



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

***APLICAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS NA
SÍNDROME DE DIFICULDADE RESPIRATÓRIA
AGUDA***

João Filipe Rodrigues Neto

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professor Doutor João Pedro Fidalgo Rocha

2014

Aplicação de Células Estaminais na Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(João Neto)

Copyright © João Filipe Rodrigues Neto

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“A journey of a thousand miles begins with a single step.”

Lao-Tzu

Dedicatória e Agradecimentos

A presente dissertação simboliza, não só a conclusão dos cinco anos de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, mas também o término do meu percurso académico. Deste modo, tenho a agradecer a muitas pessoas. Destaco aqueles que sempre me acompanharam e que contribuíram de forma decisiva para que este dia pudesse chegar.

Começo por agradecer ao meu orientador, Professor Doutor João Rocha, pela disponibilidade que mostrou para me orientar e ajudar na elaboração deste trabalho, mas também pelo entusiasmo que sempre demonstrou pelo tema do mesmo.

Aos professores do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, por todos os conhecimentos e experiências transmitidas ao longo destes cinco anos. Quero que saibam que foram essenciais, cada um à sua maneira.

A todos os meus colegas de curso por sempre me terem ajudado e por todos os momentos com eles vividos. Quero destacar o meu colega Humberto Melo, pela amizade e companheirismo proporcionados ao longo destes anos e pela ajuda crucial na revisão desta dissertação.

Aos meus amigos, de sempre e para sempre, João Viegas, Luís Lares, Sara Sofia e Vanessa Santos, mas também a todos aqueles que, menos próximos, também contribuíram, de certa forma, para que tudo isto fosse possível. Por toda a amizade demonstrada e pelo apoio que sempre me deram. Perto ou longe, saibam que todos foram fundamentais para que este dia acontecesse.

À minha mãe, ao meu pai e à minha irmã, as pessoas que tornaram tudo isto possível. Agradeço por todos os valores transmitidos e por todo o esforço feito para que este momento fosse possível. Sei que não foi fácil, mas valeu a pena. Estendo este agradecimento à minha restante família.

Por fim, agradecer aos meus avós. Deixaram-me cedo demais e quando menos esperava. Obrigado por terem sido segundos pais e mães. As saudades apertam. Saibam que o vosso desejo foi cumprido com sucesso. Apesar de não estarem por cá fisicamente, espero que estejam orgulhosos do que alcancei.

Obrigado a todos!

Resumo

A Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda é uma forma rapidamente progressiva de insuficiência respiratória aguda, caracterizada por hipoxémia e edema pulmonar de origem não cardíaca, sendo desencadeada por uma variedade de fatores. Apesar de não ser de aparecimento recente, o conhecimento relativamente à sua fisiopatologia e as opções terapêuticas que se encontram disponíveis são muito reduzidas. A única terapia que mostrou melhorias nas taxas de mortalidade foi a implementação de uma estratégia de ventilação mecânica de baixo volume corrente. As células estaminais são células não desenvolvidas capazes de se proliferarem, autorrenovarem, diferenciarem, e regenerarem tecidos. Por este motivo, são já utilizadas no tratamento de muitas doenças. Recentemente, vários investigadores têm demonstrado os efeitos benéficos da terapia baseada em células na Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda. Dados os resultados iniciais obtidos em modelos pré-clínicos, nomeadamente no que concerne a uma melhoria nas taxas de mortalidade, houve um entusiasmo enorme por parte da comunidade científica para avançar com esta terapia em doentes com esta síndrome. Muito do interesse atual nas células estaminais centra-se na secreção de fatores solúveis parácrinos, tais como fatores de crescimento, fatores que regulam a permeabilidade endotelial e epitelial, citocinas anti-inflamatórias e, mais recentemente, péptidos antimicrobianos. Atualmente, as células estaminais mesenquimais são as que se encontram mais próximas da tradução clínica, existindo já em curso ensaios clínicos em humanos com resultados bastante promissores. Outros tipos de células estaminais, apesar de se encontrarem numa fase anterior, oferecem também uma esperança considerável. As células estaminais podem também ser modificadas geneticamente e utilizadas como veículos para a entrega de agentes terapêuticos que desempenham um papel importante no controlo e na patogénese da síndrome. Porém, são necessários mais estudos de forma a que a terapia celular possa ser considerada uma opção viável no tratamento da Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda.

Termos-chave: Lesão Pulmonar Aguda; Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda; Células Estaminais; Terapia Celular

Abstract

The Acute Respiratory Distress Syndrome is a rapidly progressive form of acute respiratory failure, characterized by hypoxemia and pulmonary edema of non-cardiac origin, being triggered by a variety of factors. Although not of recent onset, the knowledge regarding the pathophysiology and the treatment options that are available are very limited. The only therapy that has shown improvements in mortality rates was the implementation of a strategy of mechanical ventilation of low tidal volume. Stem cells are undeveloped cells capable to proliferate, auto renew, differentiate and regenerate tissues. For this reason, they are already used for the treatment of many diseases. Recently, several investigators have demonstrated the beneficial effects of cell based therapy on the Acute Respiratory Distress Syndrome. Given the initial results obtained in preclinical models, particularly with regards to an improvement in mortality rates, there was a huge enthusiasm for the scientific community to go forward with this therapy in patients with this syndrome. Much of the current interest in stem cell research is focused on the secretion of paracrine soluble factors, such as growth factors, factors that regulate endothelial and epithelial permeability, anti-inflammatory cytokines and, most recently, antimicrobial peptides. Currently, the mesenchymal stem cells are those that lie closer to the clinical translation, and there are ongoing human clinical trials with promising results. Other types of stem cells, despite being an earlier stage, also offer a considerable expectancy. Stem cells may also be genetically engineered and used as delivery vehicles for therapeutic agents that play an important role in the pathogenesis and control of the syndrome. However, more studies are needed so that cell therapy can be considered a viable option on the treatment of Acute Respiratory Distress Syndrome.

Keywords: Acute Lung Injury; Acute Respiratory Distress Syndrome; Cell Therapy; Stem Cells

Índice de Matérias

Índice de Matérias	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Quadros	ix
Lista de Siglas e Abreviaturas	x
Lista de Símbolos	x
1. Capítulo 1	11
1.1 Justificação do tema	12
1.2 Metodologia.....	12
1.3 Organização.....	13
2. Capítulo 2	14
2.1 Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda	15
2.1.1 Fatores de risco	18
2.1.2 Epidemiologia.....	20
2.1.2.1 Incidência	20
2.1.2.2 Mortalidade e Morbilidade	21
2.1.3 Fisiopatologia	23
2.1.4 Tratamento.....	29
2.1.4.1 Ventilação mecânica	29
2.1.4.2 Posição de decúbito ventral	31
2.1.4.3 Estratégia conservadora de fluído	31
2.1.4.4 Reposição de surfactante	32
2.1.4.5 Vasodilatadores inalados	33
2.1.4.5.1 Monóxido de azoto.....	34
2.1.4.5.2 Prostaciclina.....	35
2.1.4.6 Glucocorticoides	36
2.1.4.7 Agonistas adrenérgicos β_2	37
2.1.4.8 Agentes bloqueadores neuromusculares	38
2.1.4.9 Outros.....	39
3. Capítulo 3	40
3.1 Célula estaminais	41
3.1.1 Células estaminais embrionárias	44

3.1.2	Células estaminais adultas	47
3.1.3	Células estaminais pluripotentes induzidas	50
3.1.4	Questões legais e regulatórias da terapia celular	52
4.	Capítulo 4	55
4.1	Aplicação das células estaminais na Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda.....	56
4.1.1	Células estaminais embrionárias	59
4.1.2	Células estaminais adultas	60
4.1.2.1	Células estaminais progenitoras endoteliais	60
4.1.2.2	Células estaminais endógenas pulmonares	62
4.1.2.3	Células estaminais mesenquimais.....	63
4.1.2.3.1	Enxerto	66
4.1.2.3.2	Reparação pulmonar/Permeabilidade.....	67
4.1.2.3.3	Inflamação.....	69
4.1.2.3.4	Imunomodulação.....	71
4.1.2.3.5	Antimicrobiano.....	72
4.1.2.3.6	Microvesículas e Mitocôndrias	74
4.1.2.4	Células modificadas geneticamente.....	74
4.1.3	Células estaminais pluripotentes induzidas	78
5.	Capítulo 5	80
5.1	Conclusão	81
5.2	Referências Bibliográficas.....	83

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Cronologia das várias fases no desenvolvimento da Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda.	24
Figura 2.2 – Alvéolos normal (lado esquerdo) e lesado (lado direito) durante a fase aguda da Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda.	25
Figura 2.3 – História natural da Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda.	26
Figura 2.4 – Mecanismos importantes na resolução da Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda.	28
Figura 2.5 – Efeito dos vasodilatadores inalados.	33
Figura 3.1 – Representação da potencialidade das células estaminais.	43
Figura 3.2 – Ilustração da obtenção de células estaminais embrionárias e da sua respetiva potencialidade.	44
Figura 3.3 - Isolamento, produção e cultura de células estaminais pluripotentes.	51
Figura 4.1 -Propriedades terapêuticas das células estaminais mesenquimais na Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda.	65

Índice de Quadros

Quadro 2.1 – Comparação entre a Definição AECC e a Definição de Berlim, relativas à Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda.....	18
Quadro 2.2 – Principais fatores de risco para o desenvolvimento da SDRA.....	19
Quadro 3.1 - Vantagens e desvantagens dos vários tipos de células estaminais para a sua aplicação clínica.	54

Lista de Siglas e Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AECC	“The American European Consensus Conference on ARDS”
Ang-1	Angiopietina 1
ATP	Adenosina trifosfato
CEE	Célula estaminal embrionária
CEM	Célula estaminal mesenquimal
CEPE	Célula estaminal progenitora endotelial
CEPi	Célula estaminal pluripotente induzida
FiO₂	Fração inspirada de oxigénio
HGF	Fator de crescimento dos hepatócitos
IL	Interleucina
INF	Interferão
K⁺	Ião potássio
Kg	Quilograma
KGF	Fator de crescimento dos queratinócitos
LPA	Lesão pulmonar aguda
Mg	Miligramma
MIF	Fator de inibição dos macrófagos
mL	Mililitro
mmHg	Milímetro de mercúrio
Na⁺	Ião sódio
PAF	Fator de ativação plaquetária
PaO₂	Pressão parcial de oxigénio
PEEP	Pressão positiva expiratória final
SDRA	Síndrome de dificuldade respiratória aguda
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TSG-6	Fator de necrose tumoral alfa induzido pela proteína 6
UCI	Unidade de cuidados intensivos

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
----------	-------------

1. Capítulo 1

1.1 Justificação do tema

A Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda (SDRA) constitui uma forma de insuficiência respiratória aguda hipoxémica, que é desencadeada por uma diversidade de doenças e outros fatores. A síndrome é relativamente comum em doentes em estado crítico, representando taxas de mortalidade e morbidade substancialmente elevadas.¹

Ao longo dos últimos anos, muitos mecanismos moleculares foram descobertos, o que resultou num aumento considerável do conhecimento e da compreensão relativamente à fisiopatologia da SDRA. Para além disso, apenas em 2011, a definição da SDRA foi unanimemente aceite pela comunidade científica.²

Porém, e apesar de várias estratégias terapêuticas tenham sido pensadas para o tratamento da SDRA, nenhuma delas resultou em melhorias significativas dos prognósticos dos doentes com esta síndrome. Atualmente, a única terapia que representa melhorias nas taxas de mortalidade é a implementação de uma estratégia de ventilação de baixo volume corrente.³

Assim, o campo da terapia celular surge como uma possível abordagem terapêutica no tratamento da SDRA. Apesar de recente, este interesse é suportado pela aplicação desta tecnologia na medicina regenerativa. Para além disso, existem atualmente inúmeros ensaios clínicos que estudam a aplicação de células estaminais noutras doenças, com resultados bastante promissores.⁴

Deste modo, com esta dissertação pretende-se fazer uma revisão e sistematização, baseada em bibliografia atualizada, da aplicação de células estaminais na SDRA.

1.2 Metodologia

Com recurso às bases de dados Pubmed, B-on, Biomed, Web of Knowledge, ScienceDirect e Google, foi realizada, entre Fevereiro de 2014 e Setembro do mesmo ano, uma pesquisa de artigos de revisão, ensaios clínicos e meta-análises, publicados em língua inglesa e portuguesa, tendo em conta os seguintes termos de pesquisa: “Acute Respiratory

Distress Syndrome”, “Acute Lung Injury”, “Stem Cells”, “Acute Respiratory Distress Syndrome+Stem Cells” e “Acute Lung Injury+Stem Cells”.

A pesquisa supracitada resultou na obtenção de milhares de resultados, tendo sido, a partir destes, selecionados os artigos cujos título e/ou resumo tenham sido considerados relevantes para a realização do presente trabalho. Para além disso, a atualidade dos artigos referidos foi também tida em conta, de forma a tentar englobar apenas artigos dos últimos 15 anos.

1.3 Organização

A presente dissertação encontra-se dividida em vários capítulos. Inicialmente, é feita uma breve introdução à SDRA, onde é feito um enquadramento histórico e apresentada a definição que vigora relativamente à síndrome, a sua epidemiologia e fisiopatologia, e onde são abordadas as várias opções terapêuticas existentes no que concerne ao tratamento da SDRA. Numa segunda parte, é introduzido o tema das células estaminais. Assim, é feita uma definição geral de “célula estaminal”, e depois são apresentados os vários tipos existentes de células estaminais, assim como as suas aplicações terapêuticas e as questões regulatórias e legais referentes a cada tipo. No terceiro capítulo, são apresentados os vários estudos pré-clínicos e clínicos, existentes até à data, relativos ao tratamento da SDRA baseado na terapia celular. Por último, são efetuadas algumas considerações finais e apresentadas as conclusões obtidas, relativamente ao trabalho realizado, assim como todas as referências bibliográficas utilizadas para a realização do mesmo.

2. Capítulo 2

2.1 Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda

A SDRA é uma forma rapidamente progressiva de insuficiência respiratória aguda, caracterizada por hipoxémia e edema pulmonar de origem não cardíaca^a. A síndrome representa um padrão comum de lesão alvéolo-capilar aguda em doentes em estado crítico, sendo desencadeada por uma diversidade de doenças.¹

A SDRA não é de aparecimento recente na prática médica, tendo a sua terminologia vindo a ser alterada ao longo de tempo. A primeira referência a esta síndrome data de 1821, quando Laennec descreveu um edema pulmonar de causa não cardíaca, a que chamou de “anasarca idiopática”.⁵ O conhecimento etiológico teve maior crescimento durante a Primeira Grande Guerra Mundial, com as situações de colapso pulmonar agudo provocados por ferimentos em batalha a que os combatentes estavam sujeitos.⁶

No entanto, a SDRA apenas foi reconhecida pela primeira vez durante a década de 60, quando uma forma diferente de insuficiência respiratória hipoxémica, caracterizada por uma anormalidade aguda em ambos os pulmões, surgiu. Médicos militares a trabalhar em hospitais cirúrgicos no Vietname chamaram-lhe choque pulmonar, enquanto médicos civis referiram-se a essa insuficiência como Síndrome de Dificuldade Respiratória no Adulto. O subsequente reconhecimento de que indivíduos de qualquer idade poderiam ser afetados, levou ao termo atual, Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda.⁶

A primeira definição da SDRA acabou por surgir em 1967, quando Ashbaugh *et al.* descreveram 12 doentes com insuficiência respiratória aguda grave.⁶ A síndrome era refratária à terapêutica respiratória utilizada na altura, passando a ser definida através de cinco características clínicas principais: a presença de um fator de risco conhecido; hipoxémia grave, refratária à administração de oxigenioterapia; infiltrados pulmonares bilaterais; diminuição da *compliance*^b pulmonar; e ausência de insuficiência cardíaca congestiva.¹

^a **Edema pulmonar de origem não cardíaca** - Edema causado por várias doenças, nas quais os fatores que não sejam a pressão capilar pulmonar elevada são responsáveis pela acumulação de líquido e proteínas nos alvéolos.¹⁷⁴

^b **Compliance pulmonar** - Medida da facilidade de expansão dos pulmões e do tórax, determinada pelo volume e elasticidade pulmonares.¹⁷⁵

Os critérios para o diagnóstico da SDRA têm, no entanto, evoluído ao longo do tempo. Em 1988, Murray *et al.* tentaram expandir esta definição, propondo um modo de avaliar quantitativamente a gravidade da lesão pulmonar, através de um sistema de pontuação baseado em quatro critérios: no grau de hipoxémia; no nível de pressão positiva no final da expiração (PEEP)^c; na *compliance* pulmonar e na extensão dos infiltrados presentes na radiografia do tórax. Através destes critérios, a gravidade da lesão pulmonar era estratificada. Com um valor final superior a 2,5, considerar-se-ia o diagnóstico de SDRA.⁷ Esse sistema, designado de Índice de Lesão Pulmonar, acabou por ser útil à investigação e ensaios clínicos realizados na altura. Porém, atualmente este sistema constitui um marcador de risco de mortalidade não válido.⁸

Ao longo dos últimos 30 anos, várias definições foram propostas. No entanto, nenhuma obteve aprovação total da comunidade científica. Em 1994, depois de décadas de definições diferentes, o “*The American-European Consensus Conference on ARDS*” (AECC) reconheceu a variabilidade na gravidade da lesão pulmonar, e dividiu os doentes em dois grupos: aqueles com hipoxémia leve, isto é, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2^d \leq 300\text{mmHg}$, foram categorizados como tendo Lesão Pulmonar Aguda (LPA), e aqueles com hipoxémia grave, ou seja, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200\text{mmHg}$, foram definidos como tendo SDRA. Para além da categorização dos doentes, foi proposto que o início da síndrome seria agudo; existiriam infiltrados pulmonares bilaterais à radiografia torácica; e um pico de pressão pulmonar < 18mmHg, ou nenhuma evidência clínica de insuficiência ventricular esquerda.⁹

As duas principais vantagens desta definição foram a simplicidade de aplicação clínica e a capacidade de quantificar a gravidade da lesão pulmonar. Até recentemente, a definição mais aceite da SDRA era a definição proposta pela AECC. No entanto, apesar da simplicidade, esta definição apresentava uma série de limitações clínicas reconhecidas.⁹

Ao longo dos últimos 20 anos, a precisão do diagnóstico da definição da SDRA pela AECC veio sendo questionada. Numa série de 138 doentes com SDRA, a definição teve uma especificidade relativamente baixa (51%), quando comparada com os resultados da autópsia.¹⁰ Para além disso, a fiabilidade do critério que dizia respeito à radiografia do

^c **PEEP** - Pressão nos pulmões (pressão alveolar) acima da pressão atmosférica, que existe no fim da expiração. Existem dois tipos de PEEP: a PEEP intrínseca (causada pela exalação não completa) e a PEEP extrínseca (aplicada por um ventilador).¹⁷⁶

^d **Hipoxémia** - Razão entre a pressão parcial de oxigénio arterial e a fração inspirada de oxigénio, ou seja, comparação entre o nível de oxigénio no sangue e a concentração de oxigénio que se respira. Determina a forma como os pulmões transferem oxigénio para o sangue.²

tórax era moderada, com uma variabilidade entre observadores substancial.^{11,12} Ainda, o critério da hipoxemia poderia ser significativamente afetado pela ventilação do doente, especialmente no nível de PEEP usado.¹³ Finalmente, a pressão pulmonar poderia ser difícil de interpretar, e se um doente com SDRA desenvolvesse uma alta pressão pulmonar, isso não significaria que o mesmo não tivesse realmente a síndrome. Com base nestas preocupações, um painel de especialistas reuniu-se, em 2011, em Berlim, com o objetivo de tentar melhorar a viabilidade, a fiabilidade e a validade da definição da SDRA proposta pela AECC.² Existem algumas alterações fundamentais na definição de Berlim, comparativamente com a definição AECC.

