o auxílio de um micrótomo (Leica, SM 2000R, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas pré-tratadas com 10% de poli-L-lisina (Sigma, USA) e levados à estufa a 60°C por 24 horas.

Os cortes foram desparafinizados por incubação em xilol por 5 minutos por três vezes, seguido da re-hidratação dos cortes em seqüência de etanol em concentrações decrescentes, começando com etanol absoluto, 90%, 80% e 70% por 2 minutos em cada diluição. A seguir, os cortes foram lavados três vezes em água destilada e incubados em tampão PBS por 5 minutos.

A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão para microondas por 25 minutos em tampão Tris/Edta pH 9.0, seguido de 3 lavagens em tampão PBS por 5 minutos cada. O anticorpo primário foi diluído 1:50 em tampão PBS e incubado overnight em refrigerador ( temperatura +/- 4-8 C).

Após a incubação com o anticorpo primário foram feitas 3 lavagens com tampão PBS de 5 minutos cada. As lâminas foram secas em temperatura ambiente sem exposição à luz. Para a montagem das lâminas usou-se glicerina

tamponada. As células tronco derivadas da medula óssea foram identificadas pela marcação com o anticorpo anti-Sca-1.

A avaliação das lâminas tanto as coradas com HE, como as utilizadas para imunofluorescência foram analisadas por dois examinadores, e um patologista cegados para as condições do experimento.

## **ÉTICA**

Todos os procedimentos deste estudo foram realizados seguindo as normas éticas para pesquisa com animais,<sup>33</sup> visando à utilização do menor número de animais e manejo da dor e sofrimento durante os procedimentos do estudo e eutanásia, após aprovação pelo comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, CEUA e pela comissão científica do PPGBB.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram digitados em planilha de dados excel e analisados com a utilização do programa SPSS, versão 11.1.

A variável quantitativa foi descrita em função de sua média, mediana e desvio-padrão e as variáveis categóricas por frequências , com os respectivos IC 95%.

As diferenças entre a área do parênquima dos dois grupos foram verificadas por meio do teste t de *Student*. Valores com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O enfisema pulmonar é uma doença crônica caracterizada pela destruição e dilatação permanente dos espaços aéreos distais aos bronquíolos terminais devido à destruição das paredes das vias aéreas. Apresenta uma maior incidência em pessoas do sexo masculino e de raça branca, o que pode ter relação com fatores genéticos.<sup>34</sup> De acordo com Starr, “a DPOC é a doença pulmonar crônica mais comum, afetando de 10 a 15% dos adultos com mais de 55 anos.”<sup>35</sup>

Os camundongos aos 60 dias de idade tornam-se aptos à reprodução, sendo que os efeitos hormonais iniciais já estão presentes em ambos os sexos ao redor dos 30 dias de idade. Após 8 meses de idade são considerados idosos. Devido a isto, foram utilizados neste trabalho camundongos com doze meses de vida e machos para uma maior fidedignidade em relação aos seres humanos.

A realização de trabalhos em modelos experimentais é uma abordagem atraente para um melhor entendimento da fisiologia, da etiopatogenia das doenças, dos efeitos das intervenções cirúrgicas, da ação de medicamentos na medida em que auxiliam na compreensão dos fenômenos naturais. Sua maior importância está relacionada com o respeito à barreira ética de não intervenção primária experimental em seres humanos. A utilização de animais isogênicos com populações estáveis e geneticamente homogêneas torna menor o número



amostral mínimo para um experimento, já que existem apenas as variáveis ambientais e experimentais.<sup>36</sup>

