

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica e Terapia com Células-Tronco
Mesenquimais: estudos *in vitro* sobre a ativação das células-tronco
na presença de células de pacientes com diferentes perfis
inflamatórios**

Sabrina Beal Pizzato

Porto Alegre, junho de 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Doença Pulmonar Obstrutiva Cônica e Terapia com Células-Tronco
Mesenquimais: estudos *in vitro* sobre a ativação das células-tronco na
presença de células de pacientes com diferentes perfis inflamatórios

Sabrina Beal Pizzato

Professora Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima

Orientadora

Dra. Fernanda dos Santos de Oliveira

Co-orientadora

Porto Alegre, junho de 2015.

Este artigo foi elaborado segundo as normas do Jornal Brasileiro de Pneumologia,
as quais se encontram em anexo.

Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica e Terapia com Células-Tronco Mesenquimais:
estudos *in vitro* sobre a ativação das células-tronco na presença de células de
pacientes com diferentes perfis inflamatórios

Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Mesenchymal Stem Cells Therapy: *in vitro* studies on the activation of the stem cells in the presence of cells from patients with different inflammatory profiles

Sabrina Beal Pizzato^{1,2}, Bruno Rocha de Macedo⁴, Cristiana Palma Kuhl², Débora Gotardi², Carolina Uribe³, Marli Knorst⁴, Danilo Berton⁴, Fernanda dos Santos de Oliveira² e Elizabeth Obino Cirne Lima²

¹ Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

² Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

³ Centro de Terapia Gênica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

⁴ Serviço de Pneumologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Santa Cecília, Porto Alegre – RS – Brasil,

CEP 90035-903

Telefone (51) 3359 8989

Email: sabrinapizzato@gmail.com

Órgãos Financiadores: FIPE (Fundo de Investimento em Pesquisa e Eventos) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, CNPq/UFRGS, CNPq/HCPA, CAPES

Resumo

Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é caracterizada pela diminuição progressiva do fluxo de ar nas vias aéreas. Se o paciente necessitar alterar seu tratamento devido sua piora clínica, diz-se que ele está em exacerbação. O paciente, durante os diferentes estágios da DPOC, apresenta perfis inflamatórios distintos. Devido ao caráter inflamatório da doença, células-tronco mesenquimais (MSC) são estudadas como alternativa terapêutica por serem capazes de imunomodular o microambiente em que se encontram, através da secreção de citocinas. O objetivo do trabalho foi estudar a capacidade das MSC de serem estimuladas quando em cultura com o soro de pacientes com DPOC em diferentes situações clínicas e em co-cultura com as PBMC desses pacientes. Para tal, as PBMC dos pacientes foram isolados e co-cultivados com MSC, assim como as MSC foram cultivadas em meio contendo soro desses pacientes. Após 48 horas em cultura, extraiu-se RNA das MSC para quantificar a expressão gênica de ciclooxigenase-2 (COX-2) e hemeoxigenase-1 (HO-1) através de qRT-PCR. A expressão de COX-2 no grupo de MSC cultivadas com o soro de pacientes com DPOC exacerbados e das MSC co-cultivadas com PBMC de pacientes exacerbados foi quase 15 vezes maior ($p= 0,043$). Não se observou diferença estatística na expressão da HO-1. Em ambas as avaliações, a ausência de diferença estatística pode ser devido ao baixo número de indivíduos no estudo. Novas avaliações são necessárias para estabelecer a relação entre a capacidade imunomodulatória das MSC e a expressão de COX-2 e HO-1 e o perfil inflamatório da DPOC.

Descritores: células-tronco mesenquimais, Doença pulmonar obstrutiva crônica, Expressão gênica, Ciclooxigenase 2, Hemeoxigenase 1

Abstract

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is characterized by a progressive reduction of airflow in the airways. If the patient need to change your treatment because your clinical worsening, it is said that it is in exacerbation. The patient, during the different stages of COPD, presents distinct inflammatory profile. Due to the inflammatory nature of the disease, mesenchymal stem cells (MSCs) have been studied as an alternative therapy to be able to immunomodulation the microenvironment in which they are, by secreting a variety of cytokines. The objective was to study the ability of the MSC to be stimulated in culture with the serum of COPD patients in different clinical settings and in co-culture with PBMC of these patients. To this end, the PBMC of patients were isolated and co-cultured with MSCs were cultured with serum from patients. After 48 hours in culture, RNA was extracted from MSC to quantify the gene expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and hemeoxygenase-1 (HO-1) by qRT-PCR. COX-2 expression in the MSC group cultured with serum from patients with exacerbated COPD and MSCs co-cultured with PBMCs from patients exacerbated was almost 15 times higher ($p = 0.043$). There was no statistical difference in the expression of HO-1. In both evaluations, the absence of statistical difference may be due to the low number of individuals in the study. New evaluations are needed to establish the relationship between the immunomodulatory capacity of MSC and COX-2 expression and HO-1 and inflammatory profile of COPD.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Genic expression, Cyclooxygenase 2, Heme oxygenase 1

Introdução

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma doença comum e prevalente, caracterizada pela diminuição progressiva do fluxo de ar das vias aéreas (1). Há uma inflamação anormal que não pode ser totalmente revertida, causada por pela combinação da obstrução dos bronquíolos e destruição do parênquima pulmonar (2, 3). Ainda, há uma troca gasosa deficiente nos tecidos, além de dificuldade na expiração do volume de ar do pulmão e aumento da pressão pulmonar, causado pela vasoconstrição das artérias pulmonares (1). No paciente, sintomas clínicos envolvem dispneia, tosse persistente e excesso na produção de secreção (1, 4). O diagnóstico da doença é feito através da espirometria: se, após o uso de um broncodilatador, a relação entre o volume expiratório forçado em um segundo (FEV1) e a capacidade vital forçada (FVC) for menor que 0,70, é indicativo de uma limitação no fluxo respiratório, ou seja, de DPOC (1). Quando há uma piora aguda dos sintomas clínicos que leva à alteração no tratamento, diz-se que o paciente está em exacerbação (1, 4). A exacerbação pode ser desencadeada pela exposição a fatores de risco, como cigarro, poluição, infecções nas vias aéreas – sejam elas virais ou bacterianas (1). O tratamento da exacerbação da DPOC busca minimizar os prejuízos causados pela exacerbação e evitar que novos episódios ocorram (1). Embora seja uma doença tratável, estima-se que em 2020 essa doença será a quinta maior causa de morte no mundo (5).