No **Quadro 2.1** encontram-se representados os principais critérios de diagnóstico da SDRA, de acordo com as definições AECC e de Berlim.

Na definição de Berlim, o termo LPA não é utilizado. O painel de especialistas decidiu que este termo tinha sido utilizado de forma inadequada em muitos contextos e, portanto, não seria útil. Na definição de Berlim, a SDRA foi classificada como leve ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 201-300), moderada ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 101-200) e grave ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$), de acordo com o valor da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, correspondendo a LPA à SDRA leve.²

Para além disso, a definição AECC indicava que o início da SDRA era agudo, de forma a excluir as condições pulmonares crónicas que pudessem causar insuficiência respiratória hipoxémica. Porém, não declarava um prazo explícito. Dados observacionais sugerem que a maioria dos doentes com SDRA são identificados num prazo de 72 horas após o reconhecimento do fator de risco subjacente, sendo os restantes num prazo máximo de 7 dias.¹⁴ Neste contexto, o painel definiu “início agudo” como um prazo de 1 semana.² O período de tempo relativamente ao início agudo da SDRA encontra-se, assim, claramente definido na definição de Berlim.

Ainda, a definição AECC tinha como critério de diagnóstico a presença de infiltrados bilaterais consistentes com edema pulmonar na radiografia do tórax, apesar de não existir fiabilidade na observação inter-individual.^{11,12} De forma a solucionar este problema, o painel tentou clarificar este critério, explicitando que a radiografia deveria incluir opacidades bilaterais consistentes com edema pulmonar, não explicadas por derrame, colapso pulmonar/lobar ou nódulos pulmonares.²

Na ausência de fatores de risco conhecidos (**Quadro 2.2**), a avaliação da função cardíaca (por exemplo, ecocardiografia ou medição do débito cardíaco) é, no entanto, necessária de forma a excluir o edema pulmonar secundário à insuficiência cardíaca. Conseqüentemente, a medição da pressão pulmonar foi abandonada porque a SDRA pode coexistir com edema pulmonar causado pela sobrecarga de líquidos ou insuficiência cardíaca.¹⁵

Quadro 2.1 – Comparação entre a Definição AECC e a Definição de Berlim, relativas à Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda

	Definição AECC	Definição de Berlim
Grau de hipoxemia 200mmHg<PaO ₂ /FiO ₂ ≤300mmHg 100mmHg<PaO ₂ /FiO ₂ ≤200mmHg PaO ₂ /FiO ₂ ≤100mmHg	LPA SDRA SDRA	SDRA leve SDRA moderada SDRA grave
Início	Agudo (prazo não explícito)	Agudo (no prazo de 7 dias)
Imagem radiográfica	Opacidades pulmonares bilaterais	Opacidades pulmonares bilaterais não totalmente explicadas por derrames, colapsos lobares/pulmonares ou nódulos
Origem do edema	Pico de pressão pulmonar <18mmHg	Não totalmente explicado pela insuficiência cardíaca ou sobrecarga de líquidos

2.1.1 Fatores de risco

A SDRA tem sido tradicionalmente conceptualizada como um padrão de lesão pulmonar e de manifestações clínicas que podem ser causadas por uma variedade de fatores. Mais de 60 possíveis causas foram identificadas, e outras potenciais causas continuam a surgir como reações pulmonares adversas a novas terapias. No entanto, apenas algumas são responsáveis pela maioria dos casos da SDRA.^{16,17}

Há muitos fatores de risco comuns para a SDRA, que a definição AECC classificava como diretos e indiretos, consoante esses fatores afetassem ou não

diretamente a função pulmonar, respetivamente. Apesar de alguns estudos experimentais e clínicos mostrarem diferenças nas respostas inflamatórias e nos padrões radiográficos, bem como nas respostas fisiológicas ao tratamento ventilatório, as categorias direta e indireta sobrepõem-se a um grau tão grande de variabilidade que o painel de Berlim decidiu não incluir causas diretas ou indiretas como entidades distintas. A identificação do fator de risco que leva à SDRA num doente individual, independentemente da sua natureza direta ou indireta, serve sobretudo para orientar a terapia para a doença subjacente.¹⁸

No **Quadro 2.2** abaixo representado encontram-se apresentados os principais fatores de risco para o desenvolvimento da síndrome.

Quadro 2.2 – Principais fatores de risco para o desenvolvimento da SDRA. Adaptado de Ranieri et al., 2012²

Fator de risco
Pneumonia
Sepsis não pulmonar
Aspiração de conteúdo gástrico
Trauma grave
Contusão pulmonar
Pancreatite
Lesão por inalação
Queimaduras graves
Choque não cardiogénico
<i>Overdose</i> medicamentosa
Múltiplas transfusões ou lesão pulmonar aguda associada à transfusão
Vasculite pulmonar
Afogamento
Outras

Alguns eventos têm, no entanto, uma maior probabilidade de progredir para a lesão pulmonar do que outros. A sepsis é considerada a causa mais comum da SDRA, sendo que esta deve ser a primeira etiologia a ser considerada sempre que a síndrome se desenvolve num doente predisposto a infeções graves. Para além disso, a pneumonia

adquirida na comunidade é provavelmente a causa mais comum da SDRA contraída em ambiente não hospitalar. Não obstante a este fato, as pneumonias nosocomiais podem também progredir para a síndrome. As etiologias menos comuns parecem ser a aspiração de conteúdo gástrico, o trauma grave, transfusões, a pancreatite aguda, entre outros.¹⁷

Para além disso, variantes em mais de 25 genes foram associados ao desenvolvimento da SDRA e aos seus resultados clínicos¹⁹, incluindo as variantes comuns de genes que regulam a inflamação, a coagulação, a função das células endoteliais, a produção de espécies reativas de oxigénio, bem como a apoptose²⁰⁻²⁴ - todos os processos que são importantes na lesão pulmonar e na sua reparação.

Por fim, o risco de desenvolver SDRA parece depender também das características do doente. O alcoolismo²⁵, a exposição ao fumo de tabaco^{26,27}, a obesidade^{28,29} e o grupos sanguíneo do tipo A³⁰, têm sido associados a um maior risco de desenvolver SDRA.

2.1.2 Epidemiologia

2.1.2.1 Incidência

A incidência da SDRA tem sido difícil de avaliar ao longo dos anos devido a definições não uniformes, variações etiológicas e geográficas, documentação inadequada e sub-reconhecimento da entidade da doença.⁴

No entanto, durante 15 meses, entre os anos de 1999 e 2000, 1113 doentes foram seguidos nos Estados Unidos da América, através de um estudo de coorte conduzido por Rubinfeld *et al.*, 2005, o que permitiu estimar a incidência da SDRA. Nesse estudo, a incidência foi de 86 por 100.000 pessoas/ano para indivíduos com uma razão de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300\text{mmHg}$ e de 64 por 100.000 pessoas/ano para indivíduos com uma razão de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200\text{mmHg}$.³¹ Porém, estimativas do Norte da Europa (17 casos por 100.000 pessoas)³², de Espanha (7,2 casos por 100.000 pessoas)¹⁷, e da Austrália/Nova Zelândia (34 casos por 100.000 pessoas)³³ apresentam taxas substancialmente mais baixas. Razões para estas diferenças observadas ainda não são totalmente claras, mas podem incluir grandes diferenças na demografia e na assistência dos sistemas de saúde.¹⁷

Outros fatores, como a idade, podem afetar a incidência de SDRA. No estudo de coorte de Rubenfeld, a incidência da síndrome aumentou com a idade de 16 por 100.000 pessoas/ano entre os 15 e os 19 anos de idade, para 306 por 100.000 pessoas/ano entre os 75 e os 84 anos de idade.³¹

Dentro das unidades de cuidados intensivos, a incidência da síndrome corresponde a aproximadamente 10 a 15% dos doentes admitidos, sendo que até 20% dos doentes mecanicamente ventilados, satisfazem os critérios para a doença.³⁴

De uma forma geral, as estimativas de Rubenfeld *et al.* indicam que existem cerca de 190.000 casos por ano de SDRA nos Estados Unidos da América, com 74.500 mortes associadas.³¹

No entanto, a incidência da SDRA parece estar a diminuir. Um estudo realizado por Li *et al.*, 2011, em Olmsted County (Estados Unidos da América), relatou que a incidência da SDRA diminuiu dos 82,4 casos por 100.000 pessoas/ano, em 2001, para os 38,9 casos por 100.000 pessoas/ano, em 2008. Isto foi atribuído a um declínio no número de casos de SDRA adquirida em ambiente hospitalar, bem como numa melhoria dos cuidados de saúde. Porém, aqueles que desenvolveram SDRA tiveram um quadro clínico mais grave, mais co-morbilidades e mais condições predisponentes.³⁵

2.1.2.2 Mortalidade e Morbilidade

A SDRA está associada a uma mortalidade apreciável, com diferentes estudos realizados em populações diferentes, relatando estimativas de 26% a 58%.^{2,31,35-38} A mortalidade varia, no entanto, de acordo com o défice de oxigenação. No estudo de coorte da definição de Berlim, a mortalidade determinada foi de 27% em doentes com SDRA leve, 32% em doentes com SDRA moderada, e 45% em doentes com SDRA grave.² No entanto, embora o défice de oxigenação seja um fator de risco para a mortalidade por SDRA, os doentes normalmente morrem de falência de múltiplos órgãos ou de doença progressiva subjacente, sendo que apenas uma minoria dos doentes (13%-19%) morre de insuficiência respiratória refratária.^{17,39}

Tal como a incidência, também as taxas de mortalidade da SDRA variam bastante dependendo da idade do doente. Rubenfeld *et al.*, 2005, constataram que a mortalidade

foi significativamente menor nos doentes com idade compreendida entre os 15 e os 19 anos de idade (24%) em comparação com os doentes com 85 ou mais anos de idade (60%).³¹ Esta descoberta foi ainda suportada por Flori *et al.*, 2005, onde se estimou a taxa de mortalidade pediátrica em 22%.⁴⁰

A natureza da doença clínica subjacente à síndrome é também um importante determinante do resultado. Por exemplo, a sepsis apresenta taxas de mortalidade superiores, comparando com o trauma (43% vs 11%), enquanto a pneumonia e a aspiração de conteúdo gástrico são fatores intermediários de risco (36% e 37%, respetivamente).⁴¹

Apesar destas diferenças nas taxas de mortalidade, a tendência geral tem sido um declínio da mortalidade, acompanhando a tendência da incidência. Neste sentido, um estudo observacional de 2451 doentes, concluiu que a mortalidade diminuiu dos 35% para os 26%, entre 1996 e 2005.⁴² O progresso inicial na redução da mortalidade deve-se, provavelmente, ao aumento da implementação de uma estratégia de ventilação mecânica de baixo volume corrente, uma modalidade terapêutica que reduz a lesão pulmonar, a inflamação sistémica e a subsequente falência de múltiplos órgãos.³ No entanto, esta melhoria nas taxas de mortalidade deve ser interpretada com cautela, tendo em conta que a definição comum para a SDRA e para a LPA só foi adotada em 2012.

Dada a gravidade da destruição do tecido pulmonar em doentes com SDRA, os médicos geralmente concordam que a insuficiência pulmonar grave, a longo prazo, é um resultado inevitável para os seus sobreviventes. No entanto, estudos epidemiológicos recentes refutam esta ideia. Na verdade, esses estudos indicam que a função pulmonar dos sobreviventes se aproxima, no espaço de cinco anos, da normalidade. No entanto, a SDRA provoca inúmeras morbilidades nos sobreviventes.⁴³

As morbilidades cognitivas, psicológicas e físicas são as mais comuns entre os sobreviventes da SDRA. Sequelas adicionais incluem distúrbios na visão e stress familiar. Tal como observado nos sobreviventes de qualquer doença grave, as morbilidades são geralmente evidentes após o doente obter alta da Unidade de Cuidados Intensivos (UCI). Estas morbilidades tendem a ser resolvidas muito lentamente e a maioria está presente durante, pelo menos, 5 anos.⁴⁴⁻⁴⁶

Apesar destas anormalidades, alguns sobreviventes estão aptos para regressar ao trabalho num período até 2 anos após o momento da alta. No entanto, alguns destes necessitam de um período de transição.⁴³

2.1.3 Fisiopatologia

Os pulmões saudáveis regulam o movimento do fluído de forma a manter uma pequena quantidade de fluído intersticial e os alvéolos secos. Este equilíbrio é interrompido quando há lesão pulmonar, causando um excesso de fluído, tanto no interstício como nos alvéolos. As consequências incluem anormalidades nas trocas gasosas, diminuição da *compliance*, e aumento da pressão arterial pulmonar.⁴

A SDRA é uma doença de inflamação aguda que causa a rutura do endotélio pulmonar e das barreiras epiteliais. A membrana alvéolo-capilar é composta por endotélio microvascular, interstício e epitélio alveolar. As características celulares da SDRA incluem a libertação de citocinas pro-inflamatórias, a migração transepitelial excessiva de neutrófilos com consequente perda da integridade da membrana alvéolo-capilar.⁴⁷

Doentes com SDRA tendem a passar por três fases patológicas discretas (**Figura 2.1**): fase exsudativa, com inflamação aguda e infiltração de neutrófilos no espaço alveolar; fase de resolução, caracterizada por resolução do edema pulmonar, proliferação de células alveolares do tipo II^e, infiltração intersticial pelos miofibroblastos^f, bem como deposição precoce de colagénio; e, finalmente, fase fibroproliferativa, com vários graus de fibrose intersticial.⁴

^e **Células alveolares do tipo II ou pneumócitos do tipo II** - células presentes no pulmão responsáveis pela produção e secreção de surfactante. Estas células podem-se replicar nos alvéolos, substituindo as células alveolares do tipo I (ou pneumócitos do tipo I) lesadas.⁴

^f **Miofibroblasto** - célula que, no processo de diferenciação, se encontra entre um fibroblasto e uma célula de músculo liso.⁴

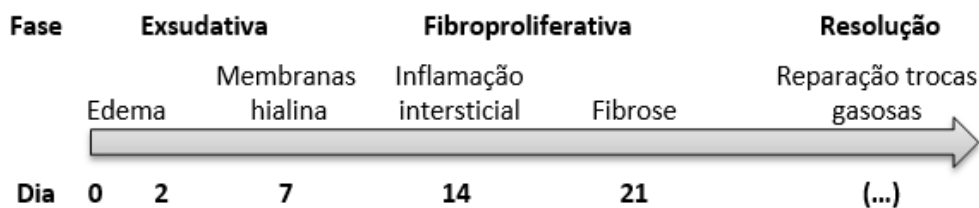


Figura 2.1 – Cronologia das várias fases no desenvolvimento da Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda. Adaptado de Bosma et al., 2010⁴⁸

Durante a fase aguda, ocorre o desprendimento das células alveolares epiteliais e bronquiais, com a formação de membranas de hialina, ricas em proteínas. Nesta fase, denominada também de fase exsudativa, ocorre migração dos neutrófilos, que se encontram aderentes ao endotélio capilar lesado, migrando do interstício para o alvéolo. No alvéolo, os macrófagos alveolares secretam citocinas, como as interleucinas (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-10 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que estimulam localmente a quimiotaxia dos neutrófilos e ativam-nos. A ativação excessiva e/ou prolongada dos mesmos contribui para a destruição da membrana basal, o que promove um aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar. Para além disso, os neutrófilos libertam uma panóplia de mediadores tóxicos, como por exemplo, espécies reativas de oxigénio e proteases, que iniciam e perpetuam a inflamação, provocando danos no endotélio capilar e no epitélio alveolar (**Figura 2.2**).⁴⁹

