

Revisão / Review

Terapia celular em doenças pulmonares: existem perspectivas?

Cell therapy in pulmonary diseases: are there perspectives?

João T. Ribeiro-Paes¹Aldemir Bilaqui²Oswaldo T. Greco³Milton A. Ruiz⁴Luis B. C. Alves-de-Moraes⁵Carolina A. Faria⁵Talita Stessuk⁶

A terapia celular poderia ser conceituada de forma ampla e genérica como o emprego de células para tratamento de doenças. Apesar de um número não tão expressivo de relatos tendo o pulmão como objeto de estudo na terapia celular em pacientes humanos, há dados consistentes da literatura, tanto em humanos, quanto em modelos animais, que evidenciam a migração de células-tronco da medula óssea para o pulmão, em diferentes situações experimentais. Esses resultados forneceram o embasamento experimental para o emprego de células-tronco na regeneração do tecido pulmonar em modelos animais. Em nosso laboratório, vários projetos de pesquisa têm sido conduzidos com a finalidade de avaliar a resposta pulmonar (morfológica e funcional) ao tratamento com células-tronco adultas em camundongos com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) induzida experimentalmente. Os resultados obtidos, aliados àqueles de outros grupos de pesquisa, permitem aventar a possibilidade de aplicação, a curto prazo, da terapia celular em pacientes com DPOC. Em outra patologia pulmonar, fibrose cística (FC), cuja abordagem terapêutica com células-tronco apresenta aspectos particulares em relação às patologias pulmonares crônico-degenerativas, há avanços promissores e potencialmente interessantes; no entanto, os resultados podem ser considerados incipientes e deve-se assinalar, portanto, que a associação da terapia gênica e celular apresenta-se como uma alternativa possível, mas ainda muito distante quanto à sua consolidação e incorporação como opção terapêutica segura e eficaz em FC. Por outro lado, tendo por embasamento os resultados obtidos em modelos experimentais, é possível postular que a terapia celular com células-tronco hematopoéticas (ou de outras fontes) encerra perspectivas consistentes de aplicação em diversas outras patologias pulmonares humanas, especialmente em DPOC. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31(Supl. 1):140-148.

Palavras-chave: Células-tronco; terapia celular; pulmão; doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC); enfisema; fibrose cística.

Introdução: células-tronco e terapia celular

Células indiferenciadas que apresentam capacidade de autoduplicação e de dar origem a células diferenciadas são denominadas células-tronco (CT).¹ Melton e Cowan

(2004) propuseram uma *working definition* de CT: "Uma entidade clonal autorrenovável, que é pluripotente e pode dar origem a vários tipos de células diferenciadas".² Apesar de variações conceituais, há dois aspectos básicos e comuns presentes nas mais diferentes definições de CT:

¹Professor Associado do Departamento de Ciências Biológicas – Unesp – Assis-SP.

²Chefe do Serviço de Cirurgia do Tórax do IMC – Instituto de Moléstias Cardiovasculares – São José do Rio Preto-SP.

³Chefe do Departamento Científico do IMC – Instituto de Moléstias Cardiovasculares – São José do Rio Preto-SP.

⁴Professor Colaborador da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da FMUSP-SP e coordenador do Grupo de Terapia Celular do IMC/HMC – São José do Rio Preto-SP.

⁵Aluno(a) do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da USP – São Paulo-SP.

⁶Aluno de Graduação do Curso de Engenharia Biotecnológica – Unesp – Assis-SP.

Correspondência: João Tadeu Ribeiro-Paes

Departamento de Ciências Biológicas – Unesp – Campus de Assis

Av. Dom Antonio, 2100

19806-900 – Assis-SP – Brasil

Tel.: (55 18) 3302-5856

E-mail: jtrpaes@yahoo.com.br

Doi: 10.1590/S1516-84842009005000034

autorrenovação e capacidade de originar células diferenciadas.

Em função de sua origem, pode-se definir 3 tipos gerais: CT oriundas da massa celular interna do blastocisto, denominadas células-tronco embrionárias (CTE); as oriundas da crista gonadal, células-tronco germinativas (CTG) e as células-tronco adultas (CTA), obtidas em diferentes tecidos, incluindo-se as células-tronco hematopoéticas (CTH), obtidas da medula óssea e as células obtidas do cordão umbilical.^{1,3-5}

A tendência atual, que se apreende da literatura, é de assumir, quanto ao potencial de diferenciação, que as CTA são multipotentes, ou seja, podem formar diferentes tipos celulares que constituem um tecido. Dessa forma, o potencial de diferenciação, a plasticidade ou transdiferenciação das CTA, têm sido, recentemente, considerados de forma mais restrita,^{2,6-8} sobretudo em relação às proposições enunciadas nos anos 90 e início deste século.⁹⁻¹⁵