Em relação ao tratamento da DPOC, os fármacos mais utilizados são os corticoides (1, 2), broncodilatadores (6) e antibióticos (1), mas pode-se ainda ser necessário fazer uso da oxigenioterapia e ventilação mecânica.

Células-tronco mesenquimais (MSC) tem sido testadas como uma das potenciais estratégias para o tratamento da DPOC (7, 8), uma vez que possuem importante atividade imunomoduladora. A ação das MSC é capaz de modular respostas imune e inflamatória (9) e é influenciada pelo microambiente em que elas se encontram. São capazes de produzir, em resposta aos estímulos recebidos, uma série de fatores de crescimento e citocinas (10-12) e, com isso, reduzir a inflamação ou injúria, reparando o tecido (10). Essa capacidade de modular o ambiente se dá pelo efeito parácrino que as substâncias secretadas pela MSC têm sobre as células vizinhas (7). Para que ocorra a produção desses fatores, é preciso que haja a ativação das MSC, através de, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias (7, 9). Já se

tem mostrado que as MSC são capazes de produzir prostaglandina E2 (PGE2) – metabólito da enzima ciclo oxigenase 2, que tem um efeito antiproliferativo nas células mononucleares de sangue periférico (PBMC); quinurenina – um metabólito do L-triptofano produzido pela indolamina 2,3 dioxigenase (IDO), com efeito antiproliferativo nas células T (7, 13); e biliverdina e monóxido de carbono, produtos da hemeoxigenase-1 (HO-1) que induz o aumento do número de células T regulatórias (Treg); além de eritropoetina, fatores de crescimento endoteliais, angiopoetinas, interleucina 6 e uma série de outros fatores (7, 9). Em modelos murinos de DPOC, as MSC demonstraram afetar o grau de enfisema.

Recentemente, Yang Jin *et al* (14) demonstraram diferenças no perfil de linfócitos e citocinas dependendo do estágio da DPOC que o paciente se encontra. Por exemplo, linfócitos T reguladores (Treg) podem estar envolvidos na patogênese da DPOC, estando aumentados em pacientes que se encontram em exacerbação (15). Também, mostrou-se um aumento nos níveis de interleucina 17 (IL-17) em pacientes com DPOC. Essa interleucina tem um perfil inflamatório importante e é produzida pelas células Th 17 (16). Há, portanto, um desequilíbrio na relação entre Treg / IL-17 nesses pacientes, especialmente quando em exacerbação onde, aparentemente, as Treg não são capazes de produzir uma reação eficiente (14).

Desta forma, o presente estudo foi realizado para investigar se o paciente com DPOC ou DPOC exacerbada possui diferente capacidade de estimular o potencial imunomodulador das células-tronco mesenquimais.

Materiais e Métodos

Isolamento de Células-Tronco Adipoderivadas (AdMSC)

As AdMSC foram isoladas a partir de tecido adiposo obtido de pacientes (n = 3) submetidos a procedimentos cirúrgicos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O tecido adiposo foi submetido à digestão enzimática com uma solução de meio RPMI-1640 (Life Technologies, DE) contendo 2% de soro fetal bovino (SFB) e 300 u/mL de colagenase do tipo I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As células obtidas foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle médium* - DMEM (Life Technologies, DE) com 10% de SFB em estufa com temperatura e umidade controladas (37°C, 5%

CO₂). Trocas de meio ocorreram a cada 48 horas até que as células atingissem confluência adequada. Células com confluência de 80-90% eram repicadas para novos frascos de cultura ou então congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido.

Caracterização das MSC e Diferenciação Celular

Os ensaios de diferenciação das MSC foram realizados usando-se meios de indução de diferenciação celular, segundo as normas da *Internacional Society for Cell Transplantation*, que preconiza que as MSC devem ser capazes de se diferenciar em, obrigatoriamente, duas das três linhagens osteócito, adipócito e condrócito. Para diferenciação das células em osteócitos, adicionou-se 10 Mm β-glicerolfosfato, 10⁻⁸ M de dexametasona e 50 µg/mL de ácido ascórbico fosfatado ao meio de cultura e a detecção da diferenciação realizou-se por coloração com Alizarin Red S, que cora os depósitos de cálcio, presentes na matriz extracelular dos osteócitos. Para diferenciação em adipócitos, adicionou-se ao meio de cultivo 2,5 µg/mL Insulina, 5 µM Indometacina, 5 µM rosiglitazona dissolvido em DMSO e 10⁻⁷ M de dexametasona. A coloração foi feita com Oil Red, que cora os vacúolos com depósitos de gordura, tipicamente encontrados nos adipócitos.

Seleção dos Pacientes

Para o estudo, foram convidados a participar pacientes com DPOC provenientes do Ambulatório Especializado em DPOC do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em duas diferentes situações clínicas: não exacerbados e exacerbados, a partir dos critérios estabelecidos pelo *Global Initiative for Chronic Obstructive Disease* (1).

Os pacientes estudados tinham diagnóstico espirométrico de DPOC grave ou muito grave (VEF₁ < que 50%) com mais de 40 anos, com índice tabágico superior a 10 maços-ano, que cessaram o tabagismo há mais de um ano (1). O grupo um, de pacientes não exacerbados – DPOC, constituiu-se por pacientes clinicamente estáveis nas últimas 6 semanas não exacerbadores (sem exacerbações no último ano). O grupo dois é constituído por pacientes com DPOC na vigência de uma exacerbação aguda – DPOC EX. O terceiro grupo – grupo controle – é constituído

por indivíduos sem DPOC, não tabagistas e recrutados no Banco de Sangue do HCPA, que também passaram pelos critérios de inclusão e exclusão do estudo.