Com o aumento do *stress* oxidativo e da atividade da protease, a inflamação nos alvéolos e no interstício reduz a produção de surfactante, e inativa o restante, promovendo assim a atelectasia[§] generalizada. O surfactante, um complexo lipídico e proteico secretado pelas células pulmonares do tipo II, diminui a tensão de superfície alveolar na interface ar-fluído nos alvéolos, sendo crítico para a manutenção da inflação do pulmão a baixas pressões transpulmonares. Para além disso, representa um papel importante na supressão do processo inflamatório, através da captação de espécies reativas de oxigénio.⁵⁰

[§] **Atelectasia** - colapso pulmonar, o que resulta em reduzidas ou ausentes trocas gasosas.⁵⁰

Ainda, um dos mediadores dos neutrófilos melhor estudado, a elastase, parece degradar as proteínas de junção das células epiteliais, tendo ainda propriedades pro-aptóticas e efeitos citotóxicos diretos sobre o epitélio.⁵¹

Assim, o dano no endotélio capilar permite às proteínas a passagem para o espaço vascular. O gradiente oncótico que favorece a reabsorção de líquido é perdido e o líquido flui para o interstício, sobrecarregando os vasos linfáticos. O aumento de líquido no interstício, combinado com o dano no epitélio alveolar, faz com que os espaços de ar se encham de líquido rico em proteínas e sangue, e de detritos de células degeneradas.⁴

Este influxo de líquido para o pulmão e o infiltrado inflamatório causam anormalidades na difusão e na ventilação-perfusão, levando ao comprometimento das trocas gasosas, que clinicamente se manifesta como hipoxemia. Ao mesmo tempo, a infiltração celular, a atelectasia e o líquido do edema reduzem a *compliance* pulmonar. Por fim, a vasoconstrição hipoxêmica e a obliteração capilar levam ao aumento da pressão arterial pulmonar.⁴

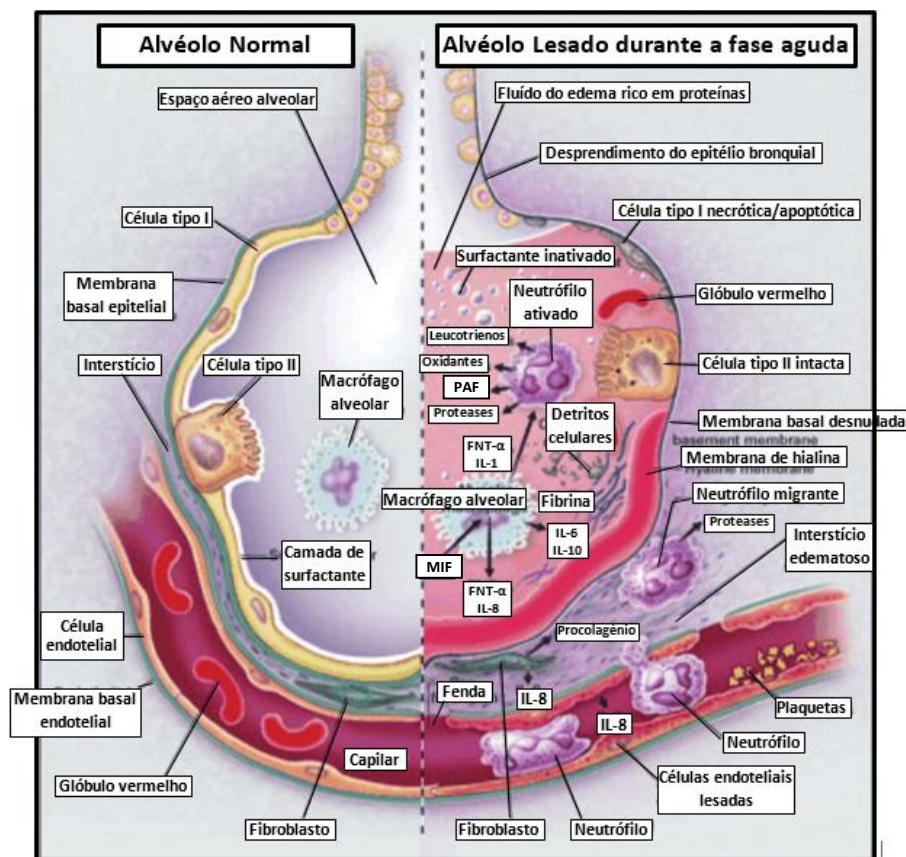


Figura 2.2 – Alvéolos normal (lado esquerdo) e lesado (lado direito) durante a fase aguda da Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda. Adaptado de Tsushima et al., 2009⁵²

O aumento da ventilação do espaço morto^h, a diminuição da *compliance* pulmonar e a hipoxémia combinam-se para aumentar consideravelmente o necessário esforço da respiração, tornando os doentes muito debilitados. Eventualmente, a exigência em oxigénio pode exceder a capacidade ventilatória, e a insuficiência respiratória hipercápnicaⁱ terá lugar se não for tratada.²⁵

Nos dias seguintes à fase aguda, a maioria dos doentes que sobrevivem a este período inicial começam a exibir uma melhor oxigenação e uma diminuição dos infiltrados alveolares. Toma lugar a fase de resolução. Durante esta fase, a quantidade de suporte ventilatório pode ser reduzido, iniciando o desmame. Porém, alguns doentes passam ainda por uma fase fibroproliferativa, onde é observada a persistência e a progressão da lesão, com inúmeras consequências (**Figura 2.3**). No entanto, é desconhecida a razão da maioria dos sobreviventes resolver rapidamente a inflamação aguda, enquanto alguns progridem para a fase crónica.²⁵

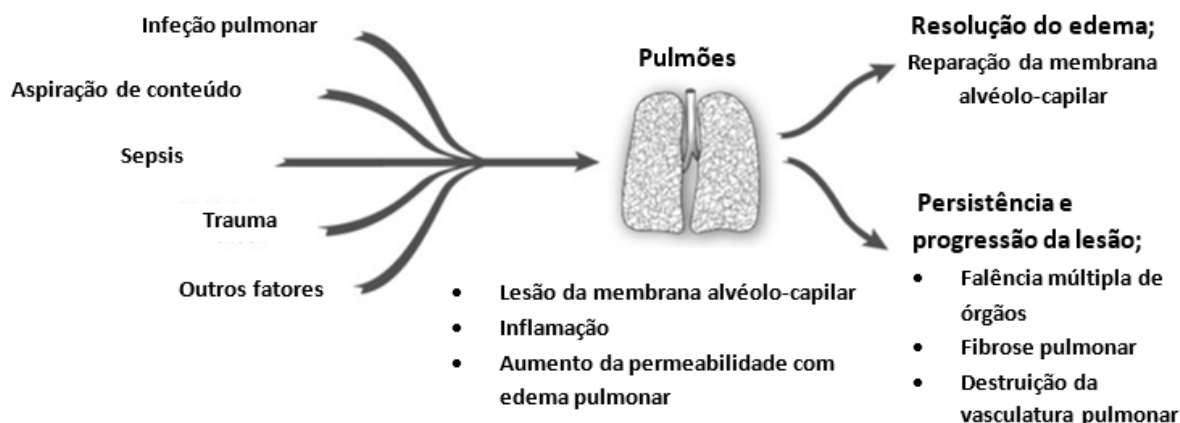


Figura 2.3 – História natural da Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda. Adaptado de Johnson et al., 2010⁴

Para aqueles que progridem para a fase fibroproliferativa, a inflamação crónica, a fibrose e a neovascularização tomam lugar, observando-se clinicamente uma hipoxémia persistente e grave. Infelizmente, esta fase não tem características específicas, levando o

^h **Espaço morto** - ar que é inalado pelo corpo durante a respiração, mas que não participa nas trocas gasosas. Esta situação pode ser devida a um aumento na ventilação ou a uma diminuição da perfusão sanguínea.²⁵

ⁱ **Insuficiência respiratória hipercápnica** - tipo de insuficiência respiratória em que ocorre diminuição da ventilação e, consequentemente, hipercapnia (aumento de CO₂ no sangue arterial).²⁵

clínico a dispende muito tempo na distinção do período exsudativo e do período fibroproliferativo. No entanto, radiograficamente, esta fase fibroproliferativa é caracterizada pela progressão da opacificação do espaço aéreo para um padrão reticular mais grave de infiltração pulmonar.²⁵

Os pulmões dos doentes que sobrevivem a esta fase fibroproliferativa entram numa fase subsequente de resolução e reparação, onde a função cardiopulmonar geralmente regressa à normalidade após 6 meses ou mais da lesão pulmonar inicial. A resolução da SDRA é primariamente dependente de uma reparação atempada e ordenada das trocas gasosas alveolares. De forma a otimizar as trocas gasosas, o transporte de fluído alveolar deve ser regulado, de forma a limpar o espaço das vias aéreas de fluído do edema, e a restaurar a secreção normal das células alveolares do tipo II.⁴

Reconhece-se que a resolução da lesão pulmonar não é simplesmente o alívio dos agentes ou fatores prejudiciais, mas também um programa ativamente regulado que envolve a remoção dos neutrófilos apoptóticos, a remodelação da matriz, a resolução do fluído alveolar rico em proteínas e o envolvimento de inúmeras vias de sinalização distintas intervenientes na lesão aguda (**Figura 2.4**).⁵²

O edema pulmonar, constituído por uma solução aquosa de sais e proteínas do plasma, é resolvido pela reabsorção do líquido do edema rico em proteínas. O sódio é absorvido pelo canal de sódio epitelial e através da membrana basolateral das células do tipo II, pela bomba ATPase Na^+/K^+ . As vias de transporte do cloreto não são claras. A água move-se principalmente através dos canais de água, as aquaporinas, localizadas maioritariamente nas células do tipo I. A água pode também ser transportada por uma via paracelular^j. As proteínas solúveis parecem ser removidas pela difusão entre as células epiteliais alveolares, enquanto as proteínas insolúveis parecem ser removidas por endocitose e transcitose, pelas células epiteliais alveolares, e fagocitose pelos macrófagos alveolares.⁵²

Para a resolução da SDRA contribui ainda a proliferação das células epiteliais alveolares do tipo II, o que permite cobrir a membrana basal lesada, e a sua diferenciação nas células epiteliais alveolares do tipo I. Para além disso, a apoptose dos neutrófilos é

^j **Transporte paracelular** - transporte que ocorre através dos espaços de junção entre as células.⁵²

A intervenção baseada na interrupção das vias identificadas na fase aguda tem sido eficaz em modelos animais quando é fornecido pré-tratamento. No entanto, a exigência de um tratamento antecipado, juntamente com a complexidade fisiopatológica da SDRA, tem nitidamente limitado a sua utilidade clínica.⁵³

2.1.4 Tratamento

A SDRA ainda não dispõe de uma terapêutica específica e universal. O principal objetivo consiste no tratamento da causa subjacente à síndrome, na prevenção do desenvolvimento de complicações iatrogênicas, bem como na manutenção de níveis de oxigenação apropriados.²⁵

Desde que a SDRA foi descrita pela primeira vez, em 1967, têm havido progressos significativos na compreensão da sua fisiopatologia, bem como no seu tratamento. Inúmeras abordagens terapêuticas foram aplicadas, na tentativa de melhorar os resultados clínicos. A taxa de mortalidade foi reduzida substancialmente nas últimas décadas, o que se deveu principalmente a avanços importantes nos cuidados de suporte, particularmente numa melhor estratégia de ventilação.^{31,50}

Potenciais terapias estão sendo avaliadas na tentativa de melhorar os resultados clínicos da síndrome. Porém, nenhuma delas está atualmente recomendada como terapia de rotina.⁵⁴

De seguida, são explicitadas as principais abordagens terapêuticas da SDRA.

2.1.4.1 Ventilação mecânica

A ventilação mecânica continua a ser a principal modalidade de suporte na SDRA, sendo indicada na maioria dos casos.⁴⁸ Uma estratégia de ventilação mecânica ótima em doentes com SDRA tem sido, no entanto, um dos assuntos mais controversos na gestão da doença, desde que a síndrome foi descrita pela primeira vez.⁵⁰

Sabe-se que a correção da hipoxémia é essencial para a gestão da SDRA, sendo que a maioria dos doentes com SDRA avançada necessitam de suporte ventilatório mecânico.¹

No entanto, há evidências de estudos experimentais e clínicos que demonstram que a ventilação mecânica pode agravar as alterações funcionais e estruturais do pulmão. É de notar que a ventilação mecânica não só perpetua a lesão pulmonar, como também contribui para a morbidade e mortalidade da SDRA.⁵⁵ Porém, estudos observacionais sugerem benefícios na utilização de uma estratégia de ventilação de baixo volume corrente. Num estudo que seguiu 861 doentes com SDRA, randomizados em 2 grupos (um recebendo 12mL/kg de volume corrente, e outro recebendo 6mL/kg de volume corrente), foi demonstrada uma redução na mortalidade em 22% no grupo que recebeu um baixo volume corrente.⁵⁶

A explicação para estes resultados reside no fato de que, para estados de baixa distensibilidade pulmonar, a introdução de um volume corrente elevado ou moderado pode provocar distensão exagerada dos alvéolos, designada de volutrauma.²⁵

Além da distensão pulmonar, causada por grandes volumes correntes (volutrauma), os ciclos de abertura e fecho das pequenas vias aéreas e unidades alveolares (atelectrauma) também podem originar lesão pulmonar.⁵⁷ Diversos ensaios clínicos foram realizados em doentes com SDRA para examinar os efeitos de uma abordagem de “pulmão aberto”, no qual a aplicação de manobras de recrutamento alveolar^k, como a aplicação de altos níveis de PEEP, podem limitar o atelectrauma.⁵⁴

A função da PEEP é exatamente evitar que os alvéolos com menor distensibilidade colapsem no final de cada expiração. Ao recrutar os alvéolos em atelectasia, a PEEP acaba por promover uma correta oxigenação dos pulmões danificados.²⁵

No entanto, uma meta-análise recente que incorporou ensaios de 1996 a 2010, comparando altos níveis de PEEP com baixos níveis de PEEP, concluiu que não existe diferença na mortalidade entre as duas estratégias em doentes com SDRA leve. No entanto, no subgrupo de doentes com SDRA grave, foi demonstrado um benefício na aplicação de níveis mais elevados de PEEP.⁵⁸

Assim, a aplicação de PEEP em doentes com SDRA não é atualmente recomendada, pelo menos para doentes com SDRA leve ou moderada.

^k **Manobras de recrutamento alveolar** - estratégias voluntárias para aumentar transitoriamente a pressão transpulmonar, com o objetivo de reabrir as unidades alveolares mal gaseificadas (re-expansão do tecido pulmonar colapsado).⁵⁴

2.1.4.2 Posição de decúbito ventral

A posição de decúbito ventral tem sido reconhecida como forma de melhorar a oxigenação numa fração significativa de doentes com SDRA. Como os infiltrados pulmonares são característicos das regiões dependentes da gravidade, crê-se que esta estratégia redistribui a circulação sanguínea e a ventilação para as áreas pulmonares menos afetadas. Desta forma, a posição de decúbito ventral promove uma limpeza das secreções e troca o peso do conteúdo do tórax para que este auxilie no recrutamento das regiões com atelectasia.²⁵

Outros autores propõem o aumento do volume pulmonar no final da expiração, a melhoria da relação ventilação-perfusão e a distribuição mais uniforme do *stress* pulmonar como mecanismos benéficos desta estratégia. Porém, independentemente do mecanismo, uma melhoria da oxigenação ocorre na maioria dos doentes quando se aplica esta intervenção.¹

A simplicidade e o baixo custo desta estratégia tornaram esta opção bastante popular. No entanto, apesar da melhoria na oxigenação arterial, a posição de decúbito ventral não demonstrou uma melhoria significativa na mortalidade. Para além disso, é uma técnica que traz vários potenciais riscos, como é exemplo o deslocamento do tubo de ventilação com as manobras de rotação.^{59,60}

2.1.4.3 Estratégia conservadora de fluído

Ao longo da última década, vários tratamentos não ventilatórios foram investigados na tentativa de melhorar ainda mais os resultados clínicos de doentes com SDRA, em particular, as taxas de mortalidade.⁵⁴

Em termos de gestão de fluídos, a abordagem conservadora consiste na restrição da ingestão de fluídos e no aumento do débito urinário, numa tentativa de diminuir o edema pulmonar e encurtar a duração da ventilação mecânica. Neste sentido, fármacos diuréticos, como a furosemida, têm sido amplamente testados.⁵²

Apesar da estratégia conservadora de fluídos permitir uma melhoria da função pulmonar, um maior número de dias livres de ventilação mecânica e um menor tempo de permanência em UCI, não há diferença significativa na mortalidade em 60 dias.¹⁵

Desta forma, a estratégia conservadora de fluído é uma opção terapêutica a ser considerada no tratamento de doentes com SDRA.

2.1.4.4 Reposição de surfactante

A ideia de utilizar surfactante exógeno como terapia em doentes com SDRA é baseada numa série de observações. O objetivo principal do surfactante endógeno é o de evitar a atelectasia, sendo que esta é o principal contributo para a hipoxémia e para a propagação da lesão pulmonar.⁴ Depois, muitas anormalidades no surfactante têm sido descritas em doentes com SDRA, tanto na composição como na função, podendo ser exacerbadas pela ventilação mecânica.^{61,62} Desta forma, o objetivo da terapia com surfactante exógeno é o de atenuar ou eliminar a atelectasia causada pelo insuficiente ou anormal surfactante endógeno, administrando surfactante funcional.