A terapia celular poderia ser conceituada de forma ampla e genérica, talvez pouco precisa em função da amplitude de seu alcance, como o emprego de células para tratamento de doenças. Considerada nesta perspectiva ampla, a terapia celular representa uma antiga prática terapêutica, iniciada com a transfusão de sangue total ou concentrado de plaquetas em diferentes situações clínicas agudas ou crônicas. Os transplantes de células-tronco hematopoéticas (TCTH) foram, pioneiramente, iniciados com os trabalhos de Till e McCulloch em 1961,¹⁶ durante seus estudos sobre a resposta de ratos com a medula óssea transplantada após lesão provocada por irradiação ionizante. Esse trabalho pioneiro abriu novas perspectivas e sinalizou para a possibilidade de utilização de outros tecidos seguindo o modelo experimental adotado por estes autores. O TCTH, ou transplante de medula óssea, representa, até o momento, a única forma de terapia celular consolidada e incorporada rotineiramente em terapêutica humana. Por outro lado, as possibilidades de terapia celular com CTA consolidam-se progressivamente em termos de potencialidade terapêutica e vem sendo cada vez mais utilizada por diferentes grupos de pesquisadores visando a regeneração de tecidos lesados ou correção funcional de órgãos primariamente acometidos por diferentes patologias. Essa nova abordagem amplia o leque de alternativas e esse conjunto de práticas terapêuticas inovadoras tem sido agrupado, por alguns pesquisadores, sob a denominação de medicina regenerativa.

Terapia celular em pulmão: embasamento experimental e referencial teórico

Há uma vasta literatura sobre os resultados promissores e perspectivas terapêuticas com CTA e CTE em diferentes patologias humanas e modelos animais. Apesar de um número não tão expressivo de relatos tendo o pulmão como objeto de estudo na terapia celular em pacientes hu-

manos, há dados consistentes da literatura, tanto em humanos, quanto em modelos animais, que evidenciam a presença de CT marcadas da medula óssea nos pulmões de animais ou pacientes submetidos ao transplante de medula óssea.^{14,17-23} Esses e outros trabalhos cujos resultados prévios evidenciam a migração de CT e/ou pool de células mononucleares da medula óssea para o pulmão, em diferentes situações experimentais, forneceram o arcabouço conceitual, o referencial teórico que fundamenta a ideia do emprego de CT na regeneração do tecido pulmonar em modelos animais e, espera-se, para um futuro próximo, em pacientes humanos.

A comprovação experimental referente à migração de células-tronco da medula para o pulmão foi, pioneiramente, realizada por Pereira *et al.* em 1995. Os autores mostraram que as células da medula óssea podem migrar para o pulmão e atuar como precursores de células locais. Por meio de PCR foi possível mostrar a presença de células transplantadas nos animais receptores por um período de até 5 meses, incorporadas ao tecido pulmonar, onde se difundiram pelo parênquima.

Posteriormente, Krause *et al.*¹⁴ transplantaram células de camundongos machos em fêmeas com medula óssea depletada por irradiação ionizante e rastream a presença do cromossomo Y em diferentes órgãos. Por meio da técnica de FISH (marcação do cromossomo Y) e imunohistoquímica (anticorpos anti-citoqueratina para detecção de células epiteliais) foi verificado co-marcação de células epiteliais e cromossomo Y em brônquios e alvéolos. Os autores propuseram, nesse trabalho, que os altos níveis de incorporação no tecido pulmonar poderiam estar vinculados a um dano significativo no tecido pulmonar, decorrente da irradiação. No mesmo ano e, de certa forma, reforçando esses resultados, Kotton *et al.*¹⁸ inocularam, por via intravenosa, células marcadas lac-Z de camundongos transgênicos em animais receptores selvagens, que foram submetidas a lesão pulmonar por instilação intratraqueal de bleomicina. Foi detectado marcação típica de expressão de lac-Z (incubação em meio contendo X-gal) com aumento estatisticamente significativa nos animais que sofreram lesão com bleomicina. As células enxertadas evidenciaram fenótipo morfológico e molecular de pneumócitos tipo I.

Em pacientes humanos que receberam, por diferentes motivos, transplante alogênico de medula óssea, foi verificado, como nos modelos de estudo animais, a migração e quimerismo celular nos pacientes receptores. Suratt *et al.*¹⁹ mostraram, pioneiramente, quimerismo pulmonar com a incorporação de células com cromossomo Y em mulheres que receberam transplante alogênico de CTH de doadores do sexo masculino. Mais recentemente, Lama *et al.*²³ analisaram sete pacientes submetidos a transplante pulmonar entre indivíduos (doador e receptor) de sexos diferentes. Os autores mostraram, por meio de diferentes técnicas de marcação histoquímica e análise molecular (RT-PCR) a presença de

células-tronco mesenquimais (MSC) nos pulmões de receptores com expressão citogenética do sexo do doador. Um achado muito interessante foi a verificação de células do doador, nos pacientes receptores, por um período de, até, 11 anos e meio após o transplante

Um aspecto muito relevante em termos de implicação para a terapia celular foi a verificação que, em modelos animais, a infusão de MSC marcadas apresentaram um sinal expressivamente maior no tecido pulmonar, em relação a vários outros órgãos, como coração, fígado, baço e rim.²²

Apesar da diversidade das metodologias utilizadas, vários trabalhos, em pacientes humanos e em modelos animais têm mostrado que CTA (hematopoéticas e mesenquimais) podem migrar para áreas lesionadas no pulmão e adquirir características fenotípicas dos principais tipos celulares que formam o parênquima pulmonar. Rojas *et al.*²⁴ verificaram que camundongos submetidos à supressão da medula óssea e posterior tratamento com bleomicina tiveram, nos grupos transplantados com MSC, índice total de sobrevivência. A análise imunohistoquímica do tecido pulmonar dos animais com supressão da medula mostrou que as células transplantadas (GFP+) estavam presentes no órgão, e em grande número, mesmo 14 dias após a administração da bleomicina.

