



Fatores solúveis de células-tronco mesenquimais (FS-CTM) como uma ferramenta potencial para reduzir a inflamação nos pulmões de doadores após choque hipovolêmico

Vinicius Luderer Dias¹ , Karina Andrighetti de Oliveira Braga¹ ,
Natalia Aparecida Nepomuceno¹ , Liliane Moreira Ruiz¹ ,
Juan David Ruiz Perez² , Aristides Tadeu Correia¹ ,
Luiz Carlos de Caires Junior³ , Ernesto Goulart³ , Mayana Zatz³ ,
Paulo Manuel Pêgo-Fernandes¹ 

1. Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), Brasil.
2. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), Brasil.
3. Centro de Pesquisa do Genoma Humano e Células-Tronco, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), Brasil.

Recebido: 23 fevereiro 2021.
Aprovado: 10 abril 2021.

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), Brasil.

RESUMO

Objetivo: A escassez de pulmões viáveis ainda é um grande obstáculo para o transplante. As vítimas de trauma, que constituem potenciais doadores de pulmão, comumente apresentam choque hipovolêmico que acarreta inflamação e deterioração pulmonar e rejeição após o transplante. Buscando melhorar o enxerto pulmonar, testaram-se novas abordagens ao tratamento do doador. Este estudo foca o tratamento com células-tronco mesenquimais (CTMs) ou fatores solúveis produzidos pelas CTMs (FS-CTMs), usando um modelo com ratos para doadores de pulmão após choque hemorrágico. **Métodos:** Quarenta e oito ratos foram divididos em quatro grupos: Controle (n=12), animais sem indução de choque hipovolêmico; Choque (n=12), animais submetidos a choque hipovolêmico (pressão arterial média de 40 mmHg); CTM (n=12), animais submetidos a choque hipovolêmico e tratados com CTMs; e FS (n=12), animais submetidos a choque hipovolêmico e tratados com FS-CTMs. Os animais foram submetidos a um procedimento de choque hipovolêmico (40 mmHg) com 50 minutos de duração. Os animais tratados foram monitorados por 115 minutos. Realizamos análise histopatológica do tecido pulmonar e quantificação dos marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, iCAM e vCAM) no tecido pulmonar e leucócitos no sangue periférico (LSPs). **Resultados:** O choque hemorrágico resultou em taxas mais altas de LSPs e infiltrado de neutrófilos nos pulmões. Os animais do grupo FS apresentaram menor densidade de neutrófilos em comparação com os animais dos grupos Choque e CTM (p<0,001). Não foram observadas diferenças entre os grupos quanto aos níveis de citocinas no tecido pulmonar. **Conclusão:** Os pulmões dos ratos submetidos a choque hemorrágico e tratados com FS-CTM apresentaram inflamação reduzida indicada por uma diminuição do infiltrado de neutrófilos nos pulmões.

Descritores: Transplante pulmonar; Doadores de tecido; Choque hipovolêmico; Células mesenquimais; Inflamação.

INTRODUÇÃO

O transplante pulmonar melhora a qualidade de vida e a sobrevivência de pacientes com doença pulmonar em fase terminal.⁽¹⁾ Apesar de todos os avanços alcançados no transplante pulmonar, o número de receptores em lista de espera não reduziu – pelo contrário, ele agora ultrapassa o número de órgãos disponíveis para doação.⁽²⁾ Diversas estratégias têm sido propostas para aumentar o número de doadores efetivos, incluindo campanhas

públicas pró-doação, uso de doadores após parada circulatória, uso de doadores vivos, técnicas de perfusão pulmonar *ex vivo* e terapias celulares.⁽³⁻⁵⁾

A rejeição aguda do enxerto é comum após o transplante pulmonar e ocorre na metade dos receptores de transplante pulmonar após o transplante⁽⁶⁾ através de mecanismos tais como inflamação e edema pulmonar.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) têm sido estudadas como terapia celular para uma variedade de

Endereço para correspondência:

Paulo Manuel Pêgo-Fernandes. Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Av. Enéas Carvalho Aguiar, 44 – Bloco 01 Sala 25 Cerqueira César – Subsolo, Cep: 05403-000, São Paulo, SP, Brasil.
Telefone: +55 11 2661-5039/2661-5922. E-mail: paulopego@incor.usp.br
Apoio Financeiro: Nenhum.

doenças degenerativas e distúrbios imunológicos e inflamatórios.^(7,8) Estudos com animais mostraram que as CTMs induzem a reparação de órgãos lesionados, diminuem a inflamação e têm uma ação imunomoduladora com efeitos protetores sobre as células através da liberação de fatores solúveis (FS-CTM) como citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento.⁽⁹⁾ Nossa hipótese é que o tratamento de doadores de pulmão com CTMs pode reduzir a inflamação do enxerto. Considerando sua natureza como produto final e ação imediata, os FS-CTM poderiam ser a alternativa para contribuir para um aumento no número de pulmões viáveis para transplante.

Este estudo enfoca o impacto do tratamento *in vivo* com CTMs e FS-CTM sobre a inflamação pulmonar em um modelo de doador de pulmão em ratos após choque hemorrágico.

MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética [Protocolo de pesquisa n.º 188/14]. Todos os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, fornecido pelo Institute of Laboratory Animal Research e publicado pela National Academies Press, 8ª Edição, 2011.