Excluiu-se do estudo pacientes portadores de doenças inflamatórias crônicas como doenças reumatológicas ou doença inflamatória intestinal, outras doenças pulmonares (doença pulmonar intersticial, tuberculose ativa, asma ou overlap asma/DPOC), insuficiência cardíaca ou cardiopatia isquêmica, cirrose, doença renal crônica, neoplasia maligna ou SIDA.

Coleta de Sangue e Isolamento da Fração Mononuclear de Sangue Total

Coletou-se 20 mL de sangue periférico dos pacientes selecionados após análise dos critérios e inclusão e exclusão e assinatura dos TCLEs. O sangue coletado foi dividido em tubos contendo anticoagulante e outros sem anticoagulante. Separou-se o soro do sangue periférico e parte dele foi congelada em freezer - 80°C. Com o sangue total, procedeu-se o isolamento da fração mononuclear (PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) com Ficoll-Paque PLUS (Sigma- Aldrich Ltda, Reino Unido) através de um processo de separação por gradiente de densidade, segundo protocolo do fabricante. O pellet de células formado foi ressuspensionado em meio RPMI-1640 com 10% de soro do paciente e 1% de penicilina.

Ensaio de co-cultura

A co-cultura de MSC e PBMC foi realizada em placas de 24 poços. 24 horas antes do ensaio, plaqueou-se 3×10^4 MSC em passagem 4 por poço com meio DMEM completo. No dia seguinte, o meio de cultura era trocado e as células submetidas a três diferentes tratamentos: um controle, composto por RPMI-1640 com 10% de SFB; o segundo tratamento foi feito com meio RPMI-1640 e 10% do soro do paciente; e, no terceiro tratamento, as MSC ficaram em meio RPMI-1640 com 10% do soro do paciente e também receberam um inserto – sistema de transmembrana com poro de 0,4 μm (Greiner Bio-one, Stonehouse, Glos, UK) – onde plaqueou-se as PBMCs isoladas (3×10^5 células por inserto) para cada grupo de pacientes. Esse sistema permite que haja troca de meio entre as células dos dois compartimentos, sem contato direto entre os diferentes tipos celulares. Ao final, a proporção de MSC:PBMC foi de 1:10.

Extração e Quantificação de RNA

As MSC, após 48 horas de co-cultura, foram submetidas à extração de RNA com o Kit comercial RNAeasy (Quiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fornecedor. Cada um dos tratamentos constituiu uma amostra e foram quantificados separadamente através do espectrofotômetro NanoDrop 3300 (Thermo Fischer, Wilmington, DE) e armazenadas em freezer -80°C.

Expressão gênica por qRT-PCR:

1 µg de cDNA foi sintetizado a partir do RNA extraído das MSC utilizando-se a transcriptase reversa SuperScript Vilo (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (*Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* – qRT-PCR) foi realizada no equipamento *Vii7 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os genes avaliados foram a COX-2 (F: 5' CAGCACTTCACGCATCAGTTT 3'; R: 5' GCGCAGTTTACGCTGTCTA 3') (17) e a HO-1 (F: 5' CACGCATATACCCGCTACCT 3' ; R: 5' AAGGCGGTCTTAGCCTCTTC 3') (18). A expressão do gene GAPDH (F: 5' CCCATCACCATCTTCCAGG 3' ; R: 5' GAGATGATGACCCTTTTGGC 3') foi usada como controle interno: $Ct = Ct(\text{gene}) - Ct(\text{GAPDH})$. Os resultados foram calibrados contra a expressão gênica das MSC cultivadas com SFB (controle interno) e analisadas pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Análises estatísticas

Os resultados obtidos na expressão dos genes COX-2 e HO-1 por qRT-PCR foram analisados com o *software* SPSS, versão 20.0. Fez-se teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. Os dados foram expressos por mediana (intervalo interquartil 25;75) e considerou-se valores de $p < 0,05$ significativos.

Resultados

Caracterização dos pacientes

As características clínicas dos pacientes com DPOC estão descritas na tabela abaixo.

Paciente	Grupo	Masc / Fem	Idade (anos)	Histórico de fumo (maços-ano)	FEV 1 (% predito)	FEV 1 (% FVC)	Teste de broncodilatação
1	DPOC	F	68	30	55	58	negativo
2	DPOC	F	58	50	31	52	negativo
3	DPOC	M	68	80	39	58	negativo
4	DPOC EX	F	66	36	24	34	negativo
5	DPOC EX	M	82	50	46	57	negativo
6	DPOC EX	F	60	11	58	43	positivo
7	Controle	F	42	-	-	-	-
8	Controle	F	53	-	-	-	-
9	Controle	F	38	-	-	-	-

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes. Grupo DPOC é formado por pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica estável. Grupo DPOC EX formado por pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica em exacerbação. Grupo de pacientes controle formados por pacientes saudáveis.

Caracterização das MSC isoladas

As células isoladas a partir de tecido adiposo apresentaram morfologia fibroblastoide e capacidade de aderência ao plástico. Também, as células foram capazes de se diferenciar em adipócitos e osteócitos, como mostra a figura a seguir.

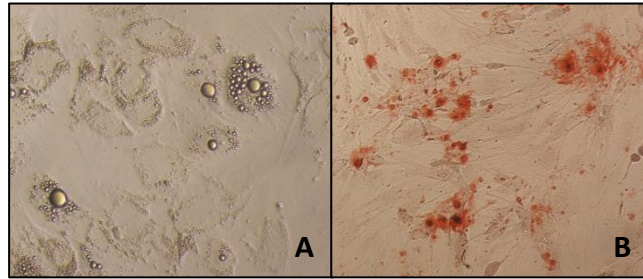


Figura 1: Capacidade de diferenciação das Células-Tronco Mesenquimais. (A) Diferenciação em adipócitos (aumento de 200x). (B) Diferenciação em osteócitos (aumento de 100x).