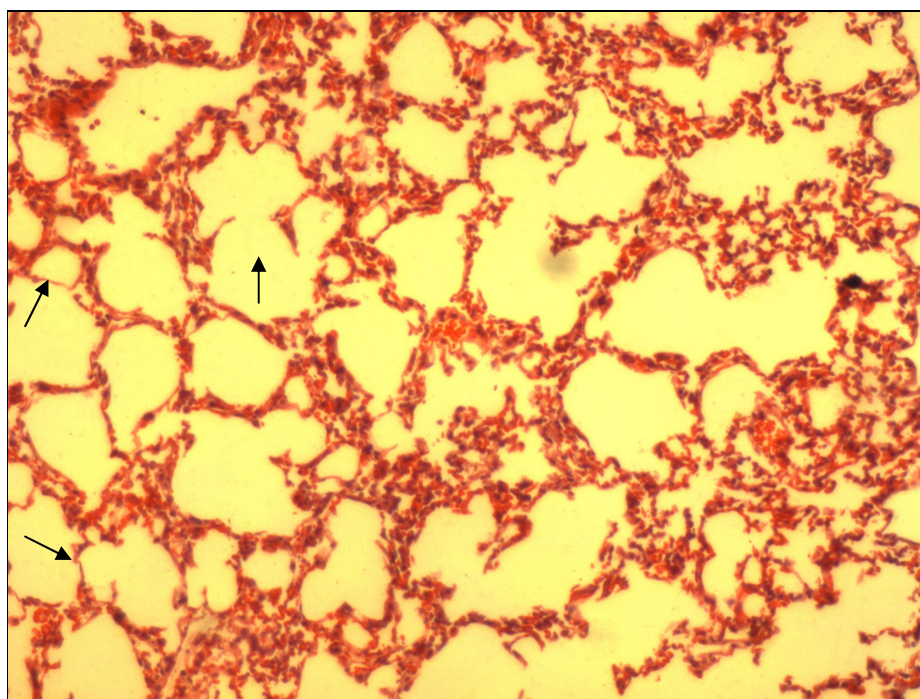
Para a indução do enfisema pulmonar foi realizado um teste piloto com 2 camundongos, analisado por um patologista cegado e, após confirmado o enfisema pulmonar, o procedimento foi realizado nos animais pertencentes ao grupo experimental.

Existem outros métodos de indução de enfisema pulmonar, como por exemplo, a exposição ao cigarro que produz dilatação dos ductos alveolares. Essas alterações progridem com o aumento da exposição ao fumo e são semelhantes a uma forma leve de enfisema, mas a destruição tecidual total que é observada em humanos é mais difícil de demonstrar em animais através deste método, além de ser um método de indução longo, pois leva alguns meses até que o enfisema esteja estabelecido.<sup>37,38</sup>

Além do cigarro, existem outras substâncias tais como o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) que é um gás irritante que se inalado de 4 a 8 semanas produz lesões similares a DPOC, bem como o dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) que também produz lesões pulmonares dependendo da concentração e da duração a exposição.<sup>39</sup>

Outra possibilidade são modelos transgênicos de camundongos C57BL/6 que são propensos a desenvolver enfisema pulmonar. Tais animais recebem a denominação de *tight skin*, *pallid mice* e *blotchy mice* e possuem mutações em diferentes genes ligados a formação e manutenção do tecido pulmonar.<sup>40</sup>

Após a realização do tratamento e remoção dos pulmões as lâminas coradas com HE foram utilizadas para avaliação e caracterização do enfisema pulmonar nos animais do grupo 2 (controle), os quais receberam instilação intranasal de papaína e não receberam tratamento. Neste grupo, observou-se alterações morfológicas características de lesões enfisematosas com padrão panacinar, onde os ácinos estão dilatados desde o bronquíolo respiratório até o alvéolo terminal, como pode ser observado na Figura 7.