Incluímos neste estudo 48 ratos machos adultos da linhagem Sprague Dawley com peso entre 250-350 g, que foram atribuídos aleatoriamente aos seguintes grupos experimentais: Controle (n=12) – animais submetidos a cateterização vascular sem indução de choque e tratamento; Choque (n=12) – animais submetidos a cateterização vascular, indução de choque hemorrágico e tratados com reposição de 25% do volume de sangue previamente extraído; CTM (n=12) – animais submetidos a cateterização vascular, indução de choque hemorrágico através da extração de sangue e tratamento com reposição de 25% do volume de sangue previamente extraído, seguido de infusão de CTMs via veia femoral; FS (n=12) – animais submetidos a cateterização vascular, indução de choque hemorrágico e tratamento com reposição de 25% do volume de sangue extraído, seguido de infusão de FS-CTM via veia femoral.

Protocolo experimental

Os animais foram anestesiados com isoflurano a 5% em uma câmara de acrílico, pesados e imobilizados em uma mesa de preparação. Realizamos uma intubação orotraqueal usando um tubo adequado para animais de pequeno porte e iniciamos a ventilação mecânica usando um ventilador igualmente apropriado para animais pequenos (Harvard Apparatus, Modelo 683), com um volume corrente de 10 ml/kg e uma frequência de 80 ciclos por minuto. A anestesia foi mantida com o próprio isoflurano.

Todos os animais anestesiados foram dispostos sobre a mesa de operação. Realizada a depilação da região femoral direita, fizemos uma incisão seguida de dissecação dos vasos e canulação da artéria e veia femoral direita usando cateteres Tygon de longa permanência (Critchley, Austrália) com solução salina e heparina. Para a inserção dos cateteres na artéria e veia femoral, utilizamos um microscópio estereoscópico binocular com ampliação de 4,5X (Olympus, modelo SZ6145). O cateter da artéria femoral direita foi conectado a um monitor (Dixtal, DX2021, Brasil) para registrar a pressão arterial média (PAM). O cateter da veia femoral direita foi usado para induzir e manter o choque hemorrágico através da extração de sangue, além da reinfusão do sangue e administração de CTMs e FS-CTM.

O choque hemorrágico foi induzido pela extração de sangue da veia femoral direita com alíquotas sucessivas até que a PAM chegasse a 40 mmHg nos primeiros 10 minutos do experimento, como descrito por Nepomuceno et al.⁽¹⁰⁾ Os ratos permaneceram em choque hemorrágico por 50 minutos, seja pela extração ou pela reinfusão do sangue em caso de alteração da PAM (± 5 mmHg).

O grupo Controle foi monitorado durante todo o período experimental. Após o choque hemorrágico, os grupos CTM, FS e Choque foram submetidos a tratamento com reinfusão de 25% do sangue extraído. O grupo CTM recebeu infusão de CTMs a uma concentração de 1×10^7 células em 1 ml de meio de cultura durante um período de 5 minutos. O grupo FS recebeu infusão de fatores solúveis em 1 ml de meio durante um período de 5 minutos. A PAM foi observada durante um período de 115 minutos (Figura 1).

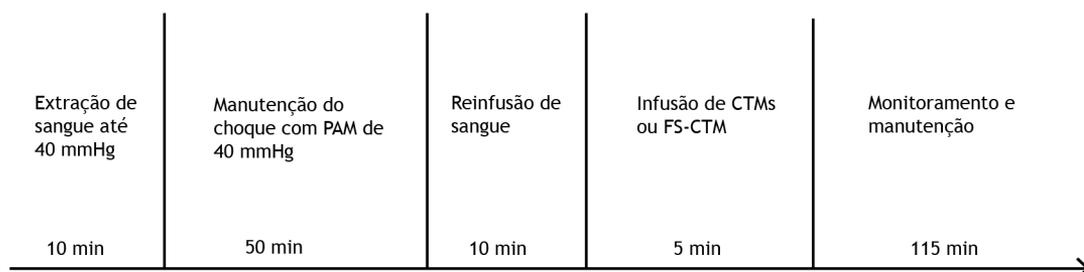


Figura 1. Linha do tempo do procedimento experimental.

Extração e preservação dos pulmões

No final do experimento, realizamos a extração pulmonar através de uma laparotomia estendida em sentido cranial com ressecção do esterno e abertura radial do diafragma. O coração foi exposto e uma ventriculotomia direita foi realizada adjacente à artéria pulmonar. A veia cava inferior foi cortada e o ventrículo esquerdo foi seccionado longitudinalmente na ponta. A perfusão pulmonar anterógrada foi realizada com solução de preservação (Perfadex®, Vitrolife Göteborg, Suécia) usando uma cânula introduzida na artéria pulmonar através da ventriculotomia direita. A solução de preservação foi administrada por gravidade a partir de um reservatório posicionado 20 cm acima do coração com drenagem espontânea do efluente através da ventriculotomia esquerda. Terminada a infusão, a traqueia foi ligada com sutura abaixo da cânula e procedeu-se à extração pulmonar.