Expressão gênica da COX-2 e expressão gênica da HO-1

A expressão dos genes da COX-2 e da HO-1 foi avaliada pelos valores exponenciais de $\Delta\Delta CT$. As medianas de cada tratamento e o intervalo interquartil (25 ; 75) para os pacientes controle, DPOC e DPOC EX estão na tabela abaixo.

Grupo	Quantificação relativa COX-2	Quantificação relativa HO-1
MSC + Soro Controle	0,31 (0,30 ; 1,48)	0,09 (0,07 ; 2,00)
MSC + Soro DPOC	0,47 (0,42 ; 0,50)	0,09 (0,08 ; 0,10)
MSC + Soro DPOC EX	0,31 (0,25 ; 0,36)	0,06 (0,05 ; 0,07)
MSC + PBMC Controle	10,13 (7,59 ; 12,72)	0,18 (0,13 ; 0,31)
MSC + PBMC DPOC	2,94 (2,38 ; 3,43)	0,12 (0,08 ; 0,36)
MSC + PBMC DPOC EX	18,01 (14,20 ; 18,01)	0,07 (0,06 ; 0,09)

Tabela 2: Quantificação relativa dos genes da ciclooxigenase 2 (COX-2) e da hemeoxigenase 1 (HO-1) expressos nas células-tronco mesenquimais (MSC). Os seis diferentes grupos referem-se à combinação dos diferentes tratamentos *in vitro* e os diferentes grupos de pacientes: MSC com soro de paciente controle; MSC com soro de pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC); MSC com soro de pacientes com DPOC em exacerbação (DPOC EX); MSC com células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes controle; MSC com PBMC de pacientes com DPOC; e MSC com PBMC de pacientes DPOC EX.

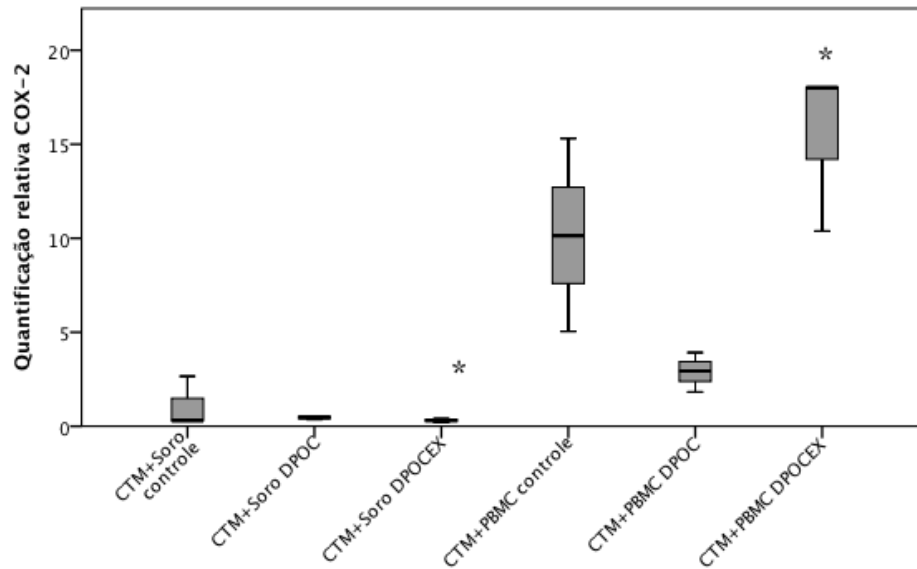


Figura 2: Expressão relativa do gene da ciclooxigenase 2 (COX-2) nas células-tronco mesenquimais submetidas a diferentes tipos de meio de cultura. Os seis diferentes grupos referem-se à combinação dos diferentes tratamentos *in vitro* e os diferentes grupos de pacientes: MSC com soro de paciente controle; MSC com soro de pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC); MSC com soro de pacientes com DPOC em exacerbação (DPOC EX); MSC com células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes controle; MSC com PBMC de pacientes com DPOC; e MSC com PBMC de pacientes DPOC EX. * $p=0,043$

Na comparação entre os diferentes tratamentos aos quais as MSC foram submetidas, observou-se que houve diferença estatística ($p=0,043$) na quantificação relativa de COX-2 apenas entre as MSC cultivadas com soro de DPOC EX e as MSC co-cultivadas com PBMC de pacientes DPOC EX.