A terapia de reposição de surfactante tem demonstrado ser benéfica na Síndrome de Dificuldade Respiratória do Recém-nascido, uma doença causada pela deficiência na produção de surfactante pelo pulmão imaturo. No entanto, na SDRA, as anormalidades de surfactante são mais complexas. Além da diminuição da produção de surfactante, outros fatores contribuem para a baixa função de surfactante: alterações na composição fosfolipídica, inibição da função do surfactante por proteínas plasmáticas, radicais de oxigénio e proteases, etc.⁵⁰

Apesar de não haver evidência de que a administração de surfactante melhore a mortalidade em doentes com SDRA, vários estudos têm documentado uma melhoria na função pulmonar após a administração de surfactante endobronquial. Casos recentes demonstraram que a administração de surfactante sintético, porcino ou bovino nos pulmões de doentes com SDRA grave, resultaram numa melhoria sustentada da oxigenação.⁵⁰

Esta inconsistência nos resultados observados até à data pode refletir diferenças na formulação do surfactante, na população em estudo, no método de administração do surfactante, na dose, na estratégia de ventilação concomitante, ou na inativação do surfactante quando administrado.^{62,63}

Assim, até que estejam disponíveis mais estudos sobre a utilização desta estratégia terapêutica, a utilização da terapia de reposição de surfactante em doentes com SDRA não é utilizada nem recomendada.⁵⁰

2.1.4.5 Vasodilatadores inalados

Conforme supracitado, a fisiopatologia da SDRA compreende alterações na vasodilatação que comprometem a função pulmonar. A má distribuição do fluxo sanguíneo no pulmão lesado resulta num *shunt*¹ intrapulmonar da direita para a esquerda, hipertensão pulmonar e hipoxemia grave.⁶⁴

Os vasodilatadores constituem a classe de fármacos com resultados mais promissores no tratamento da hipoxemia e da hipertensão pulmonar. Estes fármacos, quando inalados, promovem uma vasodilatação da vasculatura pulmonar nas regiões ventiladas, com diminuição da pressão das artérias pulmonares, uma diminuição do *shunt* da direita para a esquerda, e um aumento na relação PaO_2/FiO_2 , conforme representado na **Figura 2.5**.⁵⁰ Para além disso, estes efeitos benéficos dos vasodilatadores inalados não têm sido associados a efeitos colaterais sistêmicos.¹

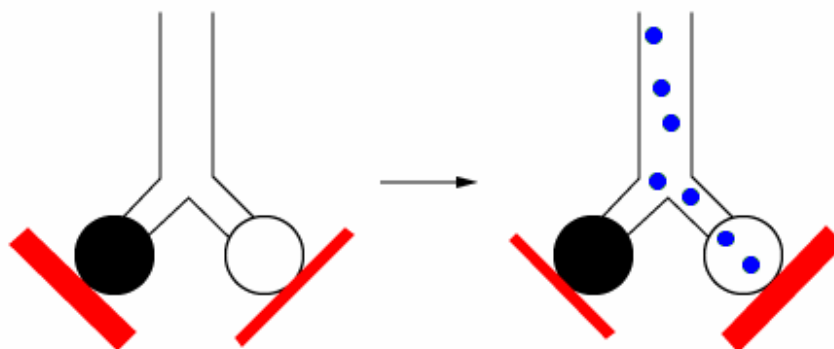


Figura 2.5 – Efeito dos vasodilatadores inalados.

Os vasodilatadores inalados (círculos azuis) dilatam preferencialmente os vasos pulmonares que irrigam os alvéolos funcionantes (círculos brancos), recrutando o sangue dos alvéolos menos ventilados (círculos pretos), aumentando desta forma a razão ventilação/perfusão. Adaptado de Bosma et al., 2010⁴⁸

¹ *Shunt* - condição fisiopatológica que ocorre geralmente quando os alvéolos se enchem de líquido, resultando em áreas onde a perfusão sanguínea excede a ventilação, não havendo uma correta oxigenação do sangue venoso.⁶⁴

Porém, a administração sistêmica de vasodilatadores, incluindo as prostaglandinas e o sildenafil, não demonstram benefício terapêutico na SDRA, sendo frequentemente associados a um agravamento nos índices de oxigenação.^{65,66}

Os dois tipos de vasodilatadores inalados mais frequentemente investigados são o monóxido de azoto e as prostaciclina.

2.1.4.5.1 Monóxido de azoto

O monóxido de azoto inalado pelos seus efeitos vasodilatadores pulmonares, tem sido proposto como terapêutica da hipoxemia refratária, restabelecendo uma correspondência de ventilação-perfusão adequada.⁵⁴

Este fármaco é um vasodilatador endógeno potente que pode ser direcionado para a vasculatura pulmonar através da inalação. Ele é produzido pelas células epiteliais alveolares, pelos macrófagos alveolares, e pelas células endoteliais pulmonares, sendo inativado em contacto com a hemoglobina.⁶⁷ Por esse motivo, provoca vasodilatação seletiva da vasculatura pulmonar nas regiões ventiladas, sem causar efeitos sistêmicos.⁶⁶ Estas propriedades fisiológicas do monóxido de azoto parecem ser ideais para a sua potencial utilização como um agente terapêutico na SDRA.

Os últimos estudos indicaram que o monóxido de azoto inalado melhora a oxigenação durante um período de 24 horas de tratamento. No entanto, nenhum benefício foi demonstrado sobre a redução da mortalidade, a diminuição da duração da ventilação mecânica, e o aumento do número de dias livres sem ventilação. Além disso, a administração deste fármaco tem sido associada a efeitos nefrotóxicos que limitam a sua utilização em doentes com SDRA grave e hipertensão pulmonar.⁶⁸

Assim sendo, a inalação de monóxido de azoto não tem sido uma terapia rotineira em doentes com SDRA. A sua utilização apenas poderá ser considerada como terapia de resgate para a hipoxemia refratária em casos individuais.⁵²

2.1.4.5.2 Prostaciclina

As prostaglandinas são derivados do ácido araquidónico produzidos endogenamente, que causam vasodilatação, inibem a agregação plaquetária, e têm propriedades anti-inflamatórias via inibição da ativação dos neutrófilos e dos macrófagos. As prostaciclina, um tipo de prostaglandinas, causam vasodilatação pulmonar seletiva, melhorando assim a relação ventilação/perfusão e a oxigenação, tal como o monóxido de azoto. Para além disso, estas podem também diminuir a pressão da artéria pulmonar através das suas propriedades antitrombóticas, prevenindo a obstrução da microcirculação pulmonar.⁵⁰

Atualmente, em Portugal, apenas o Iloprost, um análogo da prostaciclina, se encontra disponível no mercado para inalação, não havendo qualquer registo de prostaciclina para inalação.⁶⁹

A principal vantagem da utilização de prostaciclina inalada comparativamente à utilização de monóxido de azoto prende-se com o facto de não ser necessário equipamento sofisticado para a sua administração. Estudos clínicos com prostaciclina inalada sugerem que os seus efeitos adversos não são tão frequentes.⁷⁰ Estudos preliminares com iloprost inalado, um análogo da prostaciclina, em doentes com SDRA e hipertensão pulmonar, mostraram melhorias na oxigenação sem efeitos adversos na mecânica pulmonar ou hemodinâmica sistémica.⁷¹

No entanto, tal como acontece com o monóxido de azoto, não existe evidência de que as prostaciclina inalada possam melhorar as taxas de mortalidade de doentes com SDRA. Porém, podem ser usadas como alternativa mais económica ao monóxido de azoto inalado, no tratamento da hipoxémia refratária em doentes com SDRA grave.¹

Assim, com base nos estudos publicados até à data, a utilização de vasodilatadores inalados deve ser considerada apenas como uma terapia de resgate para doentes com hipoxémia refratária e/ou com hipertensão pulmonar, onde outras intervenções têm sido infrutíferas.¹

2.1.4.6 Glucocorticoides

O facto da lesão pulmonar aguda nos doentes com SDRA resultar de um processo inflamatório agressivo, fez com que os fármacos anti-inflamatórios fossem considerados terapêuticas lógicas para esta patologia, como por exemplo os corticosteroides.⁵²

O possível benefício clínico da administração de glucocorticoides na gestão da SDRA tem sido algo controverso. Os glucocorticoides sistémicos claramente desempenham um papel importante em situações em que a síndrome é precipitada por um processo de resposta esteroide (como por exemplo, a pneumonia aguda eosinofílica).⁷²

Os glucocorticoides podem reduzir a inflamação e a fibrose através da inibição da ação de várias citocinas, incluindo as IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, o TNF- α , e o fator de estimulação da colónia de granulócitos e macrófagos. Além da sua ação sobre as citocinas, os glucocorticoides podem, também, aumentar a degradação do colagénio tipo I e prevenir a sua excessiva deposição. Dadas as suas propriedades anti-inflamatórias e antifibróticas, os glucocorticosteroides pareciam ser os candidatos ideais na terapêutica das fases exsudativa e fibroproliferativa da SDRA.⁵⁰

No entanto, apesar dos glucocorticoides reduzirem a inflamação sistémica, promovendo uma melhoria significativa na disfunção orgânica pulmonar e extrapulmonar, bem como uma redução na duração da ventilação mecânica e no tempo de internamento nas UCI, a sua utilização não parece reduzir a taxa de mortalidade em doentes com SDRA.^{73,74}

Esta incerteza nos efeitos dos glucocorticoides sobre a mortalidade é exemplificada através de três estudos que comparam a terapia sistémica de glucocorticoides com placebo em doentes com SDRA. Um estudo concluiu que a terapia glucocorticoide reduz a mortalidade.⁷⁵ No entanto, os outros dois reportaram uma redução na mortalidade que não foi estatisticamente significativa.^{76,77}

Para além disso, tem sido sugerido que os efeitos dos glucocorticoides sistémicos variam de acordo com o momento em que são administrados. Diversos estudos avaliaram o impacto dos glucocorticoides sistémicos durante a SDRA persistente, isto é, durante a fase fibroproliferativa. O mais notável foi um estudo duplamente cego, que dividiu os 180 doentes seguidos em grupos onde foi administrado metilprednisolona ou placebo, durante 21 dias. O grupo submetido a tratamento com metilprednisolona foi subdividido em 2

grupos: no subgrupo que iniciou o tratamento entre os 7 e os 13 dias após o começo da SDRA, observou-se uma redução da mortalidade estatisticamente não significativa; no subgrupo que iniciou o tratamento 14 dias ou mais após o começo da síndrome, observou-se um aumento da mortalidade. A metilprednisolona aumentou os dias livres de ventilação, melhorou a *compliance* pulmonar e a pressão arterial, mas também aumentou a fraqueza neuromuscular.⁷⁴

Outros estudos abordaram a possibilidade dos glucocorticoides sistêmicos poderem ser efetivos precocemente na SDRA (≤ 72 horas). Num estudo duplamente cego, os 91 doentes seguidos foram divididos em dois grupos: um submetido a tratamento com metilprednisolona e outro submetido a placebo, numa razão de 2:1, respetivamente. No grupo submetido a tratamento, observou-se uma redução na duração da ventilação mecânica, no tempo de permanência em UCI e na mortalidade, apesar da amostra ser bastante pequena.⁷³

Juntos, estes dados sugerem que a terapia com glucocorticoides sistêmicos não deve ser iniciada mais do que 14 dias após o começo da SDRA. O impacto da administração de glucocorticoides numa fase inicial permanece incerto, pelo que são necessários mais estudos de forma a inferir sobre o benefício clínico da utilização desta classe de fármacos no tratamento da SDRA.

2.1.4.7 Agonistas adrenérgicos β_2

Pelo facto da *clearance* do fluído alveolar se encontrar diminuída em doentes com SDRA, os ensaios clínicos recentes têm testado a administração de agonistas beta como uma intervenção farmacológica nesta síndrome.

Os agonistas adrenérgicos β_2 têm demonstrado acelerar a *clearance* do fluído, através do aumento do transporte de sódio e de cloreto transepitelial. Além da sobre-regulação do transporte destes iões, os agonistas β_2 podem reduzir o edema pulmonar através da redução da permeabilidade do endotélio pulmonar e podem ter um efeito anti-inflamatório através da diminuição da libertação de citocinas pro-inflamatórias.⁷⁸ Por exemplo, um estudo randomizado que comparou a administração intravenosa de salbutamol com placebo, em 40 doentes, concluiu que a administração intravenosa de

salbutamol foi associada a uma menor quantidade de líquido no pulmão e a uma menor pressão pulmonar.⁷⁹

No entanto, um estudo recente realizado por Gao Smith *et al.*, 2012, em 46 UCI no Reino Unido, mostrou que a administração de salbutamol intravenoso é prejudicial para os doentes com SDRA inicial e grave. Na verdade, doentes tratados com salbutamol na dose de 15mg/kg de peso corporal apresentaram uma maior mortalidade em 28 dias e menos dias livres de ventilação mecânica, bem como de falência multiorgânica, em comparação com o grupo placebo. A razão destes resultados desfavoráveis parece estar relacionada com a maior incidência de efeitos secundários, como taquicardia, arritmias e acidose láctica.⁸⁰

Apesar destes estudos indicarem que os beta agonistas não apresentam um efeito benéfico direto na SDRA, eles podem, no entanto, ser agentes eficazes no tratamento do broncospasma em doentes com SDRA.⁵⁴

2.1.4.8 Agentes bloqueadores neuromusculares

Os agentes bloqueadores neuromusculares são frequentemente utilizados em doentes com SDRA de forma a facilitar a sincronia doente-ventilador e melhorar a oxigenação quando a sedação tradicional não é adequada. Estes efeitos parecem limitar a sobredistensão regional (volutrauma) e o colapso alveolar cíclico (atelectrauma), bem como o metabolismo e a exigência ventilatória geral. Para estas condições, estes agentes são frequentemente eficazes.¹

Em doentes com SDRA grave, a administração durante 48 horas de cisatracúrio (um agente bloqueador muscular) melhorou a oxigenação, bem como diminuiu a duração da ventilação mecânica, sem aumentar a fraqueza muscular.⁸¹ Além disso, os agentes bloqueadores neuromusculares têm demonstrado reduzir os níveis de mediadores pró-inflamatórios pulmonares e sistémicos.⁵⁴

No entanto, tendo em conta os efeitos colaterais destes medicamentos, a compreensão do perfil de risco/benefício desses medicamentos no tratamento de doentes com SDRA é especialmente importante. De uma forma geral, a utilização de agentes bloqueadores neuromusculares deve ser limitada aos doentes hipoxémicos graves por um curto período de tempo.⁵⁴

2.1.4.9 Outros

Para além das terapêuticas supracitadas, um número vasto de potenciais abordagens no tratamento da SDRA foram consideradas como promissoras. No entanto, estas abordagens revelaram ser ineficazes ou mesmo, nalguns casos, prejudiciais. Estas incluem:

- Estatinas ⁸²
- Antibióticos macrólidos ⁸³
- Cetoconazol ⁸⁴
- Procisteína e N-acetilcisteína ⁸⁵
- Glutamina ⁸⁶
- Preparações antioxidantes ⁸⁶
- Lisofilina ⁸⁷
- Ibuprofeno ⁸⁸

Na última década, muitos mecanismos moleculares foram descobertos, aumentando em muito o conhecimento e a compreensão da patogénese da SDRA. No entanto, nenhum destes novos avanços foi traduzido em terapias eficazes de benefício clínico significativo para os doentes com SDRA.⁵⁴

Atualmente, não há nenhuma intervenção farmacológica que possa ser recomendada para a terapia padrão da SDRA. Porém, começam agora a surgir algumas terapias promissoras que podem, eventualmente, ser aplicadas na SDRA, incluindo a aplicação das células estaminais.⁵⁰

3. Capítulo 3

3.1 Célula estaminais

A biologia das células estaminais constitui, atualmente, uma das áreas de maior interesse na investigação biomédica. Este interesse é suportado pela crescente aplicação desta tecnologia na medicina regenerativa. No entanto, tal como acontece com muitas tecnologias pioneiras, há ainda muito para ser testado e provado, de forma a que se possa inferir sobre a viabilidade desta tecnologia no tratamento de certas doenças, incluindo a SDRA.⁸⁹

Os avanços no conhecimento acerca das células estaminais mudaram fundamentalmente a maneira como vemos a biologia e a fisiologia humanas. Nos últimos anos, tornou-se claro, não só que o nosso corpo é mais plástico do que se pensava, mas também que o número e o tipo de células estaminais que desempenham um papel na produção e regeneração de tecidos humanos excedem em muito as expectativas originais.⁹⁰

As células estaminais são células primitivas que são consideradas as progenitoras de mais de duzentos tipos de células presentes num organismo adulto. Todas as células estaminais são células não especializadas (indiferenciadas) que pertencem à mesma linhagem. Elas mantêm a capacidade de se dividir ao longo da vida, dando origem a células que se podem tornar altamente especializadas, ocupando o lugar das células que vão morrendo ou que vão sendo perdidas.⁹¹ Ou seja, as células estaminais são células não desenvolvidas capazes de se proliferarem, autorrenovarem, diferenciarem, e regenerarem tecidos.⁹²

A fim de caracterizar as células estaminais, primeiramente temos que as identificar. Marcadores para diferentes populações de células estaminais foram já elucidados, mas existem ainda populações mal caracterizadas.⁹⁰

Existem diferentes tipos de células estaminais, que podem ser melhor descritos no contexto do desenvolvimento humano normal. A mais primitiva das células é o ovo fertilizado. Esta célula é considerada totipotente, o que significa que tem o potencial para desenvolver um embrião completo, isto é, para formar qualquer tipo de célula, incluindo as células do tecido extraembrionário. Esta propriedade é, no entanto, efémera. À medida que o ovo fertilizado se divide, as células no embrião permanecem totipotentes até que o ovo fertilizado atinja o estágio de 4 a 8 células.⁹³

Aproximadamente cinco dias após a fertilização, as células totipotentes já se diferenciaram e começa-se a formar uma esfera oca de células, a que se chama de blastocisto. O blastocisto apresenta-se como uma camada externa de células, contendo no centro um aglomerado de células chamado de "massa celular interna". Algumas das células da massa celular interna vão desenvolver o feto, ao passo que as restantes irão formar a placenta e outros tecidos necessários ao desenvolvimento do feto no útero. As células que irão dar origem ao feto são consideradas células pluripotentes, uma vez que podem formar qualquer tipo de célula no corpo. No entanto, por si só elas não são capazes de formar um organismo inteiro, uma vez que não possuem a capacidade de originar tecidos extraembrionários essenciais para o desenvolvimento normal do feto no útero, como por exemplo a placenta (**Figura 3.1**).⁹⁴

As células estaminais pluripotentes diferenciam-se em células comumente designadas de células estaminais multipotentes. Estas células estaminais limitam-se a determinadas linhagens celulares. Um exemplo de uma célula multipotente é uma célula hematopoiética, que pode originar diversos tipos de células sanguíneas. As células estaminais multipotentes estão presentes no indivíduo adulto, bem como no feto e no cordão umbilical.⁹⁴

Por fim, as células unipotentes apenas se diferenciam numa única linhagem de células, sendo encontradas em diferentes tecidos corporais. A sua função, essencialmente, é a de atuar como reservatório de células nos diferentes tecidos onde elas se encontram.⁹⁵

Na **Figura 3.1** que se segue encontram-se representados, em diagrama, a potência e o respetivo potencial de diferenciação dos vários tipos de células estaminais.

