

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFEITOS DO TRATAMENTO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
ADMINISTRADAS PELAS VIAS INTRAPERITONEAL E INTRAVENOSA EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE AGUDA

Alessandra Bileski Magrisso

PORTO ALEGRE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFEITOS DO TRATAMENTO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
ADMINISTRADAS PELAS VIAS INTRAPERITONEAL E INTRAVENOSA EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE AGUDA

Autora: Alessandra Bileski Magrisso

Dissertação apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Veterinárias na área de Medicina Veterinária  
Preventiva e Patologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Obino Cirne-Lima

PORTO ALEGRE

2013

### CIP - Catalogação na Publicação

BILESKI MAGRISSO, ALESSANDRA  
EFEITOS DO TRATAMENTO COM CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS ADMINISTRADAS PELAS VIAS  
INTRAPERITONEAL E INTRAVENOSA EM MODELO EXPERIMENTAL  
DE SEPSE AGUDA / ALESSANDRA BILESKI MAGRISSO. --  
2013.  
96 f.

Orientadora: ELIZABETH OBINO CIRNE-LIMA.

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

1. SEPSE. 2. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS. 3. VIAS  
DE ADMINISTRAÇÃO. 4. TECIDO ADIPOSEO. 5. TERAPIA  
CELULAR. I. OBINO CIRNE-LIMA, ELIZABETH, orient. II.  
Título.

Alessandra Bileski Magrisso

EFEITOS DO TRATAMENTO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
ADMINISTRADAS PELAS VIAS INTRAPERITONEAL E INTRAVENOSA EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE AGUDA

APROVADO POR

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. ELIZABETH OBINO CIRNE-LIMA

Orientadora e Presidente da Comissão

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. MELISSA GUERRA SIMÕES PIRES

Membro da Comissão (PUCRS)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. ANA HELENA DA ROSA PAZ

Membro da Comissão (UFRGS)

---

Prof. Dr. EMERSON ANTONIO CONTESINI

Membro da Comissão (UFRGS)

## **DEDICATÓRIA**

Inicialmente, dedico este trabalho à minha grande amiga Kiyoko Uemura, por ter sido a maior incentivadora e a primeira a me direcionar para esta incrível experiência.

Ao meu noivo, Rogério Gitz, pela paciência e compreensão em momentos de dúvida e insegurança. Obrigada pelo infinito amor...

Aos meus avós, Israel e Luíza Bileski, pela constante disposição, interesse e aconchegantes almoços semanais, que deram ainda mais significado à rotina de estudos.

Aos meus pais e irmão, pelo apoio, amor e confiança, além da demonstração de orgulho a cada pequeno passo, mesmo sem saber ao certo o destino final desta jornada.

À minha cadela e amiga, Jade, por estar em minha companhia em todas as noites inquietas e por transmitir afeto diário, reforçando o amor e respeito que devemos ter pelos animais.

Dedico, em especial, aos camundongos que participaram deste trabalho, por doar suas vidas involuntariamente para o desenvolvimento da pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha querida orientadora, Elizabeth Obino Cirne-Lima, pela oportunidade, confiança, postura e, principalmente, amizade e amor creditados ao longo destes dois últimos anos. Obrigada por ter me proporcionado esta experiência encantadora.

À minha co-orientadora, Claudia Cilene Fernandes Correia Laurino que, mesmo sem a oficialização de seu papel, teve participação fundamental na execução deste trabalho. Obrigada mil vezes pela atenção, disposição, amizade e por ter existido na minha vida.

Às minhas colegas, amigas e parceiras do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular: Ana Helena da Rosa Paz, Cristiana Kuhl, Fabiany Gonçalves, Fernanda Loss, Isabel Cirne-Lima, Letícia Gal, Melchiani Baggio, Nathalia Schneider e Paula Barros Terraciano. Não tenho como descrever em palavras tudo o que ganhei com a amizade de vocês. Obrigada pelas risadas, cafés, branquinhos, negrinhos, cheesecakes, picolés, almoços, mates, pracinhas, aniversários, happy hours, eventos... Agradeço por transformarem o dia-a-dia em momentos prazerosos e o coleguismo em cumplicidade. Este projeto não teria sido possível sem o auxílio de todas vocês, que se disponibilizaram, sempre, a me ajudar nos experimentos.

Agradeço, em especial, à amiga Cristiana Kuhl, por ter sido meu braço direito na finalização do projeto, pela disposição na efetivação das análises estatísticas, pelos ouvidos e pela amizade dedicada durante todo este tempo, mesmo quando tudo estava complicado também para ela. Amiga, te conhecer foi simplesmente um presente.

À estagiária, Rosana Martins, por ter aparecido cheia de carisma, disposição e vontade. Obrigada por ter se prontificado a imitar meu senso organizacional em benefício da minha sanidade. Agradeço, também, por estar sempre disposta a flexibilizar o horário, manter a calma e a ordem durante meus ataques de nervosismo e estar sempre com o sorriso doce no rosto. Muito obrigada por ter sido minha fiel parceira na principal etapa do projeto.

Às amigas médicas veterinárias: Fabíola Schons Meyer, Karina Magano e Tuane Nerissa Alvez Garcez. Vocês formaram a melhor equipe que eu poderia desejar.

Muito obrigada pelas dicas e colaboração nas longas cirurgias, pelos ensinamentos e por estarem sempre presentes, cuidando dos animais e me direcionando nas etapas práticas do projeto. Agradeço de coração por estarem nos principais momentos comigo e pela qualidade e competência de seu trabalho.

À amiga e colega Bianca Pfaffenseller, pela infinita paciência e efetivação das análises de citometria, com uma ternura e capacidade infinitas.

Às equipes dos laboratórios colaboradores do HCPA. Agradeço a permissão, disponibilidade e boa vontade com os pesquisadores.

À enfermeira Marta Justina Giotti Cioato, pela organização e cuidados com meus animais. Obrigada por ter sempre solucionado meus dilemas.

À Profa. Dra. Luise Meurer, pelas análises histológicas e tentativas de encontrar sempre um momento em sua agenda para me atender, quando nada fazia sentido para mim.

Às queridas Priscila Lora e Patricia Oliveira, pelas palavras, pensamentos e compartilhamento de idéias. Obrigada pelo apoio e solução de problemas práticos que me deparei em diversos momentos.

Aos colegas Everaldo e Roger, cruciais para agilizar os processos burocráticos e administrativos dos projetos de pesquisa.

À UFRGS e ao PPGCV, pela oportunidade de ensino e aprendizado.

Às minhas amigas da outra parte da minha vida: Cristiane Verçoza, Fabiane Chaves, Gabriela Cipriani, Julie Ferzola, Letícia Ignácio e Tanize Rosa, que estiveram presentes com sua amizade incondicional, compreendendo minhas eventuais ausências, angústias e sempre presentes para me lembrar que amigas como vocês, não se encontram todos os dias. Obrigada, queridas amigas, por estarem sempre no meu caminho, seja ele qual for.

À todos que, de alguma forma, tornaram este momento possível.

Muito obrigada!

## RESUMO

Muito se tem investido em pesquisa na compreensão dos processos e fenômenos envolvidos nas respostas imunes às infecções e, principalmente, no desenvolvimento de recursos e tecnologias a fim favorecer os avanços no tratamento da sepse. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos anti-inflamatórios das células-tronco mesenquimais (MSCs) quando administradas por duas diferentes vias: intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV), determinando qual a melhor via de tratamento, em modelo experimental murino de sepse. Foram utilizados 31 camundongos da linhagem C57Bl/6 para padronização do modelo de Ligadura e Perfuração do Ceco (CLP). Após os experimentos de estabelecimento do modelo, outros 60 animais foram distribuídos em nove grupos: grupo CONTROLE, grupo sepse sem tratamento (SEPSE), grupo SHAM, grupo sepse com administração de PBS via IV (SEPSE PBS IV), grupo sham com administração de PBS via IV (SHAM PBS IV), grupo sham com administração de MSCs via IV (SHAM MSC IV), grupo sham com administração de MSCs via IP (SHAM MSC IP), grupo sepse com administração de MSCs via IP (SEPSE MSC IP) e grupo sepse com administração de MSCs via IV (SEPSE MSC IV). Transcorridas 6 horas da indução da sepse pelo modelo CLP, padronizado com oclusão total do ceco seguida de uma única punctura com agulha 18G, os animais receberam o tratamento de acordo com o grupo que compunham. Após 24 horas do procedimento cirúrgico, procedeu-se a eutanásia dos animais para coleta dos órgãos, sangue e fluidos peritoneais. As amostras foram analisadas quanto aos parâmetros histológicos, hematológicos e inflamatórios, respectivamente. Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que: 1) O modelo CLP padronizado com oclusão total do ceco e uma punctura com agulha 18G induziu sepse aguda nos animais; 2) A administração das MSCs via IP foi atenuadamente mais eficaz na redução da concentração de leucócitos hematológicos e no quadro de trombocitopenia instalado nos animais com sepse induzida; 3) A injeção IP das MSCs diminuiu, com maior eficiência, a infiltração de células inflamatórias na região abdominal dos animais doentes. 4) As citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 obtiveram queda de suas concentrações séricas com a terapia nos animais dos grupos submetidos à indução da sepse. 5) O tratamento com MSCs melhorou o grau de peritonite, necrose e ulcerações observadas na histologia do ceco dos animais, com melhores resultados encontrados no grupo SEPSE MSC IP.

**Palavras-chave:** sepse, terapia celular, imunomodulação, vias de administração.

## **ABSTRACT**

*Much has been invested on research regarding comprehension of the processes and phenomena that are involved in immune responses to infections and mainly on resources and technologies development in order to support advances in the treatment of sepsis. This study has been performed in order to evaluate the anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells (MSCs) when administered by two different routes: intraperitoneal (IP) and intravenous (IV), to determine which is the best treatment route, in an experimental murine model of sepsis. Thirty-one C57Bl/6 strain mice have been used to standardize the Cecal Ligation and Perforation (CLP) model. After the establishment of CLP, 60 animals were allocated into nine groups: CONTROL group, sepsis group without treatment (SEPSE), SHAM group, sepsis group with intravenously administration of PBS (SEPSE PBS IV), sham group with intravenously administration of PBS (SHAM PBS IV), sham group with intravenously administration of MSCs (SHAM MSC IV), sham group with intraperitoneal administration of MSCs (SHAM MSC IP), sepsis group with intraperitoneal administration of MSCs (SEPSE MSC IP), and sepsis group with intravenously administration of MSCs (SEPSE MSC IV). 6 hours after the induction of sepsis by CLP model, standardized with total occlusion followed by a single cecal puncture with a 18G needle, the animals received the treatment according to the group they belonged to. 24 hours after the surgical procedure the animals were sacrificed in order to get the organs, blood and peritoneal fluid. The samples were analyzed for histological, haematological and inflammatory parameters, respectively. Basing on the results it was concluded that: 1) The CLP model standardized with total occlusion followed by a single cecal puncture with a 18G needle induced acute sepsis in the animals; 2) The intraperitoneal administration of MSCs was slightly better in reducing the hematological concentration of leukocytes and the installed picture of thrombocytopenia in sepsis groups; 3) the intraperitoneal injection of MSCs decreased, with greater efficiency, the inflammatory cells infiltration in the abdominal cavity of sepsis groups. 4) The IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 cytokines had their serum concentrations decline with therapy, in the groups subjected to induction of sepsis. 5) Treatment with MSCs improved the severity of peritonitis, necrosis and ulceration observed in cecum histology, with better results in the SEPSIS MSC IP group.*

**Keywords:** *sepsis; cellular therapy; immunomodulation; administration routes.*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Resumo esquemático da fisiopatologia da sepse.....	25
FIGURA 2	Mecanismos propostos de imunomodulação das MSCs em resposta ao LPS e citocinas inflamatórias.....	42
FIGURA 3	Modelo CLP estabelecido. ....	51
FIGURA 4	Coleta do baço para realização de cultura bacteriana .....	52
FIGURA 5	Administração da terapia nos animais.....	57
FIGURA 6	Análise de parâmetros hematológicos.....	59
FIGURA 7	Confirmação da indução da sepse por cultura bacteriana do baço, em placa de Petri contendo ágar-sangue.....	62
FIGURA 8	Análise da sobrevivência dos animais submetidos às diferentes técnicas cirúrgicas para indução de sepse aguda .....	63
FIGURA 9	MSCs de camundongo C57Bl/6 GFP <sup>+</sup> .....	64
FIGURA 10	Caracterização das MSCs.....	65

FIGURA 11	Contagem hematológica de leucócitos (WBC).....	66
FIGURA 12	Contagem hematológica de plaquetas (PLT) .....	67
FIGURA 13	Análise dos leucócitos (WBC) no lavado peritoneal .....	68
FIGURA 14	Análise sérica da citocina anti-inflamatória IL-10.....	69
FIGURA 15	Análise sérica da citocina pró-inflamatória IL-6 .....	70
FIGURA 16	Análise sérica da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ .....	71
FIGURA 17	Análise histológica dos cecos dos animais .....	73

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Modelos experimentais de sepse e suas correspondentes vantagens e desvantagens.....	30
TABELA 2	Representação dos grupos experimentais.....	56
TABELA 3	Concentrações séricas das citocinas IL-2, IL-4, IL-17A e IFN- $\gamma$ sem resultado estatístico significativo .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADSC	Célula-tronco Mesenquimal Derivada de Tecido Adiposo
BASES	Brazilian Sepsis Epidemiological Study
BMSC	Célula-tronco Mesenquimal Derivada de Medula Óssea
CASP	Peritonite por <i>stent</i> do Colon Ascendente
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFU-F	Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CLI	Ligação e Incisão do Ceco
CLP	Ligação e Perfuração do Ceco
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CRAMP	Peptídeo Antimicrobiano Relacionado à Catelicidina
DC	Célula Dendrítica
DIC	Coagulação Intravascular Disseminada
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMO	Disfunção de Múltiplos órgãos
DMSO	Dimetilsulfóxido
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos
GRA	Granulócito
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HCT	Hematócrito
HE	Hematoxilina-eosina
HGB	Hemoglobina
HSC	Célula-tronco Hematopoiética
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
iNOS	Sintetase Indutora de Óxido Nítrico
IV	Intravenoso
LPS	Lipopolissacarídeo
LYM	Linfócito
MO	Medula óssea
MON	Monócito
MSC	Célula-tronco Mesenquimal
NF-kB	Fator Nuclear de Transcrição Kappa B
NK	Célula Natural <i>killer</i>
NO	Óxido Nítrico
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógenos
PBS	Tampão Fosfato Salina
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PCT	Plaquetócrito
PDW	Distribuição do Volume Plaquetário
PLT	Plaqueta

PS	Penicilina-Streptomicina
RBC	Eritrócito
RDW	Amplitude da Distribuição de Eritrócitos
RES	Sistema Retículo Endotelial
SC	Subcutâneo
SFB	Soro Fetal Bovino
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
TA	Temperatura Ambiente
TLR	Receptor Toll-Like
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
UEA	Unidade de Experimentação Animal
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VCM	Volume Corpuscular Médio
VPM	Volume Plaquetário Médio
WBC	Leucócito

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	20
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	20
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
<b>3.1</b>	<b>A Sepse</b> .....	21
3.1.1	Definição .....	21
3.1.2	Epidemiologia .....	21
3.1.3	Processo inflamatório .....	23
3.1.4	Fisiopatologia .....	24
3.1.5	Tratamento .....	26
<b>3.2</b>	<b>Modelos Animais de Sepse</b> .....	29
3.2.1	CLP .....	32
<b>3.3</b>	<b>O Baço</b> .....	35
<b>3.4</b>	<b>Células-tronco Mesenquimais</b> .....	36
3.4.1	Características Gerais .....	36
3.4.2	Imunomodulação .....	38
3.4.3	Proteína Verde Fluorescente (GFP) .....	40
3.4.4	MSCs e a Sepse .....	41
<b>3.5</b>	<b>Vias de administração</b> .....	45
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	48
<b>4.1</b>	<b>Animais experimentais</b> .....	48
<b>4.2</b>	<b>Procedimento cirúrgico</b> .....	48
4.2.1	Estabelecimento do modelo CLP .....	48
4.2.1.1	CLP com semi-oclusão do ceco .....	48
4.2.1.2	CLP com oclusão total do ceco .....	49
4.2.2	Procedimento anestésico .....	49
4.2.3	Indução da sepse .....	50
4.2.4	Cultura do baço .....	51
<b>4.3</b>	<b>Obtenção das MSCs</b> .....	52
4.3.1	Coleta do tecido adiposo .....	52
4.3.2	Isolamento das MSCs .....	53

4.3.3	Congelamento das MSCs .....	53
4.3.4	Descongelamento das MSCs.....	54
4.3.5	Caracterização das MSCs.....	54
<b>4.4</b>	<b>Procedimentos terapêuticos.....</b>	<b>56</b>
4.4.1	Grupos .....	56
4.4.2	Tratamento .....	57
4.4.2.1	Preparo das MSCs .....	58
<b>4.5</b>	<b>Obtenção e análise das amostras .....</b>	<b>58</b>
4.5.1	Hemograma .....	58
4.5.2	Análise de citocinas.....	59
4.5.3	Contagem de leucócitos peritoneais.....	59
4.5.4	Histologia .....	60
<b>4.6</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>60</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>Modelo experimental .....</b>	<b>62</b>
5.1.1	Anestesia e pós-operatório .....	62
5.1.2	Confirmação da indução da sepse .....	62
5.1.3	Sobrevida .....	63
<b>5.2</b>	<b>Mortalidade .....</b>	<b>63</b>
<b>5.3</b>	<b>Cultivo das MSCs.....</b>	<b>64</b>
<b>5.4</b>	<b>Caracterização das MSCs.....</b>	<b>64</b>
<b>5.5</b>	<b>Parâmetros hematológicos.....</b>	<b>65</b>
5.5.1	Contagem de leucócitos .....	65
5.5.2	Contagem de plaquetas .....	66
<b>5.6</b>	<b>Lavado peritoneal .....</b>	<b>67</b>
5.6.1	Contagem de leucócitos .....	67
<b>5.7</b>	<b>Parâmetros anti e pró-inflamatórios .....</b>	<b>68</b>
5.7.1	Quantificação sérica de IL-10 .....	68
5.7.2	Quantificação sérica de IL-6 .....	69
5.7.3	Quantificação sérica de TNF- $\alpha$ .....	70
5.7.4	Dosagem sérica de outras citocinas.....	71
<b>5.8</b>	<b>Análise histológica.....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87
<b>ANEXO</b> – Carta de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais.....	96

## 1 INTRODUÇÃO

A sepse é uma condição patológica médica grave que afeta 18 milhões de pessoas/ano no mundo e é caracterizada por um estado inflamatório generalizado, disfunção imune, desregulação da cascata de coagulação e disfunção endotelial do hospedeiro, em resposta a uma infecção. Na sepse, mediadores endógenos ativados pelo patógeno ou por suas toxinas induzem uma reação inflamatória generalizada em diversos órgãos, podendo levar à disfunção ou falência orgânica, que acomete 30% dos pacientes com a doença.

O aumento na incidência da sepse dá-se por diversos fatores. As possíveis causas incluem melhor sensibilidade no diagnóstico, grande número de pacientes com estado imunológico comprometido, uso de procedimentos invasivos agressivos no manejo e diagnóstico do paciente, número crescente de microrganismos resistentes, devido ao uso indiscriminado de antibióticos e maior quantidade de pacientes idosos, que apresentam um risco maior no desenvolvimento da infecção e suas sequelas.

Devido à grande dificuldade no tratamento da sepse, novas terapias estão sendo estudadas para combatê-la. Entre estes estudos está em crescente expansão a terapia com células-tronco mesenquimais (MSCs). Estas células têm como principais características a multipotência, capacidade de formar colônias em cultivo e potencial de diferenciação em tecidos da mesoderme *in vitro*. Podem ser obtidas a partir de diversos tecidos, incluindo medula óssea, tecido adiposo e placenta.

Na vida adulta, as MSCs não estão restritas à medula óssea, pois constituem uma pequena proporção (0,1% -0,01%) da população de células em geral. Crescentes evidências sugerem que este tipo celular pode recircular e migrar para os tecidos lesionados, potencializando o recrutamento de macrófagos e diminuindo o grau do processo inflamatório instalado. Ainda, a rápida expansão *in vitro* sem a perda do potencial de diferenciação, juntamente com as características imunomodulatórias descritas, favorece a escolha das MSCs para investigações no tratamento de doenças. O tecido adiposo é uma fonte abundante de MSCs. O isolamento destas células a partir deste tecido tem sido amplamente realizado em projetos de pesquisa, pois demanda menor tempo de coleta e proporciona maior concentração de células para cultivo *in vitro*, além de ocasionar menor estresse físico para o doador.

Com o uso crescente das MSCs na terapia da sepse, o presente estudo prevê o uso de tais células para tratamento desta síndrome, por meio da comparação das vias de administração intraperitoneal e intravenosa, para melhor aplicabilidade desta terapia celular. A partir do conhecimento da melhor via para o tratamento, a transposição dos achados da pesquisa básica poderá ser mais facilmente traduzida na clínica dos pacientes acometidos pela doença.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

Comparar os efeitos anti-inflamatórios das MSCs quando administradas pelas vias intraperitoneal e intravenosa na sepse aguda experimental, determinando qual a melhor via de tratamento.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Estabelecer o modelo de sepse em camundongos por ligação e perfuração do ceco;
- Comparar o potencial terapêutico das MSCs utilizando os parâmetros hematológicos dos animais com sepse induzida;
- Analisar os efeitos anti-inflamatórios das MSCs no lavado peritoneal dos grupos submetidos à indução da sepse;
- Dosar as citocinas pró (IL-2, IL-6, IL-17A, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) no soro dos animais;
- Avaliar histologicamente as células do ceco dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A sepse

##### 3.1.1 Definição

Sepse é a resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro a um processo microbiológico (SKIRECKI *et al.*, 2012). De acordo com os critérios propostos pelo consenso do American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine de 1991 (HENKIN *et al.*, 2009), a sepse pode ser definida como uma síndrome clínica, resultante de uma complexa interação entre o hospedeiro e o agente infeccioso, caracterizada pela ativação sistêmica da resposta inflamatória envolvendo citocinas, mediadores de fase aguda e proteínas da coagulação (DE AZEVEDO e CONVERSO, 2006). A concomitância de dois critérios da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) com um foco infeccioso presumido ou evidente confirma o diagnóstico de sepse (HENKIN *et al.*, 2009).

A sepse grave é caracterizada pela presença de sepse associada com uma ou mais alterações clínicas ou laboratoriais de disfunção orgânica, como lesão pulmonar aguda, anormalidades de coagulação, alteração de estado mental e/ou falência renal, cardíaca ou hepática (BASSO *et al.*, 2008). Considera-se um paciente em choque séptico quando há presença de hipotensão induzida pela sepse (HENKIN *et al.*, 2009) e quando os sinais clínicos desta doença prevalecem depois de adequada reposição hidroeletrólítica (BASSO *et al.*, 2008).

Assim, a presença de patógenos ou de seus produtos na corrente sanguínea, as alterações hemodinâmicas e as respostas inflamatórias local e generalizada do hospedeiro são processos que caracterizam e definem a sepse como uma SIRS decorrente de infecção bacteriana, fúngica, viral ou protozoariana (BASSO *et al.*, 2008; STRANO *et al.*, 2010).

##### 3.1.2 Epidemiologia

A sepse e suas complicações estão entre as principais causas de morte nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (SALES JÚNIOR *et al.*, 2006; BARICHELLO *et*

*al.*, 2007; DE CARVALHO *et al.*, 2010) e sua incidência pode variar de acordo com as características de cada região e da definição utilizada nos critérios de diagnóstico (DE CARVALHO *et al.*, 2010). Variações na metodologia de pesquisas epidemiológicas tornam difícil a comparação de seus resultados. As alterações no desenho das pesquisas e nos critérios de inclusão e exclusão são responsáveis por algumas das diferenças observadas (KAUSS *et al.*, 2010).

Dados epidemiológicos sobre a incidência e evolução da sepse nas UTIs da América Latina, incluindo o Brasil, são escassos (DE CARVALHO *et al.*, 2010). O estudo BASES (Brazilian Sepsis Epidemiological Study), publicado em 2004, foi desenvolvido em cinco UTIs dos Estados de São Paulo e Santa Catarina e apresentou uma incidência da sepse, sepse grave e choque séptico de 46,9%, 27,3% e 23%, respectivamente, em pacientes com mais de 24h de internação (SILVA *et al.*, 2004). Posteriormente, outro estudo multicêntrico, publicado em 2006 e realizado em 65 hospitais das regiões do Brasil, avaliou a incidência da sepse. Os autores demonstraram que 16,7% dos pacientes incluídos no estudo apresentaram sepse com mortalidade geral de 46,6% (SALES JÚNIOR *et al.*, 2006).

A incidência da sepse tem aumentado drasticamente ao longo das últimas décadas. A idade avançada do paciente, o aumento do número de procedimentos diagnósticos invasivos, o uso frequente de drogas imunossupressoras e o crescente número de infecções bacterianas multi-resistentes, especialmente no ambiente hospitalar, são fatores que participam desta situação. Infelizmente, em um número significativo de pacientes, o diagnóstico de sepse grave não é realizado no momento da manifestação dos primeiros sintomas de disfunção orgânica (FREITAS *et al.*, 2008).

O ônus social e econômico associado à doença é alarmante. De acordo com dados norte-americanos, cerca de US\$22.000 são gastos por paciente com sepse, um quadro que pode ser maior para os pacientes em cuidados intensivos. No Brasil, o estudo de SOGAYAR *et al.* (2008) encontrou um custo médio de US\$9.632 por paciente internado em UTI. Além disso, os sobreviventes de sepse grave e choque séptico têm uma alta taxa de mortalidade em longo prazo e uma queda significativa na sua qualidade de vida (FREITAS *et al.*, 2008).