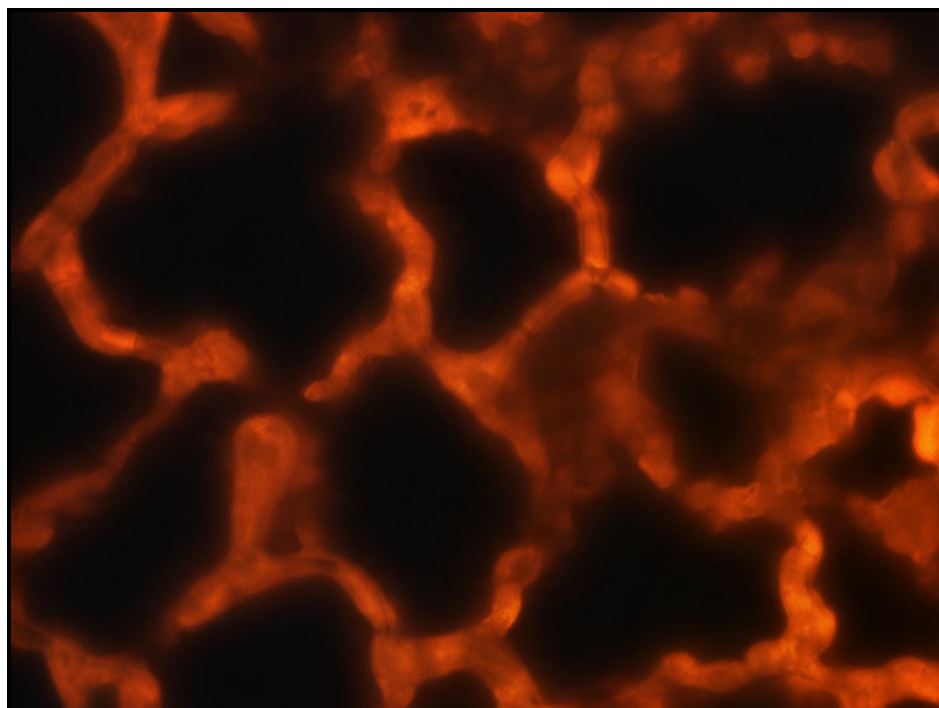
**Figura 7. Fotomicrografia de um corte histológico do pulmão de camundongo corado com HE.** As setas indicam o aumento dos espaços aéreos com adelgaçamento e destruição os septos alveolares, alterações morfológicas que confirmam a presença de enfisema pulmonar. Aumento 400X.

As lâminas coradas com azul de Evans e DAPI foram utilizadas para avaliar a presença e distribuição das células provenientes do camundongo doador (EGFP+) no tecido regenerado.

O uso da EGFP só foi possível graças à engenharia genética, que consiste na manipulação de genes em um organismo, envolvendo o isolamento, a manipulação e introdução desse gene em outro organismo. O objetivo é introduzir características de interesse de um organismo em outro, que pode ser tanto da mesma espécie quanto de espécies totalmente diferentes. A introdução pode ser feita através de um plasmídeo, de um vetor viral ou via sistêmica.

A proteína EGFP vem sendo amplamente utilizada como marcador em terapia celular, sendo utilizada para marcar células, tecidos e até mesmo alguns genes de interesse, utilizados para diferentes estudos. A presença de EGFP é um indicativo de que o tecido regenerado foi proveniente das células de medula óssea do animal doador e não são células do animal receptor.<sup>41</sup>