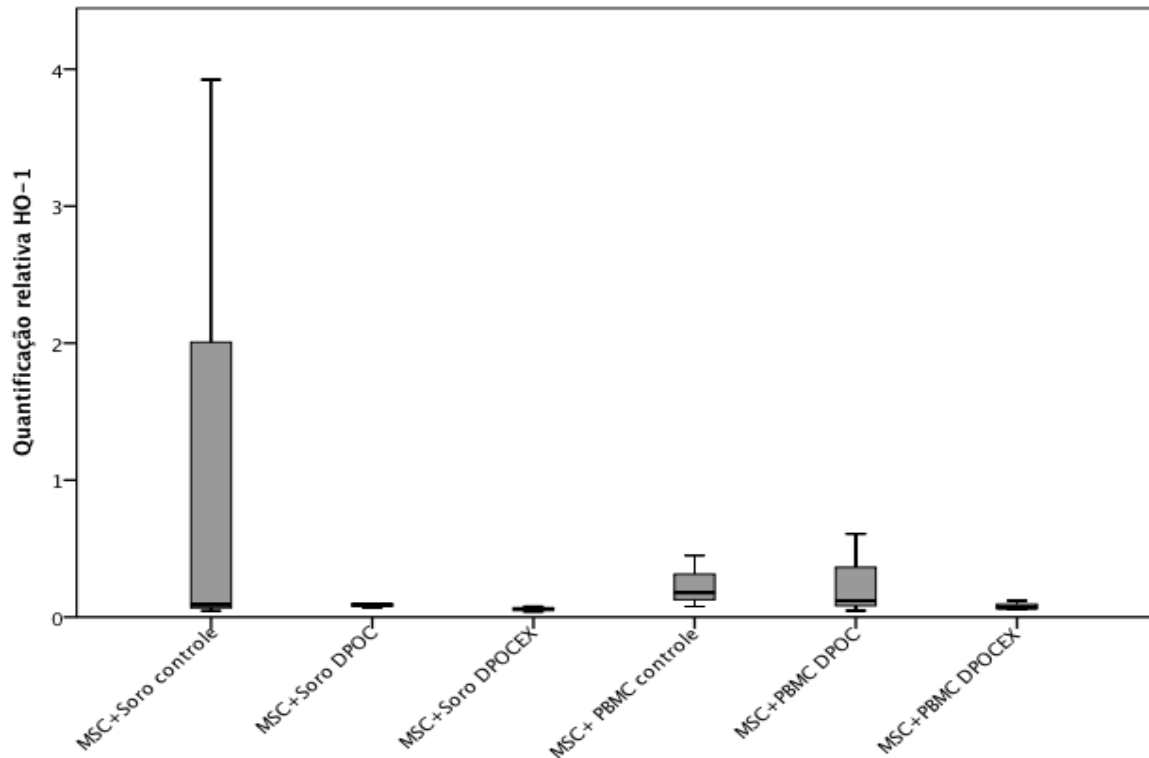


Figura 3: Expressão relativa do gene da hemeoxigenase 1 (HO-1) nas células-tronco mesenquimais submetidas a diferentes tipos de meio de cultura. Os seis diferentes grupos referem-se à combinação dos diferentes tratamentos *in vitro* e os diferentes grupos de pacientes: MSC com soro de paciente controle; MSC com soro de pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC); MSC com soro de pacientes com DPOC em exacerbação (DPOC EX); MSC com células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes controle; MSC com PBMC de pacientes com DPOC; e MSC com PBMC de pacientes DPOC EX.

Quando se observa o gráfico da quantificação relativa da expressão de HO-1 nas MSC, nota-se que não houve diferença estatística entre os grupos avaliados.

Discussão

Infusões intravenosas de células-tronco mesenquimais têm sido usadas em ensaios clínicos (FASE I) para tratar diferentes patologias. Os ensaios têm demonstrado que a infusão é segura e que não apresenta efeitos adversos importantes. Em modelos animais, tem-se observado que após a infusão intravenosa de MSC, a maioria dessas células é retida no pulmão, mas a *pega* destas células no tecido é rara, tanto pela via transtraqueal quanto sistêmica (19). Dessa forma, tem-se sugerido que o efeito terapêutico dessas células é resultado da

ação parácrina que as MSC realizam. Contudo, a atividade modulatória das MSC não é constitutivamente expressa, mas depende de um processo de sinalização dependente do microambiente em que elas se encontram. O efeito imunomodulatório é multifatorial, mediado por citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ , TNF alfa ou a ativação de receptores “*Toll-like*” por agentes infecciosos. Experimentalmente, o que se tem observado é que o momento exato para a administração de uma terapia com células-tronco depende da caracterização do microambiente inflamatório onde as células irão atuar (20).

Em uma recente revisão sobre o uso de terapia celular para doenças pulmonares, Weiss escreve que doenças crônicas com baixos níveis de inflamação, não são alvos terapêuticos para as MSC (21). A DPOC é uma doença pulmonar crônica, e pode apresentar graus diferentes de inflamação nos diferentes estágios da doença. Cientes dessas informações, definimos a hipótese que pacientes exacerbados seriam melhores respondedores às MSC e que este momento da DPOC poderia ter alta eficácia.

Células-Tronco mesenquimais podem secretar uma grande quantidade de moléculas que irão interagir com sistema imune do receptor. Dentre estas estão a COX-2 e a HO-1. A COX-2 é uma isoenzima, capaz de ter sua expressão aumentada ou reduzida dependendo dos estímulos do ambiente. O seu produto, a prostaglandina E2 (PGE2) é tradicionalmente conhecida como uma molécula com ação pró-inflamatória. Porém, uma série de estudos tem mostrados que a PGE2 pode atuar suprimindo a expressão de células T, macrófagos e *natural killers*, através da indução de expressão de citocinas, como interleucinas 6 e 10 (7, 9).

Em um estudo recente (22), a capacidade anti-inflamatória da PGE2 foi relacionada a um grupo específico de receptores, EP₄. A PGE2 exógena, quando ativa esse receptor, tem efeitos broncodilatador e anti-inflamatório importantes em modelo animal. Isso corrobora com a hipótese de que a molécula tem potencial para uma resposta benéfica, quando se trata de distúrbios respiratórios que envolvam inflamação.

No presente estudo, as MSC que estiveram em contato com as PBMC expressaram valores mais altos de COX-2 do que células cultivadas somente com soro de pacientes, ou controle ou ainda com meio de cultivo padrão. Além disso, vale destacar que quando as MSC foram co-cultivadas com PBMC de pacientes com

DPOC exacerbados, no sistema transmembrana, foi possível observar um aumento de quase 15 vezes na expressão de COX-2, quando comparada com o nível de expressão deste gene com as MSC cultivadas somente com o soro dos mesmos pacientes. Isso indica que há comunicação entre as células mediadas por fatores, visto que esse dado foi obtido no sistema *in vitro*, que permite comunicação através de fatores solúveis sem o contato direto entre as células, foi fundamental para o intenso efeito imunomodulador observado especialmente quando as MSC foram co-cultivadas com as PBMC de pacientes exacerbados. O aumento na expressão gênica da COX-2 em pacientes exacerbados pode ser pela provável presença de linfócitos B ativados. Vale destacar que estes dados devem ser confirmados com um número superior de pacientes por grupo.