Esses resultados, no entanto, têm sido vistos com maior cautela por alguns autores que questionam a acurácia das técnicas de detecção empregadas.²⁵ A migração de CT para o pulmão poderia estar sendo superestimada,²⁶ e, portanto, estariam presentes numa proporção muito menor do que tem sido proposto, com significado clínico questionável.²⁷ Resultados a favor dessa proposição foram obtidos por Xu *et al.*²⁸ Esses autores, após transplante de MSC GFP+ em camundongos que haviam previamente recebido injeção intraperitoneal de lipopolissacaride (LPS), não verificaram, na análise imunohistoquímica do tecido pulmonar feita 14 dias após o transplante, a ocorrência significativa de células com sinal positivo para GFP. Entretanto, embora não tenham encontrado evidências de uma efetiva integração das MSC ao tecido pulmonar e da presença de células derivadas com o fenótipo de tipos celulares locais, os autores puderam comprovar que o transplante das células-tronco permitiu uma redução na inflamação e edema pulmonar induzido pelo LPS.

Por outro lado, há em pacientes humanos um conjunto de evidências experimentais consistentes que mostram a migração de CT para o pulmão, sobretudo, no órgão submetido a algum tipo de trauma ou injúria. Assim, embora não se verifique uma postura consensual, quanto à eficiên-

Quadro 1. Patologias pulmonares potencialmente passíveis de tratamento com terapia celular

Patologia	Compartimento Celular Afetado	Objetivos/ Estratégia Terapêutica
Hipoplasia pulmonar congênita	Epitélio alveolar, fibroblastos intersticiais, endotélio capilar	Restaurar a estrutura tridimensional Ampliar a superfície de troca gasosa
DPOC	Epitélio alveolar, fibroblastos intersticiais, endotélio capilar	Inibir processo inflamatório Reconstituir o parênquima Restaurar a superfície de troca gasosa
Síndrome da angústia respiratória neonatal	Epitélio alveolar, endotélio capilar	Aumentar a produção do surfactante Reforçar as barreiras endotelial e epitelial
Síndrome da angústia respiratória do adulto	Epitélio alveolar, endotélio capilar	Aumentar a produção do surfactante Reforçar as barreiras endotelial e epitelial
Fibrose	Epitélio alveolar, fibroblastos intersticiais	Inibir a proliferação de fibroblastos e a fibrose pulmonar
Fibrose cística	Epitélio das vias aéreas	Incorporação de CFTR funcional Terapia celular associada à terapia gênica
Asma	Epitélio das vias aéreas, miofibroblastos, musculatura lisa das vias aéreas	Inibir o processo inflamatório Inibir o remodelamento da parede das vias aéreas Impedir a hipertrofia e a hiperplasia do músculo liso Reforçar o epitélio contra injúria tóxica, viral ou imunológica
Bronquiolite obliterante	Epitélio das vias aéreas	
Neoplasias - Carcinoma	Epitélio	Regulação da proliferação e diferenciação de células-tronco

CFTR = *cystic fibrosis transmembrane conductance regulato*.

Modificado de Neuringer e Randell, 2004

cia de migração de CT, existe, como já referido, um conjunto de evidências experimentais que sustentam, de forma consistente, a possibilidade do emprego de MSC ou *pool* de células mononucleares da medula óssea (BMMC) na terapia celular em doenças pulmonares.

No quadro 1 apresenta-se uma síntese do potencial de aplicabilidade da terapia celular com CTA e CTE em patologias pulmonares crônico-degenerativas ou heredofamiliares. Nessa revisão serão, mais detalhadamente, comentadas duas patologias, consideradas no contexto da importância epidemiológica, impacto socioeconômico e pela forma diferencial de abordagem no âmbito da terapia celular.

Terapia celular em doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)

Sob a designação de doenças obstrutivas, reúnem-se as entidades clínicas capazes de provocar uma limitação ao fluxo aéreo. A DPOC pode ser entendida como um estado patológico caracterizado por limitação de troca gasosa, não reversível. Esta limitação é usualmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões a partículas e gases nocivos.^{29,30} A principal característica da DPOC, limitação progressiva de troca gasosa, culmina em incapacitação e morte prematura.²⁹⁻³² A principal causa relacionada à DPOC é o tabagismo, ao qual se associam cerca de 90% dos casos. Outros fatores causais incluem a poluição atmosférica e exposição ocupacional a poluentes.^{30,32,33}

O enfisema pulmonar, dentro do espectro da DPOC, apresenta como principal característica a obstrução do fluxo aéreo, resultante da destruição das paredes alveolares e aumento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, sem fibrose evidente.^{29-31,34}

As diferentes abordagens terapêuticas clínicas, associadas às técnicas de reabilitação pulmonar, têm, inegavelmente, contribuído para o prolongamento e melhora na qualidade de vida dos portadores de DPOC. Apesar dos avanços significativos resultantes da introdução de novas abordagens terapêuticas e de reabilitação, não se logrou, até o presente, uma forma de tratamento clínico eficaz que não seja apenas paliativa. O tratamento cirúrgico, por sua vez, envolve procedimentos de alta complexidade e, no caso específico do transplante pulmonar, a escassez de doadores.