Isolamento e cultura de células-tronco mesenquimais

Realizamos o isolamento e a cultura de CTMs de tecido adiposo de acordo com protocolos descritos na literatura pelo Centro de Pesquisa do Genoma Humano e Células-Tronco (HUG-CEL) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).⁽¹¹⁾ As células foram armazenadas a uma concentração de 1×10^7 células em 1 ml do meio de cultura a ser aplicado como uma dose única em bolus. Esta concentração foi determinada em estudos anteriores do HUG-CEL da FMUSP.⁽¹²⁾ Cultivamos as CTMs em meio sem soro (T225 a 80% de confluência) para obter os FS-CTM. Posteriormente, elas foram enxaguadas três vezes com 36 ml de PBS e cultivadas em 36 ml de meio de cultura DMEM/F12 sem soro ou antibióticos. Em seguida, incubamos as células durante oito horas, realizando em seguida três enxágues com 36 ml de PBS e adicionando subsequentemente 36 ml de DMEM/F12 sem soro ou antibióticos. Uma nova incubação foi realizada por 20 horas. Em seguida, realizamos a coleta do meio, contagem de células e centrifugação a $300 \times g$ durante 5 minutos para remover os detritos. O sobrenadante foi coletado e o meio condicionado foi armazenado para uso. Os FS-CTM foram armazenados no meio a um volume de 1 ml para uso como dose única em bolus em cada animal do grupo indicado. A densidade celular inicial, concentração de proteínas e distribuição de tamanho das partículas não foram avaliadas porque estudos anteriores do HUG-CEL da FMUSP já haviam descrito estas características.⁽¹³⁾

Análise histológica

Os lobos superiores dos pulmões direitos foram imersos em formalina tamponada a 10% para fixação. Após 24 horas, blocos de parafina foram preparados com as amostras, cortados em seções de 5 µm e corados com hematoxilina-eosina. As análises foram realizadas em duplicata por dois pesquisadores treinados cegos aos grupos de estudo. As lâminas foram analisadas utilizando um microscópio Olympus CX22LED com um

retículo de pontos e retas. Para cada lâmina, avaliamos 15 campos de maior aumento do retículo contando os pontos que tocaram as áreas do parênquima pulmonar, assim como a contagem total de neutrófilos. Foi possível estimar a área parenquimatosa de cada animal examinado através da área do retículo pré-determinada, e a razão entre a contagem de neutrófilos e a área do parênquima forneceu a densidade de neutrófilos por micrômetro quadrado (μm^2) de tecido pulmonar. Os valores foram então convertidos para centímetros quadrados (cm^2) a fim de facilitar os cálculos.

Quantificação de leucócitos no sangue periférico

Amostras de sangue periférico (20 µl) foram coletadas da cauda dos ratos no início do protocolo imediatamente antes da indução do choque hemorrágico, bem como no final, pouco antes da extração pulmonar. Estas amostras foram analisadas através da contagem total de neutrófilos na câmara de Neubauer.

Análise de citocinas no tecido pulmonar

Preparamos a proteína total dos tecidos dos animais adicionando tampão de lise RIPA (RIPA Lysis Buffer, 10x - MERK#20-188) a uma proporção de 0,4 ml por 0,1 g de tecido. Um total de 10 µl de mistura de inibidores de protease (Protease Inhibitor Cocktail Set I - MERK#53131) foi adicionado para cada 1 ml do tampão RIPA diluído. A mistura foi então homogeneizada em gelo usando um homogeneizador (Fisherbrand™ Pellet Pestles™) e o homogeneizado foi transferido para um tubo de Eppendorf de 2 ml. Incubamos o material em gelo por 10 minutos e centrifugamos a $10.000 \times g$ a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de Eppendorf. As proteínas totais foram quantificadas em cada amostra e normalizadas ao valor obtido no ensaio (Kit BCA protein assay MERK #71285).

Em seguida, enviamos o material para análise multiplex das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 de acordo com a metodologia xMap (Luminex™ xMAP - Kit Cat. #RECYTMAG-65K-04 (IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α), Millipore, St. Charles, MO, EUA).

Análise estatística

Realizamos análises descritivas de dados quantitativos, médias e respectivos desvios padrão (DP). Os dados sem distribuição normal são apresentados utilizando medianas e faixas interquartis IQ (25-75%). As suposições da distribuição normal em cada grupo e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliadas usando o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene, respectivamente.

Para a análise de dois fatores (Grupo e Tempo), aplicamos uma ANOVA de medidas repetidas de duas vias para um único fator (Tempo), enquanto a ANOVA foi usada para avaliar as variáveis normalmente distribuídas. Nos casos em que foi necessário realizar comparações múltiplas de médias, utilizamos o teste de Bonferroni.

Aplicamos o teste Kruskal-Wallis para variáveis não distribuídas normalmente e o teste de Dunn quando comparações múltiplas foram necessárias. Todas as análises inferenciais consideraram um α de 0,05. As análises estatísticas descritivas e inferenciais foram realizadas no software SPSS versão 21 (SPSS 21.0 para Windows).

RESULTADOS

Os grupos Choque, FS e CTM foram submetidos a choque hemorrágico de 0 a 10 minutos, apresentando uma diminuição da PAM, como esperado ($p < 0,001$). Durante o período de manutenção do choque hemorrágico (10 a 60 minutos), estes grupos permaneceram com PAM mais baixa do que a do grupo Controle, e suas médias permaneceram próximas às do delineamento do estudo. Após a substituição do sangue (70 minutos), a pressão arterial dos grupos Choque, FS e CTM subiu. Entretanto, os valores de pressão permaneceram mais baixos em comparação aos do grupo Controle ($p < 0,05$) e não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,10$) (Figura 2).

Os grupos submetidos ao choque hemorrágico, com ou sem tratamento, apresentaram mais leucócitos periféricos no final do experimento em relação aos dados da linha de base ($p < 0,001$). O mesmo aumento não foi observado entre a linha de base e os dados finais do grupo Controle ($p = 0,805$), como mostra a Figura 3a.