### 3.1.3 Processo inflamatório

A reação do hospedeiro em resposta à sepse é caracterizada pela ativação e produção excessiva de células e mediadores inflamatórios, resultando em um desequilíbrio metabólico e imunológico (DE MELLO *et al.*, 2011). Na maioria dos casos de infecção microbiana, a resposta imune inata e adaptativa permite a remoção do patógeno e o retorno à homeostase. Em alguns casos, no entanto, esta estratégia de defesa, conhecida como resistência à infecção, pode levar a danos teciduais irreversíveis e comprometer a viabilidade homeostática. Uma estratégia alternativa, conhecida como tolerância à infecção, pode limitar a severidade da doença, independente da carga de patógenos (LARSEN *et al.*, 2010). As estratégias de defesa implicam no envolvimento do sistema imune inato na tentativa de conter e eliminar os microrganismos agressores, desencadeando uma resposta inflamatória aguda no local da infecção (WARD, 2010).

Pacientes em quadro de sepse padecem de acentuados distúrbios hemodinâmicos, evidenciados principalmente na evolução do choque séptico, caracterizado por vasodilatação, depressão miocárdica, redução do volume intravascular e metabolismo aumentado. Esses eventos provocam uma liberação intensa de mediadores inflamatórios, associada a um fluxo sanguíneo inadequado nos tecidos e simultânea produção de substâncias anti-inflamatórias, além de elevados níveis plasmáticos de compostos vasodilatadores e vasoconstritores (DE AZEVEDO e CONVERSO, 2006; DE FARIAS *et al.*, 2009).

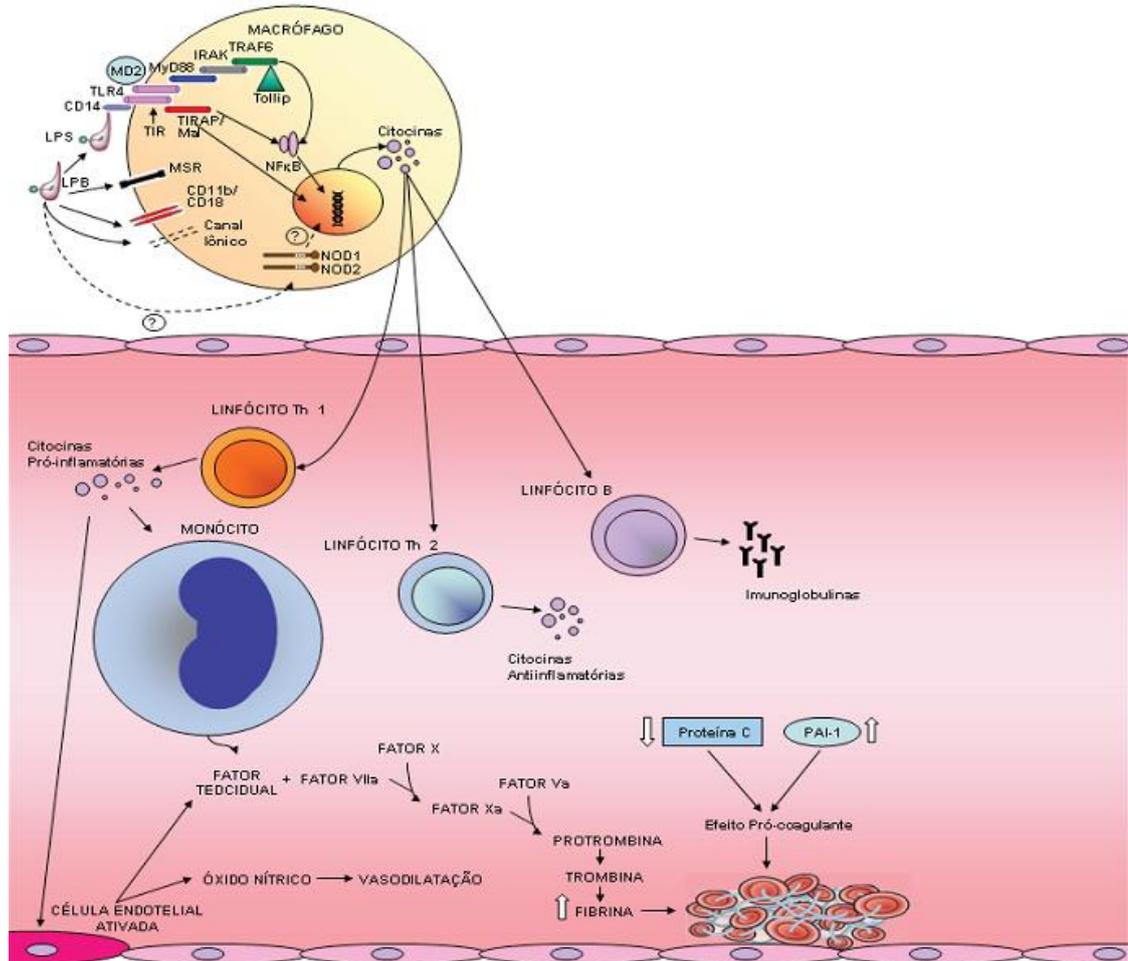
A inflamação sistêmica aumenta a atividade de sintetases indutoras de óxido nítrico (iNOS), que amplificam a síntese de óxido nítrico (NO), causando efeito vasodilatador. A vasodilatação resulta em aumento da capacitância vascular devido à diminuição na resistência periférica, o que conduz à hipovolemia relativa, desencadeando hipotensão, hipoperfusão tecidual e danos isquêmicos (BASSO *et al.*, 2008). A resposta imune é ativada para eliminar a infecção e reparar o tecido afetado. Na presença de inflamação sistêmica, porém, a reação inflamatória à injúria tissular é capaz de ativar o sistema da coagulação, inibir anticoagulantes endógenos e atenuar a resposta fibrinolítica, causando efeitos deletérios (DE AZEVEDO e CONVERSO, 2006). Estes sinais e sintomas são parcialmente responsáveis pela disfunção de órgãos e pela alta taxa de mortalidade observada em pacientes com sepse (DE FARIAS *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm sido realizados para investigar o papel de órgãos como pulmões, fígado, intestino e rins, no desenvolvimento da sepse (BARICHELLO *et al.*, 2007). VINCENT e ABRAHAM (2006) afirmam que o pulmão é o sítio de infecção primário mais comum associado à sepse em humanos e a infecção abdominal, segundo os autores, tem maior significância na rotina clínica veterinária.

#### 3.1.4 Fisiopatologia

O sistema imune inato é responsável pela primeira defesa do organismo contra patógenos invasores (BASSO *et al.*, 2008; HENKIN *et al.*, 2009; KNAPP, 2010). Os macrófagos, células natural *killer* (NK), neutrófilos e células dendríticas (DCs), epiteliais e endoteliais contribuem para o reconhecimento de microrganismos e iniciação da resposta inflamatória, visando à eliminação de patógenos e consequente reparação do dano tecidual (KNAPP, 2010). A ativação descontrolada de macrófagos, a perda da função da barreira intestinal e a depleção ou disfunção das DCs têm sido implicadas no desenvolvimento de falência orgânica e contribuem para a mortalidade em um quadro de sepse (CAI *et al.*, 2010).

Em um modelo simplificado de infecção, o microrganismo contamina uma região até então estéril, como, por exemplo, a cavidade abdominal, durante a ruptura de um apêndice inflamado (KNAPP, 2010). A sepse se inicia quando as moléculas presentes na parede celular do microrganismo se ligam aos Toll-like receptors (TLRs), na superfície dos macrófagos peritoneais (Figura 1). Os peptidoglicanos de bactérias gram-positivas e os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas ligam-se ao TLR-2 e TLR-4, respectivamente. Uma vez ativados, estes receptores desencadeiam uma cascata de eventos intracelulares, que culmina com a translocação do Fator Nuclear de transcrição Kappa B (NF- $\kappa$ B) (BASSO *et al.*, 2008; HENKIN *et al.*, 2009), aumentando a transcrição de citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 (DE AZEVEDO e CONVERSO, 2006; BASSO *et al.*, 2008; HENKIN *et al.*, 2009) e IL-10 (HENKIN *et al.*, 2009). Estas citocinas ajudam a atrair neutrófilos, para que fagocitem o patógeno, iniciando a resposta imune adaptativa e causando injúria direta ou indireta aos tecidos do hospedeiro (BASSO *et al.*, 2008; KNAPP, 2010). Em sequência, os neutrófilos sofrem apoptose e são fagocitados pelos macrófagos, que, por sua vez, finalizam a resposta inflamatória (KNAPP, 2010).



**Figura 1** – Resumo esquemático da fisiopatologia da sepse. Os peptidoglicanos ou lipopolissacarídeo (LPS) são reconhecidos pelos TLR-2 e TLR-4, respectivamente, na superfície dos macrófagos. Uma vez ativados, os TLRs desencadeiam a translocação nuclear do NF-κB, ativando a resposta imune adaptativa (linfócitos T e linfócitos B) e as células B iniciam a liberação de imunoglobulinas. Ao mesmo tempo, os linfócitos T *helper* tipo 1 (Th1) secretam citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) enquanto que os linfócitos T *helper* tipo 2 (Th2) secretam interleucinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10). Os neutrófilos ativados causam aumento da permeabilidade vascular, ocasionando edema tecidual que permite a liberação de óxido nítrico. Na presença do patógeno ou suas toxinas, a cascata da coagulação é super-ativada, ocasionando a deposição de fibrina em um estágio inicial e hemorragia em um estágio final, como consequência do esgotamento dos fatores de coagulação.

LBP: proteína ligante de LPS; TLR-4: toll-like receptor 4; MyD88: fator 88 de diferenciação mielóide; IRAK: quinase associada ao receptor de IL-1; TRAF6: Fator 6 associado ao receptor de TNF; Tollip: proteína de interação Toll; TIR: domínio intracelular homólogo ao receptor toll/IL-1; TIRAP/Mal: proteína adaptadora contendo domínio TIR; MSR: receptor de macrófago scavenger; NFκB: fator de transcrição nuclear kappa-beta; PAI-1: inibidor-1 do ativador de plasminogênio. (adaptado de HENKIN *et al.*, 2009).

Modificações no calibre dos pequenos vasos, além de mudanças bioquímicas e fisiológicas no sangue, afetam a homeostase da microcirculação durante o choque séptico. Essas alterações hemodinâmicas ocorrem devido à liberação de componentes da parede bacteriana (endotoxinas e ácido teicóico), que induz uma sequência de alterações

inflamatórias, incluindo a ativação de células efetoras e a liberação de diversos mediadores, como as citocinas, moléculas de adesão, células endoteliais, fator de ativação plaquetário e NO. Estes eventos induzem a destruição local do endotélio, resultando em um aumento da permeabilidade capilar, vasodilatação e edema tecidual, além de contribuir para a diminuição da oferta de oxigênio nos tecidos (DE MELLO *et al.*, 2011).

### 3.1.5 Tratamento

A alta mortalidade por sepse grave e choque séptico está intimamente relacionada à inadequação da abordagem do agente infeccioso e pouca compreensão das interações fisiológicas envolvidas. A conduta terapêutica, incluindo drogas antimicrobianas, vai diferir, substancialmente, de acordo com o local da infecção primária. O controle do foco infeccioso é pré-requisito para que as defesas do hospedeiro, bem como a antibioticoterapia, tenham sucesso na eliminação do agressor (SALOMÃO *et al.*, 2011).

A mortalidade associada à sepse é multifatorial e há diversos fatores de risco identificados na literatura, incluindo escores de prognóstico, doenças crônicas associadas, disfunção orgânica aguda, alcoolismo, idade e características da infecção. Além disso, o manejo da sepse de acordo com a “Campanha Sobrevivendo à Sepse” (LEVY *et al.*, 2010) também pode alterar o prognóstico da doença e reduzir a mortalidade dos pacientes (KAUSS *et al.*, 2010).

Indivíduos com sepse grave e choque séptico apresentam vasodilatação e grandes perdas hídricas para o espaço intersticial, que podem somar-se à depressão miocárdica. O consequente comprometimento do fluxo sanguíneo pode resultar em isquemia de largas extensões que, se não revertida precocemente, precipita o desenvolvimento da Disfunção de Múltiplos Órgãos (DMO) elevando a chance de óbito (WESTPHAL *et al.*, 2011). Além disso, ocorrem complexas alterações na contratilidade miocárdica, na micro e macrocirculação, causando a diminuição da perfusão e da oferta de oxigênio tecidual. Dessa maneira, por ser uma doença comum, dispendiosa e potencialmente fatal, sendo pouco o progresso em relação à mudança nas taxas de mortalidade, torna-se necessária uma terapia agressiva contra a sepse, incluindo a

antibioticoterapia e um tratamento de suporte, principalmente hemodinâmico, pela reposição volêmica para restabelecimento da perfusão tecidual (STRANO *et al.*, 2010).

A hemocultura é um teste crítico de diagnóstico, que orienta o manejo de pacientes com infecções e é fundamental para a instituição rápida e adequada de terapias antimicrobianas (BARMAN *et al.*, 2010). Estima-se que ocorram no Brasil 400.000 casos de sepse grave por ano, que demandam 17% dos leitos disponíveis nas UTIs. A confirmação do diagnóstico depende de exames microbiológicos baseados nas hemoculturas que, em geral, exigem 24 a 72 horas para o fornecimento do resultado. Assim, na maioria dos casos, a terapia antibiótica é iniciada com base em critérios clínicos. Regimes terapêuticos antimicrobianos inadequados se associam com o surgimento de cepas resistentes, aumento dos custos do tratamento e das taxas de mortalidade, especialmente em pacientes em condições críticas. Apesar disto, recomenda-se que uma terapia antimicrobiana adequada deva ser iniciada o mais precocemente possível, pois cada hora de atraso resulta em um aumento de 7,6% na mortalidade. Ensaio moleculares com o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) são importantes ferramentas para a detecção e identificação de microrganismos e podem contribuir para o diagnóstico precoce com alta sensibilidade (FERREIRA *et al.*, 2011).

Independente do método de diagnóstico das infecções graves faz-se necessário a detecção precoce e precisa nos estágios iniciais da doença (DE FARIAS *et al.*, 2009). Existem, pelo menos, duas abordagens terapêuticas para o tratamento da sepse em humanos. Para sepse mediada por bactérias gram-negativas, a inibição da sinalização por TLR-4 pode ser uma terapia alternativa útil, pois diminuir a resposta ao TLR-4 pode melhorar substancialmente a sobrevivência. Esta abordagem tem a vantagem de diminuir as respostas de vários mediadores da inflamação. Além disso, outra terapêutica com maior eficácia pode ser obtida com a utilização de tratamentos que inibem combinações de citocinas superproduzidas nos últimos estágios da sepse (IL-1 $\beta$  e IL-6) e que aumentam os principais mediadores que não são conhecidos por contribuir para a letalidade nos estágios intermediários, como o Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (PRUETT *et al.*, 2010).

Outro tratamento amplamente pesquisado é a utilização da Proteína C Reativa, que tem papel importante na modulação das rotas da inflamação e coagulação. Sabe-se que pacientes que morrem com sepse tendem a ter níveis elevados de inibidor de

fibrinólise e diminuição dos níveis dos anticoagulantes antitrombina III e proteína C. Esta última já mostrou melhora comprovada na sobrevivência em estudos com modelos animais de sepse, além de resultados em pacientes com meningite septicêmica. Inicialmente, a Proteína C era obtida a partir de plasma humano, exigindo grandes quantidades de plasma para que se extraíssem pequenas quantidades da proteína, o que fez com que o uso comercial para a sepse não fosse viável. Entretanto, a evidência do papel desta proteína na sepse levou ao desenvolvimento de uma Proteína C humana recombinante, chamada drotrecogina alfa (BRADLEY, 2001). No entanto, a administração desta proteína é combinada com graves efeitos colaterais (sangramento), e, assim, sua aplicação é restrita a pacientes com alto risco de morte (OEHMCKE e HERWALD, 2010).

Após o estado hiperinflamatório, o paciente séptico frequentemente desenvolve um quadro imune caracterizado por hiporesponsividade das células T e distúrbios na apresentação de antígenos, desencadeando, dessa forma, acentuada imunossupressão e conduzindo o paciente ao óbito. O aumento da apoptose, particularmente no tecido linfóide e potencialmente em órgãos sólidos, contribui para a imunossupressão do paciente com sepse (BASSO *et al.*, 2008).

No âmbito da reposição volêmica, há que se decidir sobre o melhor fluido a ser utilizado. Segundo o Consenso Brasileiro de Sepse (AKAMINE *et al.*, 2004), os cristalóides são a primeira escolha. Dentre eles, a solução salina isotônica (NaCl 0,9%) é a mais utilizada, porém com a necessidade de infusão de grandes volumes. Já as soluções hipertônicas melhoram a contratilidade cardíaca e fazem vasodilatação pré-capilar, apresentando, porém, risco de desenvolvimento de estados hipertônicos. O uso da solução salina hipertônica tem sido pouco estudado no campo da sepse, sendo seus principais mecanismos de ação a rápida mobilização de fluídos do compartimento intracelular para o extracelular, a redução do edema endotelial e tissular, o aumento da contratilidade miocárdica, a melhora do débito cardíaco, vasodilatação arteriolar, melhora da microcirculação, hemodiluição e imunomodulação (STRANO *et al.*, 2010).

Embora se tenha estudado sobre a fisiopatologia da sepse, o que, conseqüentemente, acarreta melhoras nas perspectivas de tratamento, alguns pontos ainda permanecem incertos (STRANO *et al.*, 2010). A ausência de um teste diagnóstico considerado padrão-ouro dificulta a escolha do tratamento, aumentando a perspectiva de

agravamento do quadro e contribuindo para o aumento da taxa de mortalidade relacionada a esta síndrome.

### 3.2 Modelos animais de sepse

Modelos animais representam uma ferramenta importante e indispensável para a compreensão dos mecanismos moleculares e genéticos que envolvem uma doença (RITTIRSCH *et al.*, 2007; DEJAGER *et al.*, 2011). O objetivo do desenvolvimento destes modelos concentra-se na aquisição de um ambiente controlado, reduzindo o número de variáveis e sendo capaz de estudar em detalhes o metabolismo alterado de células, tecidos e órgãos. Tais modelos devem permitir a obtenção de amostras repetidas de tecido, de modo a resultar em um número suficiente de ensaios para comprovação de reprodutibilidade e ganho de significância estatística (WICHTERMAN *et al.*, 1980).

O termo "sepse" causou considerável confusão em modelos animais e estudos clínicos, pois se refere a distintas condições em diferentes estudos. Alguns modelos animais produzem um baixo grau de infecção latente, que pode durar alguns dias ou semanas, enquanto outros descrevem um processo agudo que produz morte em poucas horas (WICHTERMAN *et al.*, 1980).

Para estudar os mecanismos subjacentes da sepse e a resposta inflamatória sistêmica associada, modelos experimentais tentam mimetizar alterações fisiopatológicas tipicamente observadas em pacientes doentes (RITTIRSCH *et al.*, 2009). Estes modelos devem oferecer meios para avaliar e controlar o fenômeno da sepse como um processo dinâmico, desde sua instalação até o desenvolvimento da falência múltipla de órgãos e sistemas (TRAMONTE *et al.*, 2004).

As duas principais fontes de infecção em pacientes com sepse são o trato respiratório e a cavidade abdominal (VAN DER POLL, 2012). Por esta razão, modelos que agridem a barreira intestinal endógena, como a ligadura e perfuração do ceco (CLP) ou modificações, incluindo ligadura e incisão do ceco (CLI) e peritonite por *stent* do cólon ascendente (CASP) permanecem com maior relevância clínica para o estudo da sepse (GONNERT *et al.*, 2011; VAN DER POLL, 2012). Ainda assim, estes modelos também têm limitações importantes (Tabela 1). O modelo CLP pode ser um substituto razoável da sepse humana, mas pode não oferecer informações relevantes sobre o

aumento da incidência da sepse provocada por fungos e bactérias gram-positivas (RITTIRSCH *et al.*, 2007).

**Tabela 1** – Modelos experimentais de sepse e suas correspondentes vantagens e desvantagens.

MODELO	RESULTADO	VANTAGEM	DESVANTAGEM	PESQUISAS RECENTES
LPS	Endotoxemia	Fácil reprodução; alto grau de homogeneidade	Falha na reflexão da complexidade da sepse humana	WEIL <i>et al.</i> , 2011; KUWAHARA-OTANI <i>et al.</i> , 2013; WANG <i>et al.</i> , 2013.
Inóculo bacteriano	Sepse monomicrobiana	Fornecer informações sobre os mecanismos de defesa antibacterianos do hospedeiro na ausência de tecido lesado	Curso da doença é mais fulminante do que a sepse clínica; pode causar intoxicação por endotoxinas	DOCOBO-PÉREZ <i>et al.</i> , 2013; KWIECINSKI <i>et al.</i> , 2013.
CASP	Peritonite Difusa	Controle local do foco séptico pela formação de abscesso	A colocação do stent cria uma saída constante de conteúdo intestinal, mimetizando uma situação de anastomose insuficiente	EHRENTAUT <i>et al.</i> , 2012; YUAN <i>et al.</i> , 2012; MIAO <i>et al.</i> , 2013.
CLP	Sepse polimicrobiana	Consegue recriar a maioria dos aspectos da sepse humana com foco abdominal	A reprodutibilidade depende de diversos fatores cirúrgicos	GONZALEZ-REY <i>et al.</i> , 2009; NÉMETH <i>et al.</i> , 2009; MEI <i>et al.</i> , 2010; ANDERSON <i>et al.</i> , 2012; XU <i>et al.</i> , 2013.

A magnitude do desafio séptico é difícil de ser controlada, devido à grande variabilidade na progressão da doença e em sua taxa de sobrevivência (GONNERT *et al.*, 2011). Em virtude disto, diferentes tipos de modelos animais de sepse já foram desenvolvidos, baseando-se em quatro abordagens principais: administração primária de bactérias ou de componentes de sua parede celular, indução de peritonite por meio de suspensões de fezes ou microrganismos, indução de abscessos nas extremidades de tecidos moles e destruição parcial de barreiras normais do trato gastrointestinal (WICHTERMAN *et al.*, 1980; FINK e HEARD, 1990; RITTIRSCH *et al.*, 2007). No entanto, existem outros eventos iniciais, como queimaduras, traumatismo grave ou procedimentos cirúrgicos, que podem levar a uma resposta inflamatória sistêmica, explicando, talvez, porque tantos ensaios clínicos falharam na tentativa de repetir resultados obtidos com pesquisas experimentais (RITTIRSCH *et al.*, 2007).

Animais submetidos a modelos experimentais de sepse apresentam sinais de estresse, como déficit cognitivo, diminuição da memória de reconhecimento, sinais clínicos de depressão, piloereção, baixa atenção e mobilidade (NARDI *et al.*, 2012). Embora manifestações típicas como hipertermia (que progride para hipotermia), taquicardia e taquipnéia possam ser observadas em animais com sepse, outros parâmetros como níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias diferem entre animais e seres humanos doentes (RITTIRSCH *et al.*, 2007). Além disso, modelos pré-clínicos de sepse devem levar em consideração a importância da reposição hídrica e regimes de antibióticos adequados (DEJAGER *et al.*, 2011).

Geralmente, é na pesquisa básica que os mecanismos ou vias individuais são investigados de uma forma isolada, ao passo que um paciente com sepse apresenta um sistema complexo e interligado, que está fora de equilíbrio (RITTIRSCH *et al.*, 2007). Uma melhor compreensão do estado do paciente pode auxiliar na geração de terapias mais adequadas para este e para o desfecho da progressão de sua doença (ESMON, 2004). No entanto, sabe-se que os resultados obtidos a partir de animais não são suficientes para obter-se conclusões sobre um paciente individual (RITTIRSCH *et al.*, 2007). Desta forma, a sepse poderia ser melhor estudada em um ambiente pré-clínico por meio da realização de múltiplas investigações, cada uma procurando reproduzir quadros clínicos específicos, da mesma maneira que ocorre nas UTIs (VAN DER POLL, 2012).

Além disso, a interpretação e transposição dos resultados de estudos com animais para o ambiente hospitalar humano é um desafio persistente. As medidas que têm sido protetoras em animais com sepse não mostraram eficácia clínica em seres humanos (WICHTERMAN *et al.*, 1980; RITTIRSCH *et al.*, 2007). Isto não significa que modelos animais são irrelevantes para a prática clínica humana (RITTIRSCH *et al.*, 2007), mas estes dados reforçam a necessidade da definição clara do objetivo da utilização de cada modelo específico (VAN DER POLL, 2012). No entanto, existe a questão se os modelos animais atualmente utilizados para estudar a sepse realmente diferem muito de pacientes com sepse ou se os pesquisadores e médicos se perdem ao tentar adaptar suas conclusões à prática diária (RITTIRSCH *et al.*, 2007).

Embora algumas das diferenças entre os seres humanos e modelos animais impeçam uma extrapolação direta destes estudos para os pacientes, a utilização de

animais na pesquisa é essencial para a identificação de potenciais agentes terapêuticos e compreensão de como estes funcionam (ESMON, 2004). Apesar das limitações, o uso de modelos animais continuará a ser essencial para o desenvolvimento de novas terapias para a sepse humana (DEJAGER *et al.*, 2011).

Novos agentes terapêuticos devem ser estudados em modelos de infecção mesmo após o estabelecimento da doença. Na maioria das pesquisas acertivas, o agente foi administrado antes ou logo após o início da síndrome, enquanto que os pacientes são usualmente diagnosticados e tratados após o avanço do curso da sepse (DEJAGER *et al.*, 2011).