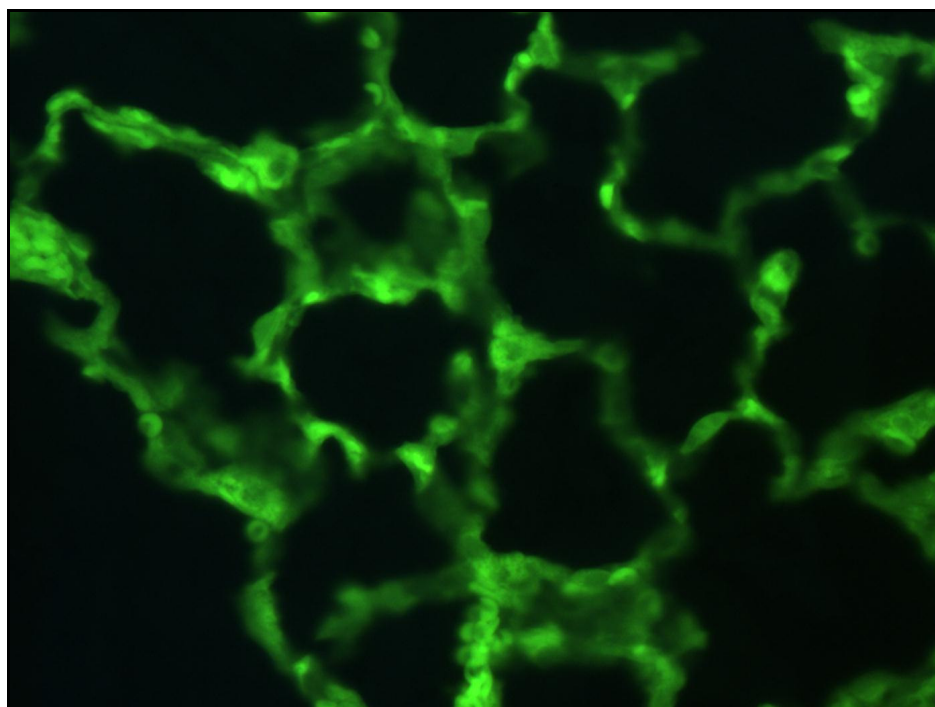
No grupo 2 (controle), que recebeu apenas solução de cloreto de sódio 0,9 %, não se observou a presença de células EGFP+ no parênquima pulmonar como pode ser visto na Figura 8.



**Figura 8. Fotomicrografia de um corte histológico de pulmão de camundongo do grupo controle, corado com azul de Evans e DAPI. Aumento 400x.**

Já no grupo 1, que recebeu o tratamento com células mononucleares de medula óssea, constatou-se a presença de células EGFP+ no epitélio pulmonar, na parede alveolar mas principalmente no epitélio brônquico. Talvez isso se deva ao fato de que as células, quando injetadas via sistêmica, possuem duas vias de acesso ao pulmão: uma seria através das artérias pulmonares e a outra através das artérias brônquicas. Isto nos leva a outra pergunta sobre o padrão de sinalização celular, será que a sinalização ocorre a partir dos brônquios? No entanto, esta questão ainda não está esclarecida (Figura 9).

Existe ainda, no tratamento do enfisema pulmonar, outra via de administração de células, onde o transplante é feito diretamente nos brônquios principais direito e esquerdo com o auxílio de um cateter.<sup>42</sup>