Não houve diferença estatisticamente significativa da contagem inicial de leucócitos entre os diferentes grupos do estudo e o grupo Controle, como esperado ($p = 0,33$). Entretanto, observou-se um aumento significativo de leucócitos circulantes após o choque hemorrágico nos grupos Choque, FS e CTM em comparação com o grupo Controle ($p = 0,002$) (Figura 3b).

A histologia pulmonar mostrou uma diferença estatisticamente significativa na densidade de neutrófilos entre os grupos ($p < 0,001$). O grupo CTM apresentou a maior densidade de neutrófilos ($180,77$ neutrófilos/ cm^2) entre todos os grupos, ao passo que o grupo FS apresentou a menor densidade dessas células ($40,38$ neutrófilos/ cm^2) (Figura 4).

Comparando os grupos Choque e FS, observamos uma diferença significativa entre suas densidades de neutrófilos ($172,52$ neutrófilos/ cm^2 e $40,38$ neutrófilos/ cm^2 , respectivamente, $p < 0,001$). Por outro lado, diferenças significativas não foram observadas entre os grupos Choque e CTM.

As análises de citocinas no tecido pulmonar não mostraram diferença significativa nas comparações dos grupos quanto a TNF- α ($p = 0,21$), IL-6 ($p = 0,21$), IL-1 β ($p = 0,58$).

DISCUSSÃO

No âmbito do transplante pulmonar, a escassez de doadores de pulmão é um dos principais obstáculos e provoca o acúmulo de pacientes nas listas de espera.

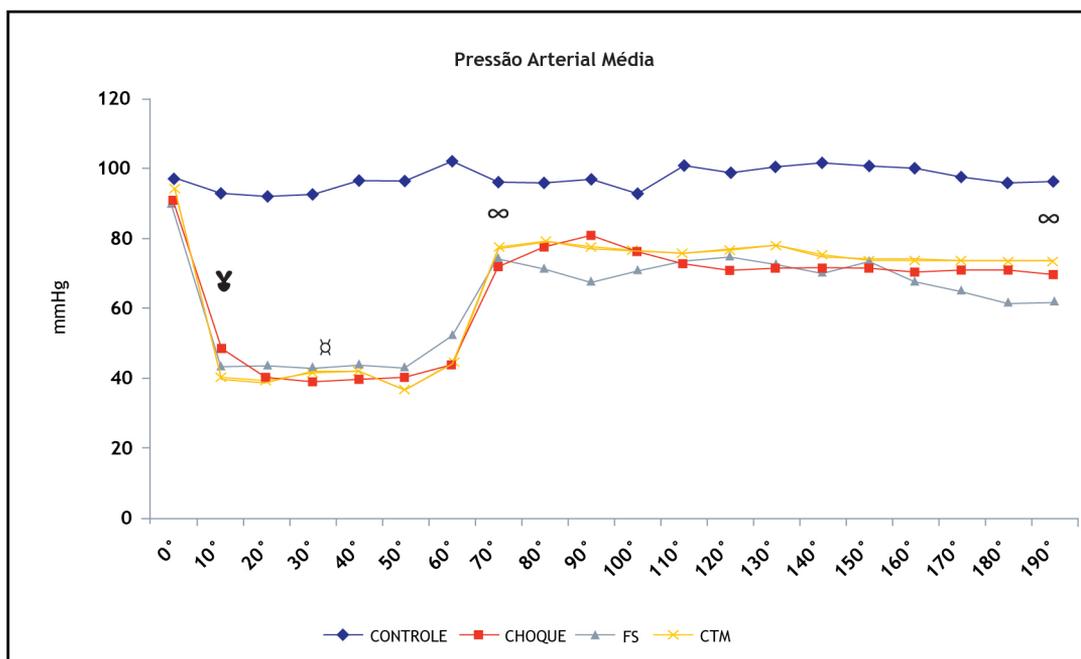


Figura 2. Pressão arterial média *in vivo*. Uma diferença estatisticamente significativa foi observada nos grupos submetidos a choque hemorrágico (Choque, FS e CTM) em comparação com a linha de base ($\text{¥} p < 0,001$). Durante a manutenção do choque hemorrágico, uma diferença significativa foi observada entre os grupos Choque, FS e CTM em comparação com o grupo Controle ($\text{×} p < 0,001$). Ao fim de 70 minutos e aos 190 minutos, os grupos Choque, FS e CTM apresentaram uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle ($\text{⦿} p < 0,05$).