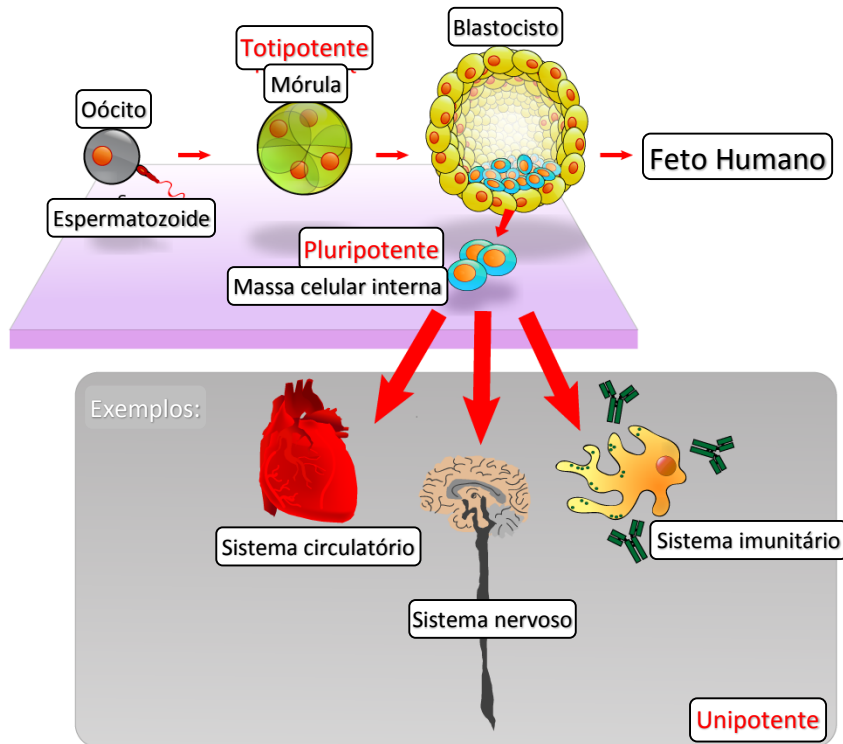


Figura 3.1 – Representação da potencialidade das células estaminais. Adaptado de Jones et al., 2006 ⁹⁶

Assim, tendo em conta o seu estado de desenvolvimento, é possível distinguir, no geral, dois tipos de células estaminais: as células estaminais embrionárias (CEE) e as células estaminais adultas.⁹⁷ Enquanto as CEE são consideradas pluripotentes, tendo a capacidade para se diferenciarem em quase todas as células das três camadas germinais, as células estaminais adultas são consideradas multipotentes, tendo a capacidade para se diferenciarem numa gama limitada de linhagens de células, adequadas à sua localização.^{92,98}

3.1.1 Células estaminais embrionárias

As CEE são células pluripotentes obtidas a partir da massa celular interna do blastocisto, que se forma vários dias após o óvulo ser fertilizado (**Figura 3.2**).^{92,99} A fim de se obterem linhas de CEE, a massa celular interna do blastocisto é cultivada sob condições apropriadas.^{99,100}

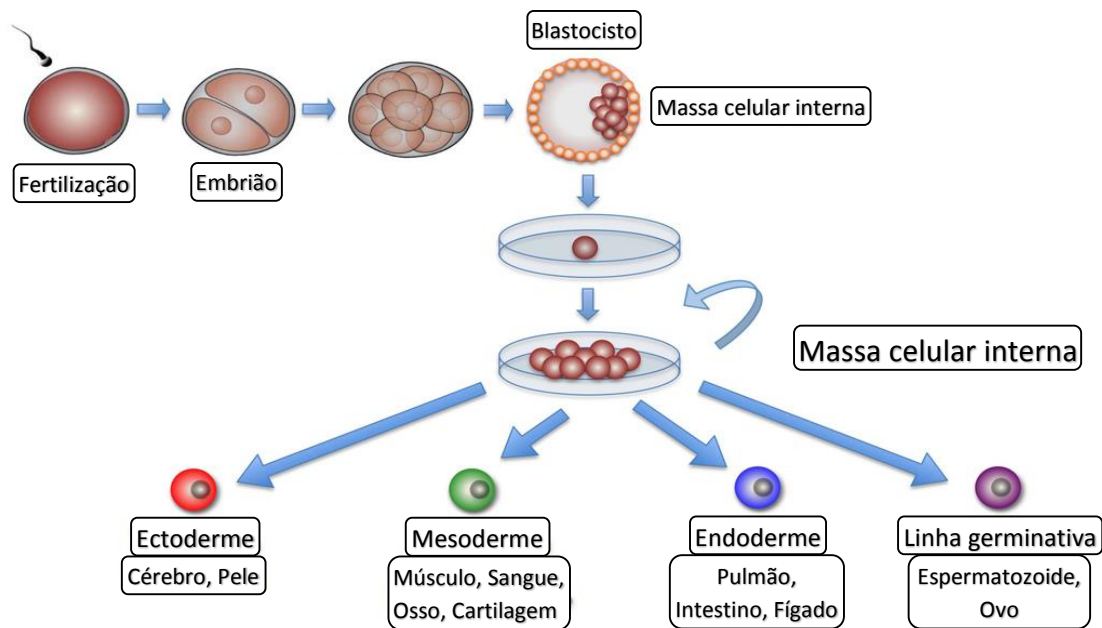


Figura 3.2 – Ilustração da obtenção de células estaminais embrionárias e da sua respetiva potencialidade.

A fertilização de um óvulo com um espermatozoide, leva à formação do blastocisto, a partir do qual a massa celular interna é removida para criar uma linha de células estaminais embrionárias. Estas são células pluripotentes que se irão diferenciar, sob condições apropriadas de cultivo, nas três camadas germinativas (ectoderme, mesoderme ou endoderme) ou na linha germinativa. Adaptado de Yabut et al., 2011¹⁰¹

As CEE são consideradas o tipo de célula estaminal prototípica, representando uma fonte potencial de células com uma capacidade praticamente ilimitada de autorrenovação e diferenciação. Capazes de originar todas as células somáticas e germinativas do organismo completamente desenvolvido, estas células são as responsáveis por originar as três camadas germinativas embrionárias (a ectoderme, a endoderme e a mesoderme), mesmo após serem cultivadas durante longos períodos de tempo. Por outras palavras, as CEE podem dar origem a mais de 220 tipos de células de

um organismo adulto, quando é administrada a estimulação necessária e suficiente para um tipo específico de célula.^{89,91,92,99,102} Desta forma, as CEE constituem um modelo valioso para estudar os mecanismos que regulam a diferenciação.⁹⁴

As CEE humanas têm um tempo de duplicação da população de cerca de 36 horas, podendo ser mantidas em cultura como células indiferenciadas ou ser induzidas a diferenciarem-se em diferentes linhagens.^{91,94} Estas células são rotineiramente cultivadas em muitos laboratórios, existindo já muitos protocolos de diferenciação para gerar uma grande variedade de tipos de células a partir destas.¹⁰³

As linhagens de CEE humanas também podem, teoricamente, ser derivadas de uma forma não fisiológica através de um processo chamado "transferência nuclear", também conhecido como clonagem terapêutica. Isto requer a transferência do núcleo de uma célula somática do doador, como por exemplo, uma célula da pele, para o interior do citoplasma de um ovo não nucleado. Existem fatores no citoplasma desta célula híbrida que irão permitir a sua diferenciação num blastocisto. A linhagem de CEE obtidas por este método terá o mesmo ADN nuclear que o doador pelo que, células derivadas desta linhagem, em princípio, não serão rejeitadas quando transplantadas para o doador.⁹²

Várias vantagens têm sido associadas às CEE, em comparação com as células estaminais adultas, tais como: uma melhor integração das células com o recetor do tecido alvo; uma capacidade de divisão após a implantação, minimizando assim o número de células a ser transplantadas; uma facilidade de extração e produção altamente rentável em laboratório; uma capacidade para gerar uma ou mais células somáticas adultas.⁹⁸

As CEE são mais fáceis de multiplicar e manipular *in vitro* do que as células estaminais adultas ou somáticas. Muitos estudos têm demonstrado o seu sucesso na obtenção de várias células, incluindo cardiomiócitos, hepatócitos, células beta do pâncreas, células vermelhas do sangue, células das vias aéreas e células epiteliais alveolares. Assim, estas células têm sido descritas como terapia potencial para algumas doenças incuráveis, tais como a doença de Parkinson, doenças degenerativas e o enfarte do miocárdio.⁹⁸

Apesar das perspetivas iniciais, as CEE têm sido recebidas com um misto de entusiasmo e desconfiança. A sua utilização na investigação médica tem atraído a atenção de muitos setores da população. Questões religiosas, históricas, culturais, médicas e

outras, contribuíram para um discurso muito vigoroso e abrangente sobre o uso desta terapia. Algumas pessoas consideram que a investigação com CEE humanas é imoral, uma vez que acreditam que a vida começa com a fecundação do óvulo, sendo que a destruição de um embrião com a potencialidade de formar um ser humano viável é entendido como um infanticídio.^{89,93}

Para além das questões éticas associadas à utilização de embriões humanos, o facto destes constituírem uma fonte de CEE muito limitada, faz com que a aplicação em grande escala deste tipo de células para potenciais tratamentos seja impedida. Para além disso, a rejeição imunológica e os potenciais riscos de contaminação são aspetos a ter em consideração. Uma outra desvantagem das CEE é a sua capacidade proliferativa ilimitada, o que pode levar à formação de tumores após o seu transplante, designados por teratomas.¹⁰⁴ Até agora, o potencial de formação de teratomas das CEE tem sido uma limitação para a aplicação de terapias baseadas neste tipo de células. Nos últimos anos, inúmeros artigos têm demonstrado a formação de tumores em animais tratados com células diferenciadas derivadas de CEE. No entanto, há também cada vez mais publicações que apresentam estratégias de purificação das células derivadas de CEE, de forma a eliminar as células com maior predisposição para originar teratomas.⁹⁷ Para além disso, o local de transplante e o número de células transplantadas tem que ser tido em consideração. Por exemplo, Koch *et al.*, 2006, demonstrou que, para se observar a formação de tumores, é necessária a administração de pelo menos 1×10^5 células.¹⁰⁵

Assim, espera-se que vá levar ainda alguns anos até que as CEE possam entrar em ensaios clínicos em grande escala, uma vez que continua a existir uma série de obstáculos a ser ultrapassados. Em primeiro lugar, é necessário estabelecer as condições de cultura das CEE na ausência de soro ou de outros fatores de origem animal. Isto porque há um risco de transmissão de agentes causadores de doenças dos animais para os humanos. Em segundo lugar, os mecanismos que permitem que as células transplantadas possam ser eliminadas *in vivo* são um pré-requisito para o tratamento de doenças graves. Isto porque, se o comportamento das células estaminais não for o esperado, será fundamental dispor de mecanismos que possam neutralizar essas células. Em terceiro lugar, é necessário um número considerável de ensaios clínicos realizados em animais, que avaliem tanto a toxicidade como a eficácia desta tecnologia, antes que estes mesmos ensaios possam ser realizados no Homem. Porém, os ensaios clínicos realizados em animais com CEE podem

ser de valor limitado, devido ao potencial de rejeição das células humanas no animal e à falta de respostas fisiológicas, que se verificam devido às diferenças entre espécies. Por fim, as células transplantadas devem ser aceites pelo sistema imunológico do doente, para evitar rejeições.^{94,99}

Assim, estes obstáculos devem ser superados antes de se tentar a sua aplicação clínica. Dada a sua grande variabilidade genética e as alterações epigenéticas que ocorrem nas CEE, são assim necessários mais estudos.⁸⁹

3.1.2 Células estaminais adultas

As células estaminais adultas são células indiferenciadas, que existem em tecidos e órgãos de indivíduos adultos, e que são capazes de se diferenciarem em células do tecido em que se encontram. O termo “célula estaminal adulta” é, no entanto, um termo impróprio, uma vez que estas células estão também presentes em crianças, e até mesmo no cordão umbilical e na placenta.¹⁰⁶ Estas células são também conhecidas como células estaminais somáticas.⁹¹

Assim, elas atuam como um reservatório natural para a substituição de células quando se verifica qualquer dano tecidual ou quando as mesmas vão morrendo.⁹¹

A maioria dos estudos que demonstra a diferenciação das células estaminais adultas noutros tecidos, apresenta um aumento da incorporação das células, baseando-se assim nos danos dos tecidos para se iniciar a diferenciação. Isto pode indicar que, sem essa necessidade de substituição ou reparação, há pouca ou nenhuma ativação das células estaminais adultas. O recrutamento das células estaminais adultas para os tecidos danificados é, assim, um fenómeno fascinante, mas que permanece relativamente inexplicável.¹⁰⁶

As células estaminais adultas têm recebido um intenso escrutínio ao longo dos últimos anos, devido às descobertas surpreendentes da sua capacidade de originar vários tipos de células e tecidos.¹⁰⁶

Assim, os aspectos cruciais das células estaminais adultas são: a sua identidade, a sua origem, a sua capacidade para formar outros tipos de células e tecidos, e os mecanismos subjacentes a essa capacidade, bem como os efeitos sobre os tecidos e órgãos.¹⁰⁶

A lista dos tecidos e órgãos dos quais já foram isoladas células estaminais adultas cresce constantemente, e inclui a medula óssea, o osso trabecular, o periósteo, a membrana sinovial, o músculo, o tecido adiposo, a glândula mamária, o trato gastrointestinal, o sistema nervoso central, o pulmão, o sangue periférico, a derme, o folículo piloso, o limbo da córnea, entre outros.^{92,106,107}

Na maioria dos casos, as células estaminais de tecidos adultos são capazes de se diferenciar em linhagens celulares características do local onde estas se encontram. Por exemplo, as células estaminais do sistema nervoso central são capazes de se diferenciar nos neurónios, nos astrócitos e nos oligodendrócitos.⁹⁵

A identificação do tipo de célula estaminal adulta baseia-se na utilização de marcadores de superfície das células (antígenos de diferenciação celular), que denotam que a expressão de proteínas específicas está relacionada com um estado de diferenciação particular dessa célula. A identificação também se baseia em índices morfológicos e moleculares da função, como por exemplo a expressão de enzimas específicas. No entanto, como as células estaminais, por definição, ainda não assumiram uma função diferenciada específica, a sua identificação baseia-se principalmente na utilização de marcadores de superfície celular.¹⁰⁶

Existem, assim, diferentes tipos de células estaminais adultas, de acordo com o tecido de onde são originárias. As mais estudadas e usadas na prática clínica incluem as células estaminais hematopoiéticas, mesenquimais, neurais e epiteliais.¹⁰⁶

As células estaminais hematopoiéticas encontram-se, sobretudo, na medula óssea, mas são também encontradas na circulação sanguínea, no sangue do cordão umbilical e na placenta. Tipicamente, estas células originam dois tipos de células progenitoras: as células mieloides (de onde derivam monócitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrócitos, megacariócitos/plaquetas e células dendríticas) e as células linfoides (de onde derivam linfócitos T e B, e células *Natural Killer*).¹⁰⁸

Quanto às células estaminais mesenquimais (CEM), elas encontram-se geralmente em tecidos conectivos, especialmente na medula óssea, no tecido adiposo e no sangue do cordão umbilical. Originam por diferenciação condrócitos, miócitos, adipócitos e osteócitos, e são consideradas as células estaminais adultas mais fáceis de isolar.¹⁰⁸

Relativamente às células estaminais neurais, são encontradas nas zonas subventriculares cerebrais e na zona subgranular do hipocampo, originando neurónios, oligodendrócitos e astrócitos.¹⁰⁸

Por fim, as células estaminais epiteliais são as responsáveis por originar todas as células epiteliais do nosso organismo, desde as que constituem as superfícies externas (como a pele e as mucosas) até às que delimitam o tubo digestivo e as vias respiratórias, bem como todos os vasos, glândulas e outras cavidades.¹⁰⁸

