

**Atualização**

## Terapia celular nas doenças respiratórias.

Cell therapy for respiratory diseases.

*Soraia Carvalho Abreu<sup>1</sup>, Caroline Pinto Passaro<sup>2</sup>, Cristiane Sousa Nascimento Baez Garcia<sup>3</sup>, Marcelo Marcos Morales<sup>4</sup>, Patricia Rieken Macedo Rocco<sup>5</sup>.*

### RESUMO

As células-tronco são definidas como células indiferenciadas, com capacidade de se dividir por período indefinido, em cultura, e se diferenciar em diversos tipos celulares especializados, dependendo do estímulo ao qual são submetidas. Nesse artigo, será realizada uma revisão crítica dos efeitos da terapia com células-tronco em algumas doenças respiratórias tais como: síndrome do desconforto respiratório agudo, fibrose pulmonar, asma e enfisema. Estudos recentes têm mostrado os efeitos benéficos da administração de células-tronco endógenas e exógenas no desenvolvimento, reparo e remodelamento do pulmão em diversas doenças respiratórias. Entretanto, a biologia das células-tronco ainda é pouco entendida devido às limitações técnicas atuais, estando diversas questões ainda sem respostas. Portanto, mais estudos são necessários para um melhor entendimento dos mecanismos que controlam a divisão e diferenciação dessas células, para que, assim, a terapia celular possa ser utilizada de maneira segura e eficaz em humanos.

**Descritores:** Fibrose; síndrome do desconforto respiratório agudo; asma; enfisema.

### ABSTRACT

Stem cells are defined as undifferentiated progenitors that can self-renew *ad infinitum* and differentiate into various specialized cell types depending on the stimulus to which they are submitted. In this article, we will perform a critical review of the effects of cell therapy in respiratory diseases such as: acute respiratory distress syndrome, pulmonary fibrosis, asthma, and emphysema. Recent studies have shown the beneficial effects of endogenous and exogenous stem cells in lung development, repair and remodeling in respiratory diseases. However, the biology of stem cells remains poorly understood due to technical limitations, and some important questions need to be answered. More studies should be performed to better understand the mechanisms that control cell division and differentiation, therefore enabling the use of cell therapy in human respiratory diseases.

**Keywords:** Fibrosis; acute respiratory distress syndrome; asthma; emphysema.

1. Mestranda em Ciências Biológicas (Fisiologia) do Laboratório de Investigação Pulmonar, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

2. Doutora em Ciências Biológicas (Fisiologia) e Pós-doutoranda do Laboratório de Investigação Pulmonar, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

3. Doutora em Ciências Biológicas (Fisiologia) e Pós-doutoranda em Fisiologia e Farmacodinâmica da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

4. Professor Associado do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

5. Professora Associada do Laboratório de Investigação Pulmonar, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Trabalho realizado no Laboratório de Investigação Pulmonar, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Apoio Financeiro: Programa de Núcleos de Excelência – Ministério de Ciência e Tecnologia (PRONEX-FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Instituto do Milênio (IM-INOVAR).

**Endereço para correspondência:** Patricia Rieken Macêdo Rocco. Laboratório de Investigação Pulmonar, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Edifício do Centro de Ciências da Saúde, Bloco G-014, Av. Carlos Chagas Filho, s/n, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, CEP: 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel: (+5521)2562-6530, Fax: (+5521) 2280-8193, e-mail: prmrocco@biof.ufrj.br.

Recebido em 01/04/2008 e aceito em 30/06/2008, após revisão.

## INTRODUÇÃO

O conceito de células-tronco foi introduzido por Alexander Maximow no início do século XX.<sup>1</sup> Entretanto, somente em 1963, Till e McCullough apresentaram evidências consistentes da existência de células-tronco na medula óssea.<sup>2,3</sup> As células-tronco são definidas como células indiferenciadas capazes de se dividirem indefinidamente e se diferenciarem em diversos tipos celulares especializados.<sup>4</sup> A capacidade das células-tronco de se proliferarem e se diferenciarem em diversos tipos celulares faz com que as mesmas sejam vistas como possíveis fontes de cura para diversas doenças, até então sem um tratamento eficaz.