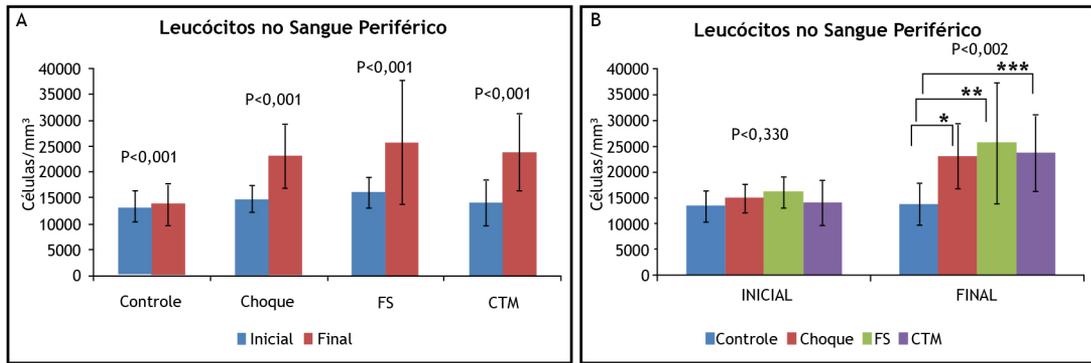


Figura 3. (a) Número de leucócitos no sangue periférico coletados no início e no final do protocolo experimental em cada grupo que apresentaram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos Choque, FS e CTM ($p < 0,001$). O grupo Controle não apresentou diferença entre as dosagens ($p = 0,805$); **(b)** Figura comparando a quantificação dos leucócitos no sangue periférico nos grupos do estudo no momento inicial e final dos experimentos. Não houve diferença significativa na linha de base entre os grupos ($p = 0,33$), ao contrário do observado no final dos experimentos entre os grupos ($p = 0,002$). Encontrou-se uma diferença nas comparações múltiplas entre os grupos Controle vs. Choque ($*p = 0,02$), Controle vs. FS ($**p = 0,006$) e Controle vs. CTM ($***p = 0,01$).

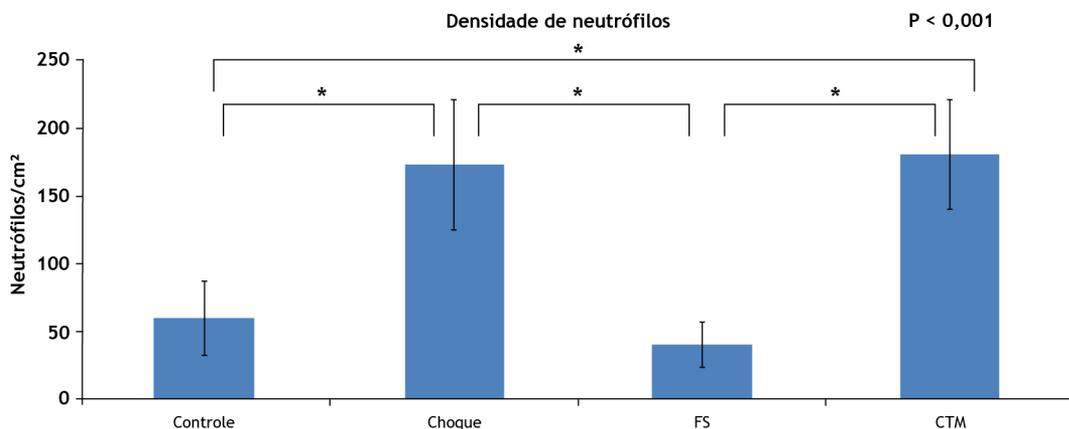


Figura 4. Gráfico comparativo do infiltrado neutrófilico dos grupos, medido como densidade de neutrófilos. Houve uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). Nas comparações múltiplas, uma diferença significativa foi observada na comparação entre os grupos Controle vs. Choque ($*p < 0,001$), Controle vs. CTM ($*p < 0,001$), Choque vs. FS ($*p < 0,001$) e FS vs. CTM ($*p < 0,001$).

Devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antifibróticas, as terapias celulares representam atualmente uma nova abordagem terapêutica neste contexto.^(14,15) Estudos pré-clínicos demonstraram melhorias após a administração de CTMs contra várias doenças pulmonares, incluindo doença pulmonar obstrutiva crônica, síndrome do desconforto respiratório agudo e fibrose pulmonar idiopática.⁽¹⁶⁾ Neste estudo, animais foram submetidos a lesão pulmonar por indução de choque hemorrágico e tratados com infusão venosa de CTMs humanas. Os efeitos de proteção pulmonar podem estar relacionados à angiogênese e efeitos anti-inflamatórios.⁽¹⁷⁻²²⁾

Nosso estudo utilizou um modelo de choque hemorrágico controlado previamente descrito na literatura.^(10,23,24) Nossos resultados demonstraram a eficácia da redução e manutenção dos níveis de pressão durante o período de choque nos grupos Choque, CTM e FS. Os níveis de

leucócitos circulantes quantificados antes do choque foram inferiores aos quantificados após o início do choque hemorrágico. Além disso, este modelo de choque mostrou um aumento no infiltrado neutrófilico no pulmão em relação ao grupo Controle. Como esperado, nossos resultados demonstraram que o choque atua como um desencadeador do processo inflamatório. Em contraste, os níveis de TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 no tecido pulmonar não foram significativamente diferentes daqueles encontrados no grupo Controle.

Após a substituição do sangue e intervenção nos grupos de tratamento, monitoramos os ratos por 115 minutos e extraímos o bloco coração-pulmão no final do experimento. Este procedimento tinha como objetivo simular uma situação clínica de recuperação de múltiplos órgãos de um doador após a notificação de morte encefálica. De Oliveira et al.⁽²⁵⁾ relataram uma meia-vida de citocinas inflamatórias com variação

entre 6 minutos e 4 horas. Em um estudo utilizando um modelo de choque hemorrágico em ratos, Pati et al.⁽¹⁷⁾ também coletaram amostras para avaliar citocinas inflamatórias após 2 horas. Em estudos anteriores, os autores identificaram que grandes mudanças nas citocinas inflamatórias ocorreram entre 1 e 4 horas após o choque.⁽²⁶⁾

A concentração de CTMs utilizada em nosso estudo foi de 1×10^7 células diluídas em meio padrão em uma única dose. A concentração de células usadas em terapia celular com CTMs ainda é uma questão controversa e não há consenso entre as publicações sobre o assunto. Outros estudos mostraram um efeito positivo em concentrações de $2,5 \times 10^5$ a 9×10^7 , embora melhores resultados não estivessem necessariamente relacionados a uma maior concentração de células.⁽²⁷⁻³⁰⁾ Watanabe et al.⁽¹⁹⁾ usaram uma concentração de 5×10^6 células para tratar isquemia e lesão de reperfusão em um modelo de transplante pulmonar em ratos. Outros autores também utilizaram a mesma concentração de células em terapias respiratórias.^(31,32) Sendo assim, a concentração ideal de CTMs ainda não é estabelecida.