É importante salientar que a DPOC apresenta uma alta prevalência e um elevado custo econômico e social.³⁵ Projeta-se que será a terceira causa de morte em 2020.^{30,36} Considerando-se que os tabagistas representam cerca de 24% da população brasileira e que, do total de fumantes, 15% irão desenvolver DPOC,²⁹ pode-se estimar uma prevalência de 6 a 7 milhões de pessoas acometidas por doença pulmonar obstrutiva no Brasil. Considerando os aspectos epidemiológicos, como a alta prevalência, morbidade e mortalidade, bem como o impacto social e familiar provocados por essa

condição patológica, há uma intensa pesquisa visando novas proposições de tratamento. Neste contexto, vários modelos experimentais têm sido propostos, objetivando o avanço no conhecimento sobre os processos fisiopatológicos e novas opções terapêuticas em DPOC. A terapia celular com MSC ou *pool* de BMMC poderá, neste contexto, contemplar novas e eficazes formas de tratamento nas doenças crônicas pulmonares de caráter obstrutivo.

Em modelos animais, resultados promissores têm sido obtidos. Em geral adota-se, nesses estudos, uma lesão ou indução do enfisema pulmonar por irradiação, ou diferentes tipos de drogas, como elastase, papaína, LPS ou tratamento com bleomicina, seguindo-se a inoculação de CTA na veia caudal ou diretamente no pulmão.

Resultados consistentes de regeneração pulmonar em modelo experimental de lesão e posterior inoculação de CT da medula óssea foram, de forma pioneira, relatados em 2004 por dois grupos de pesquisadores japoneses. Em um dos modelos de estudo, Yamada *et al.*²⁰ utilizaram camundongos da linhagem C57BL/6 submetidos ao tratamento com LPS após irradiação em dose não letal. Um grupo de animais recebeu transplante de medula de doadores transgênicos expressando GFP, enquanto um segundo grupo recebeu apenas meio de cultura. Os resultados mostraram proteção do pulmão contra o desenvolvimento de lesão do tipo enfisematoso nos animais transplantados com BMMC. Um outro dado interessante, mostrado neste artigo, foi a detecção de células marcadas apenas nos animais receptores nos quais houve lesão pulmonar induzida, neste caso, por LPS. Em um modelo de indução de enfisema pulmonar por elastase, Ishizawa *et al.*³⁷ mostraram que o tratamento com ácido retinóico ou fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF) levou à regeneração alveolar, e o tratamento com ambos os fatores, de forma concomitante, resultou num efeito aditivo. As análises histoquímicas, com tripla marcação, mostraram que as células da medula apresentaram fenótipo de células endoteliais e epiteliais.

Kuang *et al.*³⁸ testaram a inoculação de fibroblastos isolados imediatamente após o nascimento de camundongos GFP. Por meio de técnicas histoquímicas e análise de fluorescência foi detectado um número expressivamente maior de fibroblastos nas paredes alveolares e regiões intersticiais nos animais tratados com elastase. Adotando o modelo de lesão pulmonar por instilação de elastase, Murakami *et al.*³⁹ investigaram um possível efeito da adrenomedulina, uma molécula peptídica com ação primariamente vasodilatadora, sobre a mobilização de células da medula óssea, procurando também determinar se tal substância teria algum efeito reparador sobre estrutura e a função pulmonar em camundongos com enfisema induzido. Para tanto, após administração endotraqueal de elastase, um grupo de animais recebeu adrenomedulina, de forma contínua, durante 12 dias. Na análise histológica e funcional, realizada 25 dias após o tratamento com elastase, verificou-se, nos animais tratados, uma

menor destruição das paredes alveolares, avaliada pela medida da distância do intercepto linear médio, bem como um efeito benéfico sobre diferentes parâmetros da função pulmonar.

Um estudo bastante original e elegante foi realizado por Adachi *et al.*⁴⁰ Os autores utilizaram camundongos da linhagem C3H (normais) e camundongos Tsk (*tight-skin*) – animais com uma mutação no gene da proteína fibrilina-1, que manifestam, entre outros fenótipos, o desenvolvimento de enfisema pulmonar. Foi inicialmente realizado transplante com CTA de animais C3H para camundongos Tsk. Seis meses após esse transplante, os pesquisadores constataram que os pulmões dos camundongos Tsk que haviam recebido as células de animais normais (C3H) apresentavam estruturas pulmonares normais, enquanto animais transplantados com células de doadores da mesma linhagem (Tsk) desenvolveram o quadro enfisematoso. Quando o transplante foi feito em sentido inverso, ou seja, com a transferência da medula óssea de camundongos Tsk para camundongos C3H, esses animais apresentaram padrão morfológico pulmonar característico de enfisema. Em função desses resultados, os autores formularam uma proposta bastante original, segundo a qual o enfisema nos camundongos Tsk teria origem em anomalias na população de CT da medula óssea, com um possível mecanismo autoimune envolvido no desenvolvimento de enfisema nesses animais.