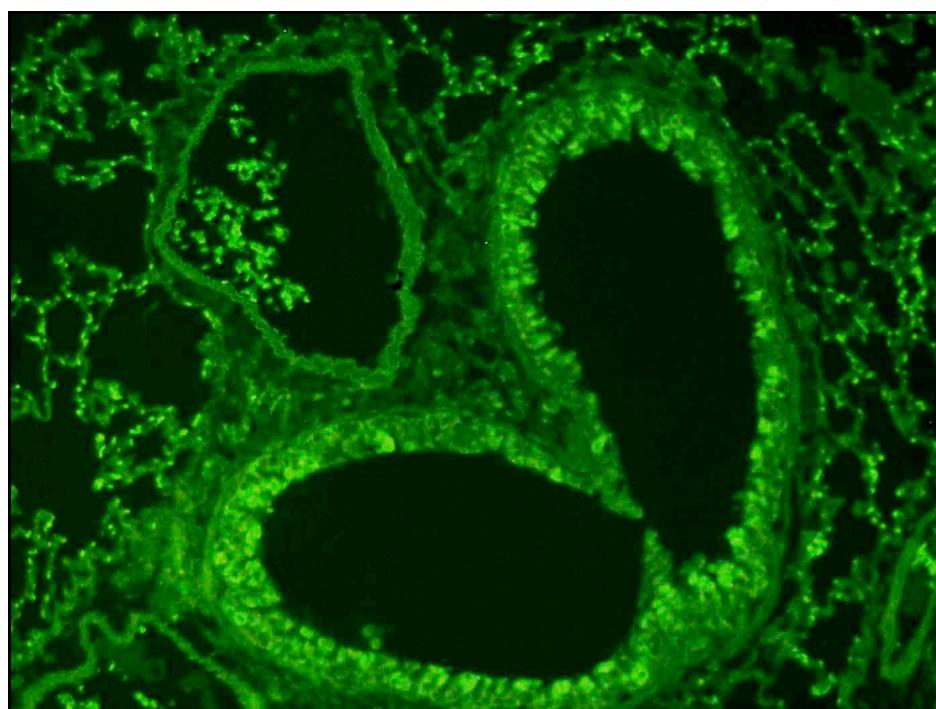
**Figura 9. Fotomicrografia de pulmão de camundongo corado com azul de Evans + DAPI evidenciando a presença e células EGFP+ no parênquima pulmonar do Grupo 1. A forte fluorescência verde evidencia a presença de células EGFP+ no parênquima pulmonar de animais que receberam células da medula óssea. Aumento 400x.**

A imunofluorescência realizada com o anticorpo anti-Sca-1 nos cortes de pulmão foi positiva demonstrando a presença de células mononucleares de medula óssea no parênquima pulmonar dos animais que receberam o transplante de células (Figura 10).

A Sca-1 é uma proteína de cerca de 18 kDa, encontrada na medula óssea de adultos e fígado fetal e é amplamente utilizada como marcador de células tronco.

Oh et al., injetando por via endovenosa células marcadas com Sca-1, observaram que estas células participam da regeneração cardíaca através de mecanismos combinados de fusão e diferenciação.<sup>43</sup>

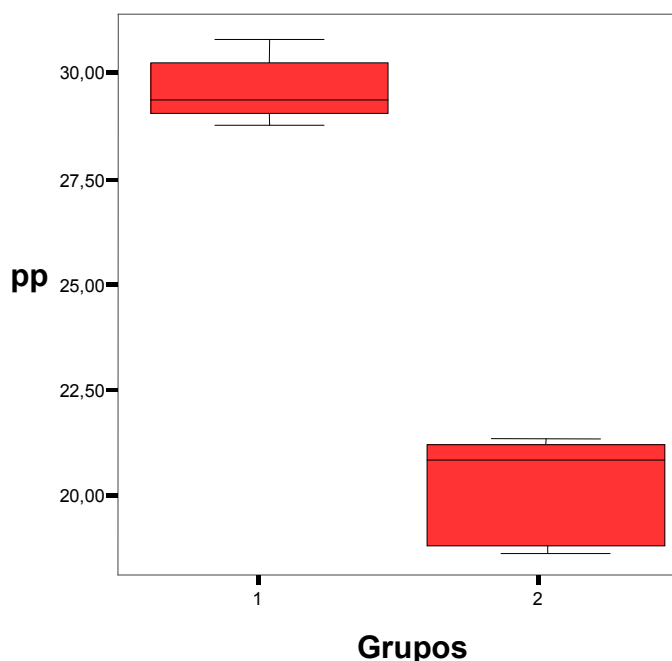
Kotton e colaboradores, em seus estudos sobre expressão de Sca-1 no endotélio vascular, constataram que a expressão de Sca-1 no pulmão está localizada na superfície das células endoteliais em grandes e pequenos vasos pulmonares. Concluem então que a expressão de Sca-1 pode ser utilizada como um marcador confiável para o estudo e análise do endotélio pulmonar.<sup>44</sup>



**Figura 10.** Fotomicrografia de pulmão de camundongo utilizando a técnica de Imunofluorescência com o anticorpo Sca-1. Aumento 400x

Para verificar a eficácia do tratamento com células mononucleares de medula óssea, em relação ao grupo controle, foi realizado o cálculo da área do parênquima utilizando o programa Image Pro-Plus versão 4.7.1.