As células-tronco podem ser classificadas segundo diferentes critérios. No que tange à sua capacidade de diferenciação, podemos classificá-las em: 1) totipotentes: células capazes de se diferenciarem em todos os tipos celulares do organismo, além das células da placenta. Apenas o zigoto, o embrião e as células descendentes das primeiras divisões celulares (até 64 divisões) são considerados células totipotentes; 2) pluripotentes: células capazes de se diferenciarem em praticamente todos os tipos celulares provenientes dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma), incluindo as células germinativas; 3) multipotentes: células capazes de se diferenciarem em diversos tipos celulares derivados de um mesmo folheto embrionário.<sup>5</sup> As células-tronco também podem ser classificadas, segundo a sua origem, em dois principais tipos celulares: embrionárias e adultas (somáticas) (Figura 1). As células-tronco embrionárias (CTE) são células pluripotentes, já que são capazes de se diferenciarem em todos os tipos celulares do organismo. Já as células-tronco adultas (CTA) são multipotentes, uma vez que possuem capacidade de diferenciação mais limitada, apenas dando origem a tipos celulares derivados de um mesmo folheto embrionário. Há também as chamadas células precursoras ou progenitoras que, de maneira semelhante às células-tronco, têm capacidade proliferativa, porém estão comprometidas com certas linhagens celulares. As diferenças entre as CTA e as células progenitoras permanecem incertas e necessitam de mais estudos.

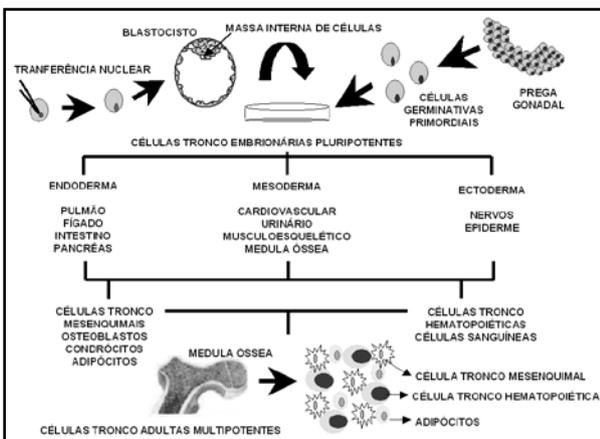


Figura 1 - Representação esquemática das células-tronco quanto as suas diversas classificações.

O presente artigo traz uma revisão crítica da literatura acerca das células-tronco e dos seus efeitos terapêuticos em algumas doenças respiratórias, tais como: síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), fibrose pulmonar, asma e enfisema.

## CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

As células-tronco embrionárias (CTE) são obtidas do interior da massa celular de embriões em estado de blastocisto. Tais células foram primeiramente isoladas por James Thomson e colaboradores, em 1998, sendo obtidas de embriões criados por fertilização *in vitro*.<sup>6</sup> As CTE também podem ser obtidas através da técnica de transferência nuclear, onde o núcleo de uma célula doadora é transferido para o interior do citoplasma de um ovo anucleado. No citoplasma dessa célula híbrida existem fatores que permitem seu desenvolvimento até o estágio de blastocisto. As CTE obtidas desse blastocisto possuem o mesmo DNA da célula doadora. As CTE são células pluripotentes, ou seja, capazes de se proliferarem, sem se diferenciarem em tipos celulares específicos. No entanto, quando necessário, as CTE são capazes de se diferenciarem tanto morfológica quanto funcionalmente em diversos tipos celulares, permitindo o reparo de inúmeros tecidos do organismo. Assim, as CTE são vistas como uma possível forma de tratamento para diversas doenças consideradas incuráveis, como: doença de Parkinson, infarto do miocárdio, doenças neurodegenerativas, entre outras.<sup>7</sup>

Vários estudos demonstraram sucesso na obtenção de diversos tipos celulares a partir de CTE em laboratório: cardiomiócitos,<sup>8</sup> hepatócitos,<sup>9</sup> células beta-pancreáticas, células sanguíneas, assim como células dos epitélios alveolar<sup>10,11</sup> e das vias aéreas.<sup>12</sup>

A terapia com CTE apresenta limitações, tais como: 1) a grande questão ética que rodeia a obtenção e a utilização de CTE humanas e 2) a elevada incidência de formação de tumores (teratomas e teratocarcinomas) após o transplante de CTE. Entretanto, quando CTE imaturas são cultivadas em condições que induzam uma diferenciação por uma via específica, a gênese de tumores parece ser reduzida. Outra limitação associada ao transplante de CTE é o risco de rejeição, como ocorre em qualquer outro tipo de transplante. Logo, é necessário associar terapia imunossupressora que expõe o paciente a diversos efeitos adversos. Uma solução para tal problema seria a utilização da técnica de transferência nuclear para a obtenção de tais células, já que as células transplantadas possuiriam o mesmo DNA do receptor e as chances de rejeição, em casos de transplantes, seriam quase nulas. Porém, atualmente, isso não é possível, nem economicamente, nem cientificamente, necessitando de mais investimentos financeiros e estudos.