Em nosso laboratório, vários projetos de pesquisa têm sido dirigidos para o estudo da recuperação pulmonar morfológica e funcional ao tratamento com CTA em camundongos com DPOC induzida experimentalmente. Nosso modelo consiste, basicamente, na indução de enfisema por instilação intranasal de papaína ou elastase, em fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6. Camundongos machos transgênicos (com *back-ground* C57BL/6) que expressam a proteína fluorescente verde (GFP) são utilizados como doadores de BMMC. Esses animais foram gentilmente cedidos

pelo Dr. Masaru Okabe (Osaka University, Japan). Os resultados obtidos mostraram, de forma quali e quantitativa, a regeneração do tecido pulmonar nos animais com enfisema e tratados com *pool* de BMMC. A regeneração do tecido pulmonar, expressa de forma quantitativa como a medida do intercepto alveolar médio, mostrou diferença estatística significativa entre animais tratados com CTA e controles.^{41,42} A Figura 1 ilustra, de forma geral, em termos qualitativos, os resultados obtidos em nosso laboratório, a partir da indução de enfisema por instilação nasal de elastase e posterior tratamento com *pool* de BMMC (Faria e Ribeiro-Paes).⁴³

Como se apreende da literatura, há um conjunto consistente de resultados gerados por vários laboratórios, incluindo-se aqueles obtidos por nosso grupo de pesquisa, que fornecem o embasamento experimental e sinalizam para a possibilidade de aplicação, a médio prazo, da terapia celular em pacientes com DPOC.

Terapia celular em fibrose cística

A fibrose cística (FC) é uma doença hereditária com alta incidência (um a cada 2.500 nascidos) entre a população caucasiana.⁴⁴ Apresenta um padrão de herança autossômico recessivo, determinada por uma mutação no gene CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane regulator*), mapeado em 7q31.2.⁴⁵ Mais de 1.600 mutações neste gene têm sido descritas desde sua descoberta em 1989, no entanto, cerca de 70% das mutações verificadas em pacientes com FC são o resultado da deleção de três pares de bases, que determina a perda de um aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína codificada.⁴⁶ Estimativas indicam mil novos casos diagnosticados por ano, sendo que, em 2006, a expectativa média de vida era de apenas 37 anos entre os afetados. A prevalência global é de, aproximadamente, 70 mil indivíduos (crianças e adultos), sendo que quase 50 % dos casos ocorrem os Estados Unidos.⁴⁷

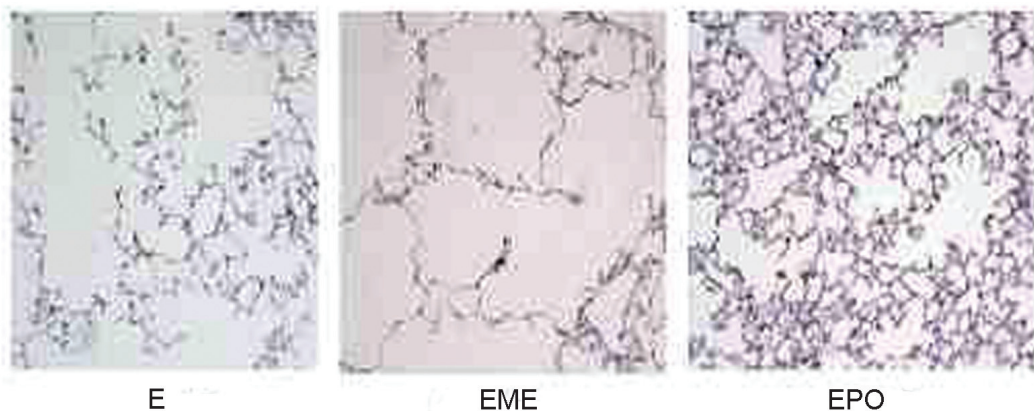


Figura 1. Lâminas de tecido pulmonar obtido de fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6. Tecido corado com hematoxilina-eosina. E – instilação nasal de elastase; EME – instilação nasal de elastase seguido de inoculação de meio de cultura após 28 dias e análise histológica após 24 dias; e EPO – instilação nasal de elastase, seguido de inoculação de *pool* de células após 28 dias e análise histológica após 24 dias

O produto do gene CFTR é uma glicoproteína de membrana (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), encontrada em diversas superfícies epiteliais secretoras, tais como aquelas existentes no pulmão, fígado, pâncreas, intestinos e trato reprodutivo. A função normal da glicoproteína é desempenhar o papel de um canal iônico, a fim de regular o equilíbrio salino por meio da secreção de cloreto e inibição da absorção de íons sódio. A alteração da sequência de aminoácidos da glicoproteína prejudica a função normal de canal iônico.⁴⁸ O pulmão é, normalmente, o órgão mais afetado. A superfície líquida das vias aéreas torna-se reduzida e desidratada a ponto de prejudicar a liberação mucociliar, ou seja, a falência da defesa inata pulmonar. Patógenos inalados não podem ser eliminados e há intensa reação inflamatória e lesão estrutural.^{49,50} Há, portanto, uma tendência para infecções de repetição, prejuízo das trocas gasosas e falência da função pulmonar.

Em função de suas características peculiares de patologia genética monogênica seria uma candidata ao tratamento por meio de terapia gênica, considerando que a restauração de baixos níveis funcionais da proteína CFTR em cada célula pode ser suficiente para inibir o fenótipo da doença.⁵¹ Embora a formulação dos experimentos, o delineamento experimental seja, em geral, elegante, racional e coerente no plano teórico, não se obteve, até o presente, com o emprego da terapia gênica, resultados consistentes e satisfatórios. Concorrem para o insucesso ou pleno êxito da terapia: capacidade indutora de resposta inflamatória e ineficiência do vetor, alta rotatividade das células epiteliais, ou, ainda, a correção apenas transitória do defeito gênico.^{52,53,54}

A FC enquadra-se, dessa forma, como uma das patologias pulmonares potencialmente passíveis de tratamento por terapia celular, seja por transplante heterólogo, ou mesmo autólogo mediante correção gênica.⁵⁴ Foi demonstrado que CT humanas com considerável potencial de diferenciação são capazes de expressar in vitro marcadores epiteliais pulmonares, como as embrionárias⁵⁵ e as mesenquimais derivadas da medula óssea.⁵⁶ Sabe-se também que nos processos de lesão pulmonar, como já comentado anteriormente, as CT derivadas da medula óssea podem confluir preferencialmente em direção ao pulmão a fim de estabelecer o reparo.^{18,21,22,57} O mesmo raciocínio utilizado em DPOC, aplica-se aqui, ou seja, há um conjunto de dados e evidências que sustentam a possibilidade de emprego de CT derivadas da medula óssea no tratamento da FC e abrem a perspectiva de estruturação de protocolos experimentais nessa direção.