Para análise estatística foi realizado teste t de *Student* e podemos observar que houve diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de parênquima nos dois grupos ( $p= 0,036$ ). O grupo 1 obteve uma média de  $30\ \mu\text{m}^2$  enquanto o grupo 2 obteve uma media de  $20\ \mu\text{m}^2$ , como pode ser visto no Figura 11.



**Figura 11. Porcentagem da área do parênquima pulmonar (pp) dos animais tratados com células mononucleares de medula óssea (grupo 1) e não tratados (grupo 2).**

Atualmente, existem cada vez mais evidências que mostram a capacidade das células tronco adultas em reconhecer danos teciduais e migrar para a região da lesão. No entanto, o mecanismo por meio do qual as células causam a melhora tecidual ainda não está claro.<sup>45,46</sup>

Diferentes mecanismos possíveis podem estar atuando juntos ou separadamente no processo de reparo do tecido lesado. Especula-se a possibilidade desse processo ser decorrente de trans-diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em um ou mais tipos celulares específicos, através da fusão da célula tronco adulta com as células residentes no tecido-alvo, ou ainda, um efeito parácrino dessas células, secretando substâncias ou fatores de crescimento capazes de ativar a regeneração do tecido. Compreender as etapas do processo de diferenciação, ou ainda, descobrir quais moléculas são responsáveis pelo processo de regeneração do parênquima pulmonar é de fundamental importância para o avanço da utilização da terapia celular em patologias respiratórias.

Yuhgetsu e colaboradores, utilizando um modelo de enfisema pulmonar induzido por elastase, em coelhos, relataram que os animais que receberam transplante de células mononucleares de medula óssea, apresentaram melhora significativa na função pulmonar (CVF, VEF 100, VEF/PFE) e menores espaços alveolares, indicando que o transplante de células mononucleares de medula óssea pode inibir a progressão do enfisema. Os autores sugerem que a inibição



da apoptose e o aumento da proliferação celular, da parede alveolar, podem estar relacionados aos efeitos benéficos deste tipo de terapia.<sup>42</sup>

Ishizawa K também observou uma redução de 44% no enfisema nos camundongos tratados com G-CSF em comparação com os animais com enfisema pulmonar induzido por elastase. Neste estudo os animais foram irradiados para ablação total da medula e, em seguida, receberam um transplante de medula óssea de doadores transgênicos para GFP+. A análise histológica mostrou a presença de GFP+ nas paredes alveolares, demonstrando a presença de células com fenótipo alveolar derivadas de progenitores da medula óssea.<sup>14</sup>

Sendo assim nossos resultados demonstram a possibilidade das células mononucleares de medula óssea estarem envolvidas no processo de reparo do tecido lesado e podem ser de grande utilidade em intervenções terapêuticas para o tratamento de doenças pulmonares.

## **5. CONCLUSÕES**

Neste trabalho investigamos os efeitos do transplante de células mononucleares de medula óssea em camundongos com enfisema pulmonar induzido por papaína. Nosso estudo possibilitou as seguintes conclusões.

1. O presente estudo demonstrou a capacidade de células de medula óssea em migrarem, e se inserirem no parênquima pulmonar.

2. O Grupo 1, o qual recebeu o tratamento, obteve a porcentagem de parênquima significativamente maior que o grupo 2, que não recebeu o tratamento.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Futuramente, mantendo esta mesma linha de pesquisa, pretendemos aprofundar nossos conhecimentos sobre o potencial terapêutico das células tronco da medula óssea em modelo experimental de enfisema pulmonar.