A hemeoxigenase é uma enzima intracelular que degrada o grupo heme em biliverdina, monóxido de carbono e ferro divalente. É a sua isoenzima do tipo 1 – HO-1 - que considera-se ter uma atividade anti-inflamatória. Na literatura, seus efeitos sobre os linfócitos T regulatórios (Treg) são descritos, modulando as células através do aumento da secreção de interleucina 10 (7, 18). Uma vez que as células Treg são conhecidas por sua capacidade anti-inflamatória e já foi descrito um desequilíbrio na quantidade dessas células em pacientes com doenças pulmonares, esperava-se que, quando as MSC fossem colocadas em contato com o soro de pacientes exacerbados e também quando as MSC fossem co-cultivadas com as PBMC desses pacientes, houvesse um aumento na expressão da HO-1. Porém, Mouggiakakos e colaboradores descrevem uma alta variabilidade na expressão deste gene. E, assim, possivelmente, com um número maior de pacientes por grupo seja possível observar resultados mais fidedignos a respeito da influência das PBMC e do soro de pacientes com DPOC na regulação gênica das MSC (23).

Desta forma, após avaliar a influência de soro e PBMC de pacientes com DPOC exacerbados ou não, foi possível demonstrar, através de experimentos *in vitro*, que fatores secretados pelas PBMC de pacientes com DPOC exacerbado exercem alta influência sobre as MSC. Nestas condições as MSC expressam grandes quantidades de RNA codificando COX-2.

Agradecimentos

Agradecemos aos órgãos financiadores FIFE-HCPA, CNPq e CAPES.

Referências Bibliográficas

1. Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(4):347-65.
2. Woods JA, Wheeler JS, Finch CK, Pinner NA. Corticosteroids in the treatment of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:421-30.
3. Cazzola M, Hanania NA, MacNee W, Rüdell K, Hackford C, Tamimi N. A review of the most common patient-reported outcomes in COPD - revisiting current knowledge and estimating future challenges. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:725-38.
4. De Soyza A, Calverley PM. Large trials, new knowledge: the changing face of COPD management. *Eur Respir J*. 2015;45(6):1692-703.
5. Torres-Sánchez I, Rodríguez-Alzueta E, Cabrera-Martos I, López-Torres I, Moreno-Ramírez MP, Valenza MC. Cognitive impairment in COPD: a systematic review. *J Bras Pneumol*. 2015;41(2):182-90.
6. Lim TK, Ko FW, Thomas PS, Grainge C, Yang IA. Year in review 2014: Chronic obstructive pulmonary disease, asthma and airway biology. *Respirology*. 2015;20(3):510-8.
7. Doorn J, Moll G, Le Blanc K, van Blitterswijk C, de Boer J. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012;18(2):101-15.
8. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
9. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol*. 2012;33(3):136-43.
10. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:457-78.
11. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*. 2013;45:e54.
12. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009;217(2):318-24.
13. Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med*. 2012;18(2):128-34.
14. Jin Y, Wan Y, Chen G, Chen L, Zhang MQ, Deng L, et al. Treg/IL-17 ratio and Treg differentiation in patients with COPD. *PLoS One*. 2014;9(10):e111044.
15. Xiong XZ, Jin Y, Zhou Q, Zhang XJ, Du W, Liu W, et al. [Correlation between FoxP3(+) regulatory T cells and chronic obstructive pulmonary disease]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2008;88(7):471-4.
16. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, et al. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of

- stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol*. 2009;157(2):316-24.
17. Manferdini C, Maumus M, Gabusi E, Piacentini A, Filardo G, Peyrafitte JA, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E2. *Arthritis Rheum*. 2013;65(5):1271-81.
 18. Li JG, Zhuan-sun YX, Wen B, Wu H, Huang FT, Ghimire H, et al. Human mesenchymal stem cells elevate CD4+CD25+CD127low/- regulatory T cells of asthmatic patients via heme oxygenase-1. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2013;12(3):228-35.
 19. Rolandsson S, Karlsson JC, Scheduling S, Westergren-Thorsson G. Specific subsets of mesenchymal stroma cells to treat lung disorders--finding the Holy Grail. *Pulm Pharmacol Ther*. 2014;29(2):93-5.
 20. Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia*. 2011;25(9):1408-14.
 21. Weiss DJ, Bertoncetto I, Borok Z, Kim C, Panoskaltsis-Mortari A, Reynolds S, et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc Am Thorac Soc*. 2011;8(3):223-72.
 22. Birrell MA, Maher SA, Dekkak B, Jones V, Wong S, Brook P, et al. Anti-inflammatory effects of PGE2 in the lung: role of the EP4 receptor subtype. *Thorax*. 2015.
 23. Mouggiakakos D, Jitschin R, Johansson CC, Okita R, Kiessling R, Le Blanc K. The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells. *Blood*. 2011;117(18):4826-35.

ANEXO

Instruções Redatoriais para publicação e trabalhos no Jornal Brasileiro de Pneumologia

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

O Jornal Brasileiro de Pneumologia (J Bras Pneumol) ISSN-1806-3713, publicado bimestralmente, é órgão oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia destinado à publicação de trabalhos científicos referentes à Pneumologia e áreas correlatas.

Todos os manuscritos, após aprovação pelo Conselho Editorial serão avaliados por revisores qualificados, sendo o anonimato garantido em todo o processo de julgamento.

Os artigos que não apresentarem mérito, que contenham erros significativos de metodologia, ou não se enquadrem na política editorial da revista, serão rejeitados diretamente pelo Conselho Editorial, não cabendo recurso. Os artigos podem ser escritos em português, espanhol ou inglês. Na versão eletrônica do Jornal (www.jornaldepneumologia.com.br, ISSN-1806-3756) todos os artigos serão disponibilizados tanto numa versão em língua latina como também em inglês. A impressão de figuras coloridas é opcional e os custos relativos a esse processo serão transferidos aos autores. Favor entrar em contato com a secretaria do Jornal por e-mail ou telefone, para esclarecimentos adicionais.