## CÉLULAS-TRONCO ADULTAS

As células-tronco adultas (CTA) ou somáticas são células-tronco presentes durante a vida adulta em alguns tecidos e órgãos, permitindo o reparo e a reposição

ção dos tecidos nos quais residem, em resposta a eventos traumáticos ou mesmo ao *turnover* celular natural.

As CTA são células multipotentes, que apresentam a capacidade de se diferenciarem em um número limitado de tipos celulares em função de sua origem embrionária, sendo essa a grande diferença entre as CTA e as CTE.<sup>13</sup> Entretanto, nos últimos anos, tem sido demonstrado que as CTA possuem capacidade proliferativa e de diferenciação muito maior do que se imaginava. Diversos estudos relataram que as CTA são capazes de se diferenciarem em fibras musculares esqueléticas, músculo cardíaco, neurônios do sistema nervoso central,<sup>14</sup> além de hepatócitos<sup>15</sup> e células endoteliais, ou seja, formando tecidos de camadas embrionárias distintas.<sup>16</sup> Essa elevada capacidade de diferenciação das CTA está relacionada a alguns fenômenos, tais como: 1) diferenciação: processo através do qual uma célula indiferenciada torna-se mais complexa e especializada, no que tange à sua estrutura e função (um exemplo seria a célula epitelial tipo II se diferenciando em tipo I); 2) desdiferenciação: processo pelo qual uma célula já comprometida com uma determinada linhagem é reprogramada, tornando-se uma célula mais imatura e com maior potencial proliferativo e de diferenciação (um exemplo seria a célula epitelial tipo I originando célula epitelial tipo II); 3) transdiferenciação: nesse evento, uma célula já diferenciada se transforma em um outro tipo celular completamente diferenciado (ex: células-tronco hematopoiéticas se diferenciando em tecido pulmonar); 4) transdiferenciação direta: processo através do qual uma célula diferenciada multipotente se transforma de forma direta em outro tipo celular com estrutura e função mais complexas e especializadas (ex: células tronco hematopoiéticas se diferenciando em célula epitelial tipo I) e 5) transdiferenciação oblíqua: processo caracterizado pela transformação, de forma indireta, de células diferenciadas multipotentes em outros tipos celulares em estados mais imaturos, porém com maior capacidade proliferativa (ex: células-tronco hematopoiéticas se diferenciando em célula epitelial tipo II).<sup>17</sup> Entretanto, nos últimos anos, a capacidade de transdiferenciação tem sido questionada, sendo outros fenômenos considerados responsáveis pela maior capacidade proliferativa das CTA como, por exemplo, a fusão celular.<sup>18</sup> A fusão das células-tronco adultas derivadas da medula óssea com células epiteliais pulmonares pode ocorrer sob várias circunstâncias *in vitro*, mas esse fenômeno parece não ocorrer com tanta frequência em pulmões *in vivo*. É fundamental a realização de mais estudos para o entendimento dos mecanismos moleculares que levam à diferenciação das CTA. Certamente, o entendimento desses mecanismos auxiliará no uso das CTA nas diferentes doenças respiratórias.

Acredita-se que as CTA sejam recrutadas para o local de lesão através da liberação de sinais quimiotáticos e/ou aumento da expressão de moléculas de

adesão específicas. Outro fator que permanece sem resposta é o mecanismo pelo qual a CTA consegue atravessar a membrana basal do tecido lesado e alcançar as áreas lesadas. Considera-se que tal fenômeno ocorra pelos mesmos mecanismos, através dos quais as células de defesa conseguem atingir seu alvo, ou seja, acredita-se que as permeabilidades de tais membranas sejam reguladas pela produção de proteínas sintetizadas pelo próprio tecido, controlando o influxo das CTA para a área lesada.