1. Aumentar o tempo de monitoramento das células após o transplante.
2. Realizar ensaios utilizando PCR em tempo real, mais sensíveis a detecção de EGFP.
3. Avaliar a presença das células transplantadas através de outras ferramentas como imunohistoquímica e microscopia confocal.
4. Realizar medidas de função pulmonar.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Freitas EV, Py L, Cançado FAX, Doll J, Gorzini ML. Tratado de Geriatria e Gerontologia. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (BR). Disponível em: <[http:// www.ibge.net/home/estatistica/populacao/censo2000](http://www.ibge.net/home/estatistica/populacao/censo2000)>. Acesso em: 19 dez. 2008.
3. Varoto, VAG, Truzzi OMS, Pavarini SCI. Programas para idosos independentes: um estudo sobre seus egressos e a prevalência de doenças crônicas. Tex Cont Enferm 2004 13:107-14.
4. Ramos LR, Rosa, TEC, Oliveira ZM, Medina MCG, Santos FRG. Perfil do idoso em área metropolitana na região sudeste do Brasil: resultados de inquérito domiciliar. Rev Saude Publica 1993 27:87-94.
5. Paschoal SMP. Epidemiologia do envelhecimento. In: Papaléo Netto, M. Tratado de Gerontologia. São Paulo: atheneu; 2002.
6. Jardim JR, Nascimento OA. Epidemiologia, impacto e tratamento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) no Brasil. Rev Rac 2007 101:33-47.
7. DATASUS. Disponível em: < <http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 20 mai. 2007.
8. GOLD. Disponível em: < <http://www.golddpoc.com.br> >. Acesso em: 14 mai. 2008.
9. Cecil. Tratado de medicina interna. 22º ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

10. Rufino R, Silva JRL. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. J Bras Pneumol 2006 32:241 -8.
11. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica - DPOC. J Bras Pneumol 2004 30:1-42.
12. Robbins, C. Patologia – Bases patológicas das doenças. 7º ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
13. West J B. Doenças obstrutivas. In: Fisiopatologia pulmonar moderna. 4 ed. São Paulo: Manole; 1996. p. 57-86.
14. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Numasaki M, et al. Bone marrow – derived cells contribute to lung regeneration after elastase – induced pulmonary emphysema. FEBS Lett 2004 556:249-52.
15. Brantigan OC. Surgical treatment of pulmonary emphysema. Maryl Med J 1957 6:409-14.
16. Gaensler EA, Cugell DW, Knudson RJ. Management of emphysema. Clin Chest Med 1983 4:443-63.
17. Fishman A, Fessler H, Martinez F, Arbor A, McKenna, RJ, Naunheim K et al. Patients at risk of death after Lung-Volume – Reduction Surgery. N Engl J Med 2001 345:1075-83.
18. Dweik R, Stoller JK. Doenças Pulmonares Obstrutivas: DPOC, Asma e Doenças Relacionadas. In: Scanlan CL, Wilkins RL, Stoller JK. FUNDAMENTOS DA TERAPIA RESPIRATÓRIA DE EGAN. 7 ed. São Paulo: Manole; 2000. p. 457-78.

19. Camelier AA, Winter DH, Jardim J R, Barboza CEG, Cukier A, Miravittles M. Deficiência de alfa-1 antitripsina: diagnóstico e tratamento. *J Bras Pneumol* 2008 34:514-27.

20. Pavarini SCI, Mendiondo MSZ de, Barham EJ, Varoto VAG, Filizola CLA. A arte de cuidar do idoso: gerontologia como profissão? *Tex Cont Enferm* 2005 14:398-402.

21. Loeffler, M, Potten, CS. In *Stem Cells* (Potten, C.S., Ed.) Pp. 1-27, Academic Press Ltd, London And San Diego, 1997.

22. Bjorson, CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999 283:534-7.

23. Fodor, W L. *Tissue Engineering And Cell Based Therapies, From The Bench To The Clinic: The Potential To Replace, Repair And Regenerate.* *Reproductive Biology And Endocrinology* 2003.1: 1-6.