### 3.2.1 CLP

O modelo CLP foi desenvolvido por WICHTERMAN *et al.* (1980) com o objetivo de criar um modelo animal de sepse que fosse reprodutível e de baixo custo, que culminasse em choque séptico e conseguisse mimetizar as principais alterações fisiopatológicas decorrentes desta síndrome. Para a realização do modelo, procede-se uma laparotomia, para exposição do ceco com intestino adjacente. Após, realiza-se a ligadura do ceco, seguida por punctura com auxílio de agulha hipodérmica, com ou sem liberação manual do conteúdo intestinal na cavidade peritoneal (RITTIRSCH *et al.*, 2007; RITTIRSCH *et al.*, 2009; VAN DER POLL, 2012). Este modelo produz um ceco necrótico e um abscesso intraperitoneal localizado. Sob condições fisiológicas, a barreira da mucosa intestinal mantém as bactérias e suas toxinas em seu lúmen, enquanto realiza a absorção de nutrientes. Quando o ceco é perfurado, a integridade deste órgão é violada e o resultado é uma infecção polimicrobiana do peritônio, seguida pela translocação destas bactérias entéricas na corrente sanguínea (WICHTERMAN *et al.*, 1980; FAINTUCH *et al.*, 2002; RITTIRSCH *et al.*, 2007; DEJAGER *et al.*, 2011). No início da sepse, a bacteremia aciona a ativação sistêmica da resposta inflamatória, com subsequente choque séptico, DMO e, por fim, a morte (RITTIRSCH *et al.*, 2007; RITTIRSCH *et al.*, 2009).

Atualmente, CLP é o modelo mais utilizado para induzir sepse em roedores (RITTIRSCH *et al.*, 2007; RITTIRSCH *et al.*, 2009; DEJAGER *et al.*, 2011; NARDI *et al.*, 2012). É considerado por muitos pesquisadores como padrão-ouro para a pesquisa da sepse (RITTIRSCH *et al.*, 2007; RITTIRSCH *et al.*, 2009; DEJAGER *et al.*, 2011;

VAN DER POLL, 2012) e é um teste pré-clínico crucial para qualquer novo tratamento da sepse humana. Este modelo tem sido amplamente utilizado nos últimos 30 anos por melhor representar a complexidade desta síndrome, envolvendo uma combinação de três insultos: trauma tecidual devido à laparotomia, inflamação do tecido necrótico causada pela ligadura do ceco e infecção devido ao vazamento de flora microbiana mista no peritônio (MEDINA, 2010; DEJAGER *et al.*, 2011; VAN DER POLL, 2012).

A principal vantagem do modelo CLP é sua simplicidade. Uma vez que a sepse é induzida por um procedimento cirúrgico simples, não há necessidade de cultivar e quantificar microrganismos ou de preparar inóculos bacterianos (FINK e HEARD, 1990). Embora diversos modelos de sepse em roedores tenham sido desenvolvidos, o modelo CLP reflete mais fielmente o curso clínico de sepse abdominal humana, caracterizado por um estado circulatório inicial hiperdinâmico e hipermetabólico, seguido pela progressão a um estado hipodinâmico e hipometabólico pronunciado (WICHTERMAN *et al.*, 1980; RITTIRSCH *et al.*, 2007; MEDINA, 2010; DEJAGER *et al.*, 2011; NARDI *et al.*, 2012; VAN DER POLL, 2012). Adicionalmente, este modelo possibilita a investigação do metabolismo de vários substratos, as alterações fisiopatológicas produzidas em órgãos e tecidos durante a sepse e os efeitos de diversas intervenções terapêuticas na sobrevivência dos animais (WICHTERMAN *et al.*, 1980).

Os roedores, após indução da sepse por CLP, têm culturas bacterianas positivas contendo mistos organismos entéricos, que são detectáveis 6 horas após a realização do procedimento (RITTIRSCH *et al.*, 2009). Enquanto estes animais parecem saudáveis na fase inicial após a cirurgia, começam a mostrar sinais clínicos de sepse 12 horas após (RITTIRSCH *et al.*, 2009; NARDI *et al.*, 2012). A letalidade começa em 18-24 horas após a indução da sepse, indicando que o CLP representa um modelo rapidamente letal de sepse aguda (RITTIRSCH *et al.*, 2009).

Modelos de sepse são geralmente classificados de acordo com a taxa de sobrevivência, nos quais a extensão das alterações inflamatórias e fisiológicas baseia-se no grau de severidade da doença e define a mortalidade dos animais (RITTIRSCH *et al.*, 2009; DEJAGER *et al.*, 2011; GONNERT *et al.*, 2011).

A reprodutibilidade é um requisito indispensável para modelos experimentais de pesquisa. A progressão da sepse e sua respectiva taxa de mortalidade são influenciadas por algumas variáveis, incluindo a técnica aplicada, a composição bacteriana do

conteúdo intestinal do animal e a variabilidade cirúrgica inter-operatória. Modificações no modelo CLP para estudos a respeito da taxa de sobrevivência podem ser efetivadas por meio da variação no protocolo cirúrgico (GONNERT *et al.*, 2011). A magnitude da resposta fisiológica da sepse pode ser controlada com diversificações no calibre da agulha utilizada para a punctura (RITTIRSCH *et al.*, 2007; RITTIRSCH *et al.*, 2009; MEDINA, 2010; GONNERT *et al.*, 2011; VAN DER POLL, 2012), no número de perfurações (RITTIRSCH *et al.*, 2007; RITTIRSCH *et al.*, 2009; GONNERT *et al.*, 2011; VAN DER POLL, 2012) e na extensão do ceco ligado (RITTIRSCH *et al.*, 2007; RITTIRSCH *et al.*, 2009; VAN DER POLL, 2012), além da distância desta ligação em relação à válvula ileo-cecal (RITTIRSCH *et al.*, 2007). Níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$  tornam-se significativamente elevados de acordo com o aumento da extensão da ligação do ceco (RITTIRSCH *et al.*, 2007; RITTIRSCH *et al.*, 2009). A extrusão manual do conteúdo cecal para a cavidade peritoneal (GONNERT *et al.*, 2011), a reposição hídrica e o tratamento com antibióticos (RITTIRSCH *et al.*, 2007) também são determinantes que afetam diretamente a mortalidade pós-CLP (RITTIRSCH *et al.*, 2007; RITTIRSCH *et al.*, 2009).

Em recente publicação, foi demonstrado que as intervenções terapêuticas que tiveram efeitos altamente protetores em modelos de sepse com médio grau de gravidade foram ineficazes em uma forma mais severa da doença. Utilizar graus de severidade definidos na sepse induzida por CLP permite aos pesquisadores obter importantes conhecimentos funcionais sobre a resposta inflamatória, que, de outro modo, pode ser mascarada pela heterogeneidade do curso da sepse. Além disso, o desempenho padronizado da execução do modelo CLP facilita a comparação dos resultados experimentais entre os grupos de pesquisa (RITTIRSCH *et al.*, 2009).

Apesar disto, detalhes sobre a ligadura do ceco não são rotineiramente descritos em estudos experimentais, embora tal informação represente um dos determinantes mais importantes para a variabilidade do modelo (RITTIRSCH *et al.*, 2009; VAN DER POLL, 2012). Sendo assim, torna-se de grande importância que o procedimento CLP seja realizado com alta consistência e reprodutibilidade, para criar um ambiente controlado, com um número minimizado de variáveis que influenciam o resultado final. Desta forma, será possível avaliar os resultados publicados pela comunidade científica, obtidos em estudos a partir de animais doentes (RITTIRSCH *et al.*, 2007; RITTIRSCH *et al.*, 2009).

Assim, embora o modelo CLP tenha contribuído muito para o entendimento das características fisiopatológicas e imunológicas da sepse clínica, avaliação de vários compostos antimicrobianos e investigação de questões fundamentais sobre a relação entre o patógeno invasor e a terapia antibiótica (MEDINA, 2010; DEJAGER *et al.*, 2011), a maior parte das intervenções terapêuticas tem sido ineficazes. Tendo em conta a heterogeneidade dos pacientes em relação à idade, peso, doenças pré-existentes, genética e cuidados de suporte clínico, torna-se um desafio conseguir reproduzir todo o espectro da sepse humana em um modelo experimental (DEJAGER *et al.*, 2011), não existindo, portanto, um modelo de sepse único ideal (RITTIRSCH *et al.*, 2007).

### 3.3 O baço

O baço é a maior massa individual de tecido linfático no corpo, sendo localizado entre o estômago e o diafragma (TORTORA e DERRICKSON, 2012). É um órgão abdominal, que desempenha papel semelhante aos linfonodos na resposta imunológica aos patógenos que ganham acesso à corrente sanguínea (ABBAS e LICHTMAN, 2007). O parênquima deste órgão consiste em dois tipos diferentes de tecido, chamados de polpa branca e polpa vermelha. A polpa branca é constituída por tecido linfático, consistindo basicamente em linfócitos e macrófagos. A polpa vermelha consiste em seios venosos repletos de sangue e de cordões de tecido esplênico, contendo eritrócitos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e granulócitos (TORTORA e DERRICKSON, 2012).

O baço tem uma função bem descrita de hemofiltração, contribuindo para a hematopoiese, fagocitose e destruição de eritrócitos, plaquetas e leucócitos defeituosos (SKATTUM *et al.*, 2012). Além disso, é um órgão fundamental no direcionamento da resposta imune inata e na modulação da inflamação, por produzir anticorpos específicos e servir como um sistema de filtro para as bactérias opsonizadas na corrente sanguínea (CAI *et al.*, 2010).

O sangue que flui para o baço entra nas artérias centrais da polpa branca. Neste local, as células B e T executam funções imunes, enquanto os macrófagos destroem os patógenos transportados pelo sangue, por meio da fagocitose (ABBAS e LICHTMAN, 2007; TORTORA e DERRICKSON, 2012). Na polpa vermelha, o baço tem as funções de remover os eritrócitos e plaquetas defeituosos, gastos ou rompidos, armazenar

plaquetas, até um terço do suprimento do corpo e produzir eritrócitos durante a vida fetal (TORTORA e DERRICKSON, 2012).

O baço é parte integrante do conjunto de macrófagos fixos, acumulados nos linfonodos e baço, que compõem o "sistema retículo endotelial" (RES) ou "sistema mononuclear fagocitário" (BOHNSACK e BROWN, 1986; CAI *et al.*, 2010). No processo de sepse, as células do RES atingem primeiramente os patógenos ou suas toxinas localizados no pulmão, fígado e baço. O sistema imune inato protege contra a infecção e lesão tecidual por meio dos órgãos especializados do RES. O sistema nervoso central regula a resposta imune inata a partir do nervo vago, um mecanismo denominado via colinérgica anti-inflamatória, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção e lesão tecidual (CAI *et al.*, 2010).

Embora desempenhe uma miríade de funções na defesa imunológica, o baço tem importância fundamental na imunidade mediada por células T. Uma das sub-populações destas células, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD45RA desempenha um papel crucial na resposta imune a novos antígenos. São células virgens geradas no timo, de reação lenta e não imunizadas que, quando expostas a um antígeno novo, são transformadas em linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD45RO. Estas últimas permanecem como células de memória no organismo e, em contraste com os linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD45RA, podem responder rapidamente ao antígeno contra o qual foram sensibilizadas (MALHOTRA *et al.*, 2010).

O desvio do fluxo sanguíneo intra-esplênico pode prejudicar a capacidade do baço de remover os microrganismos que estão no sangue (BOHNSACK e BROWN, 1986). Atualmente, nenhum marcador específico de função imune esplênica foi identificado e este parâmetro é avaliado por meio de testes indiretos de funções de hemofiltração, imunológicas e de viabilidade esplênicas (SKATTUM *et al.*, 2012).

### **3.4 Células-tronco mesenquimais (MSCs)**

#### **3.4.1 Características gerais**

Células-tronco são reservas de células existentes na maioria dos tecidos, que possuem a capacidade de se multiplicar, diferenciando-se naquele tecido ao qual pertencem e, ao mesmo tempo, mantendo uma reserva de células indiferenciadas

(ZAGO e COVAS, 2006). São classificadas de acordo com sua origem (embrionárias ou adultas) e plasticidade (totipotentes, pluripotentes ou multipotentes) e são responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos, pelo reparo dos tecidos lesados e pela remodelação dos tecidos e órgãos (ZAGO e COVAS, 2006).

As células-tronco adultas são obtidas a partir de tecidos especializados e são, principalmente, multipotentes (LIN e LEE, 2008). Entre elas, destaca-se a célula-tronco hematopoiética (HSC), encontrada na medula óssea, no sangue do cordão umbilical e, em menor quantidade, no sangue periférico. Este tipo celular pode dar origem a todas as linhagens de células sanguíneas maduras (ZAGO e COVAS, 2006).

As MSCs pertencem a outro grupo de células-tronco adultas e foram identificadas pela primeira vez em 1961, no Instituto do Câncer Ontário, Canadá, por McCULLOCH e TILL, durante um estudo sobre o efeito da radiação na medula óssea de camundongos. Mais tarde, em 1974, na Rússia, FRIEDENSTEIN *et al.* realizaram um ensaio *ex vivo* para examinar o potencial clonogênico destas células, que passaram a ser referidas como Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos (CFU-F). Pesquisas subsequentes entre 1980 e 1990 revelaram a plasticidade destas células, que receberam o controverso nome que carregam atualmente (YI e SONG, 2012). O fato de que estas células podem ter vias alternativas de diferenciação além da formação da mesoderme e ectoderme, torna o termo "mesenquimal" inadequado. Além disso, as HSC possuem, também, origem mesodérmica, o que as torna um tipo de MSC. Por esta razão, alguns autores preferem o termo "células-tronco mesenquimais não-hematopoiéticas". Todos estes conceitos, contudo, já estão inclusos quando o termo MSC é utilizado e há uma tendência ao aceite desta terminologia, embora permaneça inadequada (NARDI e MEIRELLES, 2006).

As MSCs são células progenitoras capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares, incluindo linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas (DOMINICI *et al.*, 2006; KRONSTEINER *et al.*, 2011). Devido à sua multipotência e propriedades imunológicas, são de especial interesse na engenharia de tecidos e no tratamento de doenças auto-imunes, podendo ser isoladas de tecido adiposo, placenta, sangue do cordão umbilical, pulmão e outros tecidos (HORWITZ *et al.*, 2005; KRONSTEINER *et al.*, 2011). *In vitro*, são caracterizadas pela adesão ao plástico, capacidade formadora de colônia e rápida proliferação, além de apresentar baixo fenótipo imunogênico e moléculas co-estimulatórias (LOEBINGER e JANES, 2007; HOOGDUIJN *et al.*,

2010). Este tipo celular não possui marcadores de superfície específicos. Para sua identificação, é definido pela ausência de marcadores endoteliais (CD31) e hematopoiéticos (CD34, CD45, CD14 e CD11), juntamente com a expressão de marcadores característicos, como CD29, CD73, CD90 e CD105. Dependendo do tecido de origem, novos marcadores têm sido descritos, como o CD146, CD166 e CD271 (LOEBINGER e JANES, 2007; NAUTA e FIBBE, 2007; BRANDAU *et al.*, 2010; CHEN *et al.*; 2011).

O tecido adiposo funciona como um órgão endócrino com efeitos locais e sistêmicos pela liberação de adipocinas, fatores proteicos e pequenas moléculas, incluindo ácidos graxos livres e seus derivados (GIMBLE e NUTTALL, 2011). A fração estromal do tecido adiposo é constituída de pré-adipócitos, células endoteliais, macrófagos, fibroblastos e células-tronco. Apesar da medula-óssea ser a fonte rotineiramente usada para o isolamento das MSCs, com o objetivo de utilizá-las no tratamento de algumas doenças, esta possui limitações, como a quantidade de células colhidas e ocasionamento de dor e morbidade em decorrência do procedimento de coleta. As MSCs isoladas a partir de tecido adiposo (ADSCs) são mais facilmente obtidas e coexistem em abundância com outras células do tecido adiposo, além de possuírem propriedades imunomoduladoras equivalentes às MSCs derivadas da medula óssea (BMSCs).

#### 3.4.2 Imunomodulação

O sistema imune é constituído por uma intrincada rede de órgãos, células e moléculas e tem por finalidade manter a homeostase do organismo combatendo as diversas agressões. A imunidade inata atua em conjunto com a imunidade adaptativa e caracteriza-se pela primeira e rápida resposta aos estímulos, independente da excitação prévia (ABBAS *et al.*, 2012). Foi demonstrado que as MSCs interagem com as células do sistema imune, induzindo a anergia *in vivo* e modulando suas atividades funcionais *in vitro* (RAFFAGHELLO *et al.*, 2008). Diversos grupos, nos últimos anos, têm relatado que as MSCs modulam as funções efetoras das células T e B (NAUTA e FIBBE, 2007; GEBLER *et al.*, 2012; YI e SONG, 2012), a maturação das DCs e a proliferação das células NK (Figura 2) (AGGARWAL e PITTENGER, 2005; NAUTA

e FIBBE, 2007; RAFFAGHELLO *et al.*, 2008; IVANOVA-TODOROVA *et al.*, 2009; GEBLER *et al.*, 2012; YI e SONG, 2012).

Pesquisas (GRANERO-MOLTÓ *et al.*, 2009; PAREKKADAN e MILWID, 2010) apontam que as MSCs podem recircular e migrar para os tecidos lesionados, repondo a perda de células parenquimáticas, juntamente com a possibilidade de sua rápida expansão *ex vivo*, sem a perda do potencial de diferenciação (GLENNIE *et al.*, 2005). Estas células secretam um grande número de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, exercendo efeitos parácrinos nas células vizinhas, permitindo sua migração e expansão (GEBLER *et al.*, 2012).

Ademais, as MSCs, na presença de interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), possuem a capacidade de bloquear a proliferação de células B ativadas (GEBLER *et al.*, 2012), interferindo negativamente na produção de anticorpos, com efeito dependente da dose de MSCs e do estado de ativação das células B. A secreção da quimiocina responsável pela migração adequada de células B também é inibida por MSCs (NAUTA e FIBBE, 2007; GEBLER *et al.*, 2012; YI e SONG, 2012).

Inibir a proliferação de células NK e prevenir as funções efectoras destas células, como citotoxicidade contra células infectadas por vírus, acompanhada de redução na secreção IFN- $\gamma$ , são, também, propriedades das MSCs. No caso de reparação tecidual, a atividade anti-inflamatória destas células resulta na geração de macrófagos, cruciais para a promoção da reparação tecidual (NAUTA e FIBBE, 2007; GEBLER *et al.*, 2012). Os efeitos inibitórios das MSCs na citotoxicidade de células NK requerem contato célula-célula, sugerindo a existência de um mecanismo diferente de supressão pelas MSCs (NAUTA e FIBBE, 2007), além do efeito parácrino.

Ainda, as MSCs interferem na diferenciação, maturação e função das DCs. Estas, quando imaturas e geradas na presença de MSCs, são prejudicadas em sua habilidade de induzir a ativação das células T. Estudos sugerem que as MSCs suprimem a diferenciação de DCs, resultando na formação de células imaturas com fenótipo supressor ou inibitório (NAUTA e FIBBE, 2007).

AGGARWAL e PITTENGER (2005) foram os primeiros a descrever que as MSCs humanas interagem com as células do sistema imunológico e são capazes de alterar o resultado da resposta imune celular por meio da inibição das citocinas pró-

inflamatórias IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e do aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 (NAUTA e FIBBE, 2007; YI e SONG, 2012).

A presença de IFN- $\gamma$  não melhora a imunogenicidade das MSCs, mas promove suas propriedades anti-proliferativas e induz a expressão de HLA-DR. Em resposta a esta citocina, a expressão do MHC classe I das MSCs é regulada positivamente e sua capacidade de apresentação de antígenos é potencializada. Este tipo celular expressa baixos níveis de MHC classe II, mas, após tratamento prolongado com IFN- $\gamma$ , esses níveis aumentam. Isto sugere que, em condições inflamatórias, as MSCs podem atuar como potentes células apresentadoras de antígenos (AGGARWAL e PITTENGER, 2005; NAUTA e FIBBE, 2007; HOOGDUIJN *et al.*, 2010).

Entre outras propriedades, as MSCs foram associadas à capacidade de retardo na apoptose de neutrófilos ativados e em repouso, por meio de um mecanismo mediado pela IL-6, que não requer contato célula-célula. A apoptose tardia de neutrófilos foi associada com a baixa regulação da produção de espécies reativas de oxigênio, necessárias para a morte intracelular. Pensa-se que a atividade anti-apoptótica das MSCs em neutrófilos preserva o *pool* de armazenamento destas células nos pulmões e medula óssea, acelerando a liberação de neutrófilos maduros a partir destes sítios, em resposta a uma infecção (TYNDALL e PISTOIA, 2009).

### 3.4.3 Proteína Verde Fluorescente (GFP)

A GFP foi descrita por SHIMOMURA *et al.* (1962) como uma proteína autofluorescente derivada da água-viva bioluminescente *Aequorea victoria*.

IKAWA *et al.* (1995) foram os primeiros pesquisadores a reportar o uso, com sucesso, da GFP em camundongos, pela fusão genética com proteínas destes animais, para biomonitoramento e rastreabilidade. O gene que codifica a GFP é fusionado com o gene que codifica as proteínas endógenas e a quimera resultante é expressa na célula ou organismo de interesse. O resultado ideal é uma proteína de fusão, que mantém as funções e localizações normais das proteínas do hospedeiro, mas que, agora, é fluorescente (TSIEN, 1998). Quando expressa em um sistema heterólogo e iluminada por uma luz apropriada (ultravioleta), a GFP emite fluorescência verde (HADJANTONAKIS e NAGY, 2001), como consequência do cromóforo que se

encontra no centro da molécula, responsável pelas propriedades únicas desta proteína (SANDERS e JACKSON, 2009).

A utilização de células de animais GFP no tratamento de modelos experimentais de injúrias serve para obter-se um rastreamento destas células, após a terapia no animal doente. Considerando que o gene da GFP está integrado no DNA da célula, sua expressão encontra-se presente em todas as células originadas da divisão celular, permanecendo viável e estável após indeterminados períodos mitóticos sem alteração de sua estrutura. No presente estudo, optou-se pelo isolamento de MSCs de animais GFP<sup>+</sup>, para facilitar o rastreamento destas células nos animais GFP<sup>-</sup> que receberam a infusão da terapia de acordo com os grupos ao qual estavam compreendidos.

Atualmente a GFP representa uma alternativa de biomarcação celular não invasiva, para visualização *in vivo* e *in vitro*, que pode ser monitorada em tempo real por ensaios fluorimétricos, de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência (HADJANTONAKIS e NAGY, 2001).

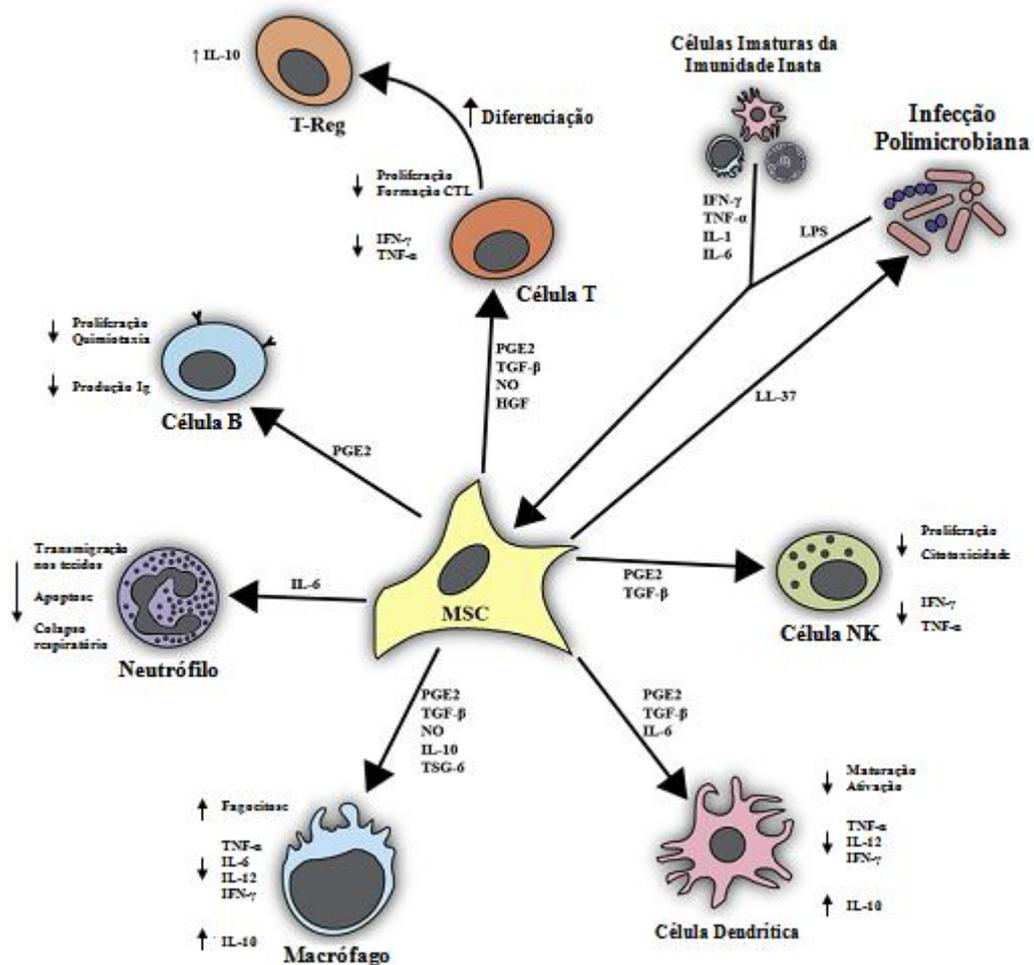
#### 3.4.4 MSCs e a sepse

Diversos estudos com o foco no tratamento da sepse buscaram bloquear seus mediadores específicos, modulando a complexa resposta inflamatória por meio da neutralização de citocinas ou pelo bloqueio de um receptor de uma citocina inflamatória específica. No entanto, estas tentativas, centradas em uma única via, tiveram uma eficácia limitada e a maioria dos ensaios clínicos não foi bem sucedida (RIEDEMANN *et al.*, 2003; SHIN *et al.*, 2013).

As MSCs vêm sendo cada vez mais investigadas para o tratamento de doenças inflamatórias e lesões orgânicas. Evidências sugerem que os mecanismos parácrinos e de depuração bacteriana, bem como as propriedades imunossupressoras e imunomoduladoras deste tipo celular, podem melhorar a sepse experimental (Figura 2), fornecendo a base para o desenvolvimento de uma estratégia potencialmente eficaz para a sepse clínica (ARTIGAS *et al.*, 2012).