O Jornal Brasileiro de Pneumologia apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), reconhecendo a importância dessas iniciativas para o registro e divulgação internacional de informações sobre estudos clínicos em acesso aberto. Sendo assim, somente serão aceitos para publicação, a partir de 2007, os artigos de pesquisas clínicas que tenham recebido um número de identificação em um dos Registros de Ensaios Clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE, cujos endereços estão disponíveis no site do ICMJE. O número de identificação deverá ser registrado ao final do resumo.

Dentro desse contexto, o Jornal Brasileiro de Pneumologia adota a definição de ensaio clínico preconizada pela OMS, que pode ser assim resumida: "qualquer pesquisa que prospectivamente designe seres humanos para uma ou mais intervenções visando avaliar seus efeitos em desfechos relacionados à saúde. As intervenções incluem drogas, células e outros produtos biológicos, procedimentos cirúrgicos, radiológicos, dispositivos, terapias comportamentais, mudanças de processos de cuidados, cuidados preventivos, etc".

CRITÉRIOS DE AUTORIA

A inclusão de um autor em um manuscrito encaminhado para publicação só é justificada se ele contribuiu significativamente, do ponto de vista intelectual, para a sua realização. Fica implícito que o autor participou em pelo menos uma das seguintes fases: 1) concepção e planejamento do trabalho, bem como da interpretação das evidências; 2) redação e/ou revisão das versões preliminares e definitiva; e 3) aprovou a versão final.

A simples coleta e catalogação de dados não constituem critérios para autoria. Igualmente, não devem ser considerados autores, auxiliares técnicos que fazem a rotina, médicos que encaminham pacientes ou interpretam exames de rotina e chefes de serviços ou departamentos, não diretamente envolvidos na pesquisa. A essas pessoas poderá ser feito agradecimento especial.

Os conceitos contidos nos manuscritos são de responsabilidade exclusiva dos autores.

Com exceção de trabalhos considerados de excepcional complexidade, a revista considera 8 o número máximo aceitável de autores. No caso de maior número de autores, enviar carta a Secretaria do Jornal descrevendo a participação de cada um no trabalho.

APRESENTAÇÃO E SUBMISSÃO DOS MANUSCRITOS

Os manuscritos deverão ser obrigatoriamente encaminhados via eletrônica a partir do sistema de submissão ScholarOne:

<https://mc04.manuscriptcentral.com/jbpneu-scielo>. As instruções e o processo de submissão estão descritos abaixo.

Ainda que os manuscritos sejam submetidos eletronicamente, deverão ser enviadas pelo correio Carta de Transferência de Copyright e Declaração de Conflitos de Interesses, assinadas por todos os autores, conforme modelo disponível aqui: **Declaração de Conflito de Interesse**"

Pede-se aos autores que sigam rigorosamente as normas editoriais da revista, particularmente no tocante ao número máximo de palavras, tabelas e figuras permitidas, bem como às regras para confecção das referências bibliográficas. A não observância das instruções redatoriais implicará na devolução do manuscrito pela Secretaria da revista para que os autores façam as correções pertinentes antes de submetê-lo aos revisores.

Instruções especiais se aplicam para a confecção de Suplementos Especiais e Diretrizes e devem ser consultadas pelos autores antes da confecção desses documentos na homepage do jornal.

A revista reserva o direito de efetuar nos artigos aceitos adaptações de estilo, gramaticais e outras.

Com exceção das unidades de medidas, siglas e abreviaturas devem ser evitadas ao máximo, devendo ser utilizadas apenas para termos consagrados. Estes termos estão definidos na Lista de Abreviaturas e Acrônimos aceitos sem definição. Clique aqui (**Lista de Abreviaturas e Siglas**). Quanto a outras abreviaturas, sempre defini-las na primeira vez em que forem citadas, por exemplo: proteína C reativa (PCR). Após a definição da abreviatura, o termo completo não deverá ser mais utilizado. Com exceção das abreviaturas aceitas sem definição, elas não devem ser utilizadas nos títulos e evitadas no resumo dos manuscritos se possível. Ao longo do texto igualmente evitar a menção ao nome de autores, dando-se sempre preferência às citações numéricas apenas.

Quando os autores mencionarem qualquer substância ou equipamento incomum, deverão incluir o modelo/número do catálogo, o nome da fabricante, a cidade e o país, por exemplo:

"... esteira ergométrica (modelo ESD-01; FUNBEC, São Paulo, Brasil)..."

No caso de produtos provenientes dos EUA e Canadá, o nome do estado ou província também deverá ser citado; por exemplo: "... tTG de fígado de porco da Guiné (T5398; Sigma, St. Louis, MO, EUA) ..."

PREPARO DO MANUSCRITO

A página de identificação deve conter o título do trabalho, em português e inglês, nome completo e titulação dos autores, instituições a que pertencem, endereço completo, inclusive telefone, fax e e-mail do autor principal, e nome do órgão financiador da pesquisa, se houver. Essa página deve ser enviada como um arquivo a parte, separado do manuscrito principal. (enviar como TITLE PAGE)

Resumo: Deve conter informações facilmente compreendidas, sem necessidade de recorrer-se ao texto, não excedendo 250 palavras. Deve ser feito na forma estruturada com: Objetivo, Métodos, Resultados e Conclusões. Quando tratar-se de artigos de Revisão e Relatos de Casos o Resumo não deve ser estruturado. Para Comunicações Breves não deve ser estruturado nem exceder 100 palavras.

Abstract: Uma versão em língua inglesa, correspondente ao conteúdo do Resumo deve ser fornecida.