Loi et al.⁵⁸ transplantaram células derivadas da medula óssea de camundongos machos adultos com o genótipo CFTR do tipo selvagem em fêmeas CFTR *knockout*. Os resultados indicaram o recrutamento das células doadoras para o epitélio alveolar e das vias aéreas, bem como a indução de mRNA e expressão da proteína CFTR no epitélio pulmonar dos animais receptores, embora em baixos níveis. De forma semelhante, baixos níveis de implante no epitélio intestinal

foram verificados em camundongos CFTR *knockout*, após o transplante de células derivadas da medula de doadores murinos com o genótipo CFTR selvagem.⁵⁹ A parcial restauração funcional da proteína CFTR mediante transplante de células derivadas da medula óssea também foi observada nos epitélios nasal e gastrointestinal de camundongos CFTR $\frac{-}{-}$.⁶⁰

Apesar da utilização de CT derivadas da medula óssea apresentar resultados promissores, novas estratégias devem ser avaliadas a fim de melhorar o reparo do epitélio pulmonar e corrigir o defeito no transporte iônico através da membrana epitelial. Wang et al.⁶¹ obtiveram resultados promitentes ao cultivar células do epitélio pulmonar com MSC provenientes da medula óssea, ambas de pacientes com fibrose cística. As MSC foram, no entanto, previamente corrigidas *ex vivo* com relação à mutação no gene CFTR, por meio de um retrovírus específico. O resultado foi a correção funcional incompleta da condução de íons cloreto através da membrana, mediada pela proteína CFTR.

As CTE poderiam representar uma outra opção de terapia celular para tratamento da fibrose cística. Quando CTE murinas são cultivadas em superfície ar-líquido, observa-se a capacidade de diferenciação em um epitélio pseudo-estratificado, semelhante ao epitélio respiratório.⁶² Porém, além do aspecto ético, a utilização de CTE em humanos é permeada por dúvidas e riscos potenciais de teratogênese. Assim, outras fontes de CT devem ser exploradas. CTM derivadas do tecido placentário e adiposo foram isoladas e, há perspectivas de que possam auxiliar a regeneração pulmonar,^{63,64} bem como as provenientes do líquido amniótico.⁶⁵ Outra população candidata a terapia celular em FC seriam as células bronquioalveolares, conforme proposto por Giangreco et al.⁶⁶ Esta proposição foi confirmada por Kim et al.⁶⁷ que mostraram que este grupo de células apresenta potencial de diferenciação em colônias de células Clara e células alveolares tipo I e II. As células bronquioalveolares poderiam, portanto, representar um grupo residente de CT pulmonares multipotentes.

Em virtude das dificuldades que acompanham o tratamento da fibrose cística mediante terapia gênica, a substituição das células portadoras da mutação no gene CFTR por meio da terapia celular representa uma proposta atraente. Muito embora os resultados obtidos até o presente denotem pouca eficiência e reprodutibilidade de resultados, deve-se considerar que foram feitos avanços importantes e significativos. Evidentemente os resultados obtidos até o presente estão ainda muito distantes no sentido de uma consolidação da terapia celular em FC. A associação da terapia gênica e celular, conforme realizado por Wang et al.,⁶¹ embora apresente resultados incipientes, relativamente pouco expressivos, encerra perspectivas promissoras e uma grande potencial de aplicação. Há, evidentemente, um longo caminho a ser percorrido, mas que se apresenta, ao mesmo tempo, altamente atraente e estimulante por envolver um conjunto de

técnicas apuradas e grande criatividade dos pesquisadores. O grande desafio a ser superado, a convergência de metodologias (terapia celular e gênica) que resulte efetiva, ou seja, que permita eliminar o descompasso entre o delineamento experimental lógico, dentro de uma proposição teórica altamente racional e a efetiva resposta biológica no organismo vivo.

Conclusão

Como apresentado e discutido, há uma série de resultados obtidos em modelos animais que mostram a regeneração do tecido pulmonar após diferentes tipos de lesão e posterior tratamento com CTA e/ou fatores estimuladores da mobilização de CT da medula óssea. Não se pode, por outro lado, deixar de considerar também a possibilidade aventada por alguns autores que esses resultados poderiam estar sendo superestimados. De qualquer forma os resultados apresentando a possibilidade de migração de células para o pulmão em pacientes humanos que receberam transplante de CTH da medula óssea ou a regeneração do tecido pulmonar em modelos animais, após diferentes tipos de lesão, abrem uma enorme via de pesquisa e fundamentam a possibilidade de aplicação da terapia celular em patologias pulmonares humanas.