O entusiasmo atual ao redor do potencial uso das MSCs para propósitos terapêuticos é derivado de sua baixa imunogenicidade e capacidade de secretar fatores

de crescimento endoteliais, epiteliais e, mais recentemente, peptídeos antimicrobianos (MATSUDA *et al.*, 2012).



**Figura 2** – Mecanismos propostos de imunomodulação das MSCs em resposta ao LPS e citocinas inflamatórias. CTL: célula-T citotóxica; IFN: interferon; IL: interleucina; Ig: imunoglobulina; HGF: fator de crescimento de hepatócito; LPS: lipopolissacarídeo; MSC: célula-tronco mesenquimal; NK: natural killer; NO: óxido nítrico; PGE2: prostaglandina E2; TGF: fator transformador de crescimento; TNF: fator de necrose tumoral; TSG: gene estimulador do fator de necrose tumoral. (adaptado de WANNEMUEHLER *et al.*, 2012).

Fagócitos de roedores e humanos expressam um único peptídeo da família das catelicidinas, uma das principais famílias de peptídeos antimicrobianos em mamíferos. O peptídeo hCAP-18/LL-37 em humanos e Peptídeo Antimicrobiano Relacionado à Catelicidina (CRAMP) em roedores, é produzido principalmente por leucócitos fagocíticos e células epiteliais, expresso também na medula óssea e nas MSCs. A catelicidina é uma proteína armazenada em grânulos, precursora de pro-peptídeos inativos em leucócitos polimorfonucleares e monócitos/macrófagos. Após estimulação, esta proteína é liberada por fagócitos e sua porção C-terminal é processada em

peptídeos ativos, passando a exercer atividade microbicida por meio do rompimento da integridade das membranas bacterianas (BU *et al.*, 2006; KRASNODEMBSKAYA *et al.*, 2010). Estudos recentes sugerem que este tipo de peptídeo, além de possuir atividade antimicrobiana intrínseca, pode, também, iniciar vias de transdução de sinal, após se ligar a tipos celulares, como os mastócitos e, assim, modular as respostas imunes (LI *et al.*, 2009).

NÉMETH *et al.* (2009) encontraram uma redução significativa na concentração das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 no soro de animais tratados com MSCs derivadas da medula óssea, administradas 24 horas antes da cirurgia, por via intravenosa (IV), em modelo de sepse induzida por CLP. A concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 aumentou gradualmente até 12 horas após a administração das células, sugerindo que as MSCs interagem com os monócitos e macrófagos circulantes, reprogramando suas funções, temporariamente. MEI *et al.* (2010), em um modelo semelhante de estudo, porém com administração das MSCs 6 horas após a efetivação da sepse, confirmaram a redução da concentração plasmática das citocinas IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-10, elevadas nos grupos sem tratamento, concluindo que o momento da administração das células é crucial para a análise dos resultados relacionados aos parâmetros inflamatórios.

GONZALEZ-REY *et al.* (2009) e ANDERSON *et al.* (2012), pesquisadores do mesmo grupo, na Espanha, induziram sepse pelo modelo CLP e trataram a doença com MSCs via intraperitoneal (IP). Em ambos os trabalhos, os pesquisadores encontraram, nos grupos tratados, uma diminuição dos níveis séricos das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , aumento dos níveis de IL-10 e redução do infiltrado inflamatório da maioria dos órgãos afetados da cavidade peritoneal. Estes resultados indicam que as MSCs atuam por meio da regulação negativa da resposta inflamatória, demonstrando, também, o papel fundamental da IL-10 na modulação desta resposta. Ademais, os pesquisadores mostraram que os grupos tratados obtiveram menores contagens bacterianas no peritônio, em relação aos grupos não tratados, sugerindo que as MSCs promovem atividades bactericidas *in vivo*, apesar deste fato não ter sido demonstrado *in vitro*.

Os TLRs são moléculas conhecidas por interligar a resposta imune inata à resposta imune adaptativa, atuando como receptores para patógenos invasores

distribuídos em células do sistema imunológico. Além disso, estão envolvidos na patogênese das doenças auto-imunes, nos processos inflamatórios crônicos e nas doenças infecciosas (RAICEVIC *et al.*, 2010). O reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) pelos TLRs, em células residentes no local da inflamação e fagócitos recrutados, inicia uma cascata de sinalização culminando em uma resposta inflamatória local, incluindo a ativação e produção de citocinas e quimiocinas, peptídeos vasoativos, sistema do complemento e espécies reativas de oxigênio (KELLY-SCUMPIA *et al.*, 2011). Sabe-se que as MSCs apresentam TLR, sugerindo que elas podem estar envolvidas nas reações imunes (KRASNODEMBSKAYA *et al.*, 2010).

No nicho de infecção, os microrganismos ou suas toxinas podem estimular as DCs, os macrófagos e os monócitos a produzirem citocinas e quimiocinas inflamatórias capazes de provocar uma resposta pró-inflamatória sistêmica, que logo será contrabalanceada por uma resposta anti-inflamatória compensatória. No predomínio da resposta pró-inflamatória, há inflamação excessiva e aumento da propensão ao desenvolvimento de DMO. Quando há uma abundância da resposta anti-inflamatória, o resultado é um estado de imunossupressão, o que torna o paciente vulnerável a novas complicações infecciosas (BALK, 2004; IVANOVA-TODOROVA *et al.*, 2009).

As MSCs atuam por meio de uma variedade de mecanismos efetores nas células chave do sistema imune inato e adaptativo, principalmente pela modulação do ciclo celular (TYNDALL e PISTOIA, 2009). Portanto, além de sua capacidade de se diferenciar em diversas linhagens celulares e seu interesse clínico em reparação de tecido, as MSCs emergiram como potentes reguladoras da resposta imune (GONZALEZ-REY *et al.*, 2009).

Embora ainda não existam ensaios clínicos em humanos para avaliar o papel das MSCs na sepse, os resultados encontrados na pesquisa experimental com modelos animais sugerem que estas células podem apresentar uma capacidade única na modulação de diversos aspectos da fisiopatologia desta síndrome. Como os modelos animais vêm demonstrando a capacidade das MSCs em suprimir a fase inicial e tardia da sepse, estas células cada vez mais representam uma terapia promissora, mas que ainda requer maiores estudos. A capacidade das MSCs em interagir com o sistema

imune pode representar um novo tratamento dinâmico para o futuro paciente com sepse (WANNEMUEHLER *et al.*, 2012).

### 3.5 Vias de administração

Uma das variáveis importantes que pode definir o sucesso de um transplante de células-tronco é a via de administração, que interfere diretamente no fornecimento eficiente de células para o local de interesse (ZONTA *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2012). A infusão IV tem sido utilizada como primeira escolha na administração de células em um grande número de estudos pré-clínicos e clínicos. No entanto, não se sabe ao certo qual a real concentração celular que alcança a área da lesão neste tipo de abordagem sistêmica (FISCHER *et al.*, 2009; ZONTA *et al.*, 2010).

Tendo como exemplo as doenças tumorais, a via de administração afeta significativamente a indução da resposta sistêmica das células T tumor-específicas e pode ser responsável pela supressão do crescimento de tumores sólidos e metastáticos. Sendo o tropismo por tumores uma característica conhecida das células-tronco, a terapia com estas células por via IV facilita sua migração em direção aos tumores metastáticos, inibindo seu crescimento de forma mais eficiente do que quando injetadas por outras vias (SEO *et al.*, 2011).

De acordo com alguns estudos, a infusão IV de MSCs pode modular benéficamente a resposta imune do hospedeiro por meio do estímulo da produção e liberação de IL-10 e pelo aumento da liberação da prostaglandina E<sub>2</sub>, que age sobre receptores de macrófagos (ZHAO *et al.*, 2012). No entanto, FISCHER *et al.* (2009) demonstraram que terapia sistêmica de células-tronco não produz o número suficiente de células para atingir o órgão de interesse, pois a maioria das células injetadas migra em direção aos pulmões no momento de sua administração (FISCHER *et al.*, 2009). Devido o tamanho das MSCs (20µm), grande parte das células injetadas por via IV permanece presa nos filtros dos capilares dos pulmões (ZONTA *et al.*, 2010) enquanto que outra fração de células é gradualmente transferida para o fígado, baço, rim e medula óssea em um período de 48h (FISCHER *et al.*, 2009).

Desta forma, acredita-se que a captura pulmonar inicial das MSCs pode alterar sua capacidade de migrar para o tecido de interesse, levando a um acúmulo celular não

específico em outros sistemas. Embora significativamente mais elevado, o número de células que alcançam a circulação arterial representa apenas uma pequena fração da quantidade originalmente administrada (FISCHER *et al.*, 2009).

Definir a forma mais adequada para permitir que as MSCs atuem no local do dano tecidual tornou-se um ponto chave na investigação do uso destas células como terapia. Considerando que a capacidade das MSCs de recircular é extremamente enfraquecida pela microcirculação e que, em outros locais pode ocorrer perda de função ou ativação da inflamação, diversos estudos têm relatado os efeitos benéficos destas células quando injetadas diretamente na região lesada (ZONTA *et al.*, 2010). No entanto, a injeção local de células concentradas pode ter efeitos indesejáveis, como o aumento dos riscos e efeitos colaterais, hemorragia e lesões teciduais (ZONTA *et al.*, 2010; HERBERTS *et al.*, 2011). As células concentradas podem formar agregados, principalmente quando reduzidas por passagens através de pequenas agulhas, que podem causar embolia pulmonar ou infartos após a infusão (HERBERTS *et al.*, 2011).

CASTELO-BRANCO *et al.* (2012) delinearão pela primeira vez a migração das MSCs para locais de inflamação e sua distribuição diferencial rota-dependente, além de verificar o estabelecimento destas células no interior do tecido do cólon. No estudo, foi concluído que as MSCs administradas por via IV acumulam-se rapidamente nos pulmões, fígado e outros órgãos, sem evidência de migração para o cólon. Ademais, o referido trabalho foi o primeiro a detalhar o caminho das MSCs injetadas via IP, que se acumularam no revestimento peritoneal do cólon inflamado e atravessaram a parede intestinal para o lado luminal.

A administração IV e IP de MSCs é eficaz devido à sua capacidade de migrar para os tecidos lesionados em resposta a gradientes quimiotáticos (WANNEMUEHLER *et al.*, 2012). O estudo de WEIL *et al.* (2011) demonstrou que as MSCs injetadas por via IV migram com maior afinidade para o pulmão e fígado após endotoxemia induzida por LPS, enquanto que o estudo de NÉMETH *et al.* (2009) demonstrou maior concentração de MSCs no pulmão, rim e baço, em resposta à sepse polimicrobiana. A capacidade de migrar para diversos locais de lesão torna as MSCs particularmente atraentes para o tratamento da DMO observada na sepse (WANNEMUEHLER *et al.*, 2012).

O mecanismo subjacente à migração das MSCs ainda precisa ser esclarecido. Dados sugerem que tanto as quimiocinas com seus receptores quanto as moléculas de adesão podem estar envolvidos nestes mecanismos. Não está claro para onde as células-tronco transplantadas migram após sua infusão bem como os riscos associados com sua distribuição em tecidos indesejados (HERBERTS *et al.*, 2011). Alguns pesquisadores acreditam que os efeitos imunomoduladores das células-tronco e outros efeitos benéficos sobre a homeostase do receptor podem estar mais relacionados com a capacidade de migração e sinalização parácrina destas células do que com quaisquer efeitos diretos com a via de administração (WANNEMUEHLER *et al.*, 2012).

Portanto, permanece ainda a necessidade de uma melhor compreensão sobre como as MSCs alcançam os benefícios terapêuticos observados e qual o destino destas células após o transplante. Para que se alcance estas respostas, é necessário o conhecimento de algumas variáveis relacionadas às células, como os métodos de marcação e rastreamento, protocolos de administração e tempo de transplante após a lesão tecidual. Além disso, a má interpretação dos resultados de microscopia pode dificultar os resultados analisados (LEIKER *et al.*, 2008).

Com isto, torna-se crucial elucidar os mecanismos que explicam as diferenças entre os efeitos das células-tronco aplicadas como terapia por meio de diferentes rotas de administração (ZHAO *et al.*, 2012).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais experimentais

Foram utilizados 98 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57Bl/6, machos, provenientes de biotérios cadastrados junto à Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA).

Para a padronização do modelo experimental, foram utilizados 31 animais, com idade variando entre 11 e 13 semanas e massa corporal entre 21 e 28 gramas.

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 60 animais, com idade variando entre 10 e 12 semanas e massa corporal entre 22 e 30 gramas. Devido à severidade do procedimento cirúrgico, obteve-se uma perda de 13,5% (oito animais) no número de animais no período trans-operatório.

Para o isolamento das células, foram utilizados sete animais, transgênicos, expressando a proteína GFP, com idade variando entre cinco e oito semanas.

Na UEA, os animais receberam água e ração comercial<sup>1</sup> *ad libitum*, foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e passaram por um período de adaptação de, pelo menos, 10 dias, antes de seu manuseio.

Os animais foram mantidos e manipulados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), de acordo com a Lei 11.794, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais. Este projeto foi avaliado e aprovado pela comissão científica do HCPA, onde está cadastrado sob protocolo número 11-0195.

### 4.2 Procedimento cirúrgico

#### 4.2.1 Estabelecimento do modelo CLP

##### 4.2.1.1 CLP com semi-oclusão do ceco

---

<sup>1</sup> Nuvilab, Nuvital, Brasil.

O experimento inicial teve como objetivo a investigação da sobrevida de seis animais submetidos à indução da sepse por meio de semi-oclusão e perfuração do ceco repetidas vezes, com agulhas de diferentes calibres.

O segundo experimento teve como finalidade a análise de parâmetros hematológicos e histológicos. Para isso, 14 animais foram submetidos à indução da sepse por meio de semi-oclusão e perfuração do ceco em três diferentes pontos, com agulha de calibre 26G.

O terceiro experimento destinou-se à análise da sobrevida de seis animais submetidos à indução da sepse por meio de semi-oclusão e perfuração do ceco apenas uma vez, com agulha de calibre 18G.

#### 4.2.1.2 CLP com oclusão total do ceco

A padronização do modelo teve como propósito a avaliação da sobrevida de cinco animais submetidos à indução da sepse pelo modelo CLP, com oclusão total e perfuração do ceco em apenas um local com agulha de calibre 18G.

#### 4.2.2 Procedimento anestésico

Inicialmente, os camundongos foram aleatoriamente pesados. A indução anestésica foi efetuada e mantida por meio de máscara com isoflurano<sup>2</sup>, em vaporizador universal ao efeito com oxigênio 100%, até o animal apresentar perda da consciência e dos reflexos. Em seguida, os animais foram pré-medicados com dose única de cloridrato de tramadol<sup>3</sup> (10mg.kg<sup>-1</sup>) por via intramuscular (IM).

Com os animais anestesiados, foi realizada a tricotomia da região abdominal com o intuito de reduzir a contaminação por bactérias cutâneas e exógenas.

No transoperatório, os animais foram monitorados quanto à ausência de reflexo interdigital e da cauda e pelo padrão de ventilação. A temperatura corporal foi mantida por meio de colchonete térmico.

---

<sup>2</sup> Isoflurano 100%, Instituto Biochimico, Brasil.

<sup>3</sup> Cloridrato de Tramadol, Cristália, Brasil.

#### 4.2.3 Indução da sepse

O animal foi posicionado em decúbito dorsal com os membros fixados ao colchonete térmico por meio de fitas adesivas e a antissepsia da pele foi realizada com álcool 70° INPM.

Procedeu-se uma laparotomia retroumbilical na linha média, com incisão longitudinal de, aproximadamente, 1cm, para permitir a exposição do ceco com intestino adjacente.

O ceco foi totalmente ocluído a uma distância de 25% da base e 75% do polo distal, na região próxima à válvula ileocecal, para preservação do trânsito intestinal, com fio de seda 3-0<sup>4</sup>. Em seguida, o órgão foi perfurado em um único ponto, na região do polo distal, com agulha de calibre 18G e conteúdo fecal foi extravasado para a cavidade por meio de compressão cecal, facilitando o estabelecimento da infecção (Figura 3).

O ceco foi reintroduzido e a cavidade abdominal suturada em duas camadas com fio de nylon 5-0<sup>5</sup>, por meio de ponto Sultan na musculatura e isolado simples na pele. O animal recebeu 300µl de solução salina<sup>6</sup> pré-aquecida, via subcutânea (SC), para reequilíbrio eletrolítico.

O animal “falso” operado (sham) foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, não sofrendo, contudo, oclusão e perfuração no ceco, sendo utilizado como controle negativo da cirurgia.

Após a recuperação anestésica, os animais foram acondicionados em caixa de polipropileno<sup>7</sup>, juntamente com outros do mesmo grupo, com maravalha<sup>8</sup> limpa e livre acesso à ração e água. Após 24 horas da cirurgia, os animais foram eutanasiados para coleta das amostras e posterior análise.

---

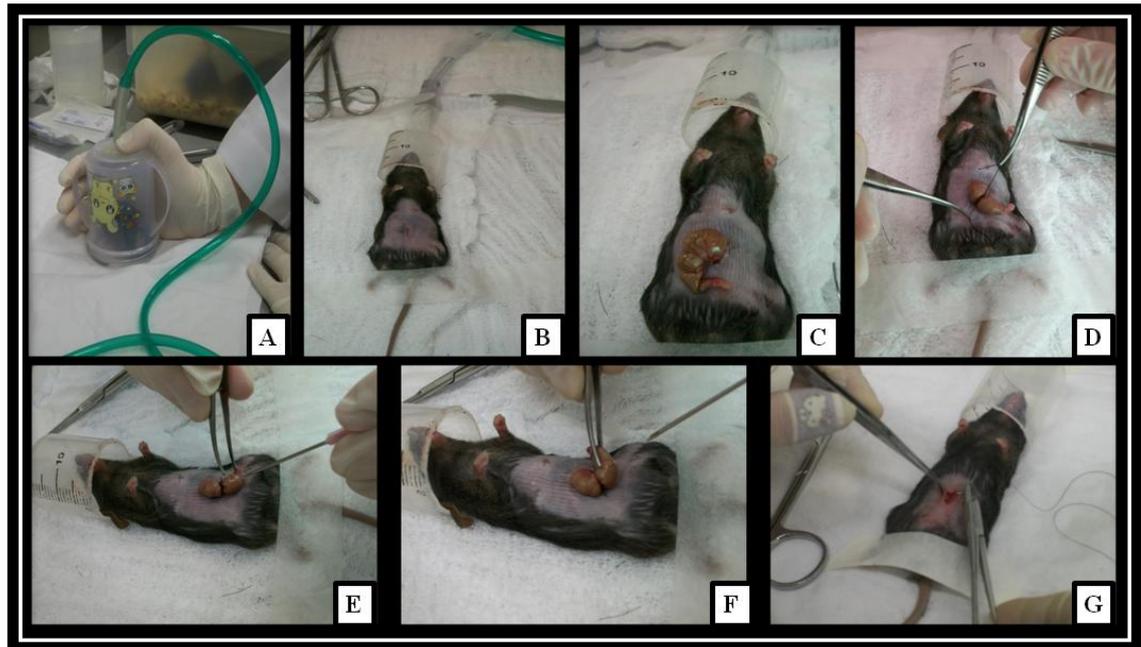
<sup>4</sup> Fio Seda 3-0, Paramed, Brasil.

<sup>5</sup> NylPoint 5-0, Point Suture, Brasil.

<sup>6</sup> Cloreto de Sódio 0,9%, Baxter, Brasil.

<sup>7</sup> Gaiola de camundongos, Beiramar, Brasil.

<sup>8</sup> Maravalha, VetSul, Brasil.



**Figura 3** – Modelo CLP estabelecido. (A-B) indução anestésica por meio de máscara com isoflurano; (C) exposição do ceco após laparotomia; (D) oclusão total do ceco com fio de seda 3-0; (E) punctura única do ceco com agulha de calibre 18G. (F) compressão cecal para extravasamento do conteúdo fecal; (G) sutura da cavidade abdominal com fio de nylon 5-0.

#### 4.2.4 Cultura do baço

Os baços de oito animais (um controle, três sham, três sepse e um sepse tratado) foram coletados para realização de cultura bacteriana (Figura 4), a fim de comprovação da indução da sepse.

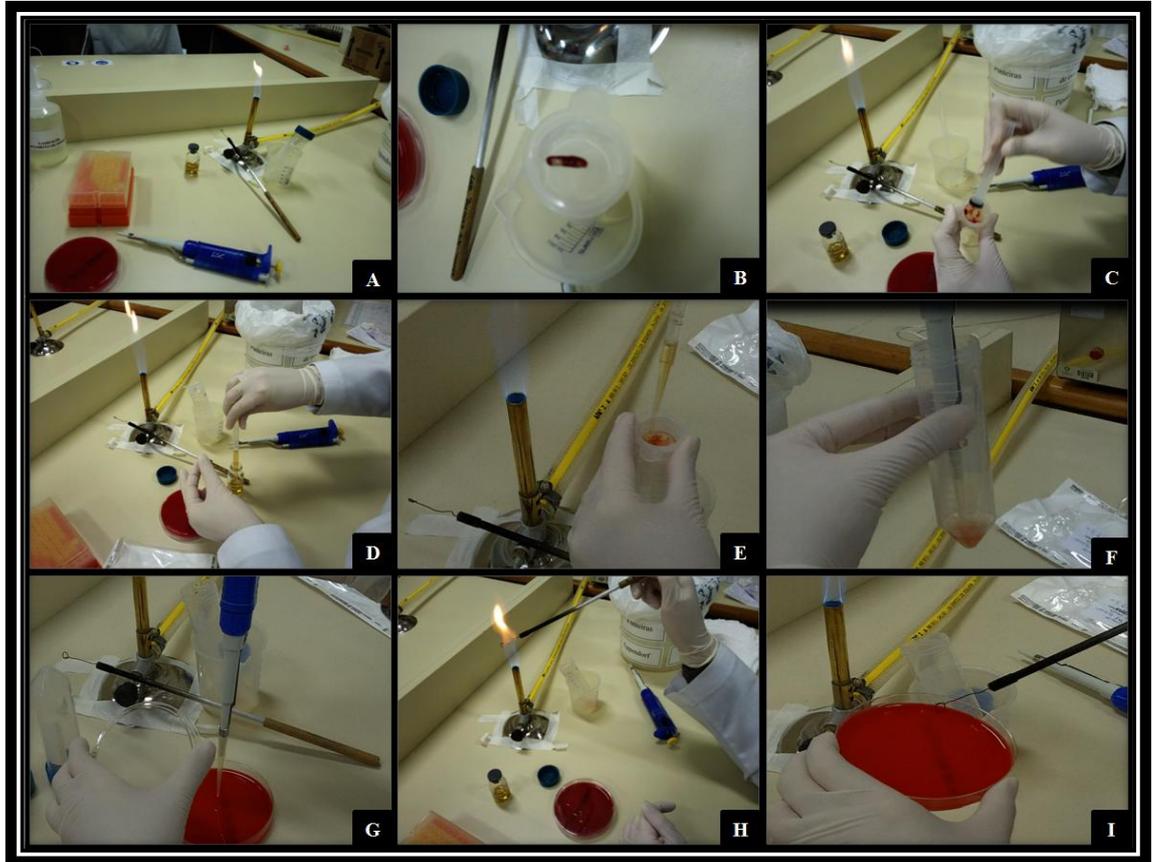
Após a retirada do órgão, este foi imediatamente acondicionado em um tubo *falcon* de 50ml. O tubo foi manuseado em bancada provida de bico de *Bunsen* para manutenção das condições estéreis do procedimento.

O baço foi transferido do tubo para o interior de um filtro de 70 $\mu$ m, apoiado em outro tubo *falcon* de 50ml, estéril. Com o auxílio do êmbolo de uma seringa, o órgão foi macerado com a adição de pequenas quantidades de caldo TSB<sup>9</sup>. O conteúdo líquido resultante deste processo foi transferido para uma placa de Petri contendo meio de cultura ágar-sangue<sup>10</sup> (triptcase soja + 5% sangue de carneiro) pelo método de esgotamento de alça.

<sup>9</sup> Hemoprov I, NewProv, Brasil.

<sup>10</sup> Placa Agar-sangue, BioMérieux, França.

As placas foram mantidas em estufa a  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Em seguida, procedeu-se a leitura dos resultados para detecção da presença ou ausência de microrganismos.



**Figura 4** – Coleta do baço para realização de cultura bacteriana. (A) preparo do material em bancada com bico de *Bunsen*; (B) baço depositado no interior de um filtro de  $70\mu\text{m}$ ; (C) maceração do baço com auxílio de um êmbolo; (D-E) adição de caldo TSB; (F) coleta do conteúdo líquido resultante do processo de maceração; (G) transferência do material para uma placa de Petri com ágar-sangue; (H) flambagem da alça de platina; (I) semeadura da amostra por esgotamento de alça.

### 4.3 Obtenção das MSCs

#### 4.3.1 Coleta do tecido adiposo

Sete camundongos foram sacrificados em câmara de gás  $\text{CO}_2$  e a gordura gonadal foi retirada e acondicionada imediatamente em um único tubo *falcon* de 15ml, contendo solução antibiótica de penicilina-estreptomicina<sup>11</sup> (PS) diluída em PBS<sup>12</sup>, na concentração de 1%.

<sup>11</sup> Penicillin Streptomycin, Gibco/Invitrogen, EUA.

<sup>12</sup> Tampão PBS, Laborclin, Brasil.

#### 4.3.2 Isolamento das MSCs

Em cabine de fluxo laminar vertical, o excesso da solução do *falcon* foi retirado e a gordura coletada foi transferida para uma placa de Petri para, em seguida, ser fracionada com auxílio de uma lâmina de bisturi.

Após o fracionamento, o tecido foi transferido para um tubo *falcon* de 15ml, estéril, ao qual foi adicionado 1ml de solução de colagenase<sup>13</sup> (1mg.mL<sup>-1</sup> em meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium<sup>14</sup> (DMEM) contendo baixa concentração de glicose, suplementado com 10mM HEPES<sup>15</sup>), para cada grama de tecido. Esta solução permaneceu incubada a 37°C por 30 minutos para digestão tecidual.