Descritores e Keywords: Deve ser fornecido de três a seis termos em português e inglês, que definam o assunto do trabalho.

Texto:

Artigos originais: O texto deve ter entre 2000 e 3000 palavras, excluindo referências e tabelas. Deve conter no máximo 6 tabelas e/ou figuras. O número de referências bibliográficas não deve exceder 40. A sua estrutura deve conter as seguintes partes: Introdução, Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências. A seção Métodos deverá conter menção a aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, ou pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais, ligados a Instituição onde o projeto foi desenvolvido. Nessa seção também deve haver descrição da análise estatística empregada, com as respectivas referências bibliográficas. Ainda que a inclusão de subtítulos no manuscrito seja aceitável, o seu uso não deve ser excessivo e deve ficar limitado às sessões Métodos e Resultados somente.

Revisões e Atualizações: Serão realizadas a convite do Conselho Editorial que, excepcionalmente, também poderá aceitar trabalhos que considerar de grande interesse. O texto não deve ultrapassar 5000 palavras, excluindo referências e tabelas. O número total de ilustrações e tabelas não deve ser superior a 8. O número de referências bibliográficas deve se limitar a 60.

Ensaio pictórico: Serão igualmente realizados a convite, ou após consulta dos autores ao Conselho Editorial. O texto não deve ultrapassar 3000 palavras, excluindo referências e tabelas. O número total de ilustrações e tabelas não deve ser superior a 12 e as referências bibliográficas não devem exceder 30.

Relatos de Casos: O texto não deve ultrapassar 1500 palavras, excluindo as referências e figuras. Deve ser composto por Introdução, Relato do Caso, Discussão e Referências. Recomenda-se não citar as iniciais do paciente e datas, sendo mostrados apenas os exames laboratoriais relevantes para o diagnóstico e discussão. O número total de ilustrações e/ou tabelas não deve ser superior a 3 e o limite de referências bibliográficas é 20. Quando o número de casos apresentados exceder 3, o manuscrito será classificado como uma Série de Casos, e serão aplicadas as mesmas regras de um artigo original.

Comunicações Breves: O texto não deve ultrapassar 1500 palavras, excluindo as referências e tabelas. O número total de tabelas e/ou figuras não deve exceder 2 e o de referências bibliográficas 20. O texto deverá ser confeccionado de forma corrida.

Cartas ao Editor: Devem ser contribuições originais contendo resultados preliminares, não ultrapassando 1000 palavras e com não mais do que 10 referências bibliográficas e 2 tabelas e/ou figuras.

Correspondência: Serão consideradas para publicação comentários e sugestões relacionadas a matéria anteriormente publicada, não ultrapassando 500 palavras no total.

Imagens em Pneumologia: o texto deve ser limitado ao máximo de 400 palavras, incluindo título, texto e até 3 referências. É possível incluir até o máximo de 3 figuras, considerando-se que o conteúdo total será publicado em apenas uma página.

Tabelas e Figuras: Tabelas e gráficos devem ser apresentados em preto e branco, com legendas e respectivas numerações impressas ao pé de cada ilustração. As tabelas e figuras devem ser enviadas no seu arquivo digital original, as tabelas preferencialmente em arquivos Microsoft Word e as figuras em arquivos Microsoft Excel, Tiff ou JPG. Fotografias de exames, procedimentos cirúrgicos e biópsias onde foram utilizadas colorações e técnicas especiais serão consideradas para impressão colorida, sem custo adicional aos autores. As grandezas, unidades e símbolos devem obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT: <http://www.abnt.org.br>).

Legendas: Legendas deverão acompanhar as respectivas figuras (gráficos, fotografias e ilustrações) e tabelas. Cada legenda deve ser numerada em algarismos arábicos, correspondendo a suas citações no texto. Além disso, todas as abreviaturas e siglas empregadas nas figuras e tabelas devem ser definidas por extenso abaixo das mesmas.

Referências: Devem ser indicadas apenas as referências utilizadas no texto, numeradas com algarismos arábicos e na ordem em que foram citadas. A apresentação deve estar baseada no formato Vancouver Style, atualizado em outubro de 2004, conforme os exemplos abaixo. Os títulos dos periódicos citados devem ser abreviados de acordo com o estilo apresentado pela List of Journal Indexed in Index Medicus, da National Library of Medicine disponibilizados no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/journals/loftext.noprov.html>.

Para todas as referências, cite todos os autores até seis. Acima desse número, cite os seis primeiros autores seguidos da expressão et al.

Exemplos:

Artigos Originais

1. Neder JA, Nery LE, Castelo A, Andreoni S, Lerario MC, Sachs AC et al. Prediction of metabolic and cardiopulmonary responses to maximum cycle ergometry: a randomized study. Eur Respir J. 1999;14(6):1204-13.

Resumos

2. Singer M, Lefort J, Lapa e Silva JR, Vargaftig BB. Failure of granulocyte depletion

to suppress mucin production in a murine model of allergy [abstract]. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:A863.

Capítulos de Livros

3. Queluz T, Andres G. Goodpastures syndrome. In: Roitt IM, Delves PJ, editors. Encyclopedia of Immunology. 1st ed. London: Academic Press; 1992. p. 621-3.

Publicações Oficiais

4. World Health Organization. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO/Tb, 1994;178:1-24.

Teses

5. Martinez TY. Impacto da dispnéia e parâmetros funcionais respiratórios em medidas de qualidade de vida relacionada a saúde de pacientes com fibrose pulmonar idiopática [thesis]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1998.

Artigos Publicados na Internet

6. Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12]; 102(6): [about 3 p.]. Available from:

<http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Homepages/Endereços Eletrônicos

7. Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>

Outras situações:

Na eventualidade do surgimento de situações não contempladas por estas Instruções Redatoriais, deverão ser seguidas as recomendações contidas em International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Updated October 2004. Disponível em <http://www.icmje.org/>.istente Editorial Luana Campos)