Neste amplo contexto, tendo por embasamento os resultados obtidos em modelos experimentais, deve-se enfatizar a importância de manutenção das pesquisas em ciência básica, enquanto se considera, paralelamente, dentro de princípios éticos e racionais, a premente necessidade de estruturação de protocolos clínicos uni e multicêntricos de terapia celular em doenças pulmonares, especialmente em DPOC, considerando-se o estágio atual das pesquisas e dos avanços reportados em modelos animais.

Abstract

Cell therapy can be briefly described as the use of cells in the treatment of diseases. Although the number of scientific reports involving lung and cell therapy in humans is not expressive, there are consistent data, both in humans and animal models. Experiments show the migration of bone marrow stem cells to the lung, in different situations. These results provide the experimental basis for the use of stem cells in the regeneration of the lung tissue in animal models. In our laboratory, several projects have been conducted aiming to evaluate the pulmonary response (morphological and functional) to treatment with adult stem cells in mice with experimentally induced chronic obstructive pulmonary disease. The results obtained, together with those from other research groups, allow us to consider the possibility of application, in the near future, of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease patients. For another disease, cystic fibrosis, cell therapy shows particular aspects in relation to other chronic degenerative pulmonary diseases. In this pathology, there are interesting and promising advances, however, the results are incipient and, thus, it must be said that the association between genetic and cell therapy appears to be a possibility, but still far from

being consolidated and incorporated as a safe and effective therapeutic alternative in cystic fibrosis. On the other hand, based on the results obtained in experimental models, it is possible to postulate that cell therapy with hematopoietic stem cells (or from other sources) brings consistent application perspectives in several other human pulmonary diseases, especially in chronic obstructive pulmonary disease. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31(Supl. 1):140-148.

Key words: *Stem-cells; cell therapy; lung; chronic obstructive pulmonary disease (COPD); lung emphysema; cystic fibrosis.*

Referências Bibliográficas

1. National Institute of Health (NIH). Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. June, 2001
2. Melton DA, Cowan C. "Stemness": Definitions, criteria, and standards. In: Lanza R, editor-in-chief. Handbook of Stem Cells. New York; Elsevier/Academic Press; 2004. v.1. p.xxv-xxxi. 2004.
3. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1981;78(12):7634-8.
4. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981;292(5819):154-6.
5. Verfaillie CM. "Adult" Stem Cells: tissue Specific or Not? In: Lanza R, Blau H, Melton D, et al, editors. Handbook of Stem Cells. Adult and Fetal Stem Cells. United Kingdom: Elsevier/Academic Press; 2004. v.2. p.1-20.
6. Turhan AG. Plasticité de cellules souches adultes. Transfus Clin Biol. 2003;10(3):103-8.
7. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. Cell. 2004; 116(5):639-48.
8. Prosper F, Herreros J. Células madre adultas. Rev Argent Cardiol. 2004;72(1):68-73.
9. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(11):4857-61.
10. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. Science. 1997;276(5309):71-4.
11. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science. 1998;279(5356):1528-30.
12. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. Science. 1999;283(5401):534-7.
13. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nat Med. 2000;6(11):1229-34.
14. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell. 2001;105(3):369-77.
15. Holden C, Vogel G. Stem cells. Plasticity: time for a reappraisal? Science. 2002;296(5576):2126-9.
16. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res. 1961; 14:213-22.
17. Bittmann I, Dose T, Baretton GB, Müller C, Schwaiblmair M, Kur F, Löhns U. Cellular chimerism of the lung after transplantation. An interphase cytogenetic study. Am J Clin Pathol. 2001;115 (4):525-33.

18. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, *et al*. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*. 2001;128 (24): 5181-8.
19. Suratt BT, Cool CD, Serls AE, Chen L, Varella-Garcia M, Shpall EJ, *et al*. Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168 (3):318-22.
20. Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, Numasaki M, Ueda S, *et al*. Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol*. 2004;172(2):1266-72.
21. Neuringer IP, Randell SH. Stem cells and repair of lung injuries. *Respir Res*. 2004;5:6.
22. Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc*. 2007;39(2):573-6.
23. Lama VN, Smith L, Badri L, Flint A, Andrei AC, Murray S, *et al*. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. *J Clin Invest*. 2007;117(4):989-96.
24. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, *et al*. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;33(2):145-52.
25. Loebinger MR, Janes SM. Stem cells for lung disease. *Chest*. 2007; 132(1):279-85.
26. Kotton DN, Fabian AJ, Mulligan RC. Failure of bone marrow to reconstitute lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;33 (4):328-34.
27. Krause DS. Engraftment of bone marrow-derived epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1044:117-24.
28. Xu J, Qu J, Cao L, Sai Y, Chen C, He L, *et al*. Mesenchymal stem cell-based angiopoietin-1 gene therapy for acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *J Pathol*. 2008;214(4):472-81.
29. Oliveira JCA, Jardim JRB, Rufino R. I Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). *J Pneumol*. 2000; 26(Supl 1)S1-S52.
30. GOLD - Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Estrategia Global Para el Diagnóstico, Tratamiento y Prevencion de la Enfermedad Pulmonar Obstrutiva Crónica. 2006.
31. Barnes PJ. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Med*. 2003;54:113-29.
32. Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(6):1304-9.
33. WHO 2002 World Health Organization Strategy for prevention and control of chronic diseases WHO/MNCRA/02.1,2002
34. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, *et al*. Patologia estrutural e funcional. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p.620-33.
35. Campos HS. O preço da DPOC. *Pulmão RJ*. 2003;12:5-7.
36. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;349 (9061): 1269-76.
37. Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Numasaki M, Ueda S, *et al*. Bone marrow-derived cells contribute to lung regeneration after elastase-induced pulmonary emphysema. *FEBS Lett*. 2004; 556(1-3):249-52.
38. Kuang PP, Lucey E, Rishikof DC, Humphries DE, Bronsnick D, Goldstein RH. Engraftment of neonatal lung fibroblasts into the normal and elastase-injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;33(4):371-7.
39. Murakami S, Nagaya N, Itoh T, Iwase T, Fujisato T, Nishioka K, *et al*. Adrenomedullin regenerates alveoli and vasculature in elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(5):581-9.
40. Adachi Y, Oyaizu H, Taketani S, Minamino K, Yamaguchi K, Shultz LD, *et al*. Treatment and transfer of emphysema by a new bone marrow transplantation method from normal mice to Tsk mice and vice versa. *Stem Cells*. 2006;24(9):2071-7.
41. Arantes PMM, Balduino A, Lopes, FDTQS, *et al*. Applications of mononuclear cells from bone marrow in experimental therapeutics of the emphysema. In: I International Symposium on Stem Cells; 2006 Sep 14-16; Salvador - Bahia. OP-01.
42. Arantes PMM. Emprego de células mononucleares da medula óssea na terapêutica experimental do enfisema pulmonar. Mestrado [Dissertação em Biotecnologia]. São Paulo (SP): USP/Instituto Butantan/IPT; 2007.
43. Faria CA, Ribeiro-Paes JT, Aplicação de mononucleares da medula óssea na terapêutica experimental de enfisema pulmonar [monografia]. Assis (SP): Unesp; 2008.
44. Davies JC, Alton EW, Bush A. Cystic fibrosis. *BMJ*. 2007;335 (7632):1255-9.
45. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, *et al*. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245 (4922):1066-73.
46. http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/posters/chromosome/cftr.shtml [acesso em 14/07/2008].
47. Cystic Fibrosis Foundation <http://www.cff.org/AboutCF/> [acesso em 13/07/2008].
48. Accurso FJ. Update in cystic fibrosis 2007. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(10):1058-61.
49. Knowles MR, Robinson JM, Wood RE, Pue CA, Mentz WM, Wager GC, *et al*. Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. *J Clin Invest*. 1997;100(10):2588-95.
50. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, *et al*. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell*. 1998;95(7):1005-15.
51. Ramalho AS, Beck S, Meyer M, Penque D, Cutting GR, Amaral MD. Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27(5):619-27.
52. Simon RH, Engelhardt JF, Yang Y, Zepeda M, Weber-Pendleton S, Grossman M, *et al*. Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study. *Hum Gene Ther*. 1993;4(6):771-80.
53. Perricone MA, Morris JE, Pavelka K, Plog MS, O'Sullivan BP, Joseph PM, *et al*. Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. II. Transfection efficiency in airway epithelium. *Hum Gene Ther*. 2001; 12(11):1383-94.
54. Conese M, Rejman J. Stem cells and cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2006;5(3):141-3.
55. Samadikucharsaei A, Cohen S, Isaac K, Rippon HJ, Polak JM, Bielby RC, *et al*. Derivation of distal airway epithelium from human embryonic stem cells. *Tissue Eng*. 2006;12(4):867-75.
56. Sueblinvong V, Loi R, Eisenhauer PL, Bernstein IM, Suratt BT, Spees JL, *et al*. Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(7):701-11.

57. Theise ND, Henegariu O, Grove J, Jagirdar J, Kao PN, Crawford M, *et al.* Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow. *Exp Hematol.* 2002;30(11):1333-8.
58. Loi R, Beckett T, Goncz KK, Suratt BT, Weiss DJ. Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(2):171-9.
59. Bruscia EM, Price JE, Cheng EC, Weiner S, Caputo C, Ferreira EC, *et al.* Assessment of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity in CFTR-null mice after bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(8):2965-70.
60. Bruscia E, Grove J, Cheng EC, *et al.* Functional CFTR is partially restored in CFTR-null mice following bone marrow transplantation. *Ped Pulmunol.* 2004;27:247.
61. Wang G, Bunnell BA, Painter RG, Quiniones BC, Tom S, Lanson NA Jr, *et al.* Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(1):186-91.
62. Coraux C, Nawrocki-Raby B, Hinnrasky J, Kileztky C, Gaillard D, Dani C, *et al.* Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32(2):87-92.
63. Fauza D. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Pract Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18(6):877-91.
64. Zheng B, Cao B, Li G, Huard J. Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo. *Tissue Eng.* 2006;12(7):1891-901.
65. Kunisaki SM, Freedman DA, Fauza DO. Fetal tracheal reconstruction with cartilaginous grafts engineered from mesenchymal amniocytes. *J Pediatr Surg.* 2006;41(4):675-82.
66. Giangreco A, Reynolds SD, Stripp BR. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am J Pathol.* 2002;161(1):173-82.
67. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, *et al.* Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell.* 2005;121(6):823-35.

Suporte Financeiro: CNPq - Fundunesp Fundação BiomaVale - Assis - SP.

Avaliação: O tema apresentado consta da pauta elaborada pelo editor, Professor Milton Artur Ruiz, e coeditores deste suplemento, Professores Sergio Paulo Bydlowski e Adriana Seber.

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 27/08/2008

Aceito: 03/11/2008