Após a incubação, a enzima foi inativada pela adição de meio DMEM (suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino<sup>16</sup> (SFB) e 1% de PS) na proporção de 3:1 e o material foi centrifugado por 10 minutos a 600xg. A seguir, o sobrenadante (fração adiposa) foi desprezado e o *pellet* formado (fração estromal) foi ressuspenso em 1ml de meio DMEM 20% SFB.

A suspensão celular foi plaqueada em quatro poços de uma placa de poliestireno de seis poços, aos quais foram adicionados 3ml de meio DMEM 20% SFB. A placa foi armazenada a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade.

Transcorridas 24h de cultivo, as células foram lavadas com PBS e meio de cultura fresco foi adicionado. A cultura celular foi repicada sempre que atingia cerca de 80% de confluência, com a utilização de solução de 0,05% de tripsina-EDTA<sup>17</sup>.

#### 4.3.3 Congelamento das MSCs

Quando as células, em terceira passagem, atingiram cerca de 80% de confluência, em frascos de poliestireno com área de 75cm<sup>2</sup> e capacidade de 270ml (T75), foram submetidas ao processo de congelamento.

---

<sup>13</sup> Collagenase Type I, Gibco/Invitrogen, EUA.

<sup>14</sup> Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, EUA.

<sup>15</sup> HEPES, Sigma, EUA.

<sup>16</sup> Fetal Bovine Serum, Gibco/Invitrogen, América do Sul.

<sup>17</sup> Trypsin-EDTA, Gibco, Canadá.

Para o congelamento, foi retirado todo o meio de cultivo do frasco e adicionado PBS para lavagem das células. Em seguida, as células foram enzimaticamente removidas da superfície com a adição de 2ml de tripsina-EDTA e incubadas a 37°C por 5 minutos, para promoção da atividade da enzima.

Após a confirmação da desagregação celular por meio da observação em microscópio ótico, foram acrescentados 4ml de meio DMEM 20% SFB, para inativação da ação da tripsina. O conteúdo total do frasco foi homogeneizado e transferido para um tubo *falcon* de 15ml, ao qual foi adicionado 3ml de meio DMEM 20% SFB. O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 1500rpm e, em seguida, o sobrenadante foi descartado.

O *pellet* resultante foi ressuspensionado em 1ml de solução de SFB suplementado com 10% de dimetilsulfóxido<sup>18</sup> (DMSO). O conteúdo foi transferido para um tubo criogênico e imediatamente armazenado em freezer -80°C.

#### 4.3.4 Descongelamento das MSCs

Cerca de 30 dias antes do transplante, as células foram descongeladas e expandidas. Para isso, todo o conteúdo do tubo criogênico foi transferido para um frasco de cultura de células de poliestireno com área de 25cm<sup>2</sup> e capacidade de 60ml (T25) contendo 5ml de meio DMEM 20% SFB.

As células foram armazenadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade. A cultura celular foi repicada sempre que atingia cerca de 80% de confluência.

#### 4.3.5 Caracterização das MSCs

De acordo com o Consenso publicado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI *et al.*, 2006), as MSCs foram caracterizadas por sua capacidade de diferenciação *in vitro* em tecidos da mesoderme.

Foram realizados três diferentes ensaios para indução da diferenciação das MSCs em linhagens adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas.

---

<sup>18</sup> Dimethyl Sulfoxide, Sigma, França.

Para isto, as células foram plaqueadas em placa de poliestireno de 24 poços, na concentração de  $9,5 \times 10^3$  cél/poço e cultivadas por 24 horas em meio DMEM 20% SFB. Após este período, o meio foi retirado e, nos poços controle, acrescentou-se meio DMEM 10% SFB. Nos poços destinados à indução da diferenciação adipogênica, pipetou-se meio DMEM 10% SFB suplementado com dexametasona<sup>19</sup>  $10^{-8}$ M, 2,5µg/ml de insulina<sup>20</sup> e indometacina<sup>21</sup> 100µm. Para indução da diferenciação em condrócitos, foi colocado meio DMEM 10% SFB acrescido de ácido ascórbico 2-fosfato<sup>22</sup> 50nM, 6,25µg/ml de insulina e 10ng/ml de TGF-β1<sup>23</sup>. Para indução da diferenciação osteogênica, utilizou-se meio DMEM 10% SFB acrescido de β-Glicerofosfato<sup>24</sup> 10mM/L, dexametasona  $10^{-8}$ M e 5µg/µL de ácido ascórbico 2-fosfato.

Os poços destinados às diferenciações e seus respectivos controles tiveram seus meios trocados 2x por semana até o momento da coloração específica.

Após 21 dias do plaqueamento, foi realizada a detecção das diferenciações. Para isso, retirou-se todo o meio de cultura dos poços e estes foram lavados com PBS e fixados com paraformaldeído<sup>25</sup> 4% por 15 minutos à temperatura ambiente (TA). Transcorrido o tempo de incubação, estes poços foram lavados com água destilada estéril. Em seguida, foi acrescentado em todos os poços, por 5 minutos, o corante Oil Red O<sup>26</sup>, filtrado, para detecção da diferenciação adipogênica, o corante Azul de Alcian<sup>27</sup> para diferenciação condrogênica e o corante Vermelho de Alizarina<sup>28</sup>, filtrado, para detecção da diferenciação em osteócitos. Após a retirada dos corantes, os poços foram lavados com água destilada estéril.

O corante Oil Red O tem a propriedade de corar os vacúolos de gordura. O corante Azul de Alcian possui afinidade pelos grupos aniônicos presentes nos glicosaminoglicanos da matriz extracelular e o corante Vermelho de Alizarina cora os nódulos de mineralização presentes na matriz extracelular.

---

<sup>19</sup> Dexamethasone, Sigma, China.

<sup>20</sup> Insulina Humana, Lilly, EUA.

<sup>21</sup> Indomethacin, Sigma, China.

<sup>22</sup> L-Ascorbic acid 2-phosphate, Sigma, Japão.

<sup>23</sup> Transforming Growth Factor – β1, Sigma, EUA.

<sup>24</sup> B-glycerol phosphate disodium salt pentahydrate, Sigma, Alemanha.

<sup>25</sup> Paraformaldeído P.A., Synth, Brasil.

<sup>26</sup> Oil Red O, Sigma, EUA.

<sup>27</sup> Azul de Alcian, Vetec, Brasil.

<sup>28</sup> Alizarin Red S, Sigma, China.

## 4.4 Procedimentos terapêuticos

### 4.4.1 Grupos

Os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em nove grupos perfazendo um total de cinco animais por grupo, de acordo com a tabela 2.

**Tabela 2** - Representação dos grupos experimentais

NÚMERO	GRUPO	TRATAMENTO	VIAS DE ADMINISTRAÇÃO	QUANTIDADE DE ANIMAIS
1	CONTROLE	-----	-----	5
2	SEPSE	-----	-----	5
3	SHAM	-----	-----	5
4	SEPSE	PBS	INTRAVENOSA	5
5	SHAM	PBS	INTRAVENOSA	5
6	SHAM	MSCs	INTRAVENOSA	5
7	SHAM	MSCs	INTRAPERITONEAL	5
8	SEPSE	MSCs	INTRAPERITONEAL	5
9	SEPSE	MSCs	INTRAVENOSA	5
<b>TOTAL DE ANIMAIS</b>				<b>45</b>

Seis horas após a cirurgia, os animais receberam os tratamentos de acordo com o grupo que compunham:

**1. Grupo controle:** Saudável; não foi submetido ao procedimento cirúrgico; não recebeu posterior administração de PBS ou MSCs.

**2. Grupo sepse sem tratamento:** Submetido à indução da sepse; não recebeu posterior administração de PBS ou MSCs.

**3. Grupo sham sem tratamento:** Submetido ao procedimento cirúrgico sem indução da sepse; não recebeu posterior administração de PBS ou MSCs.

**4. Grupo sepse PBS IV:** Submetido à indução da sepse; recebeu administração de PBS via intravenosa.

**5. Grupo sham PBS IV:** Submetido ao procedimento cirúrgico sem indução da sepse; recebeu administração de PBS via intravenosa.

**6. Grupo sham MSCs IV:** Submetido ao procedimento cirúrgico sem indução da sepse; recebeu administração de MSCs via intravenosa.

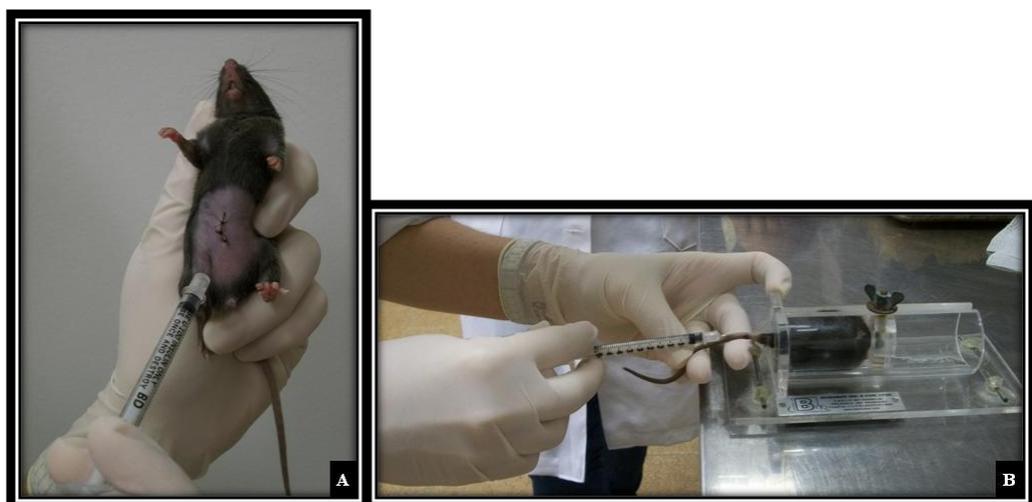
**7. Grupo Sham MSCs IP:** Submetido ao procedimento cirúrgico sem indução da sepse; recebeu administração de MSCs via intraperitoneal.

**8. Grupo Sepse MSCs IP:** Submetido à indução da sepse; recebeu administração de MSCs via intraperitoneal.

**9. Grupo Sepse MSCs IV:** Submetido à indução da sepse; recebeu administração de MSCs via intravenosa.

#### 4.4.2 Tratamento

Transcorridas seis horas do procedimento cirúrgico, os animais, referentes aos grupos destinados a receber tratamento IV, foram contidos em contensor de acrílico para administração de PBS ou MSCs, pela veia da cauda, de acordo com a divisão dos grupos (Figura 5B). Os animais, referentes aos grupos com administração de MSCs IP, foram contidos manualmente para tal finalidade (Figura 5A). Todos os grupos que receberam tratamento o fizeram em um volume final de 120 $\mu$ l, com agulha de calibre 30G e concentração celular de  $7 \times 10^5$  cel/animal.



**Figura 5** – Administração da terapia nos animais; (A) injeção pela via intraperitoneal; (B) injeção pela via intravenosa.

#### 4.4.2.1 Preparo das MSCs

No fluxo laminar, o meio de cultivo de cada T75 foi retirado e as células, em oitava passagem (P8), foram lavadas com PBS. Em seguida, as células foram enzimaticamente removidas da superfície com a adição de 2ml de tripsina-EDTA e incubadas a 37°C por 5 minutos, para promoção da atividade da enzima.

Após a confirmação da desagregação celular por meio de microscópio ótico, a atividade da tripsina foi interrompida com a adição de 4ml de meio DMEM 10%. O conteúdo total do frasco foi transferido para um tubo *falcon* de 15ml.

O tubo foi homogeneizado por inversão e 10µl foram recuperados e transferidos para uma câmara de *Neubauer*<sup>29</sup>, para contagem das células. Após, o volume calculado foi coletado e transferido para outro tubo *falcon* e centrifugado a 2000rpm por 5 minutos. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 120µl de PBS. As células foram transferidas para um microtubo, que foi imediatamente encaminhado para aplicação nos animais.

### 4.5 Obtenção e análise das amostras

#### 4.5.1 Hemograma

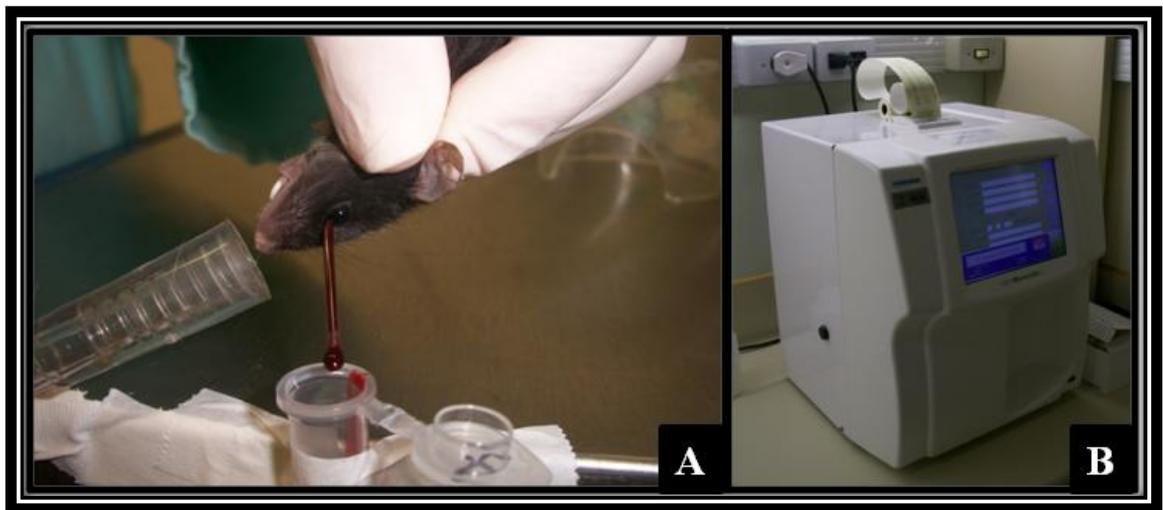
Antes do início do procedimento cirúrgico e 24 horas após, com o animal sob anestesia geral inalatória, procedeu-se a coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital, com auxílio de capilar de vidro (Figura 6A). Cerca de 50µl de sangue foram coletados em microtubo contendo 5µl de solução de PBS-EDTA (20mg.ml<sup>-1</sup>), para avaliação de parâmetros hematológicos. Ademais, cerca de 500µl foram coletados em microtubo sem anticoagulante, para avaliação de parâmetros inflamatórios. Esta última coleta ocorreu somente no período de 24 horas após a cirurgia.

Na avaliação hematológica, os parâmetros: contagem de células brancas (WBC), percentual de linfócitos (LYM%), percentual de monócitos (MON%), percentual de granulócitos (GRA%), contagem de linfócitos (LYM#), contagem de monócitos (MON#), contagem de granulócitos (GRA#), contagem de células vermelhas (RBC),

---

<sup>29</sup> Neubauer Improved, Labor Optik, Reino Unido.

dosagem de hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude da distribuição de células vermelhas (RDW), contagem de plaquetas (PLT), volume plaquetário médio (VPM), plaquetócrito (PCT) e distribuição do volume plaquetário (PDW), foram determinados em até 4 horas após a coleta, por meio de contador automático de células hematológicas<sup>30</sup> (Figura 6B).



**Figura 6** – Análise de parâmetros hematológicos. (A) coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro; (B) contador automático de células hematológicas.

#### 4.5.2 Análise de citocinas

Para avaliação das citocinas, o sangue, coletado sem anticoagulante, foi centrifugado a 7000rpm, durante 20 minutos, 1 hora após a coleta, para obtenção do soro. Após este processo, coletou-se o sobrenadante e o soro foi acondicionado em novos microtubos. As amostras foram conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

Os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-2, IL-6, IL-17A, TNF e IFN e anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 foram determinados por meio de kit comercial<sup>31</sup> e analisadas por citometria de fluxo, de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.5.3 Contagem de leucócitos peritoneais

<sup>30</sup> ABX Micros ES 60, Horiba, Japão.

<sup>31</sup> CBA mouse TH1-TH2-TH17, BD Biosciences, Brasil.

Após a coleta de sangue, realizou-se a antissepsia do abdome com álcool 70° INPM e foi injetado 1ml de Tampão PBS-EDTA 1mM na cavidade peritoneal. O abdome foi massageado, para fins de homogeneização do lavado e a recuperação do conteúdo líquido foi realizada com seringa de 1ml, para contagem global de leucócitos.

O aspirado peritoneal foi acondicionado em microtubo e armazenado a 4°C até o momento da análise. A contagem de células brancas (WBC) foi determinada em até 24 horas após a coleta, por meio de contador automático de células<sup>32</sup>.

Após o procedimento, procedeu-se a eutanásia do animal por meio de deslocamento cervical.

#### 4.5.4 Histologia

Após a finalização humanitária do animal, o ceco, intestino e baço foram retirados e acondicionados em coletor universal estéril, contendo formol tamponado a 10%, para fixação dos tecidos.

Decorridas 48 horas, os órgãos foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Os cortes histológicos do ceco e intestino, com espessura de 4µm, foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), para avaliação global dos cortes de tecido.

As lâminas foram examinadas em microscópio óptico por um observador cego.

#### 4.6 Análise estatística

As variáveis quantitativas sem distribuição normal foram comparadas através do teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações múltiplas não-paramétricas de Dunn. Os dados não-paramétricos foram descritos como mediana e intervalo interquartil.

A análise dos parâmetros hematológicos foi realizada a partir do diferencial dos valores individuais da contagem do tempo 0, antes do procedimento cirúrgico e 24h após, considerando-se, por fim, a mediana entre os grupos.

---

<sup>32</sup> ABX Micros ES 60, Horiba, Japão.

Em todos os testes, o nível de significância adotado foi de 5%. Desta forma, foram consideradas diferenças significantes aquelas cujos valores foram abaixo de 0,05 ( $P < 0,05$ ). As análises foram realizadas através do programa SPSS versão 20.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Modelo experimental

O modelo CLP estabelecido para esta pesquisa, com oclusão total do ceco seguida de uma única punctura com agulha de calibre 18G, mostrou-se apropriado para o estudo da sepse aguda. Este modelo proporcionou significativas alterações histológicas e fisiológicas, conforme descrito na literatura (MAIER *et al.*, 2004; NÉMETH *et al.*, 2009; MEI *et al.*, 2010).

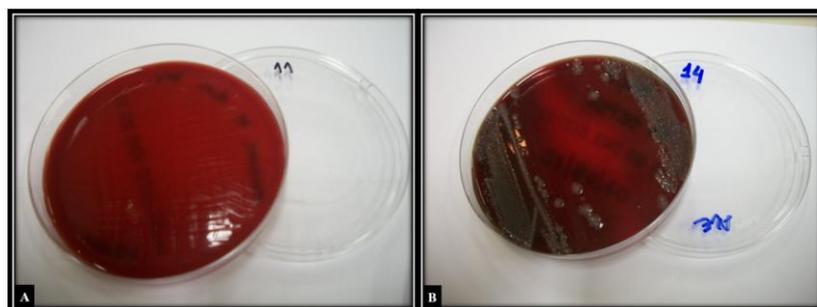
#### 5.1.1 Anestesia e pós-operatório

O protocolo anestésico empregado mostrou-se apropriado para o procedimento cirúrgico, visto que não houve morte de animais no momento da cirurgia. A recuperação pós-operatória dos camundongos, após a suspensão do anestésico volátil, foi rápida e adequada, assim como a analgesia, podendo-se constatar regresso às suas atividades logo que retornavam para a caixa.

Os procedimentos cirúrgicos foram considerados rápidos e de fácil cumprimento, com média de duração de 10 minutos por animal. As etapas anestésicas e cirúrgicas transcorreram sem intercorrências.

#### 5.1.2 Confirmação da indução da sepse

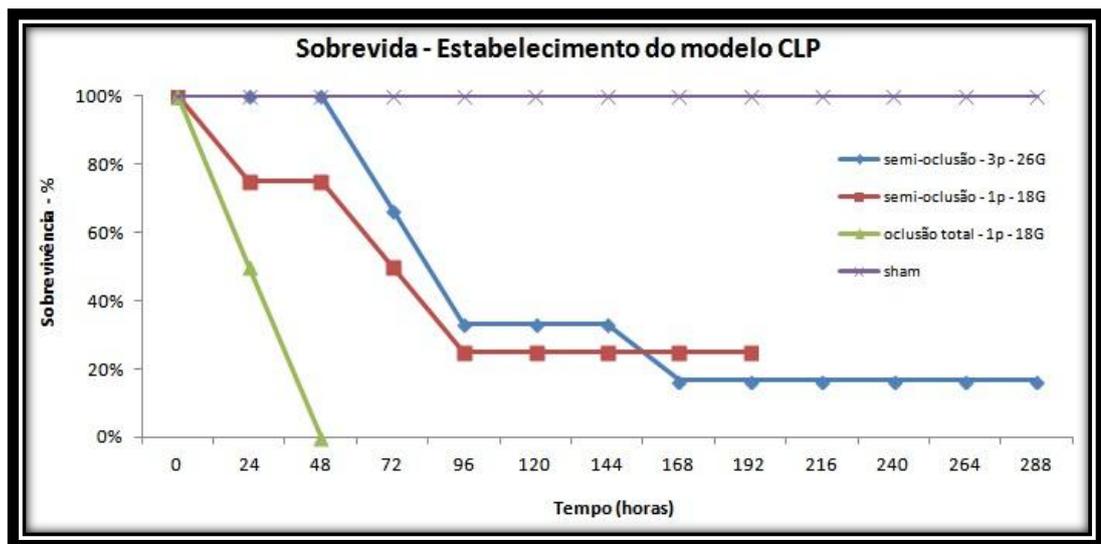
A indução da sepse pelo modelo CLP foi confirmada por cultura bacteriana em placa de Petri contendo meio ágar-sangue, a partir da maceração do baço dos animais (Figura 7).



**Figura 7** – Confirmação da indução da sepse por cultura bacteriana do baço, em placa de Petri contendo ágar-sangue. Cultura de amostras de tecido de animal do grupo sham (A) e animal do grupo sepse (B).

### 5.1.3 Sobrevida

A análise da sobrevida dos animais submetidos às diferentes técnicas cirúrgicas para indução da sepse, pelo modelo CLP, com alterações em diferentes variáveis, demonstram que a oclusão total do ceco, seguida de uma única punctura com agulha de calibre 18G, induz sepse aguda, com 100% de mortalidade em 48 horas (Figura 8). Os animais cujos cecos foram submetidos a semi-occlusão, independente do calibre da agulha e quantidade de puncturas, mantiveram, aproximadamente, a mesma taxa de sobrevivência, alcançando entre 70-80% de mortalidade em um período de quatro dias. Contudo, não foram encontradas alterações histológicas em nenhum órgão estudado dos animais destes grupos, bem como diferenças significativas nos parâmetros hematológicos destes animais. O grupo SHAM foi utilizado como controle da cirurgia e permaneceu com 100% de taxa de sobrevivência durante todo o experimento.



**Figura 8** – Análise da sobrevida dos animais submetidos às diferentes técnicas cirúrgicas para indução de sepse aguda. Os experimentos com: semi-occlusão e três puncturas com agulha 26G (n=14), semi-occlusão e uma punctura com agulha 18G (n=6) e oclusão total e uma punctura com agulha 18G (n=5), no ceco, resultaram em uma taxa de sobrevivência de, aproximadamente, 20% em sete dias, 20% em quatro dias e 0% em dois dias, respectivamente; o grupo sham resultou em 100% de sobrevivência durante todo o experimento; n=6/grupo.

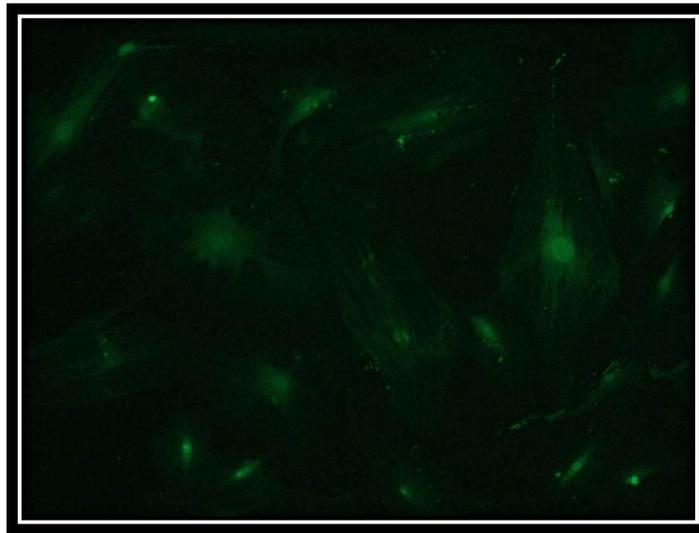
## 5.2 Mortalidade

Durante os experimentos, foram perdidos oito animais. Seis camundongos foram a óbito nas primeiras horas após a indução da sepse, devido à severidade da doença. Outros dois camundongos foram a óbito no momento da administração de PBS e MSCs

via IV, com possível razão de estas substâncias terem sido injetadas com maior velocidade do que fisiologicamente recomendado, resultando em embolia.