Vários tecidos são fontes de CTA: epiderme, músculo esquelético, fígado, intestino, testículo, retina e, mais recentemente, sistema nervoso central, coração e pulmão, órgãos ditos, até então, com pouca capacidade regenerativa.<sup>19,20</sup> No tecido pulmonar, há pelo menos três regiões distintas descritas como fontes de células-tronco: regiões intercartilaginosas das vias aéreas traqueobrônquicas,<sup>21</sup> corpos neuroepiteliais nos bronquíolos<sup>22</sup> e junções dos ductos broncoalveolares,<sup>23,24</sup> sendo que tais células seriam recrutadas, principalmente, em situações onde o tecido pulmonar fosse lesado. No entanto, ainda não se sabe se órgãos complexos como o pulmão, com baixa capacidade proliferativa, seguem o mesmo sistema hierárquico das células-tronco observadas em órgãos com alta capacidade proliferativa, que permanecem quiescentes até a injúria. Essa distinção é de extrema importância para a medicina regenerativa. Entretanto, a principal fonte de CTA é a medula óssea, onde se podem encontrar dois tipos de células-tronco, as hematopoiéticas, que são células que possuem a capacidade de se proliferarem e se diferenciarem em células sanguíneas,<sup>25</sup> e as mesenquimais, que são células encontradas no estroma da medula óssea e são capazes de se proliferarem e se diferenciarem em diversos tipos celulares, dentre eles osteoblastos, condroblastos e adipócitos.

## TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO NAS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS

### **Síndrome do desconforto respiratório agudo**

A SDRA é uma doença pulmonar grave, caracterizada por processos inflamatório e fibroelastogênico, em resposta a uma variedade de agressões pulmonares e sistêmicas. A lesão das células endoteliais e epiteliais alveolares acarreta perda da função da membrana alvéolo-capilar, induzindo o influxo de fluido protéico, sangue e células inflamatórias para o compartimento alveolar, com conseqüente deterioração da função pulmonar.<sup>26</sup> A forma mais leve da SDRA é denominada de Lesão Pulmonar Aguda (LPA). A gravidade dessa doença faz com que métodos avançados de suporte de vida, como a utilização de ventilação mecânica e o uso de potentes terapias medicamentosas, sejam adotados. Entretanto, apesar dos avanços terapêuticos, a taxa de mortalidade perdura elevada (aproximadamente 40%).<sup>27,28</sup> Acredita-se que uma terapia eficaz para o tratamento da SDRA deva promover, simultane-

amente, atenuação da resposta inflamatória e adequado reparo. Nesse contexto, a terapia celular surge como uma possível ferramenta para a reversão dos eventos patológicos da SDRA, ou, pelos menos, atenuação dos sintomas da mesma.<sup>29</sup>

Nos últimos anos, uma série de estudos tem avaliado o efeito das células-tronco na LPA, ou nas diversas etiologias da SDRA. Esses modelos evidenciaram a presença de células-tronco dos doadores nos pulmões lesados dos receptores, incluindo células epiteliais dos tipos I e II, células endoteliais, fibroblastos e monócitos intersticiais.<sup>16</sup> Entretanto, os fatores que promovem o recrutamento de tais células para o local de lesão ainda não foram identificados. Vários estudos sugerem que, além das células exógenas, as células progenitoras endógenas, presentes em baixo número na circulação sanguínea, podem desempenhar um importante papel no reparo pulmonar, podendo se diferenciar, tanto em células epiteliais,<sup>16</sup> quanto em endoteliais.<sup>30</sup> Essas células são recrutadas para o pulmão lesado como consequência do processo inflamatório desencadeado pela lesão pulmonar. Nesse contexto, o estudo de Yamada e colaboradores demonstrou que o estímulo inflamatório, por si só, acarreta recrutamento de células progenitoras da medula óssea para a circulação sistêmica, com posterior diferenciação em células epiteliais e endoteliais. Além disso, observaram-se alterações sugestivas de enfisema no pulmão lesado, quando se irradiou a medula óssea antes da indução da lesão pulmonar aguda. Logo, as células progenitoras da medula óssea parecem ter grande importância no processo de reparo da lesão pulmonar.<sup>31</sup>

Recentemente, também foi observada relação direta entre o número de células progenitoras endoteliais e a sobrevida na LPA. Tais células são um subtipo de células-tronco hematopoiéticas, isoladas do sangue periférico de humanos, com capacidade de reparar e reconstituir o endotélio pulmonar lesado na SDRA. Adicionalmente, essas células estimulam e promovem a secreção de fatores de crescimento parácrinos, regulando a resposta angiogênica, e a interação celular, facilitando a proliferação e o crescimento celulares.<sup>32,33</sup> Assim, a estimulação das células progenitoras na circulação pode representar uma nova intervenção terapêutica para a LPA/SDRA.