A via de administração intravenosa está bem estabelecida na literatura e vários estudos demonstraram que o pulmão atua como um órgão "filtro" responsável pela retenção da maioria das células infundidas devido ao diâmetro reduzido da rede pulmonar de capilares em relação ao tamanho das células-tronco. A via endobrônquica também é eficaz e pode ser uma boa opção para um tipo de estudo como o presente.⁽³³⁻³⁵⁾ Um estudo recente comparou a via intravenosa à intrabrônquica e mostrou uma vantagem associada à retenção significativa de CTMs pela via intravenosa em pulmões lesionados submetidos a perfusão *ex vivo*.⁽³⁶⁾ Outros estudos também mostraram que a infusão de CTMs é segura e bem tolerada e não provocou eventos adversos significativos.⁽³⁷⁾

Embora o choque hemorrágico promova o aumento de infiltrado neutrofílico nos pulmões, o tratamento com CTMs não demonstrou eficácia na inibição desse efeito. No entanto, observamos que o grupo FS não apresentou infiltrado neutrofílico no pulmão, o que interpretamos como resultado do curto período de observação, que foi insuficiente para as células mesenquimais se estabelecerem nos pulmões e liberarem os fatores solúveis.

Os mecanismos de ação das CTMs e suas ações imunomoduladoras não são totalmente conhecidas. As CTMs parecem exercer seus efeitos através de múltiplos mecanismos – alguns dependem de interações celulares, enquanto outros dependem de interações parácrinas, que resultam tanto de produtos solúveis secretados quanto de microvesículas ou exossomos derivados de células. Pati et al.⁽¹⁷⁾ utilizaram um modelo de choque hemorrágico semelhante ao do nosso estudo e trataram os animais com solução de ringer com lactato combinada com CTMs. Entretanto, o período pós-tratamento foi muito mais longo do que o nosso, e os animais foram avaliados 96 horas após o tratamento. Os autores observaram que o tratamento

com CTMs reduziu a expressão do CD8+, um marcador específico de neutrófilos. Chimenti et al.⁽³⁸⁾ também demonstraram o potencial do pré-tratamento com CTMs seguido de ventilação a alto volume. O pré-tratamento com CTMs reduziu o conteúdo de fluido nos pulmões e melhorou o escore da histologia pulmonar. Os níveis de neutrófilos, proteína inflamatória de macrófagos-2 e IL-1 β também reduziram consideravelmente. O tratamento *ex vivo* de suínos com CTMs também não mostrou nenhuma alteração no nível de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-10.⁽³⁶⁾ Estratégias para aumentar ainda mais a eficácia das CTMs, como a superexpressão de moléculas anti-inflamatórias ou pró-reparo, também foram investigadas.⁽³⁹⁾

A titulação de citocinas inflamatórias no tecido usado em nosso estudo não foi significativamente diferente. Pati et al.⁽¹⁷⁾ obtiveram resultados semelhantes e não encontraram diferenças significativas com este tipo de análise.

Fatores que poderiam justificar a presença de infiltrado inflamatório significativo no sangue periférico e redução do infiltrado neutrofílico no tecido pulmonar, como observado em nosso estudo, podem ser encontrados em um estudo de Stone et al.,⁽⁴⁰⁾ que descobriram que a migração transendotelial de neutrófilos para células endoteliais pulmonares pode ser efetivamente bloqueada pelos FS-CTM, protegendo a integridade da barreira endotelial contra edema.

Nosso estudo tem limitações. Fatores como a ausência de literatura focada na quantidade ideal de células necessárias, assim como o tempo ideal de observação após a infusão de CTMs e FS-CTM, podem ter influenciado os resultados. O tempo mínimo de monitoramento dos animais e os períodos prolongados de manutenção do choque hemorrágico resultaram em alta mortalidade.

Com base no valor da densidade neutrofílica encontrada no pulmão, concluímos que a infusão de FS-CTM pode reduzir os níveis de inflamação local nos pulmões de ratos com choque hemorrágico. Acreditamos que essa poderia ser uma opção melhor do que as CTMs devido à sua ação imediata, o que demanda menos tempo de tratamento e impede que o processo de inflamação continue evoluindo.

É essencial realizar mais estudos para alcançar um melhor entendimento sobre a ação, cinética e dinâmica das CTMs e sobre como utilizá-las. O tempo de exposição a essas células pode ser um fator determinante neste âmbito. A terapia celular com CTMs e FS-CTM é um campo promissor no transplante pulmonar e tem o potencial de contribuir para a melhoria dos resultados desse procedimento através da melhoria do status do doador e da redução da rejeição pós-transplante.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