### 5.3 Cultivo das MSCs

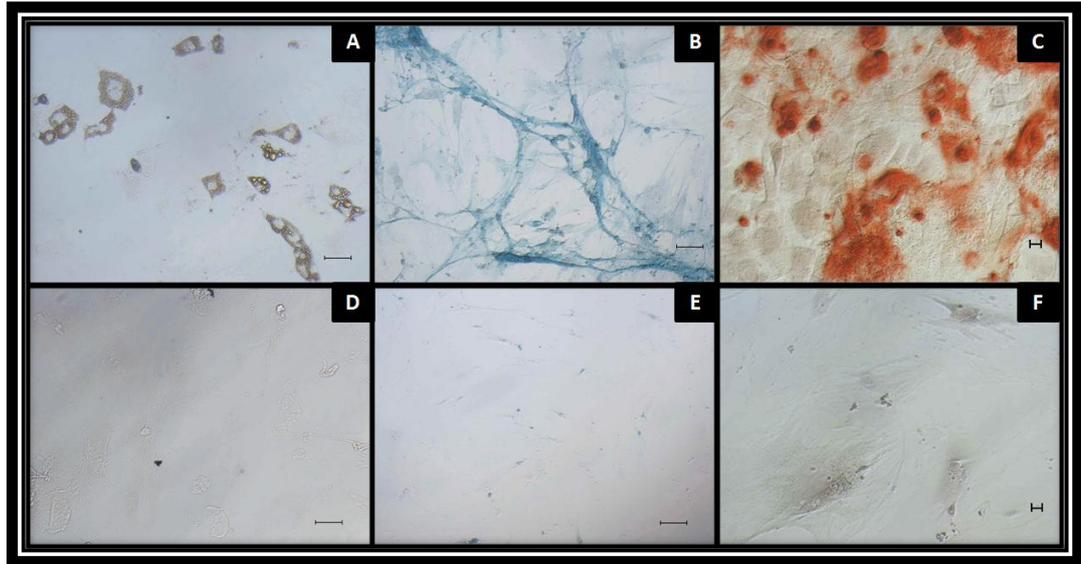
A cultura celular apresentou confluência de 80% em 72 horas. Após o descongelamento, as células apresentaram-se viáveis. Na data prevista, foram transplantadas células em oitava passagem (Figura 9), na concentração de  $7 \times 10^5$  cél/animal.



**Figura 9** – MSCs de camundongo C57Bl/6 GFP<sup>+</sup>. Células em quinta passagem, visualizadas em microscópio ótico de fluorescência, com pico de emissão captado em 509nm. Aumento de 10x.

### 5.4 Caracterização das MSCs

As MSCs, após ensaios para indução de diferenciação *in vitro*, foram capazes de dar origem a linhagens adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas (Figura 10).

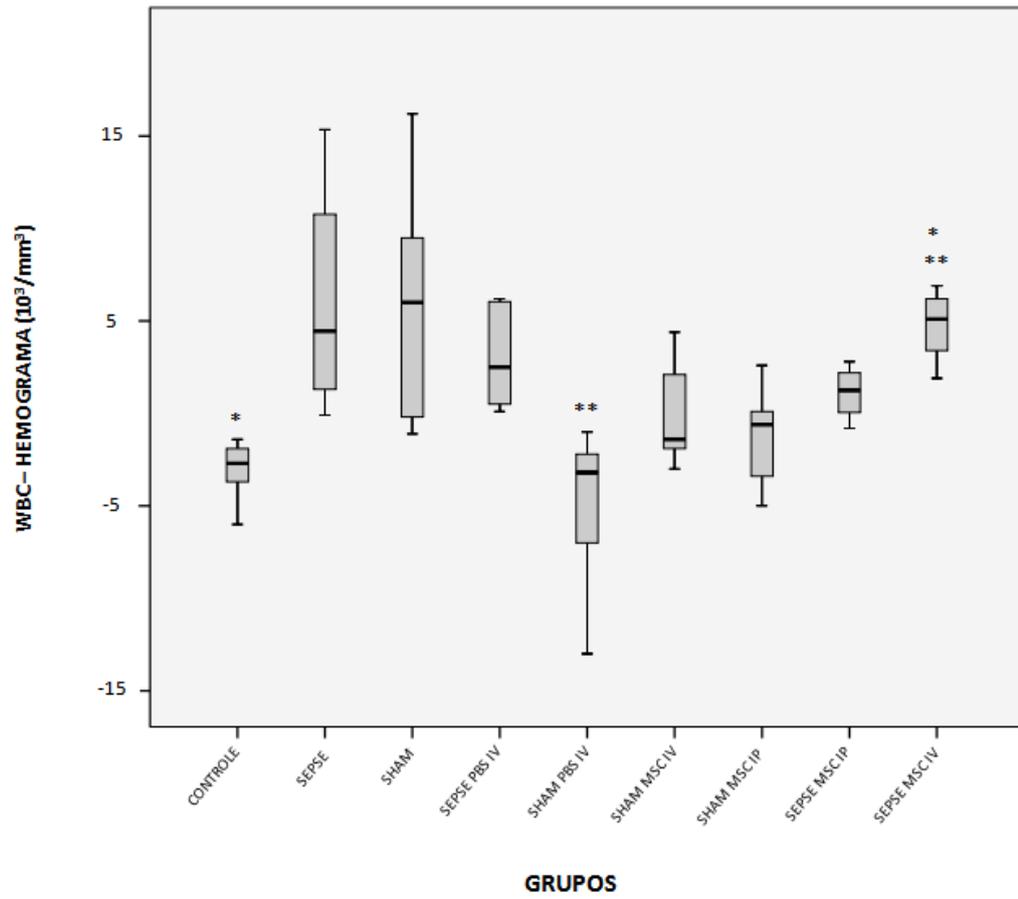


**Figura 10** – Caracterização das MSCs. **(A)** diferenciação adipogênica detectada pela coloração com Oil Red O, em aumento de 20x; **(B)** diferenciação condrogênica detectada pela coloração com Azul de Alcian, em aumento de 10x; **(C)** diferenciação osteogênica detectada pela coloração com Vermelho de Alizarina, em aumento de 20x; **(D-F)** Controles negativos das diferenciações das MSCs em linhagens adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas, respectivamente.

## 5.5 Parâmetros hematológicos

### 5.5.1 Contagem de leucócitos

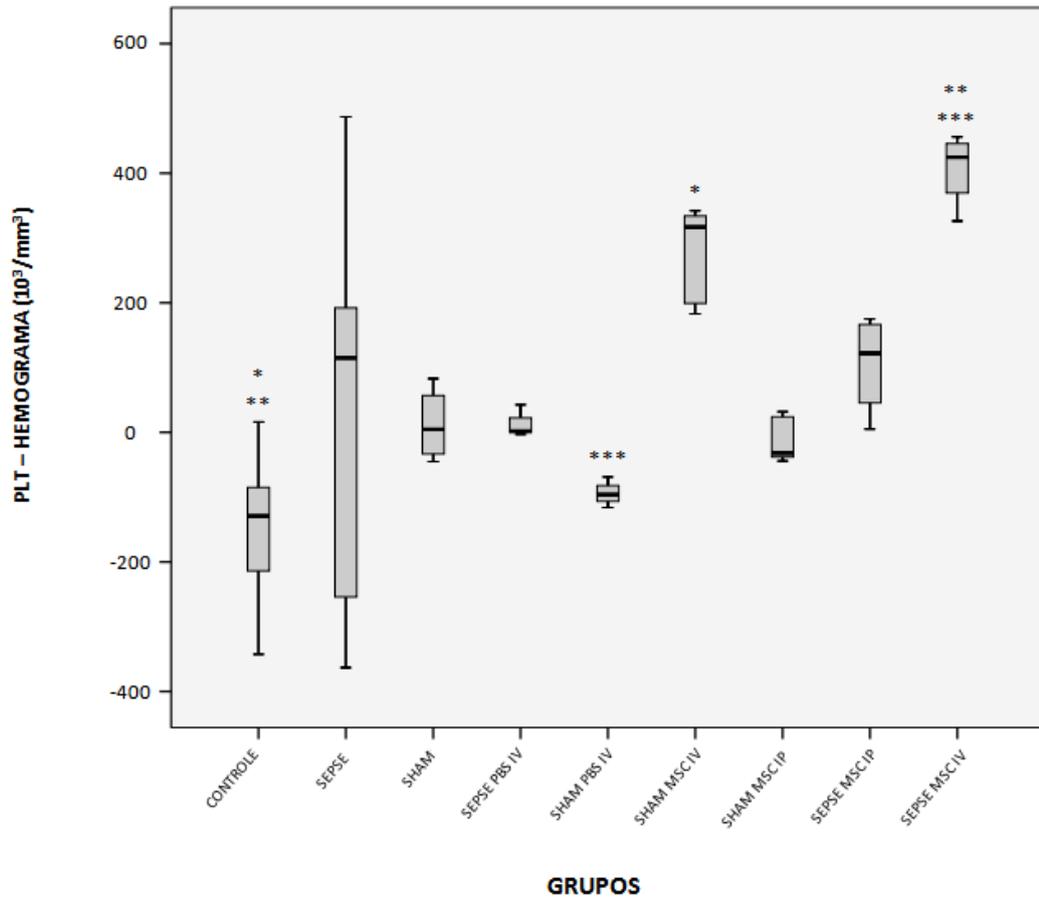
A contagem hematológica de leucócitos apresentou diferença estatística entre o grupo SEPSE MSC IV e os grupos CONTROLE e SHAM PBS IV (Figura 11). No entanto, o grupo SEPSE MSC IP apresentou contagem de WBC semelhante ao grupo CONTROLE e reduzida em comparação ao grupo SEPSE MSC IV, mas esta diminuição não foi significativa. Não houve significância estatística na diferença das medianas obtidas entre os demais grupos.



**Figura 11** – Contagem hematológica de leucócitos (WBC). Os grupos CONTROLE e SHAM PBS IV apresentaram diferença estatística em relação ao grupo SEPSE MSC IV. \* $p=0,045$ ; \*\* $p=0,027$ ;  $n=5$ /grupo.

### 5.5.2 Contagem de plaquetas

O grupo SEPSE MSC IV apresentou alta contagem plaquetária comparada à contagem dos grupos CONTROLE e SHAM PBS IV. O grupo SEPSE MSC IP obteve redução do número de plaquetas circulantes em confronto com o grupo SEPSE MSC IV, mas não foi encontrada significância estatística para este dado. Os grupos CONTROLE e SHAM MSC IV apresentaram diferença estatística entre si (Figura 12). Os demais grupos não demonstraram significância entre a diferença de suas medianas.



**Figura 12** – Contagem hematológica de plaquetas (PLT). Os grupos CONTROLE (n=5) e SHAM PBS IV (n=4) apresentaram significância estatística em relação ao grupo SEPSE MSC IV (n=4). Os grupos CONTROLE e SHAM MSC IV (n=5) apresentaram diferença estatística entre si. \*p=0,026; \*\*p=0,008; \*\*\*p=0,017.

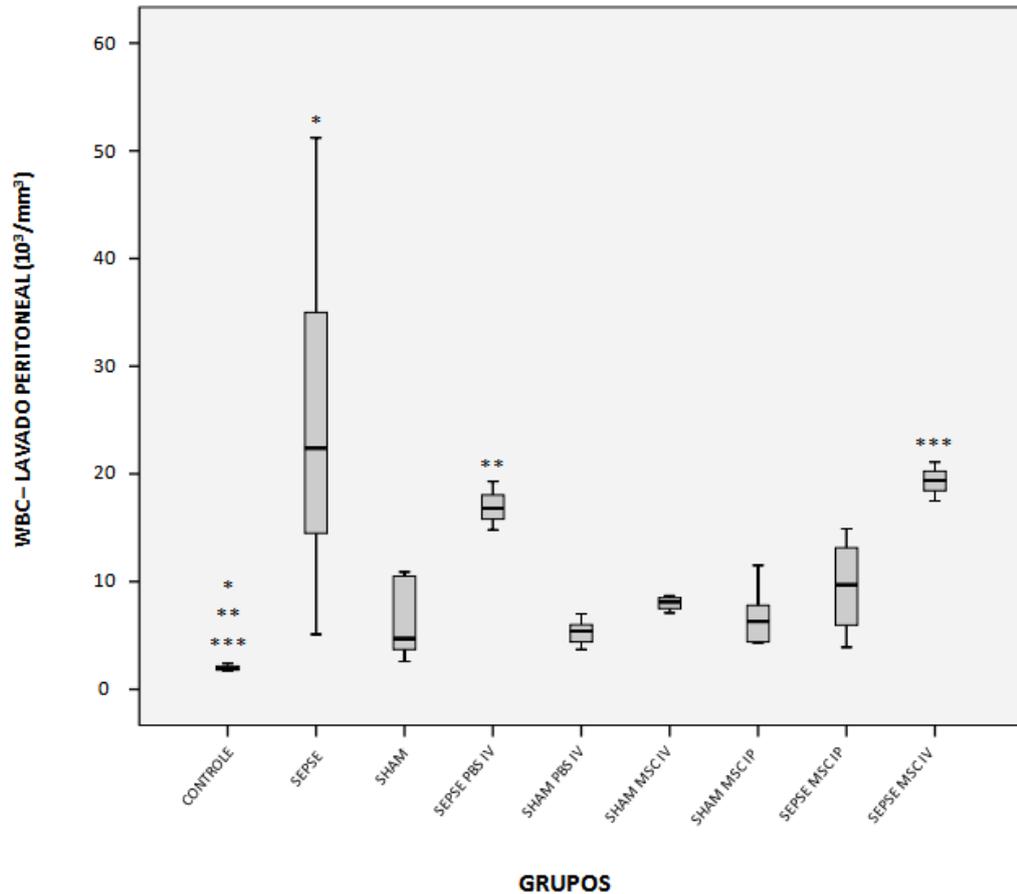
Os demais parâmetros hematológicos analisados não apresentaram alterações significativas entre os grupos.

## 5.6 Lavado peritoneal

### 5.6.1 Contagem de leucócitos

O resultado da análise da contagem de leucócitos no lavado peritoneal dos animais (Figura 13) apontou uma alta quantidade destas células na cavidade abdominal do grupo SEPSE em relação ao grupo CONTROLE. Em contraste, os grupos SEPSE PBS IV e SEPSE MSC IV obtiveram redução nas contagens de células brancas, permanecendo estatisticamente diferentes do grupo CONTROLE (p=0,023 e p=0,008,

respectivamente). O grupo SEPSE MSC IP não apresentou diferença entre os grupos saudáveis. Não houve significância estatística entre os demais grupos.

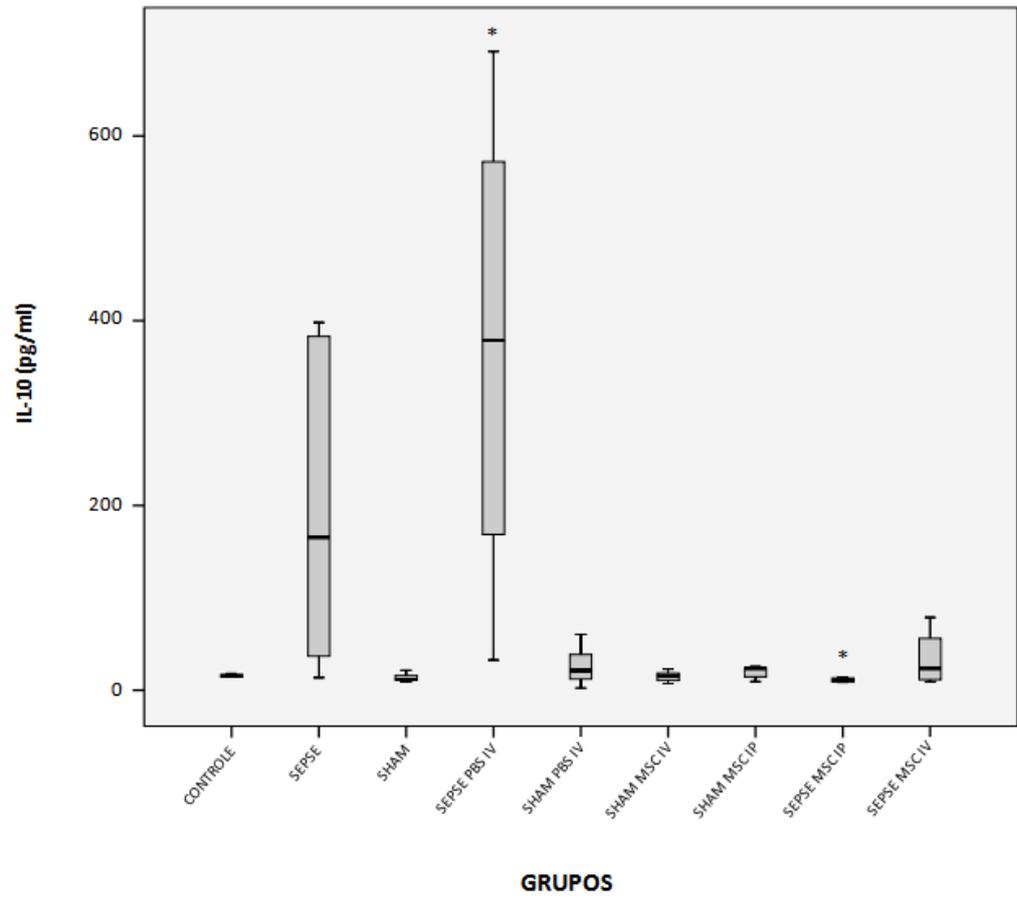


**Figura 13** – Análise dos leucócitos (WBC) no lavado peritoneal. O grupo CONTROLE (n=4) apresentou diferença estatística em relação a três outros grupos: SEPSE (n=6), SEPSE PBS IV (n=3) e SEPSE MSC IV (n=3). \*p=0,001; \*\*p=0,023; \*\*\*p=0,008.

## 5.7 Parâmetros anti e pró-inflamatórios

### 5.7.1 Quantificação sérica de IL-10

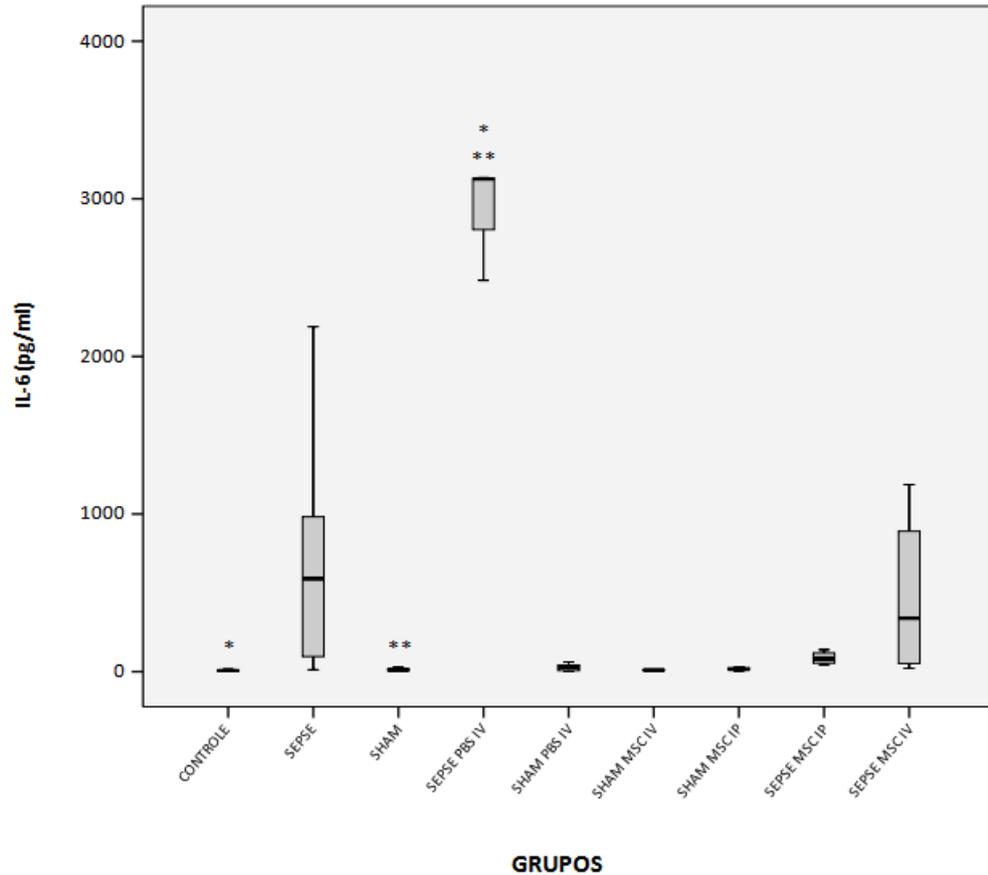
O resultado da análise da concentração da interleucina anti-inflamatória IL-10, demonstra que o grupo SEPSE PBS IP obteve redução nos níveis séricos desta citocina, quando comparado aos demais grupos de animais doentes (SEPSE e SEPSE PBS IV), igualando-se aos níveis basais dos grupos saudáveis, conforme demonstra a figura 14. Além destes, não foi encontrada diferença significativa na concentração sérica de IL-10, quando os dados dos animais dos outros grupos foram comparados.



**Figura 14** – Análise sérica da citocina anti-inflamatória IL-10. O grupo SEPSE MSC IP apresentou redução significativa na concentração sérica de IL-10 em relação ao grupo SEPSE PBS IV. \* $p=0,038$ ;  $n=4$ /grupo.

### 5.7.2 Quantificação sérica de IL-6

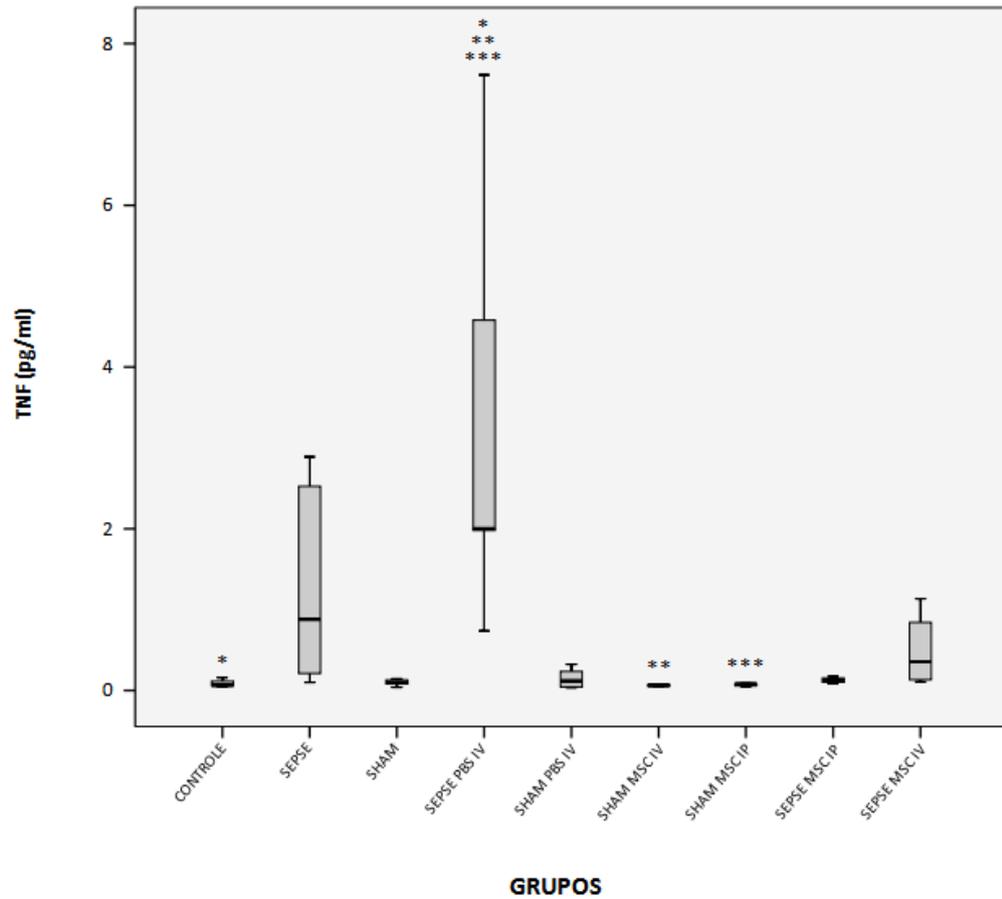
A interleucina pró-inflamatória IL-6 apresentou-se com menores níveis séricos nos animais do grupo SEPSE MSC IP em relação aos demais grupos com sepse sem tratamento (SEPSE e SEPSE PBS IV). O grupo SEPSE PBS IV obteve concentrações de IL-6 estatisticamente maiores em comparação aos grupos CONTROLE e SHAM, conforme representado graficamente na figura 15. Não houve diferença estatística entre os demais grupos.



**Figura 15** – Análise sérica da citocina pró-inflamatória IL-6. O grupo SEPSE PBS IV (n=3) apresentou concentrações séricas de IL-6 significativamente mais elevadas em relação aos grupos CONTROLE (n=5) e SHAM (n=9). \*p=0,017; \*\*p=0,032.

### 5.7.3 Quantificação sérica de TNF- $\alpha$

Em relação ao TNF- $\alpha$ , o grupo SEPSE PBS IV obteve concentrações séricas significativamente maiores quando comparado aos grupos CONTROLE, SHAM MSC IV e SHAM MSC IP. O grupo SEPSE MSC IP apresentou redução nos níveis de TNF- $\alpha$  em relação aos demais grupos com sepse, como demonstrado na figura 16. Não foi encontrada significância estatística entre os demais grupos.



**Figura 16** – Análise sérica da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ . O grupo SEPSE PBS IV (n=5) apresentou níveis aumentados de TNF- $\alpha$  em relação aos grupos CONTROLE (n=6), SHAM MSC IV (n=4) e SHAM MSC IP (n=5). \*p=0,021; \*\*p=0,009; \*\*\*p=0,010.