O recrutamento de células-tronco da medula óssea tem sido promovido, experimentalmente e clinicamente, pela administração de diversas citocinas, quimiocinas e agentes quimioterapêuticos, sendo o mais utilizado o fator estimulante de colônias de granulócitos-monócitos (GM-CSF). Já foi demonstrado que tal fator promove melhora da troca gasosa em pacientes com sepse grave, além de restaurar a função respiratória.<sup>34</sup> Entretanto, a administração de GM-CSF em indivíduos saudáveis, com o intuito de recrutar células-tronco para posterior doação, está associado a uma série de efeitos adversos, como dor óssea, cefaléia, além de

fadiga generalizada, em aproximadamente 30% dos casos. As complicações pulmonares não estão descartadas, sendo as mais freqüentes a SDRA e a pneumonia intersticial. No caso das células progenitoras endoteliais, o GM-CSF e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) parecem não estar correlacionados com o recrutamento e o conseqüente aumento do número de tais células, sendo o fator derivado de células estromais (SDF-1) mais eficaz.<sup>35</sup> Logo, mais estudos são necessários para avaliarmos os verdadeiros efeitos das células progenitoras endoteliais no reparo do dano endotelial na LPA/SDRA.

Rojas e colaboradores (2005) demonstraram efeito benéfico na administração de células mesenquimais derivadas da medula óssea, ou seja, células-tronco exógenas, na lesão pulmonar induzida por bleomicina em camundongos.<sup>36</sup> Os autores constataram que o grau de lesão pulmonar foi minimizado nos camundongos que eram mielossuprimidos, enquanto que nos animais que apresentavam a medula íntegra quase toda a lesão foi resolvida; sugerindo que tanto as células-tronco exógenas quanto as endógenas desempenham um papel importante no reparo da lesão pulmonar. As células-tronco mesenquimais também se diferenciaram em diversos tipos celulares do tecido pulmonar, como as células epiteliais tipos I e II, fibroblastos e células endoteliais; porém ainda não se sabe se tais células se originam da fusão com células residentes do próprio tecido ou, realmente, de sua diferenciação. A administração de tais células também minimizou a inflamação pulmonar, por reduzir os níveis de diversas citocinas, tais como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-1 $\beta$  e IL-4, e promover a liberação de fatores solúveis, que acabam por recrutar as células-tronco para o local da lesão. Certamente, mais estudos são necessários para determinar a verdadeira fonte celular de tais fatores e os efeitos da interação entre a lesão pulmonar e o conseqüente recrutamento de células-tronco, com posterior diferenciação das mesmas. O mesmo grupo demonstrou que a administração de células mesenquimais derivadas da medula óssea na LPA induzida por lipopolissacarídeo (LPS) preveniu a lesão pulmonar e reduziu a resposta inflamatória sistêmica, por suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimular a liberação de citocinas antiinflamatórias, não sendo necessária interação entre as células-tronco e as células pulmonares; porém, se ocorresse tal interação, a resposta antiinflamatória seria potencializada.<sup>37</sup>

Mei e colaboradores observaram que as células-tronco mesenquimais, quando administradas isoladamente, minimizaram parcialmente a inflamação pulmonar, em modelo de LPA induzida por LPS. No entanto, a administração das células-tronco mesenquimais transfectadas com angiopoetina-1 resultou em melhora do processo inflamatório, reduzindo os níveis de diversas citocinas e quimiocinas no fluido do lavado broncoalveolar, acarretando diminuição da

permeabilidade e conseqüente extravasamento de plasma. Além disso, acredita-se que essa produção aumentada de angiopoetina-1, pelas células mesenquimais geneticamente modificadas, reduz a produção de moléculas de adesão, minimizando o influxo de células inflamatórias para o espaço alveolar e diminuindo, por conseguinte, a lesão tecidual.<sup>38</sup>

Em resumo, apesar da escassa literatura, evidenciou-se que as células-tronco, endógenas ou exógenas, promoveram melhora na lesão pulmonar e seu conseqüente processo fibrótico, não somente por produzir um reparo tecidual mais adequado através da sua diferenciação em diversos tipos celulares do tecido pulmonar, como, também, em função de seus efeitos na redução da inflamação pulmonar e sistêmica e na liberação de fatores de crescimento, que estimularam a proliferação celular. Portanto, a terapia celular é vista como uma possível ferramenta terapêutica para o tratamento da LPA/SDRA, a despeito de mais estudos serem necessários.