As células estaminais adultas são mais adequadas para fins clínicos, quando comparadas com as CEE, uma vez que a sua utilização não apresenta conflitos éticos, e encontram-se disponíveis facilmente a partir de uma série de tecidos. Para além disso, as células estaminais adultas podem ser utilizadas para o tratamento autólogo de doenças degenerativas, traumáticas e congénitas, uma vez que podem ser purificadas a partir do corpo do próprio doente, evitando-se assim as complicações relacionadas com a rejeição do transplantado.¹⁰⁴

No entanto, elas são menos prevalentes e mais difíceis de isolar que as CEE humanas (à exceção das CEM em que a sua colheita e produção são mais fáceis), crescem lentamente, diferenciando-se mal em cultura, e são difíceis de manipular e produzir em quantidades adequadas para transplante. Para além disso, comportam-se de maneira diferente dependendo do tecido de origem, apresentam um encurtamento do telómero, e podem transportar anomalias genéticas hereditárias ou adquiridas pelo doador.⁹⁵

Contrariamente às CEE, o potencial natural das células estaminais adultas parece ser limitado, tendo sido inicialmente considerado restrito às células relacionadas com os respetivos órgãos. Este conceito acabou, no entanto, por ser desafiado em artigos acerca da plasticidade das células estaminais de várias linhagens que vão além destes limites, um evento denominado de transdiferenciação.¹⁰⁹

A observação de que um tipo de célula poderia alterar o seu fenótipo e tornar-se num outro tipo de célula *in vivo* foi descrito, em 1922, por Maccarty *et al.*, em tumores

nos ovários. Este fenômeno foi denominado “metaplasia” e acreditou-se ser principalmente uma resposta fisiológica ou patológica.¹⁰⁹

A transdiferenciação é um subtipo de metaplasia e, por definição, corresponde a um interruptor irreversível de uma célula já diferenciada noutra, resultando na perda de um fenótipo e no ganho de outro. Esta técnica consiste na utilização de fatores de transcrição, fazendo uma célula já diferenciada transformar-se noutra célula diferenciada, sem passar pelo seu estado pluripotente.¹¹⁰

Para além da transdiferenciação, existem outras técnicas que são úteis na aplicação clínica das células estaminais adultas. Tal como referido anteriormente, e fazendo uso da técnica de transferência nuclear, as células somáticas podem ser reprogramadas para um estado pluripotente, injetando o núcleo de uma célula adulta num óvulo sem núcleo. No entanto, esta técnica é um pouco limitada, uma vez que tende a causar alguns danos celulares, tornando-a, por conseguinte, ineficiente.¹⁰⁴

3.1.3 Células estaminais pluripotentes induzidas

Os estudos acerca da transferência nuclear de células somáticas demonstraram claramente que as células adultas poderiam ser reprogramadas para um estado pluripotente. Recentemente, o primeiro relatório de indução de pluripotência nas células adultas por reprogramação direta, originou uma nova área de investigação, a das células estaminais pluripotentes induzidas (CEPi). Em 2006, Takahashi e Yamanaka selecionaram 24 genes importantes para a manutenção da pluripotência e autorrenovação nas CEE, tendo descoberto que a transdução retroviral de apenas quatro desses genes (Oct3/4, Sox2, Klf-4 e c-Myc) era suficiente para reprogramar as células somáticas a um estado pluripotente (**Figura 3.3**).¹¹¹

As CEPi estão, assim, a revolucionar o campo das células estaminais. Estas células apresentam um valor potencial para a descoberta de novos medicamentos e estabelecimento de protocolos de terapia celular, uma vez que apresentam a pluripotência

necessária para se diferenciarem nas três camadas da linha germinativa (endoderme, mesoderme e ectoderme).¹¹²

Estas células oferecem, ainda, a possibilidade de desenvolver protocolos de terapia celular específicos para o doente, uma vez que a utilização de células geneticamente idênticas pode evitar o risco de rejeição imunológica. Para além disso, contrariamente às CEE, as CEPi não levantam quaisquer questões éticas, uma vez que esta técnica não requer a utilização de embriões humanos.^{90,95}

Na **Figura 3.3** abaixo apresentada, encontram-se representadas as várias formas de obter células estaminais pluripotentes em laboratório.

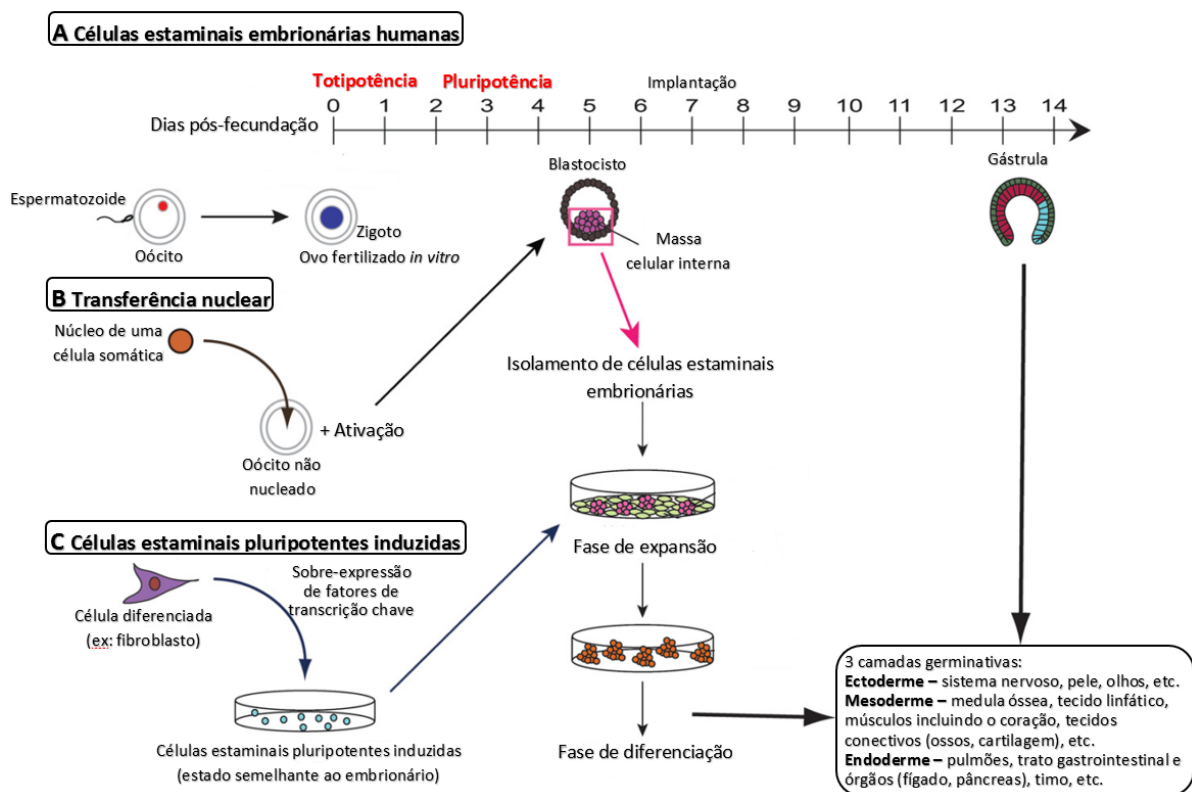


Figura 3.3 - Isolamento, produção e cultura de células estaminais pluripotentes. Adaptado de Brignier et al., 2010⁹³

3.1.4 Questões legais e regulatórias da terapia celular

A terapia celular, em conjunto com a terapia genética e a engenharia de tecidos, constitui um dos produtos da terapia avançada. Assim, é necessário um enquadramento legal para garantir a acessibilidade do doente, e uma assistência governamental para a sua regulação e controlo.⁹⁵

Aspetos a serem regulados incluem, principalmente, o controlo do desenvolvimento, fabrico e qualidade, através de testes de estabilidade; aspetos não clínicos, tais como a necessidade de estudos de biodistribuição, viabilidade e proliferação celular, níveis e taxas de diferenciação e duração da sua função *in vivo*; e aspetos clínicos, tais como as características de dose e de risco, e as questões de farmacovigilância e de rastreabilidade específicas.⁹⁵

Por fim, no caso das CEE, há sempre a considerar as questões éticas subjacentes, que variam de país para país, colocando muitas vezes entraves à sua utilização na investigação clínica.

Assim, de acordo com as suas diferentes posições no que diz respeito à pesquisa com CEE de origem humana, os países europeus podem ser classificados em três grupos: os países com um modelo político de restrição (Islândia, Lituânia, Dinamarca, Eslovénia, Alemanha, Irlanda, Áustria, Itália, Noruega e Polónia), os países com um modelo de políticas liberal (Suécia, Bélgica, Reino Unido e Espanha), e os países com um modelo intermédio (Letónia, Estónia, Finlândia, França, Grécia, Hungria, Suíça, Holanda, Bulgária, Chipre, Portugal, Turquia, Ucrânia, Geórgia, Moldávia, Roménia e Eslováquia).⁹⁵

No caso específico de Portugal, tendo subscrito a Convenção dos Direitos do Homem e da Biomedicina do Conselho da Europa, a criação de embriões, destinados à investigação, através da utilização das técnicas próprias da procriação medicamente assistida ou, segundo alguns, também por clonagem, é vedada. Apenas no caso dos embriões excedentários crioconservados^m, é discutível se a investigação científica é admissível ou não. No entanto, mesmo nestes casos, deve ser sempre assegurado que o

^m **Embriões excedentários** - embriões não utilizados, que são obtidos no decurso de um ciclo de tratamento de Fertilização *In Vitro* ou de Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoides, já que o número de ovócitos fecundados e o número de embriões obtidos podem ser diferentes dos previstos.¹⁷⁷

bem-estar do ser humano prevalece sempre sobre o interesse da sociedade ou da ciência.¹¹⁴

Nos Estados Unidos da América, as restrições são limitadas à pesquisa através de recursos federais. Não existem limitações para a pesquisa com CEE humanas, desde que os fundos venham de investidores privados ou estados específicos, tais como o Estado de Califórnia. A mudança na política em relação à investigação com CEE, através da administração de Barack Obama, conduziu a um aumento da cooperação no estudo e avaliação de terapias com células estaminais, surgindo novas e melhores expectativas neste domínio.⁹⁵

Em países como a Austrália, China, Índia, Israel, Japão, Singapura e Coreia do Sul, a clonagem terapêutica é permitida.⁹⁵

Assim, à medida que as novas terapias baseadas nas células estaminais se desenvolvem rapidamente, é necessário adaptar o enquadramento legal de forma a acompanhar este processo. Enquanto isso não acontece, as normas vigentes devem fornecer uma estrutura que garanta a segurança e eficácia das futuras terapias baseadas em células estaminais.⁹⁵

As diversas vantagens e desvantagens dos vários tipos de células estaminais para a aplicação clínica, encontram-se resumidas no **Quadro 3.1**.

Quadro 3.1 - Vantagens e desvantagens dos vários tipos de células estaminais para a sua aplicação clínica. Adaptado de Leeb et al., 2011 ¹⁰⁴

	Células estaminais embrionárias	Células estaminais adultas	Células estaminais pluripotentes induzidas
Acessibilidade das células estaminais	Muito limitada	Ilimitada	Limitada
Produção das células estaminais	Não definido	Depende do tipo de célula*	Não definido
Questões éticas relacionadas	Muitas	Nenhumas	Poucas
Risco de Doença do Enxerto contra o Hospedeiro	Alto	Depende do tipo de célula**	Nenhum
Risco de formação de tumores	Alto	Nenhum	Alto
Compatibilidade imunológica	Nenhuma	Depende do tipo de célula**	Total
Potencial de diferenciação	Pluripotente	Multipotente	Pluripotente

*A produção de células estaminais adultas depende da sua origem e idade. Assim sendo, linhagens de células neuronais, hepáticas ou pancreáticas têm uma capacidade proliferativa muito limitada, enquanto células estaminais mesenquimais derivadas do cordão umbilical têm uma capacidade proliferativa muito grande.

**A compatibilidade imunológica de células estaminais adultas alogénicas depende da compatibilidade das células do dador. No caso das células estaminais adultas autólogas, a compatibilidade imunológica é total.

4. Capítulo 4

4.1 Aplicação das células estaminais na Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda

O tratamento atual da SDRA consiste essencialmente em medidas de suporte, com estratégias de ventilação pulmonar protetora e de conservação de fluído.^{15,50,56} Grande parte da melhoria nas taxas de mortalidade hospitalar da SDRA tem sido atribuída à utilização de uma estratégia de ventilação de baixo volume corrente, limitando a lesão pulmonar secundária, uma estratégia padrão nos cuidados intensivos há mais de uma década.³¹

Acredita-se que uma terapia eficaz para o tratamento da SDRA deve promover tanto a atenuação da resposta inflamatória como a reparação adequada do tecido pulmonar. Neste contexto e, apesar de este ser um campo controverso, a terapia celular surge como uma possível abordagem na terapêutica da síndrome ou, pelo menos, no alívio dos seus sintomas.⁴

No geral, são consideradas, pelo menos, três tipos de estratégias terapêuticas que envolvem a utilização de células estaminais. A primeira consiste na estimulação de células estaminais endógenas, utilizando fatores de crescimento, citocinas e mensageiros secundários, que são capazes de induzir a autorreparação de tecidos ou órgãos danificados. A segunda, corresponde à administração direta de células estaminais nos tecidos danificados ou não funcionais, a fim de que elas se diferenciem nesses locais. Por fim, a terceira possibilidade está relacionada com a transplantação de células, tecidos ou órgãos retirados a partir de culturas de células diferenciadas derivadas de células estaminais.⁹⁵

Segundo o *ClinicalTrials.gov*, existem hoje mais de 4500 terapias baseadas em células estaminais, em ensaios clínicos humanos, em todo o Mundo. Até agora, a maioria das terapias são realizadas com células estaminais a partir da medula óssea dos próprios doentes, ou a partir de bancos de sangue de cordão umbilical.¹¹⁵ Existe também a intenção de algumas empresas em começar brevemente ensaios clínicos utilizando CEE em humanos.⁹⁷

No entanto, as células estaminais são atualmente utilizadas de uma forma limitada na prática clínica. O transplante de medula óssea é o exemplo mais conhecido, sendo que todos os anos são realizados mais de 25.000 transplantes de células estaminais

hematopoéticas para o tratamento de linfomas, leucemias, doenças imunes, defeitos metabólicos congênitos, hemoglobinopatias e síndromes mielodisplásicas e mieloproliferativas. Há, porém, uma esperança considerável no sentido de que as células estaminais possam ser utilizadas no tratamento de um grande número de doenças, como a doença de Alzheimer, Parkinson, anemia e diabetes do tipo I.^{94,95}

Para efeitos práticos, as CEE humanas são utilizadas em 13% dos procedimentos de terapia celular, as células estaminais fetais são usadas em 2 %, as células estaminais do cordão umbilical em 10 %, e as células estaminais adultas em 75 % dos tratamentos.⁹⁵

Nos últimos anos, vários estudos têm avaliado o efeito das células estaminais na SDRA. Estes modelos mostram a presença de células estaminais do doador nos pulmões, incluindo as células epiteliais dos tipos I e II, as células endoteliais, os fibroblastos e os monócitos intersticiais.¹¹⁶ As células estaminais são recrutadas para o pulmão devido ao processo inflamatório desencadeado pela lesão pulmonar. Neste contexto, Yamada *et al.*, 2004, mostraram que o estímulo inflamatório promove o recrutamento de células progenitoras da medula óssea para a circulação sistêmica, com uma maior diferenciação nas células epiteliais e endoteliais.¹¹⁷

As células estaminais podem atuar diretamente através da diferenciação em um ou mais tipos de células lesadas e através do seu enxerto no órgão lesado, ou por mecanismos de ação indiretos, que incluem a modulação da lesão e o processo de reparação, através de mecanismos parácrinosⁿ e de mecanismos dependentes do contato célula-célula.¹¹⁸

Assim, as células estaminais oferecem uma promessa considerável como uma nova estratégia terapêutica para a SDRA por uma série de razões.

Em primeiro lugar, as células estaminais, em particular as células pluripotentes, tais como as CEE ou as CEPi, têm a capacidade de se diferenciar em células do pulmão e substituir diretamente as células e os tecidos danificados.¹¹⁸

Em segundo lugar, a SDRA é caracterizada por uma intensa, mas transitória resposta inflamatória. Sabe-se que estratégias terapêuticas para simplesmente inibir esta resposta fracassaram, no entanto, as propriedades imunomoduladoras das células

ⁿ **Agentes parácrinos** - agentes produzidos por uma célula com o intuito de agir sobre as células vizinhas.¹¹⁸

estaminais adultas, como as CEM, podem ser mais efetivas neste aspeto. Deste modo, as células estaminais podem ser capazes de "reprogramar" a resposta imunitária do doente, reduzindo os elementos inflamatórios destrutivos, e preservando a resposta do hospedeiro a patogénios.¹¹⁸

Em terceiro lugar, as células estaminais podem ser capazes de melhorar a reparação e a resolução da lesão pulmonar. A resolução da SDRA é impedida pela destruição da integridade da barreira epitelial, o que inibe a *clearance* do fluído alveolar e esgota os níveis de surfactante.⁴ No entanto, as células estaminais podem restaurar as funções epitelial e endotelial, quer por se diferenciarem nestes tipos de células, quer através da secreção de fatores parácrinos que melhoram a recuperação destes tecidos.¹¹⁸

Em quarto lugar, a SDRA é frequentemente um componente de um processo complexo e generalizado que resulta em disfunção e falência multiorgânica. Neste contexto, as CEM têm demonstrado diminuir lesões e/ou restaurar a função do rim, do fígado e do coração.¹¹⁸

Em quinto lugar, as células estaminais podem atenuar diretamente a sepsis bacteriana, a mais comum e grave causa da SDRA^{17,41}, através de uma série de mecanismos, incluindo o aumento da fagocitose, o aumento da *clearance* bacteriana¹¹⁹, e a secreção de péptidos antibacterianos¹²⁰.