24. Pittenger, MF, Mackay A M, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage Potential Of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 1999 284: 143-7.

25. Tuan RS, Boland G, Tuli, R. Adult Mesenchymal Stem Cells And Cell-Based Tissue Engineering. *Arthritis Research & Therapy* 2003 5: 32-45.

26. Tohill, M. & Terenghi, G. Stem-Cell Plasticity And Therapy For Injuries Of The Peripheral Nervous System. *Biotechnology And Applied Biochemistry* 2004 40: 17-24.

27. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Dhalimy MA

et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003 422:897-901.

28. Krause SD, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R et.al. Multi-Organ, Multi-Lineage Engraftment by a Single Bone Marrow-Derived Stem Cell. *Cell* 2001 105:369-77.

29. Kocher AA, Itescu S, Schuster MD. Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: Strategies for improvement of cardiomyocyte function. *Heart Fail Rev* 2003 8:253-8.

30. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Reyes M et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002 418:41-9.

31. Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, Numasaki M, Ueda S et. al. Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol* 2004 172:1266-72.

32. Zhang S, Mohammed Q, Burbidge A, Morland CM, Roche WR. Cell culture from bronchial subepithelial myofibroblasts enhance eosinophil survival *in vitro*. *Eur Respir J* 1996 9:1839-46.

33. Andersen ML, D' Almeida V, Ko GM. In: Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. 4 ed. São Paulo: UNIFESP; 2004.

34. Enfisema pulmonar. Disponível em: <<http://www.farmalabchiesi.com.br/faserenfisema.asp>>. Acesso em: 02 jan. 2009.

35. Starr JA. Disfunção pulmonar crônica. In: O'sullivan SB, Schmitz TJ.

Fisioterapia: avaliação e tratamento. 4.ed. São Paulo: Manole, 2004. 445-69.

36. Santos BF. Classificação dos animais de laboratório quanto ao *status* genético. In: Andrade A, Pinto SC. Animais de Laboratório - criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2002.

37. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008 295:1-15.

38. Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi-Filho G, Dohlnikoff M, Pereira MP, Conceição GMS et al. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Braz J Med Biol Res* 1997 30:1241-7.

39. Groneberg DA, Chung KF. Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2004 5:18-24.

40. Dawkins PA, Stockley RA. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2001 56:972-7.

41. Liu HS, Jan MS, Chou CK, Chen PH, Ke NJ. Is green fluorescent protein toxic to the living cells?. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 260:712-7.

42. Yuhgetsu H, Ohno Y, Funaguchi N, Asai T, Sawada M, Takemura G et al. Beneficial effects of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation against elastase- induced emphysema in rabbits. *Exp Lung Res* 2006 32:413-26.

43. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *PNAS* 2003 21:12313-8.



44. Kotton DN, Summer RS, Sun X, Ma BY, Fine A. Stem cell antigen-1 expression in the pulmonary vascular endothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003 284:990-6.

45. Morales MM. TERAPIAS AVANÇADAS. Células tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde. São Paulo: Atheneu; 2007.

46. Fine A. Marrow cells as progenitor of lung tissue. *Blood Cells Mol Dis* 2004 32:95-6.

## **8. ANEXO**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 036/08-CEP

Porto Alegre, 08 de janeiro de 2008.

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS  
apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 07/03908, intitulado:  
**“Aplicação da engenharia de tecidos e terapia celular em modelo experimental  
de enfisema pulmonar”.**

Sua investigação está autorizada a partir da presente  
data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser  
entregues a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Roberto Goldim  
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)  
Profa Dra Denise Cantarelli Machado  
N/Universidade

**PUCRS**

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000  
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [cep@pucrs.br](mailto:cep@pucrs.br)  
[www.pucrs.br/prppg/cep](http://www.pucrs.br/prppg/cep)