### **Fibrose Pulmonar**

A fibrose pulmonar é uma doença caracterizada por perda progressiva da estrutura alveolar, através de processos de apoptose de células epiteliais e endoteliais, proliferação de fibroblastos e excessiva deposição de fibras colágenas na matriz extracelular. Atualmente, acredita-se que a fibrose pulmonar seja decorrente de um desequilíbrio entre os processos de lesão e reparo epiteliais, nos quais diversas citocinas estão envolvidas, sendo uma das principais o TGF- $\beta$ 1. Nesse contexto, observou-se inibição da fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos *knockout* para integrina  $\alpha\beta$ 6, que são incapazes de localizar a atividade do TGF- $\beta$ 1 latente.<sup>39</sup> Por outro lado, a superexpressão do TGF- $\beta$ 1 em pulmões de ratos, utilizando vetores virais, promoveu fibrose pulmonar grave e prolongada.<sup>40</sup> A fibrose pulmonar está associada a diversas causas, sendo sua fisiopatologia pobremente entendida e seu prognóstico ruim (taxa de sobrevivência de 2 a 4 anos após o diagnóstico). Logo, a fibrose pulmonar é uma doença devastadora, que ainda não apresenta terapia efetiva que reverta, ou retarde, o curso natural da doença. Entretanto, em função dos avanços nas pesquisas sobre a potencialidade das células-tronco nas doenças fibrogênicas, acredita-se que a terapia celular possa vir a ser uma opção na fibrose pulmonar.

Kotton e colaboradores (2001) avaliaram o efeito das células-tronco derivadas da medula óssea na fibrose pulmonar induzida por bleomicina e observaram que as células injetadas migraram para os pulmões lesados e apresentaram características morfológicas e funcionais de pneumócitos tipo I, sugerindo que as células-tronco possam ser utilizadas na terapia de doenças respiratórias caracterizadas por dano alveolar difuso.<sup>29</sup>

Ortiz e colaboradores (2003) demonstraram, em modelos de lesão pulmonar induzida por bleomicina em ratos, que a administração sistêmica de células-tronco mesenquimais induziu redução significativa na inflamação, deposição de colágeno e ativação de metaloproteinases (MMP) no tecido pulmonar. Eles sugeriram que as células-tronco mesenquimais originaram células alveolares tipo I, reparando o epitélio lesado e/ou alteraram o microambiente, através da produção de antagonistas de TNF- $\alpha$ , ou outras citocinas, interrompendo a via de sinalização que leva à fibrose. Além disso, tal estudo sugeriu que as células-tronco administradas desempenham outros efeitos locais, uma vez que o pequeno número de células originadas do doador presentes no pulmão lesado parece não ser suficiente para quantificar a resposta terapêutica observada.<sup>41</sup> Acredita-se que tais células sejam recrutadas e estimuladas a se diferenciarem no pulmão, por meio da liberação de diversas citocinas, como SDF-1 $\alpha$  (fator 1 derivado de células estromais) e SLC (quimiocina secundária no tecido linfóide), sendo as prováveis fontes celulares de tais citocinas fibroblastos residentes, ou mesmo de células endoteliais ou epiteliais. Além das células-tronco exógenas, as células progenitoras presentes na circulação também desempenham papel importante na fibrose pulmonar. Nesse contexto, Abe e colaboradores (2004) demonstraram que as células progenitoras circulantes deram origem a células alveolares tipo I e a fibroblastos, em modelo de enfisema pulmonar induzido por elastase e radiação, em camundongos parabióticos. Porém, quando o modelo de enfisema era induzido somente por elastase, tal recrutamento e diferenciação celulares não foram observados, sugerindo que a natureza do dano tecidual parece ser um fator importante na regulação de tais processos.<sup>42</sup>

Entretanto, o otimismo na utilização das células-tronco na fibrose pulmonar vem declinando, já que estudos vêm demonstrando resultados contraditórios. Em modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, Naozumi e colaboradores (2004) constataram que as células-tronco derivadas da medula óssea se diferenciaram em fibroblastos, sendo os mesmos a principal fonte para a síntese de colágeno intersticial.<sup>43</sup> Michael e colaboradores (2003) observaram resultados similares na fibrose pulmonar induzida por irradiação, onde demonstraram que as células-tronco derivadas da medula óssea originaram miofibroblastos, contribuindo para o processo fibrótico.<sup>44</sup>

Diversas questões permanecem sem respostas, tais como: 1) quais fatores promovem o recrutamento e posterior proliferação e diferenciação dessas células? 2) uma vez no pulmão, quais são as características e as funções das células-tronco? Certamente, mais estudos são necessários para um melhor entendimento dos mecanismos pelos quais as células-tronco são recrutadas para o local de lesão, seus efeitos sobre reparo, regeneração e remodelamento tecidual, assim como,

quanto às características fenotípicas e funcionais dos fibroblastos derivados da medula óssea, para realmente ser elucidado o papel de tais células dentro do processo fibrótico e, com isso, o verdadeiro efeito da terapia celular na fibrose pulmonar.