#### 5.7.4 Dosagem sérica de outras citocinas

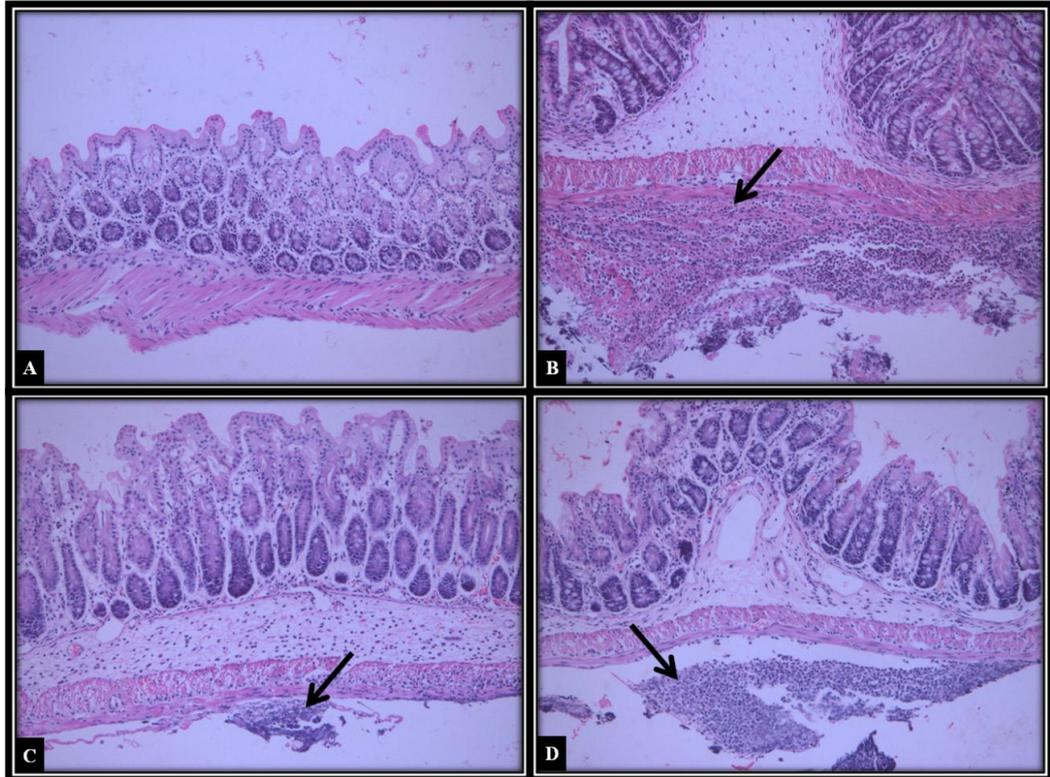
As demais citocinas analisadas, IL-2, IL-4, IL-17A e IFN- $\gamma$  não obtiveram medidas de suas concentrações estatisticamente relevantes entre os grupos. A tabela 3 exibe os resultados das medianas e intervalos interquartis de cada grupo e citocina avaliados.

**Tabela 3** – Concentrações séricas das citocinas IL-2, IL-4, IL-17A e IFN- $\gamma$  sem significado estatístico. Resultados expressos em mediana (q25;q75).

GRUPOS/ CITOCINAS	CONTROLE	SEPSE	SHAM	SEPSE PBS IV	SHAM PBS IV	SHAM MSC IV	SHAM MSC IP	SEPSE MSC IP	SEPSE MSC IV	P
IL-2	1,35 (1,30;-)	2,42 (1,71;2,89)	1,54 (1,31;2,07)	1,54 (1,43;2,56)	2,14 (1,20;5,02)	1,25 (1,19;1,35)	1,51 (1,18;1,69)	1,20 (1,09;1,45)	1,36 (1,17;1,76)	0,05
IL-4	1,66 (1,47;2,55)	1,83 (1,53;2,42)	1,89 (1,52;2,46)	1,53 (1,47;1,55)	1,61 (1,54;3,04)	1,80 (1,63;1,92)	1,94 (1,66;2,22)	1,62 (1,55;1,67)	1,80 (1,56;1,94)	0,334
IL-17A	1,56 (1,11;3,66)	2,03 (1,55;14,2)	1,73 (1,64;5,47)	1,06 (0,91;1,58)	1,33 (0,92;5,34)	1,18 (1,09;1,39)	1,73 (1,22;2,46)	1,43 (1,2;56)	1,76 (1,14;2,49)	0,299
IFN	0,72 (0,61;1,30)	1,28 (0,48;4,79)	0,79 (0,62;2,85)	0,52 (0,46;0,91)	1,39 (0,38;3,57)	0,60 (0,52;0,67)	0,95 (0,55;1,26)	0,70 (0,62;0,78)	0,75 (0,63;0,96)	0,701

### 5.8 Análise histológica

Na análise histológica dos cecos dos animais do grupo SHAM (Figura 17A), observou-se que a arquitetura das camadas mucosa, submucosa e muscular externa permaneceu intacta após a falsa cirurgia, com linfócitos e granulócitos raramente presentes ao redor da camada serosa. No entanto, no ceco dos animais do grupo SEPSE (Figura 17B), houve visualização de extensa necrose transmural e ulcerações na mucosa, além da presença de infiltrado inflamatório na camada submucosa e peritonite aguda. Em contraste, nos grupos SEPSE MSC IP (Figura 17C) e SEPSE MSC IV (Figura 17D), a infiltração de neutrófilos foi acentuadamente menor, causando um diminuto foco de peritonite, áreas isoladas de necrose e pequena recuperação da arquitetura da camada submucosa e muscular externa.



**Figura 17** – Análise histológica dos cecos dos animais dos grupos (A) SHAM (B) SEPSE (C) SEPSE MSC IP e (D) SEPSE MSC IV. As setas indicam as regiões de peritonite em torno da camada muscular externa. Aumento de 200x.

## 6 DISCUSSÃO

Em estudos ao redor da sepse, a utilização do camundongo como modelo experimental tornou-se uma escolha rotineira, por ser um animal de pequeno porte, ágil, ativo e por possuir respostas fisiológicas às infecções semelhantes às dos seres humanos (CHORILLI *et al.*, 2007). Além disso, a oportunidade de utilizar animais transgênicos para otimização da análise dos resultados adquiridos acrescenta ao camundongo outro atributo para ser primeira escolha na pesquisa laboratorial da sepse com o foco no tratamento com as MSCs. Por estas razões, esta foi a espécie animal escolhida para o desenvolvimento do presente projeto e, apesar de não ser capaz de mimetizar fielmente o curso natural da sepse em humanos, permanece sendo um modelo adequado, de baixo custo e que atendeu às expectativas e necessidades do estudo, cumprindo todos os objetivos aos quais foi desafiado.

A adoção deste animal permitiu a padronização do modelo CLP, com oclusão total do ceco seguida de uma única punctura com agulha de calibre 18G, resultando, assim, em um modelo de sepse aguda. Ainda, para efeitos de padronização, foram escolhidos animais de mesmo sexo e semelhante faixa etária. A utilização de animais doadores transgênicos expressando a proteína fluorescente GFP foi adotada para possibilitar o rastreamento das células após o transplante, para fins de confirmação da enxertia e estudos sobre a migração celular rota-dependente. No entanto, esta etapa de verificação ainda não pode ser realizada, permanecendo como umas das perspectivas futuras do presente trabalho.

No que se refere aos procedimentos anestésicos, a escolha de anestesia inalatória com isoflurano mantida por meio de máscara requer pouco preparo e é considerada suficiente para procedimentos que demandam menor tempo cirúrgico em animais de pequeno porte. A inclusão do suporte analgésico minutos antes da cirurgia proporcionou uma diminuição no desconforto algico pós-operatório. O cloridrato de tramadol é uma substância opióide com efeito antinociceptivo, que não interfere no trânsito gastrointestinal e não produz diferenças significativas nos parâmetros imunes em animais submetidos ao modelo CLP, quando utilizada nas doses recomendadas (HUGUNIN *et al.*, 2010).

A severidade do CLP varia de acordo com as variáveis empregadas. Para padronizar o modelo, foram realizados diversos experimentos alterando-se o grau de

occlusão do ceco, o calibre da agulha utilizada para efetivação das perfurações e a quantidade de puncturas. As publicações científicas que utilizam o CLP como modelo para investigações em torno da sepse geralmente não detalham a forma como o procedimento é realizado. Assim, torna-se difícil reproduzir fielmente o mesmo nível de gravidade que outros pesquisadores utilizam para a discussão de seus achados. A execução dos experimentos iniciais deste projeto permitiu o estabelecimento da sepse aguda como indução da doença nos animais, por meio da oclusão total do ceco seguida de uma única punctura com agulha de calibre 18G. A partir dos resultados histológicos, hematológicos e de sobrevivência, o emprego das referidas variáveis demonstrou maior identidade com a sepse aguda observada em humanos.

A indução da sepse pelo modelo CLP foi verificada por meio da maceração do baço dos animais, que mostrou ser uma técnica eficiente, apesar de não ser comumente empregada nos trabalhos científicos publicados. A cultura bacteriana do sangue coletado via punção cardíaca não foi bem sucedida, apesar das inúmeras tentativas de efetivar-se esta técnica, considerada padrão na confirmação da instalação da sepse nos animais destinados a tal propósito. O baço, por ser um órgão chave na resposta às infecções, foi escolhido para validação da indução da sepse. Este procedimento resultou em 100% de efetividade.

Outro fator que demonstrou atenuada diferença entre os grupos de animais saudáveis e doentes foi o acompanhamento de seus pesos. Todos os grupos obtiveram perda de peso após serem submetidos ao procedimento cirúrgico. Porém, os animais que sofreram indução da sepse, independente da administração de qualquer substância, perderam maior quantidade de peso em comparação aos animais falso-operados, que registraram uma rápida recuperação após algumas horas da cirurgia (dados não demonstrados). Os animais doentes permaneceram letárgicos, com piloereção e sem anseio por alimentação até o momento da eutanásia.

A respeito da terapêutica, os camundongos possuem uma pequena desvantagem em relação às outras espécies. Possuem menor volume sanguíneo, devido ao seu tamanho, prejudicando a obtenção de amostras no volume adequado para análise de todos os parâmetros fisiológicos desejados. Desta forma, optou-se por estudar os parâmetros inflamatórios, a partir de amostras de soro e parâmetros hematológicos, com

o uso do sangue total, postergando a análise dos parâmetros bioquímicos para perspectiva futura.

Não foram encontrados estudos ao redor das diferenças dos efeitos terapêuticos das MSCs quando administradas por diferentes vias em modelos experimentais de sepse. Ainda pouco se sabe sobre o efeito do transplante de tipos celulares com potencial regenerativo neste tipo de doença e o número limitado de estudos em torno deste tema compreende resultados semelhantes entre si, com administração da terapia por apenas uma via. Por este motivo, buscou-se avaliar a diferença de ação das MSCs pela administração em duas diferentes vias, em modelo animal de sepse.

A escolha das vias de administração IV e IP deve-se ao fato de ser o método mais popular de infusão de células na sepse induzida por CLP. O protocolo de aplicação das MSCs foi baseado em trabalhos semelhantes que avaliaram o potencial terapêutico desse grupo celular na sepse (GONZALEZ-REY *et al.*, 2009; NÉMETH *et al.*, 2009; MEI *et al.*, 2010). Ambas as vias têm grande importância em casos de sepse abdominal devido à habilidade do sistema circulatório em entregar as células ao tecido inflamado. Estas vias são passíveis de injeção de células e possuem eficiência na distribuição das mesmas, corroborando as afirmações de WANNEMUEHLER *et al.* (2012).

Oito animais foram a óbito após os procedimentos cirúrgicos. Devido à severidade do modelo CLP, seis camundongos não regressaram às suas atividades normais após a indução da sepse, permanecendo em estado letárgico e indo a óbito nas primeiras horas após a cirurgia. Além disso, segundo HUGUNIN *et al.* (2010), camundongos machos têm menor resistência à sepse em comparação às fêmeas e animais de diferentes linhagens podem ter alta variação em suas respostas na pesquisa da sepse. Os dois outros camundongos foram a óbito no momento da administração dos tratamentos por via intravenosa. A veia lateral da cauda é a mais utilizada para a realização de infusão de fluidos e para as injeções intravenosas em ratos, camundongos e cobaias. A administração das terapias é feita diretamente na corrente sanguínea, por meio de vasos superficiais, mas sua perfuração requer habilidade e prática para que a solução administrada não cause êmbolos no animal, com a consequente morte do mesmo (DE PAIVA *et al.*, 2005), suspeita levantada pelos pesquisadores deste estudo.

A sepse é caracterizada como uma doença complexa resultante de um desequilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias, onde a reação inflamatória do

organismo ocorre por meio da ativação dos componentes celulares e humorais, em resposta à presença de agentes infecciosos no organismo (DE MELLO *et al.*, 2011). A heterogeneidade da apresentação de um paciente com sepse pode tornar a doença de difícil diagnóstico, já que os sinais da doença ou disfunção orgânica podem ser facilmente mal interpretados ou atribuídos a outras causas. O tempo decorrido entre o início da disfunção orgânica e o início da intervenção terapêutica pode ser bastante longo, sendo um determinante importante de sobrevivência em casos de sepse grave e choque séptico (FREITAS *et al.*, 2008). A teoria predominante que explica a alta taxa de mortalidade nessa condição é baseada no fato de a sepse grave ser caracterizada por uma fase pró-inflamatória, um estado pró-coagulante e decréscimo na fibrinólise, os quais, se não controlados, conduzem à deteriorização funcional progressiva de múltiplos órgãos interdependentes (BASSO *et al.*, 2008).

Por tratar-se de procedimentos ainda em fase experimental, optou-se pela utilização de dois grupos controle. O grupo CONTROLE, sem manipulação cirúrgica, foi utilizado como ponto de referência para parâmetros de animais saudáveis. O grupo SHAM foi "falsamente" operado, para fins de controle negativo da cirurgia e indução da sepse, mas sem receber administração de nenhuma substância, obtendo-se dados semelhantes aos do grupo CONTROLE. O grupo SEPSE foi instituído a fim de ter-se um grupo doente sem qualquer interferência medicamentosa. Nos grupos SEPSE PBS IV e SHAM PBS IV, objetivou-se analisar as respostas dos animais ao veículo utilizado para diluição das MSCs, para exclusão de reações não relacionadas ao tratamento proposto. Este desenho experimental possibilitou a comparação direta da atuação isolada do tratamento e a via de administração utilizada. Para otimização do número de animais, de acordo com a CEUA-HCPA, os grupos SEPSE PBS IP e SHAM PBS IP, que seriam ideais para fins de comparação estatística, foram cortados do desenho experimental por não apresentarem resultados significativos diferentes dos grupos que receberam esta substância por via intravenosa.

Os trabalhos publicados nesta área não costumam fornecer dados sobre a condição clínica dos animais após a indução da sepse, restringindo-se às avaliações fisiológicas e características histológicas dos órgãos envolvidos. Neste trabalho, o procedimento cirúrgico induziu sepse aguda, com agravamento do quadro clínico em poucas horas. Além disso, a indução da morte em 24 horas após a cirurgia e 18 horas após o tratamento pontuou o tempo de análise em um período muito curto. Por estes

motivos, houve dificuldade na análise fidedigna de um escore clínico, com resultados amplamente diversificados e passíveis de errôneas interpretações, não tendo sido, por estas razões, considerados no estudo.

No presente experimento, pode-se comprovar que as MSCs induziram redução na concentração hematológica de leucócitos dos animais, que se apresentava mais elevada no grupo SEPSE frente ao grupo CONTROLE. NÉMETH *et al.* (2009) encontraram uma diminuição significativa no número de monócitos circulantes no grupo de animais com sepse induzida pelo modelo CLP, após tratamento com BMSCs, administradas pela via IV, em camundongos. Esta redução se deve ao fato dos macrófagos, células fagocíticas derivadas dos monócitos, estarem concentrados no local da lesão, efetivando sua função antimicrobiana em um quadro de sepse grave, ao invés de estarem na circulação sanguínea durante a homeostase. Em contrapartida, CHANG *et al.* (2012) não obtiveram diferença significativa, nas primeiras 24 horas pós-cirurgia, na contagem de células brancas circulantes entre os animais dos grupos SHAM, CLP e grupos tratados com MSCs. Já nas 72 horas após a indução da sepse, estes pesquisadores verificaram que o grupo CLP apresentava maior quantidade de leucócitos circulantes, mas que esta quantidade havia diminuído nos grupos tratados com MSCs. No presente estudo, verificou-se que não houve diferença significativa na concentração hematológica de leucócitos entre os grupos doentes tratados com MSCs pelas duas diferentes vias testadas. No entanto, o grupo SEPSE MSC IP obteve maior redução de valores neste parâmetro, enquanto que o grupo SEPSE MSC IV permaneceu estatisticamente maior do grupo CONTROLE. Estes dados sugerem que as MSCs, quando administradas pela via IP, possuem maior capacidade de melhorar um quadro infeccioso generalizado, induzindo o recrutamento de monócitos para o local da lesão, quando o foco da infecção encontra-se na região abdominal.

Muitos pesquisadores vêm obtendo informações a respeito da relação entre as atividades pró-coagulantes e pró-inflamatórias. Alterações no sistema de coagulação são ocorrências comuns em pacientes criticamente doentes e têm sido associadas ao aumento da taxa de mortalidade. A maioria dos pacientes com sepse apresenta anormalidades neste sistema, que vão desde uma pequena diminuição na contagem de plaquetas e prolongamento dos tempos de coagulação até coagulação intravascular disseminada (DIC). Há evidências de que a DIC está envolvida na patogênese da disfunção microvascular e contribui para a falência de órgãos. Além disso, a ativação do

sistema de coagulação pode causar hemorragia por conta da depleção de plaquetas e esgotamento de seus fatores (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Plaquetas são fragmentos de megacariócitos anucleares com a capacidade de se ligar a diversos microrganismos (LI *et al.*, 2011). Durante a sepse, as plaquetas circulantes podem se ligar ao LPS via TLR, causando uma rápida evasão desses receptores da circulação permitindo que apresentem a toxina microbiana às células fagocíticas presentes. Por outro lado, a fagocitose de plaquetas por células do RES pode ser significativamente alterada pela presença de produtos bacterianos, o que pode resultar em uma rápida depuração plaquetária e na sua natureza pró-inflamatória em um quadro de sepse (SEMPLE, 2008).

A trombocitopenia é uma reação comum do organismo durante a sepse e parece predizer a mortalidade do paciente. É um evento que ocorre como consequência da ativação sistêmica das plaquetas que, por sua vez, promove a secreção de citocinas e outras moléculas imunomoduladoras, contribuindo para o desfecho da doença (LI *et al.*, 2011). Os achados do presente estudo corroboram com estas informações. A concentração plaquetária no sangue dos animais do grupo SEPSE sofreu uma considerável queda, com os valores expressos em forma de mediana, segundo a perda do volume plaquetário de cada grupo. Os dois grupos de animais que receberam administração de MSCs via IV (SHAM MSC IV e SEPSE MSC IV) obtiveram maiores perdas na contagem de plaquetas, predizendo que a administração de MSCs pela veia da cauda de camundongos induz alteração em seu estado homeostático. O pequeno calibre venoso caudal destes animais requer habilidade na introdução de cateteres e agulhas. As MSCs possuem um diâmetro de aproximadamente 20 $\mu$ m, o que representa um problema quando a veia escolhida para sua administração é a veia da cauda. A proporção entre o tamanho das MSCs e o calibre desta veia pode provocar embolia e microinfarto coronário se a infusão destas células não for efetivada com a velocidade e habilidade requeridas (DE SOUZA *et al.*, 2010). Desta forma, a injeção de MSCs pela veia caudal de camundongos, independente de seu estado fisiopatológico, pode desencadear um processo inflamatório, como o recrutamento e agregação de plaquetas para combate à lesão inflamatória.

Por outro lado, as MSCs, quando administradas pela via IP, não induziram estes indesejados efeitos de alteração na concentração plaquetária. Apesar de não haver

diferença estatística entre o grupo SEPSE MSC IP e o grupo SEPSE, este primeiro obteve uma redução na perda de plaquetas em relação ao segundo, demonstrando uma tendência à estabilização do quadro de trombocitopenia quando as células são injetadas por esta via.

A presença de grandes concentrações de leucócitos na cavidade peritoneal de animais que sofreram indução da sepse pelo modelo CLP é retratada como um evento frequente. Os resultados da pesquisa de NÉMETH *et al.* (2009) apresentam uma contagem menor de bactérias no fluido peritoneal de animais com sepse tratados com BMSCs, após administração destas células pela via IV. No entanto, esta redução não foi estatisticamente significativa quando comparada com o grupo que não recebeu tratamento. Da mesma forma, ANDERSON *et al.* (2012) observaram uma redução de infiltrado inflamatório no pulmão, fígado, intestino e cavidade peritoneal de animais sépticos tratados com meio condicionado de MSCs, em comparação com o grupo não tratado.

Em outro experimento, realizado por GONZALEZ-REY *et al.* (2009), foram estudados os efeitos das MSCs em modelo animal de sepse induzida por CLP e por meio da infusão de LPS. Em ambos os modelos, o tratamento diminuiu a infiltração de células inflamatórias na cavidade peritoneal, especificamente os neutrófilos, macrófagos e linfócitos, bem como a carga bacteriana determinada no sangue, peritônio e macerados do baço e fígado. MEI *et al.* (2010) isolaram células peritoneais e esplênicas de animais submetidos a indução da sepse tratados e não tratados com MSCs. O objetivo do estudo *ex vivo* foi determinar se estas células possuíam a habilidade de fagocitar bactérias gram-positivas e gram-negativas marcadas por fluorescência. O resultado demonstrou melhor capacidade fagocítica em ambos os tipos celulares dos animais tratados com MSCs, independente do grupo bacteriano ao qual as células foram expostas, em comparação às células do baço ou peritônio dos animais sépticos não tratados.

Em acordo com os dados dos pesquisadores citados, a presente análise apontou um considerável aumento na concentração de leucócitos no lavado peritoneal dos animais do grupo SEPSE. Em contrapartida, os animais que receberam o tratamento com células pela via IP (grupo SEPSE MSC IP) obtiveram redução de infiltrado de células brancas na cavidade abdominal, com valores alcançando estatisticamente os dos grupos saudáveis. O tratamento com MSCs injetadas pela via IV também reduziu o

parâmetro em questão, mas com resultados ainda diferindo da contagem de leucócitos encontrada no grupo CONTROLE.

Pesquisadores sugerem que as MSCs resgatem os camundongos de um agravamento da sepse por meio da regulação negativa da resposta inflamatória exacerbada, característica desta desordem (MEI *et al.*, 2010). Além disso, persiste a hipótese de que as MSCs possam expressar e secretar peptídeos antimicrobianos, como o LL-37, um peptídeo endógeno, essencial para o sistema imune, que atua por meio de um gradiente de concentração, ativando e induzindo a migração das MSCs até o foco da infecção (KRASNODEMBSKAYA *et al.*, 2010).

Sabe-se que a administração sistêmica das MSCs pode desempenhar um papel benéfico no combate à sepse e disfunção orgânica, possivelmente via mecanismos parácrinos (WEIL *et al.*, 2009). Entretanto, diversos estudos utilizando estas células como tratamento da sepse abdominal, têm focado suas discussões nas atividades imunomodulatórias das MSCs quando administradas intraperitonealmente. Os resultados encontrados assemelham-se àqueles onde as células são infundidas por via IV, sem apontar fatores negativos por conta da via de administração da terapia. Com isso, o atual trabalho apresenta dados relevantes, demonstrando melhores efeitos na redução do foco infeccioso na cavidade abdominal quando as MSCs foram injetadas diretamente no peritônio. Desta maneira, diminui-se a perda celular e proporciona-se maior recrutamento de células fagocíticas ao local lesado, permitindo que cheguem mais rápido ao local da infecção e em maior concentração.

O aumento na regulação da produção de citocinas inflamatórias foi relatado na primeira fase de sepse, seguido por uma drástica queda quando a sepse grave ou o choque séptico estão em ocorrência no organismo. O TNF- $\alpha$  é uma das citocinas liberadas primeiramente durante a resposta inflamatória, seguida pela produção da IL-6 e IL-10 solúvel. O aumento extremo e prolongado dos níveis circulantes de IL-6 após a sepse está relacionado com morbidade e mortalidade. (LOBO e LOBO, 2007). Além disso, o TNF- $\alpha$  ativa a resposta imune adaptativa, responsável pela amplificação da imunidade inata e caracterizada pela ativação das células B, que liberam imunoglobulinas facilitadoras da apresentação de antígenos para as células fagocitárias. As células T helper tipo 1 (Th1) promovem um feedback positivo, secretando TNF- $\alpha$

enquanto que, para contrabalançar esse mecanismo, as células T helper tipo 2 (Th2) secretam as interleucinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 (HENKIN *et al.*, 2009).

A IL-10 é produzida principalmente por macrófagos, células dendríticas e células T<sub>reg</sub>, com a capacidade de inibir a produção das diversas citocinas inflamatórias produzidas pelos macrófagos ativados e células dendríticas, sendo, portanto, uma reguladora do processo de feedback negativo. Ademais, a IL-10 regula, também, as reações do sistema imune e inflamação nos tecidos da mucosa, particularmente no trato gastrointestinal (ABBAS *et al.*, 2012), funcionando como inibidora da adesão e migração transepitelial de neutrófilos, contribuindo na redução do processo inflamatório (ORNELLAS *et al.*, 2011).

Os três principais estudos já publicados em torno do tratamento da sepse induzida pelo modelo CLP com MSCs (MEI *et al.*, 2010; GONZALEZ-REY *et al.*, 2009; NÉMETH *et al.*, 2009), buscaram analisar as alterações nas concentrações sistêmicas das diversas citocinas pró e anti-inflamatórias após a administração de MSCs em grupos de animais submetidos ao modelo CLP. MEI *et al.*, (2010) trataram a doença com a infusão de MSCs por uma cânula inserida na veia jugular, 6 horas após o procedimento cirúrgico. Transcorridas 28 horas, os níveis plasmáticos das citocinas IL-6 e IL-10 foram verificados com o objetivo de avaliar o grau da inflamação sistêmica. Ambas as concentrações encontraram-se consideravelmente elevadas no grupo CLP tratado com salina, comparado ao grupo sham. Após o tratamento com MSCs, os níveis sistêmicos destas duas citocinas estavam significativamente reduzidos, em alguns pontos aproximando-se dos níveis encontrados no grupo sham-operado.