Por fim, existe o potencial de melhorar o efeito das CEM através da sua modificação, de forma a secretarem moléculas modificadoras da doença. Como as células estaminais são direcionadas para os locais de inflamação quando administradas por via intravenosa após a lesão tecidual, elas podem, portanto, constituir vetores atrativos para terapias génicas.¹²¹

Em conjunto, estas descobertas oferecem uma esperança considerável para a terapia da SDRA baseada nas células estaminais. A maioria dos estudos pré-clínicos até à data tem-se centrado nas CEM. No entanto, os potenciais mecanismos de ação, os efeitos terapêuticos e o potencial translacional difere significativamente de população para população de células estaminais. Os efeitos das células estaminais parecem, assim, variar de acordo com o tipo de célula estaminal.¹¹⁸

4.1.1 Células estaminais embrionárias

As CEE são células pluripotentes derivadas da massa celular interna do blastocisto e constituem uma fonte potencialmente ilimitada de células que se poderia diferenciar em células progenitoras do pulmão. A geração e a implantação de uma célula progenitora pulmonar teria uma vantagem terapêutica evidente, uma vez que poderia dar origem a todos os tipos de células dentro do pulmão após o seu transplante.^{92,99}

Os avanços na cultura das CEE e nos métodos de diferenciação ao longo dos últimos anos levaram a um interesse renovado nestas células como um potencial agente terapêutico para a SDRA. Os esforços têm-se concentrado, em grande parte, na derivação de células epiteliais alveolares do tipo II a partir destas células.¹²² No entanto, a dificuldade centra-se no facto do pulmão ser originado a partir da endoderme, a terceira camada germinativa, através de um processo de especificação celular complexo.

Para além disso, a pureza das populações de células para a realização de transplantes é essencial, sendo que a presença de células pluripotentes na cultura de diferenciação engloba um risco significativo de formação de teratomas após transplante, característica das CEE.¹⁰⁴

Recentemente, uma população pura de células que se assemelham às células do epitélio alveolar do tipo II, foi isolada a partir de CEE humanas, manipuladas de forma a expressar uma cassete de resistência antibiótica. Sob condições de cultura relativamente simples com soro e antibiótico puromicina, as CEE diferenciaram-se, e as células resistentes a antibióticos puderam ser seleccionadas a partir de uma população altamente pura (> 99%) de células expressando uma variedade de marcadores epiteliais alveolares do tipo II.¹²³ As técnicas anteriores, incluindo a co-cultura com mesênquima pulmonar, foram inadequadas para a utilização clínica.¹²⁴

Os estudos *in vivo* utilizando CEE como potencial terapia de reposição para as células epiteliais alveolares lesadas na SDRA permanecem limitados. O significado funcional destas células na diferenciação e no enxerto no pulmão lesado não se encontra comprovado. Roszell *et al.*, 2009, desenvolveram células alveolares do tipo II a partir de CEE de ratos, e administraram-nas intratraquealmente em ratinhos pré-termo. Durante o período de estudo de 24 horas as células mantiveram a diferenciação e a expressão de uma das proteínas do surfactante. No entanto, não foi determinado se as células tinham

enxertado no parênquima pulmonar ou se esta técnica resultou em qualquer benefício funcional.¹²² Wang *et al.*, 2010, investigaram o efeito das células alveolares do tipo II derivadas das CEE em ratos lesados por bleomicina. No dia nove após administração intratraqueal, estas células tinham enxertado no pulmão, e uma pequena quantidade tinha-se diferenciado em células epiteliais alveolares do tipo I. Além disso, a gravidade da SDRA foi reduzida e a sobrevivência dos animais aumentou.¹²⁵ Mais recentemente, Toya *et al.*, 2011, estudaram os efeitos das células progenitoras do blastocisto derivadas de CEE humanas, cultivadas em condições que favoreceram o desenvolvimento da mesoderme, num modelo de rato com punção e ligação cecal^o. Estas células melhoraram a lesão pulmonar induzida pela sepsis, quando administradas por via intravenosa uma hora após a lesão, através da modulação da resposta imunitária. Este efeito protetor pareceu advir da interação destas células com as células imunitárias do hospedeiro no pulmão, reduzindo a sua produção de citocinas pró-inflamatórias.¹²⁶

Porém, apesar da promessa das CEE no tratamento da SDRA, a investigação neste domínio tem sido impedida por preocupações éticas, financeiras e técnicas. Preocupações adicionais incluem a sua potencial transformação maligna (isto é, a formação de teratomas) e a rejeição imunitária destas células.^{89,93,104} Deste modo, não existem atualmente ensaios clínicos sobre a utilização de CEE no tratamento da SDRA.

4.1.2 Células estaminais adultas

4.1.2.1 Células estaminais progenitoras endoteliais

O interesse nas células estaminais progenitoras endoteliais (CEPE) deriva do facto do dano endotelial ser uma característica chave na fisiopatologia da SDRA, contribuindo para a formação das membranas de hialina e para o desenvolvimento do edema alveolar rico em proteínas.⁵³

^o **Punção e ligação cecal** - técnica utilizada para simular uma sepsis. Nesta técnica, a sepsis é originada a partir de um foco infeccioso polimicrobiano no interior da cavidade abdominal, seguido da translocação bacteriana para a corrente sanguínea, originando uma resposta inflamatória sistémica.¹⁷⁸

As CEPE parecem exercer efeitos terapêuticos através da diferenciação direta e através do enxerto na vasculatura, e da secreção de fatores que mobilizam as células endoteliais adjacentes e as células progenitoras do tecido de forma a participar na angiogênese e na reconstrução do tecido. O secretoma das CEPE foi recentemente analisada, tendo-se verificado que contém pelo menos 35 proteínas conhecidas referentes à biologia celular endotelial e à angiogênese.¹²⁷

Embora não exista um conjunto de marcadores celulares definidos para identificar as CEPE, duas subpopulações diferentes de CEPE, com diferentes capacidades, marcadores celulares e papéis na reparação endotelial, foram identificadas. As CEPE "precoces" têm marcadores de superfície hematopoiéticos (por exemplo, CD-34) e secretam fatores pró-angiogênicos, mas exibem uma capacidade de diferenciação limitada. Pelo contrário, as CEPE "tardias", assim chamadas porque aparecem depois de mais de duas semanas em cultura, não têm marcadores de superfície hematopoiéticos e não secretam fatores pró-angiogênicos. No entanto, elas são capazes de formar tubos endoteliais *in vitro*, tendo um papel mais importante na reposição celular do endotélio danificado.¹¹⁸

As CEPE parecem regenerar o endotélio alveolar na SDRA. Lam *et al.*, 2008, demonstraram que o transplante autólogo de CEPE "precoces" melhorou a integridade alvéolo-capilar, evidenciada pela diminuição da hemorragia pulmonar, teor de água e formação de membranas de hialina, num modelo de coelho com SDRA induzida por ácido oleico.¹²⁸

As CEPE também podem exercer efeitos anti-inflamatórios e regenerativos. Os animais tratados com CEPE alogênicas^P apresentaram um aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, bem como uma redução em óxido nítrico sintase induzível e endotelina-1 (responsáveis pelo dano endotelial). O grupo tratado com CEPE também apresentou evidências de neovascularização, re-endotelização e uma melhoria na sobrevivência. É importante ressaltar ainda que este estudo foi realizado utilizando CEPE alogênicas, atestando a sua baixa imunogenicidade.¹²⁹

Estudos em humanos mostraram uma associação entre o aumento dos níveis circulantes de CEPE e uma melhoria nos resultados clínicos da SDRA¹³⁰ e da pneumonia

^P Células alogênicas - células provenientes de um dador, que é diferente do paciente recetor.¹²⁹

bacteriana¹¹⁷, sugerindo um papel das CEPE na reparação pulmonar. Para além disso, dois ensaios clínicos foram realizados, utilizando CEPE autólogas na hipertensão pulmonar, sendo que nenhuma reação imunológica ou outro efeito adverso foi observado no grupo que recebeu a infusão de CEPE, mostrando mais uma vez a sua baixa imunogenicidade.¹¹⁸

Porém, baixos níveis circulantes de CEPE, mesmo na presença da doença, mostram o quão difícil é isolar este tipo de células.¹³¹ Para além disso, a maioria dos estudos utiliza CEPE autólogas, sendo a experiência com o transplante alogénico de CEPE limitada. Por fim, a segurança desta abordagem ainda não está confirmada.¹¹⁸

Estas são, assim, limitações significativas que reduzem o potencial terapêutico das CEPE em diversas doenças agudas, incluindo a SDRA.

4.1.2.2 Células estaminais endógenas pulmonares

Do ponto de vista teórico, o tipo de célula ideal para regenerar o pulmão lesado seria a população de células estaminais nativas do pulmão. Todos os tecidos adultos, incluindo o pulmão, têm alguma capacidade de se auto-reparar ou auto-regenerar, através da replicação e diferenciação das células estaminais residentes dentro destes órgãos.⁹¹ A capacidade do pulmão para se regenerar após uma lesão fornece evidências claras da existência de uma ou mais populações nativas do pulmão de células estaminais.¹³²

No entanto, esta população de células estaminais adultas derivadas do pulmão permaneceu mal caracterizada durante anos. Apesar de várias populações de células estaminais endógenas, anatomicamente e funcionalmente distintas, tenham sido identificadas, nenhuma destas células cumpriu os requisitos para ser considerada uma verdadeira célula estaminal. No entanto, Kajstura *et al.*, 2011, identificaram recentemente uma verdadeira população de células estaminais no pulmão humano, localizada no pulmão distal, nos bronquíolos e, em menor quantidade, nos alvéolos, demonstrando a capacidade para regenerar todos os componentes de um pulmão lesado de rato.¹³³ Noutros estudos, Chapman *et al.*, 2011, identificaram uma nova célula epitelial alveolar expressando a integrina $\alpha\beta4$ no pulmão de rato que poderia reparar o pulmão após a

SDRA¹³⁴, enquanto Hegab *et al.*, 2011, forneceram evidências convincentes de que as células do ducto da glândula submucosa constituem uma população de células estaminais/progenitoras.¹³⁵

Porém, desconhece-se se a capacidade regenerativa demonstrada por estas células estaminais pode ser replicada no pulmão humano e, se na verdade, o tecido produzido funcionará como um pulmão normal. Da mesma forma, a viabilidade das células estaminais endógenas colhidas a partir de uma pessoa criticamente doente com SDRA não é clara. Tudo isto, em conjunto com o incompleto conhecimento acerca das células estaminais residentes no pulmão, faz com que existam ainda obstáculos por ultrapassar antes dos testes clínicos com estas células para doenças pulmonares poderem ser iniciados. É provável que as primeiras aplicações clínicas das células estaminais pulmonares seja no campo da bioengenharia de tecidos no tratamento de condições crônicas, tais como a atresia traqueal^q.¹¹⁸

4.1.2.3 Células estaminais mesenquimais

As CEM são uma classe de células estaminais adultas que tem gerado uma quantidade significativa de interesse como uma potencial terapia de doenças pulmonares, sendo a terapia celular mais estudada para este tipo de patologias.¹³⁶

Estas células não têm uma característica única definida, mas foram definidas em 2006, pela *Sociedade Internacional de Terapia Celular*, através de três critérios: devem ser aderentes ao plástico em condições de cultura padrão; devem expressar certos marcadores de superfície celular, tais como CD105, CD73, e CD90, mas não devem expressar outros marcadores, incluindo CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19, e HLA-DR; e devem ter a capacidade de se diferenciarem em linhagens mesenquimais, tais como adipócitos, condrócitos e osteócitos, sob condições *in vitro*.¹³⁷

Para além da medula óssea, diferentes populações de CEM foram também isoladas a partir de outros tecidos adultos - cérebro, baço, fígado, rim, pulmão, músculo, timo,

^q **Atresia traqueal** - ausência de uma parte ou de toda a traqueia.¹¹⁸

pâncreas, gordura - e de tecidos fetais.^{138,139} Na verdade, diferentes populações anatómicas de CEM apresentam diferentes imunofenótipos, perfis de citocinas secretadas e análises de proteoma.¹⁴⁰

Porém, apesar das CEM compreenderem menos de 0,1% de todas as células da medula óssea, elas podem ser isoladas a partir de aspirados de medula óssea inteira pela sua capacidade de aderir ao plástico e de formar colônias.¹³⁶

Estudos anteriores sugeriam que as CEM derivadas da medula óssea, poderiam ter aplicações terapêuticas em várias desordens clínicas, incluindo o enfarte do miocárdio, a diabetes, a sepsis, a insuficiência hepática, e a insuficiência renal aguda. Para além disso, têm sido investigadas em vários modelos *in vivo* de doença pulmonar, incluindo a SDRA.¹⁴¹

Para além da sua derivação a partir de vários tecidos adultos, da sua facilidade de isolamento e do enorme potencial de expansão em cultura, as CEM apresentam ainda a vantagem de serem imunoprivilegiadas. Isto significa que elas podem ser administradas alogenicamente, ou seja, as células de um dador podem ser expandidas em cultura e, em seguida, reintroduzidas num doente, evitando assim problemas relacionados com a rejeição imunitária.¹⁴²

Esta propriedade das CEM de escaparem ao sistema imunitário do hospedeiro deve-se ao facto de expressarem baixos níveis do complexo principal de histocompatibilidade I (MHC-I) e não expressarem moléculas de MHC-II ou moléculas co-estimuladoras das células T, tais como CD80, CD86, ou CD40. As moléculas MHC II são projetadas para permitir que os linfócitos T reconheçam epítomos de antígenos exógenos. Assim, as CEM tornam-se atrativas para a terapia baseada em células, tanto em transplantes autólogos como alogénicos, uma vez que podem ser administradas a doentes sem haver correspondência com o antígeno leucocitário humano.¹³⁶

O papel das CEM na terapia baseada em células tem evoluído gradualmente ao longo das últimas décadas. As investigações realizadas com este tipo de células promoveram mudanças dramáticas nas hipóteses ou paradigmas referentes aos seus mecanismos de ação. Inicialmente, as células foram exploradas como camadas que forneciam um nicho para a cultura de células hematopoiéticas (paradigma I). Posteriormente, as células foram exploradas como células reparadoras que poderiam

enxertar nos tecidos lesados e diferenciar-se de forma a substituir as células danificadas (paradigma II). Mais recentemente, os dados demonstram que as células aparecem apenas de forma transiente nos tecidos lesados sob a maioria das condições, comunicando com as células lesadas de forma a limitar a destruição dos tecidos ou melhorar a reparação através de uma variedade de mecanismos (paradigma III). Estes mecanismos incluem: (a) aumento da expressão de genes que modulam as reações inflamatórias e imunitárias excessivas; (b) proporcionar um nicho para aumentar a proliferação e diferenciação das células estaminais/progenitoras de tecido endógeno (como no paradigma I); e (c) a transferência de componentes vesiculares que contêm mitocôndrias e microRNAs.¹⁴³

De uma forma geral, na figura seguinte encontram-se resumidos os principais mecanismos de ação das CEM (**Figura 4.1**).

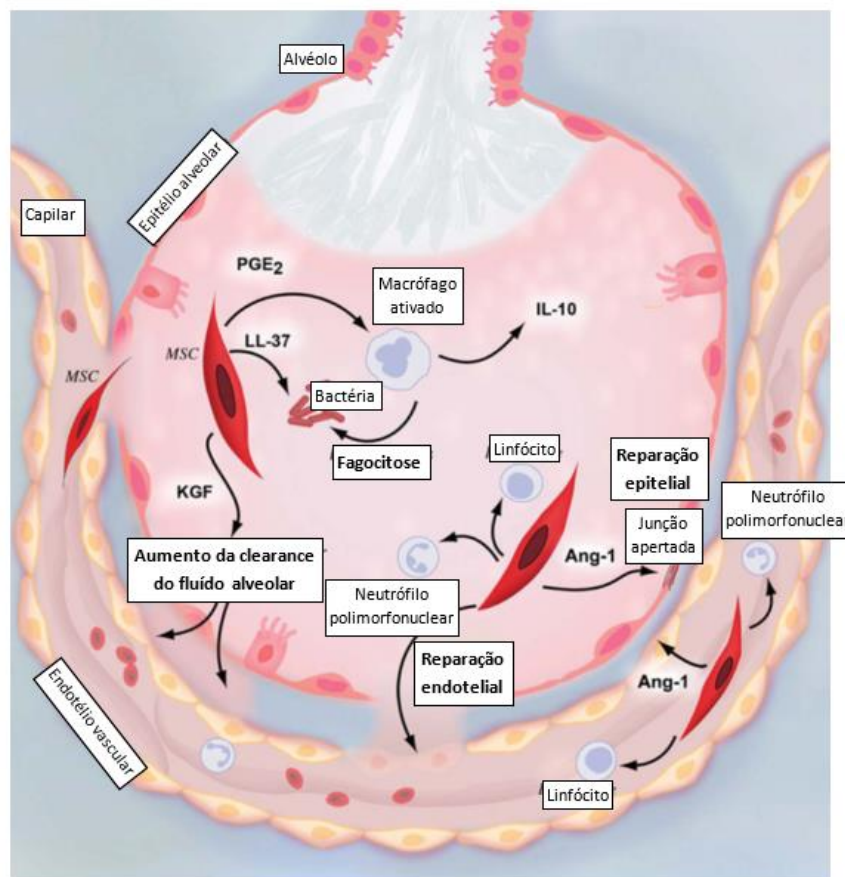


Figura 4.1 -Propriedades terapêuticas das células estaminais mesenquimais na Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda. Adaptado de Lee et al., 2011¹⁴¹

Seguidamente são apresentados, detalhadamente, os principais mecanismos de ação das CEM.