VLD é o autor principal e participou de todas as fases do projeto. KAOB participou de todas as fases do projeto, contribuiu substancialmente com o manuscrito, leu e aprovou a versão final do manuscrito. NAN participou de

todas as fases do projeto e contribuiu substancialmente com o manuscrito. LMR participou de todas as fases do projeto. O JDRP contribuiu com algumas fases do projeto. ATC foi responsável por todas as análises estatísticas e confeccionou as Figuras para o projeto. LCCJ foi responsável pelo cultivo e fornecimento das células-tronco mesenquimais e seus fatores solúveis. EG foi responsável pelo cultivo e fornecimento de

células-tronco mesenquimais e seus fatores solúveis e escreveu a metodologia relacionada às células-tronco mesenquimais. MZ foi responsável pelo cultivo e fornecimento de células-tronco mesenquimais e seus fatores solúveis e escreveu a metodologia relacionada às células-tronco mesenquimais. PMPF foi o principal orientador do estudo e leu e aprovou a versão final do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- Yusen RD, Edwards LB, Dipchand AI, Goldfarb SB, Kucheryavaya AY, Levvey BJ, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: thirty-third adult lung and heart-lung transplant report-2016; focus theme: primary diagnostic indications for transplant. *J Heart Lung Transplant.* 2016;35(10):1170-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2016.09.001>. PMID:27772669.
- Skogeland U, de Monestrol I, Godskenes TE. Experiences of individuals awaiting lung transplantation. *Respir Care.* 2018;63(12):1535-40. <http://dx.doi.org/10.4187/respcare.06401>. PMID:30467225.
- Del Sorbo L, Parotto M, Slutsky AS. Increasing the number of lungs available for transplantation. *Minerva Anestesiol.* 2014;80(8):942-53. PMID:24280815.
- Cypel M, Yeung JC, Keshavjee S. Novel approaches to expanding the lung donor pool: donation after cardiac death and *ex vivo* conditioning. *Clin Chest Med.* 2011;32(2):233-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2011.02.003>. PMID:21511086.
- Mariani AW, Pêgo-Fernandes PM, Abdalla LG, Jatene FB. Recondicionamento pulmonar *ex vivo*: uma nova era para o transplante pulmonar. *J Bras Pneumol.* 2012;38(6):776-85. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132012000600015>. PMID:23288125.
- Royer PJ, Olivera-Botello G, Koutsokera A, Aubert JD, Bernasconi E, Tissot A, et al. Chronic lung allograft dysfunction: a systematic review of mechanisms. *Transplantation.* 2016;100(9):1803-14. <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0000000000001215>. PMID:27257997.
- Lee CY, Kang JY, Lim S, Ham O, Chang W, Jang DH. Hypoxic conditioned medium from mesenchymal stem cells promotes lymphangiogenesis by regulation of mitochondrial-related proteins. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):38. <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-016-0296-1>. PMID:26968383.
- 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. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00297>. PMID:23056000.
- Ionescu L, Byrne RN, van Haaften T, Vadivel A, Alphonse RS, Rey-Parra GJ, et al. Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: *in vivo* evidence for stem cell paracrine action. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;303(11):L967-77. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00144.2011>. PMID:23023971.
- Nepomuceno NA, de Oliveira-Braga KA, Ruiz LM, Correia AT, Silva Pato EZ, da Silva LF, et al. Effect of hypertonic saline in the pretreatment of lung donors with hemorrhagic shock. *J Surg Res.* 2018;225:181-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2017.12.041>. PMID:29605030.
- Assoni AF, Coatti GC, Gomes JPA, Pelatti MV, Zatz M. Adipose-derived mesenchymal stromal cells. In: Ulrich HNP, editor. *Working with stem cells.* Switzerland: Springer International Publishing; 2016. p. 37-55. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-30582-0_3.
- Zucconi E, Vieira NM, Bueno CR Jr, Secco M, Jazedje T, Costa Valadares M, et al. Preclinical studies with umbilical cord mesenchymal stromal cells in different animal models for muscular dystrophy. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:715251. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/715251>. PMID:21785565.
- Assoni A, Coatti G, Valadares MC, Beccari M, Gomes J, Pelatti M, et al. Different donors mesenchymal stromal cells secretomes reveal heterogeneous profile of relevance for therapeutic use. *Stem Cells Dev.* 2017;26(3):206-14. <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2016.0218>. PMID:27762666.
- Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell.* 2013;13(4):392-402. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>. PMID:24094322.
- Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen O, Shou P, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res.* 2010;20(5):510-8. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2010.44>. PMID:20368733.
- Geiger S, Hirsch D, Hermann FG. Cell therapy for lung disease. *Eur Respir Rev.* 2017;26(144):170044. <http://dx.doi.org/10.1183/16000617.0044-2017>. PMID:28659506.
- Pati S, Gerber MH, Menge TD, Wataha KA, Zhao Y, Baumgartner JA, et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells inhibit inflammation and preserve vascular endothelial integrity in the lungs after hemorrhagic shock. *PLoS One.* 2011;6(9):e25171. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025171>. PMID:21980392.
- Huang ZW, Liu N, Li D, Zhang HY, Wang Y, Liu Y, et al. Angiopoietin-1 modified human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Yonsei Med J.* 2017;58(1):206-16. <http://dx.doi.org/10.3349/ymj.2017.58.1.206>. PMID:27873515.
- Watanabe T, Hoshikawa Y, Ishibashi N, Suzuki H, Notsuda H, Watanabe Y, et al. Mesenchymal stem cells attenuate ischemia-reperfusion injury after prolonged cold ischemia in a mouse model of lung transplantation: a preliminary study. *Surg Today.* 2017;47(4):425-31. <http://dx.doi.org/10.1007/s00595-016-1391-8>. PMID:27484066.
- Lee JW, Fang X, Gupta N, Serikov V, Matthey MA. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of *E. coli* endotoxin-induced acute lung injury in the *ex vivo* perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(38):16357-62. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0907996106>. PMID:19721001.
- Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthey MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol.* 2007;179(3):1855-63. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1855>. PMID:17641052.
- Martens A, Ordies S, Vanaudenaerde BM, Verleden SE, Vos R, Van Raemdonck DE, et al. Immunoregulatory effects of multipotent adult progenitor cells in a porcine *ex vivo* lung perfusion model. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):159. <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-017-0603-5>. PMID:28676074.
- Hirano ES, Mantovani M, Morandin RC, Fontelles MJ. Modelo experimental de choque hemorrágico. *Acta Cir Bras.* 2003;18(5):465-70. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502003000500013>.
- Vincenzi R, Cepeda LA, Pirani WM, Sannomyia P, Rocha-E-Silva M, Cruz RJ Jr. Small volume resuscitation with 3% hypertonic saline solution decrease inflammatory response and attenuates end organ damage after controlled hemorrhagic shock. *Am J Surg.* 2009;198(3):407-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjsurg.2009.01.017>. PMID:19520355.
- Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e dor. *Rev Bras Anestesiol.* 2011;61(2):260-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-70942011000200014>.
- Pati S, Khakoo AY, Zhao J, Jimenez F, Gerber MH, Harting M, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit vascular permeability by modulating vascular endothelial cadherin/ β -catenin signaling. *Stem Cells Dev.* 2011;20(1):89-101. <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2010.0013>. PMID:20446815.
- Gore AV, Bible LE, Livingston DH, Mohr AM, Sifri ZC. Mesenchymal stem cells enhance lung recovery after injury, shock, and chronic stress. *Surgery.* 2016;159(5):1430-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2015.12.006>. PMID:26830071.
- Le Blanc K, Frasson F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008;371(9624):1579-86. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60690-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60690-X). PMID:18468541.
- Zhu YG, Feng XM, Abbott J, Fang XH, Hao Q, Monsel A, et al. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of *Escherichia coli* endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Stem Cells.* 2014;32(1):116-25. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.1504>. PMID:23939814.