### Enfisema e Asma

Atualmente, não existem terapias específicas e efetivas para o enfisema<sup>45</sup> e, com o crescente entendimento das características e manuseio das células-tronco, as mesmas são vistas como possível fonte de tratamento, ou mesmo cura. Alguns estudos têm avaliado os níveis de células precursoras vasculares nessa doença, sendo observada a presença de tais células aderidas na superfície endotelial e dentro da camada íntima das artérias pulmonares de pacientes com enfisema pulmonar. A presença de tais células próximas às áreas de endotélio desnudo, aliada à sua relação com o estímulo hipóxico, sugere que as células precursoras vasculares podem contribuir para o início do processo de reparo do endotélio constantemente lesado, assim como para o processo de remodelamento vascular, característico desta doença.<sup>46</sup>

No contexto da asma, Palange e colaboradores quantificaram e correlacionaram os níveis de células progenitoras endoteliais e hematopoiéticas em indivíduos asmáticos, no repouso e após o exercício, e observaram que os mesmos apresentavam níveis três vezes menores de células progenitoras hematopoiéticas, enquanto as endoteliais estavam reduzidas em 50%, quando comparados aos controles, estando possivelmente correlacionados com a gravidade da doença.<sup>47</sup> Além disso, observaram que, após o exercício, a quantidade de tais células não foi alterada.<sup>47</sup>

O efeito da terapia celular no enfisema e na asma ainda não foi avaliado, sendo que, para tal, é essencial um conhecimento abrangente da dinâmica celular,

tanto das vias aéreas como do parênquima pulmonar, de modo que se possam elaborar terapias farmacológicas e/ou celulares efetivas, direcionadas às alterações características dessas doenças respiratórias.

### CONCLUSÃO

Os recentes dados advindos de estudos experimentais e clínicos sugerem que as células-tronco, endógenas ou exógenas, desempenham um papel importante no desenvolvimento, reparo e remodelamento pulmonar após a lesão. Entretanto, a biologia de tais células necessita ser melhor elucidada, limitando seu uso clínico imediato. Apesar dos recentes avanços no campo da terapia celular, perduram mais questionamentos do que respostas, em função das limitadas técnicas, no que concerne à análise do recrutamento e diferenciação de tais células. Portanto, para que a terapia celular possa ser empregada nas doenças respiratórias, algumas questões ainda precisam ser respondidas, por exemplo: 1) Qual tipo celular deve ser utilizado? 2) Quais fatores estimulam ou permitem o recrutamento de tais células para o tecido pulmonar? 3) Qual será a melhor via de administração das células-tronco? 4) Quais as possíveis complicações ou efeitos adversos desencadeados por tal tratamento? É provável que tais respostas variem conforme a doença em questão. Logo, fazem-se necessários avanços na biologia e tecnologia das células-tronco, fornecendo melhor purificação e caracterização das células-tronco da medula óssea, determinando os mecanismos de recrutamento e segurança a longo prazo do seu uso. Destarte, a terapia com células-tronco derivadas da medula óssea pode vir a ser uma opção eficaz e segura no tratamento de doenças respiratórias, tais como: SDRA, fibrose pulmonar, enfisema e asma.

### REFERÊNCIAS

- Maximov A. Der Lymphozyt als Gemeinsame Stammzelle der Verschiedenem Blutelemente in der Embryonalen Entwicklung und in Podtfetalen Leber der Säugetiere. *Folia Haematol (leipzig)* 1909;8:125-41.
- Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol* 1963;62:327-36.
- Becker A, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963;197:452-4.
- Mathur A, Martin JF. Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 2004;364(9429):183-92.
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:387-403.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145-7.
- Wu DC, Byod AS, Wood KJ. Embryonic stem cell transplantation: potential applicability in cell replacement therapy and regenerative medicine. *Front Biosci* 2007;12:4525-35.
- Passier R, Denning C, Mummery C. Cardiomyocytes from human embryonic stem cells. *Handb Exp Pharmacol* 2006;(174):101-22.
- Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, Meng S, Chen Y, Zhou R, Song X, Guo Y, Ding M, Deng H. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 2007;45(5):1229-39.
- Ali NN, Edgar AJ, Samadikucharsaraei A, Timson CM, Romanska HM, Polak JM, Bishop AE. Derivation of type II alveolar epithelial cells from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng* 2002;8(4):541-50.
- Wang D, Haviland DL, Burns AR, Zsigmond E, Wetsel RA. A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(11):4449-54.
- Samadikucharsaraei A, Cohen S, Isaac K, Rippon HJ, Polak JM, Bielby RC, Bishop AE. Derivation of distal airway epithelium from human embryonic stem cells. *Tissue Eng* 2006;12(4):867-75.
- Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:1-22.
- Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(8):4080-5.
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*