Corroborando com os achados de MEI *et al.* (2010), o corrente estudo encontrou níveis séricos de IL-10 acentuadamente elevados no grupo SEPSE e SEPSE PBS IV, com mediana de aproximadamente 200 e 400pg/ml, respectivamente. Quando os animais receberam MSCs para tratamento da sepse, induzida 6 horas antes, estes níveis foram reduzidos, praticamente equivalendo-se aos níveis basais encontrados nos animais dos grupos saudáveis. A análise estatística demonstra uma diferença nos resultados de concentração quando as células são administradas pela via IP. No entanto, sugere-se que, neste parâmetro, segundo os dados encontrados, não existem efeitos benéficos melhores em relação às vias de administração das MSCs e que a ausência de diferença estatística entre o grupo SEPSE MSC IV e o grupo SEPSE PBS IV, em

contraponto à diferença estatística apontada nos resultados, deve-se ao extenso intervalo interquartil deste segundo grupo.

No estudo de GONZALEZ-REY *et al.* (2009), os níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 estavam significativamente reduzidos no soro de animais que receberam MSCs intraperitonealmente, 4 horas pós CLP. Estes pesquisadores estudaram, também, os níveis de diversas citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , entre outras) no extrato de três órgãos (fígado, pulmão e intestino) provenientes de animais infundidos com LPS e tratados com MSCs 6 horas após a infusão. Com exceção da IL-10, que praticamente quadruplicou sua concentração após o tratamento com MSCs, todas as outras citocinas analisadas obtiveram redução de seus níveis, nos três extratos proteicos estudados. O grupo de pesquisa de NÉMETH *et al.* (2009) realizou uma análise ao redor da concentração de IL-10 no soro de animais tratados versus não tratados com MSCs, pós CLP, em 3, 6 e 12 horas após a indução da sepse. Nas primeiras 3 horas, não houve diferença nos níveis desta citocina entre os dois grupos. No entanto, na análise de 6 horas, a concentração de IL-10 no grupo tratado dobrou, chegando a 3pg/ml frente à concentração de 1,5pg/ml referente ao grupo CLP. Estes valores diminuíram na análise de 12 horas, mas permaneceram, ainda, estatisticamente maiores no grupo CLP + MSCs. Na análise de 24 horas, os níveis séricos de IL-10 de ambos os grupos equivaleram-se. Ao analisar as concentrações séricas das interleucinas IL-6 e TNF- $\alpha$ , os autores verificaram uma redução destes valores no grupo tratado, comprovando a hipótese de que as MSCs alteram a resposta imune do organismo frente a uma infecção, possivelmente devido o aumento na produção de IL-10. Os níveis de IFN- $\gamma$  permaneceram inalterados na pesquisa.

As divergências ao redor dos resultados das concentrações da IL-10 em estudos no tratamento da sepse com MSCs devem, possivelmente, estarem atribuídas ao momento em que as células são administradas após a execução da cirurgia e não à via de infusão desta terapia. No estudo de NÉMETH *et al.* (2009) as MSCs foram administradas 24 horas antes da indução da sepse, enquanto que no estudo de MEI *et al.* (2010) e neste presente estudo, as MSCs foram administradas 6 horas após o procedimento cirúrgico, alcançando, portanto, o mesmo perfil de citocinas como resultado do tratamento.

Ainda, neste presente trabalho foi possível verificar que as concentrações da IL-6 e do TNF- $\alpha$  estavam elevadas nos grupos doentes, principalmente no grupo SEPSE PBS IV, frente aos grupos saudáveis, condizendo com os dados encontrados nos outros estudos ao redor deste tema, conforme citado anteriormente. ANDERSON *et al.* (2012) trataram os animais com sepse induzida pela infusão intraperitoneal de meio condicionado de MSCs, para averiguar se os efeitos benéficos destas células necessitam, exclusivamente, do contato célula-célula. Os autores encontraram redução nos níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no soro dos animais do grupo tratado, em uma análise realizada 18 horas pós CLP. Para complementar o estudo, o meio condicionado foi co-cultivado com macrófagos ativados isolados dos animais sépticos. Como conclusão, o meio inibiu a produção das citocinas IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  pelos macrófagos. Este efeito foi parcialmente dependente da secreção de IL-10, sugerindo um papel crucial desta interleucina na atividade supressora do meio condicionado de MSCs nas doenças inflamatórias, demonstrando, também, o envolvimento de fatores solúveis na desativação de macrófagos e células T.

A análise de nossos dados sugeriu uma tendência a um melhor efeito das MSCs quando administradas pela via IP no perfil de citocinas sistêmicas dos animais doentes, mas nenhuma diferença estatística comprovando esta inclinação foi constatada.

A mucosa intestinal desempenha funções imunológicas, metabólicas e endócrinas e funciona como uma barreira importante de defesa local, impedindo a translocação de bactérias e endotoxinas do intestino para o sangue e tecidos extra-intestinais (YI *et al.*, 2007). A luz do trato gastrointestinal normalmente contém numerosas espécies de bactérias e uma alta concentração de endotoxinas. Um aumento na absorção destes organismos tem sido demonstrado em situações onde a mucosa intestinal está danificada por inflamação, infecção ou neoplasia. A integridade física da mucosa provavelmente representa a principal linha de defesa dessa estrutura, sendo auxiliada pelos componentes do sistema imune (TRAMONTE *et al.*, 2004). A deficiência da função desta barreira tem ação direta na iniciação da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (YI *et al.*, 2007).

O modelo CLP é fortemente invasivo histologicamente. Ele facilita a permeabilização das camadas naturais do tecido intestinal por meio de súbita ruptura no momento da efetivação da punctura e pela liberação de grande quantidade de fezes para

a cavidade peritoneal, o que permite o fluxo intenso e repentino de bactérias entéricas para o interior do abdômen. Além disso, a amarração do ceco proporciona necrose extensa desta região, apesar de não interferir no trânsito intestinal. A análise histopatológica dos órgãos dos animais foi um processo subjetivo neste trabalho, sendo realizadas apenas observações qualitativas das diferenças estruturais entre os grupos SHAM, SEPSE, SEPSE MSC IV e SEPSE MSC IP. Neste estudo, foi possível visualizar que a integridade da estrutura da barreira mucosa do ceco foi marcadamente comprometida no grupo SEPSE, ratificando as alterações histológicas esperadas na reprodução deste modelo (MAIER *et al.*, 2004; TRAMONTE *et al.*, 2004; GONNERT *et al.*, 2011). Nos grupos doentes tratados com MSCs, houve uma melhora deste cenário. As MSCs, quando administradas pela via IV (grupo SEPSE MSC IV), induziram uma leve recuperação na infiltração de neutrófilos na camada submucosa do ceco, além da diminuição da extensão da necrose transmural ocasionada pela perfuração do órgão no momento da efetivação do modelo CLP. No entanto, quando as MSCs foram infundidas pela via IP (grupo SEPSE MSC IP), o efeito foi histologicamente melhor. As células tiveram a capacidade de reduzir o grau de inflamação, percebendo-se apenas um quadro de peritonite focal e redução da intensidade das ulcerações na camada mucosa, sugestionando que esta é a melhor via para o tratamento da sepse aguda centrada na cavidade abdominal.

## 7 CONCLUSÕES

Nas condições em que foram realizados os experimentos do presente estudo e com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- 1) O estabelecimento do modelo CLP por oclusão total do ceco seguida de uma única punctura com agulha de calibre 18G neste órgão, foi efetivo para a indução de sepse aguda, conforme demonstrado nos experimentos de confirmação a partir da maceração do baço dos animais.
- 2) O tratamento com células-tronco mesenquimais demonstrou ser eficiente para minimizar as alterações hematológicas características da sepse, reduzindo o aumento da concentração de leucócitos e diminuindo o grau de trombocitopenia sistêmica presente nos animais doentes. A infusão da terapia pela via intraperitoneal revelou uma tendência a um melhor efeito nestes parâmetros.
- 3) A administração intraperitoneal das células-tronco mesenquimais promoveu menores índices de infiltração de células inflamatórias na análise do lavado peritoneal dos animais com sepse induzida por CLP, frente ao tratamento pela via intravenosa.
- 4) Três das sete citocinas avaliadas responderam ao tratamento com MSCs, conforme avaliação realizada no soro dos animais. A IL-10, IL-6 e o TNF apresentaram seus níveis acentuadamente elevados após o estabelecimento da síndrome e estes valores foram restabelecidos com a terapia administrada. Apesar de não ter sido encontrada diferença estatística na comparação das duas vias de administração, a via intraperitoneal demonstrou uma propensão a melhores resultados, equivalendo os níveis séricos aos níveis basais dos grupos de animais saudáveis.
- 5) As análises histológicas indicam que as MSCs restringiram a extensão da área de necrose e peritonite nos cecos dos animais sépticos, além de atenuar a magnitude das ulcerações na região mucosa. Estes resultados foram mais evidentes quando as células foram administradas pela via intraperitoneal.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Introdução ao sistema imunológico: nomenclatura, propriedades gerais e componentes do sistema imunológico. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. cap 1, p. 1-22.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 7. ed. EUA: Elsevier, 2012.
- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815-1822, 2005.
- AKAMINE, N. *et al.* Suporte hemodinâmico. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 16, n. 4, p. 241-245, 2004.
- ANDERSON, P. *et al.* Adipose derived mesenchymal stromal cell induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. **Gut**, epub ahead of print, 2012.
- ARTIGAS, A. *et al.* What is next in sepsis: current trials in sepsis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 8, p. 859-862, 2012.
- BALK, R.A. Optimum treatment of severe sepsis and septic shock: evidence in support of the recommendations. **Disease a month**, v. 50, n. 4, p. 168-213, 2004.
- BARICHELO, T. *et al.* Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 40, n. 6, p.831-837, 2007.
- BARMAN, P.; SENGUPTA, S.; SINGH, S. Study of a novel method to assist in early reporting of sepsis from the microbiology laboratory. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 4, n. 12, p. 822-827, 2010.
- BASSO, P.C. *et al.* Apoptose na sepse e síndrome da resposta inflamatória sistêmica: revisão. **Veterinária em Foco**, v. 6, n. 1, p. 63-74, 2008.
- BOHNSACK, J.F.; BROWN, E.J. The role of the spleen in resistance to infection. **Annual Review of Medicine**, v. 37, p. 49-59, 1986.
- BRADLEY, C. Activated Protein C in severe sepsis. **Intensive and Critical Care Nursing**, v. 17, p. 177-178, 2001.
- BRANDAU, S. *et al.* Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 5, p. 1005-1015, 2010.
- BU, H.F. *et al.* Lysozyme-modified probiotic components protect rats against polymicrobial sepsis: role of macrophages and cathelicidin-related innate immunity. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 12, p. 8767-8776, 2006.

CAI, B.; DEITCH, E.A.; ULLOA, L. Novel insights for systemic inflammation in sepsis and hemorrhage. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 2010.

CASTELO-BRANCO, M.T.L. *et al.* Intraperitoneal but not intravenous cryopreserved mesenchymal stromal cells home to the inflamed colon and ameliorate experimental colitis. **Plos One**, v. 7, n. 3, 2012.

CHANG, C-L. *et al.* Impact of apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cells on attenuating organ damage and reducing mortality in rat sepsis syndrome induced by cecal puncture and ligation. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 244, 2012.

CHEN, P.M. *et al.* Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Science**, v. 18 n. 49, 2011.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p. 11-23, 2007.

DEJAGER, L. *et al.* Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198-208, 2011.

DE AZEVEDO, M.R.A.; CONVERSO, A.P.G. Inflamação, coagulação e sepse. **NewsLab**, v. 77, p. 156-160, 2006.

DE CARVALHO, R.H. *et al.* Sepse, sepse grave e choque séptico: aspectos clínicos, epidemiológicos e prognóstico em pacientes de unidade de terapia intensiva de um hospital universitário. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 591-593, 2010.

DE FARIAS, G.M. *et al.* Epidemiologic aspects of sepsis in intensive care units. **Revista de Enfermagem UFPE On Line**, v. 3, n. 4, p. 408-415, 2009.

DE MELLO, R.O. *et al.* Effect of n-acetylcysteine and fructose-1,6-bisphosphate in the treatment of experimental sepsis. **Inflammation**, v. 34, n. 6, p. 539-550, 2011.

DE OLIVEIRA, L.M. *et al.* Fructose-1,6-bisphosphate inhibits *in vitro* and *ex vivo* platelet aggregation induced by ADP and ameliorates coagulation alterations in experimental sepsis in rats. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 29, n. 4, p. 387-394, 2010.

DE PAIVA, F.P.; MAFFILI, V.V.; SANTOS, A.C.S. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. **Fiocruz**, 2005.

DE SOUZA, C.F. *et al.* Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 18, n. 3, p. 344-353, 2010.

DOCOBO-PÉREZ, F. *et al.* Inoculum effect on the efficacy of amoxicillin/clavulanate, piperacillin/tazobactam, and imipenem in an experimental ESBL- and non-ESBL-

producing *Escherichia coli* murine sepsis model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, epub ahead of print, 2013.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

EHRENTRAUT, S.F. *et al.* Vascular dysfunction following polymicrobial sepsis: role of pattern recognition receptors. **Plos One**, v. 7, n. 9, 2012.

ESMON, C.T. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? **Critical Care Medicine**, v. 32, n. 5 (Suppl), p. S219-S222, 2004.

FAINTUCH, S. *et al.* Beneficial effect of tetracycline prophylaxis in a sepsis model mimicking portal and systemic bacterial translocation routes. **Transplantation Proceedings**, v. 34, n. 3, p. 1005-1006, 2002.

FERREIRA, L.E. *et al.* Painel molecular para detecção de microrganismos associados à sepse. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 1, p. 36-40, 2011.

FINK, M.P.; HEARD, S.O. Laboratory models of sepsis and septic shock. **The Journal of Surgical Research**, v. 49, n. 2, p. 186-196, 1990.

FISCHER, U.M. *et al.* Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. **Stem Cells and Development**, v. 18, n. 5, p. 683-692, 2009.

FREITAS, F.G.R. *et al.* The impact of duration of organ dysfunction on the outcome of patients with severe sepsis and septic shock. **Clinics**, v. 63, n. 4, p. 483-488, 2008.

FRIEDENSTEIN, A.J. *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. **Experimental Hematology**, v. 2, n. 2, p. 83-92, 1974.

GEBLER, A.; ZABEL, O.; SELIGER, B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 2, p. 128-134, 2012.

GIMBLE, J.M.; NUTTALL, M.E. Adipose-derived stromal/stem cells (ASC) in regenerative medicine: pharmaceutical applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 332-339, 2011.

GLENNIE, S. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest energy of activated T cells. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2821-2827, 2005.

GONNERT, F.A. *et al.* Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. **The Journal of Surgical Research**, v. 170, n. 1, p. 123-134, 2011.

GONZALEZ-REY, E. *et al.* Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. **Gut**, v. 58, n. 7, p. 929-939, 2009.

GRANERO-MOLTÓ, F. *et al.* Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. **Stem Cells**, v. 27, n. 8, p. 1887-1898, 2009.

HADJANTONAKIS, A.K.; NAGY, A. The color of mice: in the light of GFP-variant reporters. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 115, p. 49-58, 2001.

HENKIN, C.S. *et al.* Sepsis: uma visão atual. **Scientia Medica**, v. 19, n. 3, p. 135-145, 2009.

HERBERTS, C.A.; KWA, M.S.G.; HERMSEN, H.P.H. Risk factors in the development of stem cell therapy. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 29, 2011.

HOOGDUIJN, M.J. *et al.* The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 12, p. 1496-1500, 2010.

HORWITZ, E.M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.

HUGUNIN, K.M.S. *et al.* Effects of tramadol and buprenorphine on select immunologic factors in a cecal ligation and puncture model. **Shock**, v. 34, n. 3, p. 250-260, 2010.

IKAWA, M. *et al.* A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP). **FEBS Letters**, v. 375, n. 1-2, p. 125-128, 1995.

IVANOVA-TODOROVA, E. *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Immunology Letters**, v. 126, n. 1-2, p. 37-42, 2009.

KAUSS, I.A.M. *et al.* The epidemiology of sepsis in a Brazilian teaching hospital. **Brazilian Journal of Infection Disease**, v. 14, n. 3, p. 264-270, 2010.

KELLY-SCUMPIA, K.M. *et al.* B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 8, p. 1673-1682, 2011.

KNAPP, S. Update on the role of toll-like receptors during bacterial infections and sepsis. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 160, n. 5-6, p. 107-111, 2010.

KRASNODEMBSKAYA, A. *et al.* Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. **Stem Cells**, v. 28, n. 12, p. 2229-2238, 2010.

KRONSTEINER, B. *et al.* Human mesenchymal stem cells from adipose tissue and amnion influence T-cells depending on stimulation method and presence of other immune cells. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 12, p. 2115-2126, 2011.

KUWAHARA-OTANI, S. *et al.* Systemic administration of lipopolysaccharide increases the expression of aquaporin-4 in the rat anterior pituitary gland. **The Journal of Veterinary Medical Science**, epub ahead of print, 2013.

KWIECINSKI, J. *et al.* Sulfatide attenuates experimental *Staphylococcus aureus* sepsis through a cd1d-dependent pathway. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 4, p. 1114-1120, 2013.

LARSEN, R. *et al.* A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 51, p. 51-71, 2010.

LEIKER, M. *et al.* Assessment of a nuclear affinity labeling method for tracking implanted mesenchymal stem cells. **Cell Transplantation**, v. 17, n. 8, p. 911-922, 2008.

LEVY, M.M. *et al.* The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. **Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 2, p. 222-231, 2010.

LI, G. *et al.* NF- $\kappa$ B-dependent induction of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine mast cells by lipopolysaccharide. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 150, n. 2, p. 122-132, 2009.

LI, Z. *et al.* Platelets as immune mediators: their role in host defense responses and sepsis. **Thrombosis Research**, v. 127, n. 3, p. 184-188, 2011.

LIN, T.C.Y.; LEE, O.K.S. Stem cells: a primer. **Chinese Journal of Physiology**, v. 51, n. 4, p. 197-207, 2008.

LOBO, S.M.; LOBO, F.R.M. Markers and mediators of inflammatory response in infection and sepsis. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 2, p. 211-215, 2007.

LOEBINGER, M.R.; JANES, S.M. Stem cells for lung disease. **Chest**, v. 132, n. 1, p. 279-285, 2007.

MAIER, S. *et al.* Cecal Ligation and Puncture versus Colon Ascendens Stent Peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. **Shock**, v. 21, n. 6, p. 505-511, 2004.

MALHOTRA, A.K. *et al.* Preservation of splenic immunocompetence after splenic artery angioembolization for blunt splenic injury. **The Journal of Trauma**, v. 69, n. 5, p. 1126-1131, 2010.

MATSUDA, A. *et al.* Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. **Journal of Nippon Medical School**, v. 79, n. 1, p. 4-18, 2012.

MEDINA, E. Murine model of polymicrobial septic peritonitis using cecal ligation and puncture (CLP). In: PROETZEL, G.; WILES, M.V. (Eds.). **Mouse models for drug discovery**. Humana Press, 2010. *Methods in Molecular Biology*, 602, p. 411-415.

MEI, S.H.J. *et al.* Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 8, p. 1047-1057, 2010.

MIAO, P. *et al.* Hypothermia predicts the prognosis in colon ascendens stent peritonitis mice. **The Journal of Surgical Research**, v. 181, n. 1, p. 129-135, 2013.

NARDI, G.M. *et al.* Opioid analgesics in experimental sepsis: effects on physiological, biochemical, and haemodynamic parameters. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, epub ahead of print, 2012.

NARDI, N.B.; MEIRELLES, L.S. Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 174, p. 249-282, 2006.

NAUTA, A.J.; FIBBE, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3499-3506, 2007.

NÉMETH, K. *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2—dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nature Medicine**, v. 15, n. 1, p. 42-49, 2009.

OEHMCKE, S.; HERWALD, H. Contact system activation in severe infectious diseases. **Journal of Molecular Medicine**, v. 88, n. 2, p. 121-126, 2010.

ORNELLAS, D.S. *et al.* Early and late effects of bone marrow-derived mononuclear cell therapy on lung and distal organs in experimental sepsis. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 178, n. 2, p. 304-314, 2011.

PAREKKADAN, B.; MILWID, J.M. Mesenchymal stem cells as therapeutics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 12, p. 87-117, 2010.

PRUETT, S.B. *et al.* Innate immunity and inflammation in sepsis: mechanisms of suppressed host resistance in mice treated with ethanol in a binge-drinking model. **Toxicological Sciences**, v. 117, n. 2, p. 314-324, 2010.

RAFFAGHELLO, L. *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. **Stem Cells**, v. 26, n. 1, p. 151-162, 2008.

RAICEVIC, G. *et al.* Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. **Human Immunology**, v. 71, n. 3, p. 235-244, 2010.

RIEDEMANN, N.C.; GUO, R.F.; WARD, P.A. Novel strategies for the treatment of sepsis. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 517-524, 2003.

RITTIRSCH, D.; HOESEL, L.M.; WARD, P.A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 1, p. 137-143, 2007.

RITTIRSCH, D. *et al.* Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2009.

SALES JÚNIOR, J.A.L. *et al.* Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 9-17, 2006.

SALOMÃO, R. *et al.* Diretrizes para tratamento da sepsis grave/choque séptico: abordagem do agente infeccioso – controle do foco infeccioso e tratamento antimicrobiano. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 145-157, 2011.

SANDERS, J.K.M.; JACKSON, S.E. The discovery and development of the green fluorescent protein, GFP. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 2821-2822, 2009.

SEMPLE, J.W. Platelets play a direct role in sepsis-associated endothelial cell death. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 2, p. 249, 2008.

SEO, S.H. *et al.* The effects of mesenchymal stem cells injected via different routes on modified IL-12-mediated antitumor activity. **Gene Therapy**, v. 18, n. 5, p. 488-495, 2011.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F.H.; SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 59, p. 223-239, 1962.

SHIN, S. *et al.* The therapeutic effect of human adult stem cells derived from adipose tissue in endotoxemic rat model. **International Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 8-18, 2013.

SILVA, E. *et al.* Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. 251-260, 2004.

SKATTUM, J.; NAESS, P.A.; GAARDER, C. Non-operative management and immune function after splenic injury. **British Journal of Surgery**, v. 99(Suppl 1), p. 59-65, 2012.

SKIRECKI, T. *et al.* Sepsis immunopathology: perspectives of monitoring and modulation of the immune disturbances. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 60, n. 2, p. 123-135, 2012.

SOGAYAR, A.M.C. *et al.* A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **Pharmacoeconomics**, v. 26, n. 5, p. 425-434, 2008.

STRANO, T.R. *et al.* Análise comparativa da reposição volêmica com solução isotônica e solução hipertônica em ratos com sepse. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 22, n. 4, p. 321-326, 2010.

TILL, J.E.; McCULLOCH, E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiation Research**, v. 14, p. 213-222, 1961.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. Sistema linfático e imunidade. In: \_\_\_\_\_. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap 22, p. 825-868.

TRAMONTE, R. *et al.* Alterações da mucosa intestinal em ratos: estudo morfométrico em três diferentes tratamentos após indução experimental de sepse abdominal aguda. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 120-125, 2004.

TSIEN, R.Y. The green fluorescent protein. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 509-544, 1998.

TYNDALL, A.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells combat sepsis. **Nature Medicine**, v. 15, n. 1, p. 18-20, 2009.

VAN DER POLL, T. Preclinical sepsis models. **Surgical Infectious**, v. 13, n. 5, p. 287-292, 2012.

VINCENT, J-L.; ABRAHAM, E. The last 100 years of sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, n. 3, p. 256-263, 2006.

WANG, W. *et al.* Glycyrrhizin protects against porcine endotoxemia through modulation of systemic inflammatory response. **Critical Care**, v. 17, n. 2, 2013.

WANNEMUEHLER, T.J. *et al.* Advances in mesenchymal stem cell research in sepsis. **The Journal of Surgical Research**, v. 173, n. 1, p. 113-126, 2012.

WARD, P.A. The harmful role of C5a on innate immunity in sepsis. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 5, p. 439-445, 2010.

WEIL, B.R. *et al.* Stem cells in sepsis. **Annals of Surgery**, v. 250, n. 1, p. 19-27, 2009.

WEIL, B.R. *et al.* Intravenous infusion of mesenchymal stem cells is associated with improved myocardial function during endotoxemia. **Shock**, v. 36, n. 3, p. 235-241, 2011.

WESTPHAL, G.A. *et al.* Diretrizes para tratamento da sepse grave/choque séptico – ressuscitação hemodinâmica. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 1, p. 13-23, 2011.

WICHTERMAN, K.A.; BAUE, A.E.; CHAUDRY, I.H. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. **The Journal of Surgical Research**, v. 29, n. 2, p. 189-201, 1980.

XU, L. *et al.* Effects of adiponectin on acute lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis rats. **The Journal of Surgical Research**, epub ahead of print, 2013.

YI, C. *et al.* Beneficial effect of recombinant human growth hormone on the intestinal mucosa barrier of septic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 1, p. 41-48, 2007.

YI, T.; SONG, S.U. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 2, p. 213-221, 2012.

YUAN, Y. *et al.* The effect of human complement C3 protein applied at different times in treatment of polymicrobial sepsis. **Inflammation Research**, v. 61, n. 6, p. 581-589, 2012.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Células-tronco: origens e propriedades. ZAGO, M.A. **Células-tronco – a nova fronteira da medicina**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2006. cap. 1, p. 3-20.

ZHAO, W. *et al.* Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 10, p. 1048-1058, 2012.

ZONTA, S. *et al.* Which is the most suitable and effective route of administration for mesenchymal stem cell-based immunomodulation therapy in experimental kidney transplantation: endovenous or arterial? **Transplantation Proceedings**, v. 42, n. 4, p. 1336–1340, 2010.

**ANEXO 1 – Carta de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais**

HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

**Projeto:** 110195      **Versão do Projeto:** 13/04/2011

**Pesquisadores:**

EDUARDO PANDOLFI PASSOS  
ANA HELENA DA ROSA PAZ  
CLAUDIA CILENE FERNADES CORREIA LAURINO  
ALESSANDRA BILESKI MAGRISSO  
ELIZABETH OBINO CIRNE LIMA

**Título:** Avaliação Dos Efeitos Das Células-Tronco Mesenquimais Administradas Através Das Vias Intraperitoneal E Intravenosa No Tratamento Da Sepse Experimental.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 14 de abril de 2011.

  
Dr. Alessandro Bersch Osvaldt  
Coordenador da CEUA/HCPA