30. Zhu YG, Hao Q, Monsel A, Feng XM, Lee JW. Adult stem cells for acute lung injury: remaining questions and concerns. *Respirology*. 2013;18(5):744-56. <http://dx.doi.org/10.1111/resp.12093>. PMID:23578018.
31. McAuley DF, Curley GF, Hamid UI, Laffey JG, Abbott J, McKenna DH, et al. Clinical grade allogeneic human mesenchymal stem cells restore alveolar fluid clearance in human lungs rejected for transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;306(9):L809-15. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00358.2013>. PMID:24532289.
32. Chambers DC, Enever D, Lawrence S, Sturm MJ, Herrmann R, Yerkovich S, et al. Mesenchymal stromal cell therapy for chronic lung allograft dysfunction: results of a first-in-man study. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(4):1152-7. <http://dx.doi.org/10.1002/sctm.16-0372>. PMID:28186707.
33. Cardenes N, Aranda-Valderrama P, Carney JP, Sellares Torres J, Alvarez D, Kocydirim E, et al. Cell therapy for ARDS: efficacy of endobronchial versus intravenous administration and biodistribution of MAPCs in a large animal model. *BMJ Open Respir Res*. 2019;6(1):e000308. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjresp-2018-000308>. PMID:30713713.
34. Elhami E, Dietz B, Xiang B, Deng J, Wang F, Chi C, et al. Assessment of three techniques for delivering stem cells to the heart using PET and MR imaging. *EJNMMI Res*. 2013;3(1):72. <http://dx.doi.org/10.1186/2191-219X-3-72>. PMID:24165377.
35. Elhami E, Goertzen AL, Xiang B, Deng J, Stillwell C, Mzengeza S, et al. Viability and proliferation potential of adipose-derived stem cells following labeling with a positron-emitting radiotracer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011;38(7):1323-34. <http://dx.doi.org/10.1007/s00259-011-1753-9>. PMID:21380591.
36. Mordant P, Nakajima D, Kalaf R, Iskender I, Maahs L, Behrens P, et al. Mesenchymal stem cell treatment is associated with decreased perfusate concentration of interleukin-8 during *ex vivo* perfusion of donor lungs after 18-hour preservation. *J Heart Lung Transplant*. 2016;35(10):1245-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2016.04.017>. PMID:27444694.
37. Keller CA, Gonwa TA, Hodge DO, Hei DJ, Centanni JM, Zubair AC. Feasibility, safety, and tolerance of mesenchymal stem cell therapy for obstructive chronic lung allograft dysfunction. *Stem Cells Transl Med*. 2018;7(2):161-7. <http://dx.doi.org/10.1002/sctm.17-0198>. PMID:29322685.
38. Chimenti L, Luque T, Bonsignore MR, Ramirez J, Navajas D, Farre R. Pre-treatment with mesenchymal stem cells reduces ventilator-induced lung injury. *Eur Respir J*. 2012;40(4):939-48. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00153211>. PMID:22441745.
39. Horie S, Laffey JG. Recent insights: mesenchymal stromal/stem cell therapy for acute respiratory distress syndrome. *F1000Res*. 2016;5:F1000. <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.8217.1>. PMID:27408702.
40. Stone ML, Zhao Y, Robert Smith J, Weiss ML, Kron IL, Laubach VE, et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate lung ischemia-reperfusion injury and enhance reconditioning of donor lungs after circulatory death. *Respir Res*. 2017;18(1):212. <http://dx.doi.org/10.1186/s12931-017-0704-9>. PMID:29268735.