- 1999;284(5417):1168-70.
16. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105(3):369-77.
  17. Tosh D, Slack JM. How cells change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(3):187-94.
  18. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002 Apr 4;416(6880):542-5.
  19. Otto WR. Lung epithelial stem cells. *J Pathol* 2002;197(4):527-35.
  20. Bishop AE. Pulmonary epithelial stem cells. *Cell Prolif* 2004;37(1):89-96.
  21. Borthwick DW, Shahbazian M, Krantz QT, Dorin JR, Randell SH. Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24(6):662-70.
  22. Hong KU, Reynolds SD, Giangreco A, Hurley CM, Stripp BR. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24(6):671-81.
  23. Giangreco A, Reynolds SD, Stripp BR. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchioalveolar duct junction. *Am J Pathol* 2002;161(1):173-82.
  24. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005;121(6):823-35.
  25. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000;100(1):157-68.
  26. Rocco PR, Facchinetti LD, Ferreira HC, Negri EM, Capelozzi VL, Faffe DS, et al. Time course of respiratory mechanics and pulmonary structural remodelling in acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol* 2004;143(1):49-61.
  27. Artigas A, Bernard GR, Carlet J, Dreyfuss D, Gattinoni L, Hudson L, Lamy M, Marini JJ, Matthay MA, Pinsky MR, Spragg R, Suter PM. The American-European Consensus Conference on ARDS, part 2: Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. *Acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(4 Pt 1):1332-47.
  28. Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, Bion J, Romand JA, Villar J, Thorsteinsson A, Damas P, Armaganidis A, Lemaire F; ALIVE Study Group. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med* 2004;30(1):51-61.
  29. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001;128(24):5181-8.
  30. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schattteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275(5302):964-7.
  31. Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, Numasaki M, Ueda S, Suzuki T, Sasaki H. Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol* 2004;172(2):1266-72.
  32. Burnham EL, Taylor WR, Quyyumi AA, Rojas M, Brigham KL, and Moss M. Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(7):854-60.
  33. Burnham E, Moss M. Progenitor cells in acute lung injury. *Minerva Anesthesiol* 2006;72(6):369-74.
  34. Presneill JJ, Harris T, Stewart AG, Cade JF, Wilson JW. A randomized phase II trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in severe sepsis with respiratory dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(2):138-43.
  35. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(2 Pt 1):646-64.
  36. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Repair of the Injured Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33(2):145-52.
  37. Xu J, Woods CR, Mora AL, Joodi R, Brigham KL, Iyer S, Rojas M. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293(1):L131-41.
  38. Mei SH, McCarter SD, Deng Y, Parker CH, Liles WC, Stewart DJ. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1. *PLoS Med* 2007;4(9):e269.
  39. Pittet JF, Griffiths MJ, Geiser T, Kaminski N, Dalton SL, Huang X, Brown LA, Gotwals PJ, Kotliansky VE, Matthay MA, Sheppard D. TGF- $\beta$  is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest* 2001;107(12):1537-44.
  40. Sime PJ, Xing Z, Graham FL, Csaky KG, Gaudie J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor- $\beta$ 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* 1997;100(4):768-76.
  41. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(14):8407-11.
  42. Abe S, Boyer C, Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, Fang Q, Wang X, Hashimoto M, Sharp JG, Rennard SI. Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(11):1158-63.
  43. Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, Phan SH. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2004;113(2):243-52.
  44. Epperly MW, Guo H, Gretton JE, Greenberger JS. Bone Marrow Origin of Myofibroblasts in Irradiation Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29(2):213-24.
  45. Asia Pacific COPD Roundtable Group. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: an Asia-Pacific perspective. *Respirology* 2005;10(1):9-17.
  46. Peinado VI, Ramirez J, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Barbera JA. Identification of Vascular Progenitor Cells in Pulmonary Arteries of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34(3):257-63.
  47. Palange P, Testa U, Huertas A, Calabrò L, Antonucci R, Petrucci E, Pelosi E, Pasquini L, Satta A, Morici G, Vignola MA, Bonsignore MR. Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD. *Eur Respir J* 2006;27(3):529-41.