4.1.2.3.1 Enxerto

Estudos anteriores sugeriam que a diferenciação e o enxerto desempenhavam um papel importante na terapia das CEM na SDRA. No entanto, o papel destes processos nos mecanismos de ação das células estaminais adultas é controverso. Este tipo de células estaminais tem uma capacidade de diferenciação restrita, estando comprometido a linhagens específicas. As células estaminais adultas multipotentes, como as CEM, podem-se diferenciar apenas numa variedade específica de linhagem (isto é, nos tecidos mesenquimais), incluindo o osso, a cartilagem, o tendão, a gordura, o estroma da medula óssea e o músculo.¹⁴⁴

Porém, os primeiros estudos sugeriram que a transdiferenciação poderia constituir um importante mecanismo de ação das células estaminais adultas. Krause *et al.*, 2001, verificaram que uma única célula estaminal hematopoiética derivada da medula óssea poderia dar origem a células de múltiplos órgãos diferentes, incluindo o pulmão. Neste estudo, foi relatado um enxerto de até 20% de células derivadas da medula óssea no pulmão, incluindo células epiteliais, a partir de um único progenitor hematopoiético.¹¹⁶ Este relatório estimulou investigações adicionais sobre a possibilidade das CEM derivadas da medula óssea poderem ser capazes de regenerar o epitélio e/ou o endotélio pulmonar, tendo acabado todas por corroborar o primeiro estudo.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸

No entanto, estudos pré-clínicos mais recentes demonstram que, enquanto as células estaminais adultas podem reduzir a SDRA, as taxas de enxerto são baixas, lançando dúvidas sobre o significado terapêutico desse mecanismo de ação. Vários grupos questionaram este mecanismo de ação, observando apenas o enxerto de linhagens de leucócitos ou taxas de enxerto baixas (<1%) em modelos de lesão pulmonar. Diferenças nos modelos animais, métodos de lesão e métodos de administração podem ser responsáveis pelos diferentes resultados obtidos. Assim, os resultados destes estudos demonstram que o papel das células no enxerto necessita de uma maior investigação.¹⁴⁹

Considerando que foi postulado inicialmente que o maior benefício das CEM na reparação pulmonar seria devido à sua capacidade de reconstituir as áreas danificadas,

através do deslocamento para os locais de lesão tecidual, enxerto, e diferenciação, é agora geralmente aceite que, dados os baixos níveis de enxerto, as CEM provavelmente contribuem para a proteção e reparação pulmonares através de mecanismos parácrinos. O efeito benéfico das CEM parece derivar mais da sua capacidade de se deslocar para os locais de tecido lesado, interagir com as células hospedeiras lesadas, e secretar fatores solúveis parácrinos.¹⁴¹

Assim, muito do interesse atual nas CEM concentra-se na sua capacidade para atuar indiretamente, modulando aspetos-chave das respostas imunitárias e de reparação. As CEM secretam múltiplos fatores parácrinos, como fatores de crescimento, fatores que regulam a permeabilidade endotelial e epitelial, citocinas anti-inflamatórias, e péptidos antimicrobianos, que podem modular a resposta imunitária e facilitar a reparação e a regeneração (**Figura 4.1**). Para além disso, as CEM também parecem comunicar com as células hospedeiras através da libertação de microvesículas contendo o RNA e mitocôndrias.¹¹⁸

4.1.2.3.2 Reparação pulmonar/Permeabilidade

Sabe-se que a debilitada *clearance* do fluído alveolar é comum em doentes com SDRA, devido ao rompimento da barreira celular endotelial microvascular do pulmão.⁴ A terapia com CEM pode atenuar o edema pulmonar na SDRA.

Um dos mecanismos potenciais pelos quais as CEM podem prevenir ou tratar o edema pulmonar na SDRA é através da libertação de um número de fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento dos queratinócitos (KGF), o fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) e a angiopoietina-1 (Ang-1). Estes fatores, através da ligação aos recetores correspondentes nas células locais, permitem que os processos de reparação da barreira das células endoteliais se iniciem.¹⁵⁰

O KGF, o sétimo membro da família dos fatores de crescimento dos fibroblastos, tem sido extensivamente estudado como um elemento-chave no desenvolvimento, crescimento e reparação pulmonares. Após lesão pulmonar, o KGF estimula a proliferação das células epiteliais alveolares e facilita a circulação do fluído alveolar epitelial. No pulmão humano perfundido *ex vivo*, a instilação intrabronquial de CEM humanas, uma hora após a lesão pulmonar induzida pela endotoxina, restaurou a

clearance do fluído alveolar, em parte, pela secreção de KGF, o que aumentou o transporte vetorial de fluidos através do epitélio alveolar, por aumentar o tráfego de proteínas transportadoras de sódio para a superfície da célula.¹⁵¹

Outro fator de crescimento específico epitelial secretado pelas CEM é o HGF. Anteriormente, o HGF mostrou estabilizar a integridade das células endoteliais pulmonares, essencialmente através da prevenção da formação de fibras de *stress* de actina e das lacunas paracelulares entre as células endoteliais pulmonares lesadas.¹⁵⁰

A Ang-1 é um conhecido fator da sobrevivência endotelial e da estabilização vascular, que reduz a permeabilidade endotelial e inibe as interações entre os leucócitos e as células endoteliais, através da modificação das moléculas de adesão das células endoteliais e das junções celulares.¹⁴¹ Recentemente, foi descoberto que as CEM humanas alogénicas segregam uma quantidade significativa de Ang-1. Esta secreção mostrou ser essencial para evitar o aumento da permeabilidade epitelial em culturas de células alveolares epiteliais humanas do tipo II lesadas.¹⁵²

Assim, vários grupos de investigação têm relatado que as CEM podem regular a permeabilidade endotelial e epitelial, bem como melhorar a sua reparação. Gupta *et al.*, 2007, administraram CEM derivadas da medula óssea, por via intratraqueal, num modelo de rato de lesão pulmonar induzida por endotoxina. As CEM reduziram a gravidade da lesão pulmonar, através da redução no excesso de água nos pulmões (uma medida de edema pulmonar) e na concentração de proteínas no fluído de lavagem broncoalveolar (uma medida da permeabilidade endotelial e epitelial alveolar).¹⁵³ O estudo Lee *et al.*, 2009, apoiou estes resultados. Numa preparação de pulmão humano *ex vivo* lesado por endotoxina, o tratamento com CEM humanas alogénicas reduziu a água pulmonar extravascular, melhorou a permeabilidade da barreira endotelial pulmonar e restaurou o balanço de líquido do pulmão.¹⁵¹

No entanto, apesar de promissor, o efeito dos fatores de crescimento derivados das CEM em restaurar ou manter a permeabilidade do pulmão após a lesão terá de ser mais estudado.¹⁴¹

4.1.2.3.3 Inflamação

Com a finalidade de melhorar o prognóstico de doentes com SDRA, é imperativo evitar danos pulmonares permanentes, como a fibrose, através de uma intervenção precoce na progressão da doença. Sendo a inflamação o evento inicial, através da qual a morbidade se desenvolve, combater a inflamação no início é a melhor forma possível de prevenir o aparecimento da insuficiência pulmonar.¹⁵⁴

A inflamação aguda é uma das defesas importantes contra infecções e toxinas estranhas, no entanto, a inflamação descontrolada causada pela sepsis pode comprometer o pulmão, entre outros órgãos. As CEM mostraram proteger o hospedeiro contra os danos inflamatórios extraordinários, aumentando a resistência do hospedeiro à sepsis, e sub-regulando a expressão de fatores pró-inflamatórios, como por exemplo, IL-1 β , IL-8, interferão (INF)-c, TNF- α ou outros.¹¹⁸ As CEM podem também regular o desenvolvimento da inflamação pulmonar através da produção de agentes anti-inflamatórios, tais como a IL-4 e a IL-10, da redução na infiltração de neutrófilos para o pulmão, e da atenuação das citocinas pró-inflamatórias na circulação, para manter o equilíbrio entre as respostas inflamatórias e anti-inflamatórias.¹⁵⁵

Muitos estudos têm demonstrado que as CEM libertam citocinas anti-inflamatórias que podem atenuar a gravidade da inflamação na SDRA. Ortiz *et al.*, 2003, isolaram CEM de ratinho e administraram-nas por via intravenosa, imediatamente ou 7 dias após a lesão pulmonar induzida por bleomicina. Eles descobriram que as CEM melhoraram a sobrevivência, diminuíram a resposta inflamatória pulmonar e impediram o desenvolvimento de fibrose pulmonar. O grau dos efeitos anti-inflamatórios foi marcante em comparação com os níveis relativamente baixos de enxerto pulmonar.¹⁴⁷

As CEM foram eficazes apenas quando administradas ao mesmo tempo que a bleomicina, e não após 7 dias. Esta observação sugere que a ação das CEM neste modelo foi exercida nas fases iniciais da lesão, em que existe uma extensa apoptose de macrófagos. Estes resultados são consistentes com a demonstração de que a via da IL-1 desempenha um papel fulcral na produção da inflamação estéril^r, sendo os seus efeitos semelhantes aos efeitos do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) na inflamação infecciosa.¹⁵⁶ Assim, os resultados indicam que uma das vias pela qual as CEM podem

^r **Inflamação estéril** - inflamação causada sem a presença de agentes patogénicos.¹⁵⁷

modular as fases iniciais da inflamação é através da secreção de IL-1RA^s que, por consequência, atenua os efeitos de IL-1 e TNF- α .¹⁵⁷

Os efeitos terapêuticos das CEM na inflamação pulmonar induzida por *E. coli* foram demonstrados através da transplantação intratraqueal destas células três horas após a instilação de bactérias. Tal "tratamento" aumentou a sobrevivência, atenuou os danos pulmonares e reduziu a infiltração de leucócitos, bem como a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α e da proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-2, três dias após a indução de SDRA em ratos.¹⁵⁸ Um estudo recente demonstrou também que as CEM derivadas do cordão umbilical humano poderiam melhorar a SDRA num modelo de rato, aumentando a taxa de sobrevivência e reduzindo os níveis circulantes de TNF- α , IL-1 β e IL-6, mas não de IL-10.¹⁵⁹ Curley *et al.*, 2012, demonstraram também que a terapia com CEM aumentou a reparação pulmonar após lesão pulmonar induzida pelo ventilador mecânico e atenuou as concentrações de TNF- α alveolar, ao mesmo tempo que aumentou as concentrações de IL-10. Neste estudo, o efeito benéfico da secreção das CEM na reparação de feridas epiteliais pulmonares foi atenuado pela depleção de KGF, demonstrando assim, que a terapia com CEM aumenta reparação pulmonar através de um mecanismo parácrino possivelmente dependente de KGF.¹⁶⁰

Para além disso, os macrófagos e os monócitos têm um papel central na produção de mediadores inflamatórios durante a sepsis, sendo assim um alvo celular importante no efeito protetor das CEM. Vários relatórios sugeriram que as CEM poderiam reprogramar os macrófagos de um fenótipo pró-inflamatório M1 para um fenótipo alternativo ou anti-inflamatório M2. Para além das propriedades anti-inflamatórias, isto leva a um aumento da atividade fagocítica dos macrófagos. No entanto, o mecanismo pelo qual isto acontece não se encontra totalmente esclarecido.¹⁵⁶

Nas observações paralelas com CEM de rato, Maggini *et al.*, 2010, também descobriram que as CEM derivadas de medula óssea de rato alteraram os macrófagos para um fenótipo regulador, caracterizado pela diminuição da expressão de citocinas inflamatórias, aumento fagocitário de células apoptóticas, e aumento da suscetibilidade à infeção pelos patógenos intracelulares, sendo estes efeitos aparentemente mediados pela secreção de PGE2 pelas CEM.¹⁶¹

^s IL-1RA - citocina que concorre competitivamente com a IL-1 β para a ligação ao recetor da IL-1.¹⁵⁷

Deste modo, existe, um grande conjunto de evidências de que as CEM suprimem a inflamação e melhoram a reparação de tecidos, através da modulação do fenótipo dos macrófagos.

O papel das CEM contra a inflamação excessiva explica muitos dos efeitos benéficos observados após a administração destas células em modelos animais num vasto número de doenças, incluindo modelos de lesão pulmonar. Deste modo, utilizar as CEM na SDRA pode ser uma estratégia inteligente como uma solução temporária para regular a resposta inflamatória e a lesão tecidual durante a fase aguda da síndrome.¹⁵⁰

4.1.2.3.4 Imunomodulação

Para além dos efeitos anti-inflamatórios bem documentados das CEM, a literatura recente descreve também um papel imunoestimulante destas células. Vários investigadores relataram que as CEM podem regular a expressão de MHC II, quando expostas a níveis reduzidos de inflamação, funcionando como células apresentadoras de antígenos que estimulam o sistema imunitário adaptativo.¹⁴¹

Para além disso, as CEM podem suprimir ou modular a resposta imune inata e adaptativa, provavelmente, através da inibição da ativação e proliferação de linfócitos T, bem como da modificação das funções de uma ampla variedade de células imunitárias, incluindo as células *Natural Killer*, as células B e as células dendríticas.¹⁵⁰

Desta forma, as CEM podem alterar a resposta inflamatória, através de mecanismos dependentes e independentes do contacto célula-célula, pela libertação de fatores solúveis. A lista de mediadores libertados ou induzidos pelas CEM incluem o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), o fator de necrose tumoral- α induzido pela proteína 6 (TSG-6), a prostaglandina E2 (PGE2), a indoleamina 2,3- dioxigenase, a IL-10, a IL-1RA, entre outros.¹⁴¹

Estes mecanismos foram exemplificados num modelo de sepsis após punção e ligação cecal (CLP) em ratinhos, por Nemeth *et al.*, 2009, onde se descobriu que as CEM derivadas da medula óssea de ratinho, segregaram PGE2, que reprogramou os macrófagos alveolares de forma a secretar IL-10.¹⁶²

Evidências recentes também demonstraram que as CEM podem secretar IL-6 e induzir a produção de anticorpos IgG^t pelos linfócitos B num ambiente *in vitro*. Além disso, as CEM podem impedir a apoptose e a desgranulação dos neutrófilos em cultura, sem inibir as suas capacidades fagocíticas ou quimiotáticas.¹⁴¹

Assim, as CEM demonstram ter efeitos complexos sobre o sistema imunológico. No futuro, será necessário estudar a complexa, e muitas vezes oposta, relação entre a imunogenicidade potencial das CEM e a sua capacidade para suprimir a imunidade inata e adaptativa, de forma a compreender o significado de imunomodulação promovida por estas células durante o tratamento da lesão pulmonar.¹⁴¹

4.1.2.3.5 Antimicrobiano

A pneumonia bacteriana e a sepsis de causa não pulmonar são duas das etiologias mais comuns da SDRA.³¹ Dada a preponderância da literatura que descreve o efeito imunossupressor das CEM, seria uma preocupação de que este efeito poderia diminuir a defesa do hospedeiro contra as infeções. No entanto, estudos *in vivo* recentes forneceram provas dos efeitos benéficos das CEM no tratamento da sepsis induzida por bactérias, através da libertação de fatores solúveis.

Mei *et al.*, 2010, avaliaram o efeito terapêutico das CEM num modelo de rato com sepsis polimicrobiana, induzida através de punção e ligação cecal (CLP). Após indução da sepsis, foram injetadas intravenosamente uma solução salina ou CEM, sendo o plasma, o fluído broncoalveolar e tecidos coletados para análise. A carga bacteriana foi avaliada através da determinação do número de unidades formadoras de colónias (UFC) nos baços de ratinho. Os resultados mostraram que as contagens de UFC foram altas nos baços de ratos que tinham sido submetidos a CLP, tendo o tratamento com CEM reduzido significativamente este número, sugerindo que estas células modulam, diretamente ou indiretamente, a capacidade dos fagócitos do hospedeiro para eliminar a infeção bacteriana ou participar na *clearance* de bactérias. O tratamento com CEM aumentou ainda a taxa de sobrevivência de ratos lesados com CLP na ausência e na presença de terapia antibiótica.¹²⁹

^t **IgG** - principal isotipo de anticorpos encontrado no sangue e no fluído extracelular, que se liga a patogénios, controlando e protegendo o organismo contra infeções.¹⁴¹

Recentemente, também tem sido relatado que, em modelos de rato com pneumonia induzida por *E. coli*, a administração intratraqueal de CEM humanas derivadas da medula óssea e do cordão umbilical promove a eliminação bacteriana e atenua a SDRA, respetivamente.

Krasnodembskaya *et al.*, 2010, estudaram o efeito das CEM humanas derivadas da medula óssea no crescimento de bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*). O tratamento com CEM demonstrou uma inibição marcada do crescimento bacteriano em comparação com o meio de controlo ou com os fibroblastos de pulmão humano normal. A análise da expressão de grandes péptidos antimicrobianos indicou que um dos fatores responsáveis pela atividade antimicrobiana do meio de crescimento das CEM contra as bactérias Gram-negativas foi o péptido antimicrobiano humano catelicidina LL-37.¹²⁰ O péptido LL-37 é expresso pelos leucócitos polimorfonucleares, queratinócitos e células epiteliais, e pode funcionar como um sinal quimiotático para os neutrófilos, monócitos, mastócitos e células T. Além disso, este péptido liga-se e neutraliza a endotoxina, estimula a desgranulação dos mastócitos e participa na cicatrização de feridas através da promoção da vascularização e reepitelização da pele.¹⁵⁴

Além do LL-37, aIDO tem também sido associada à atividade antimicrobiana das CEM humanas. Esta atividade antimicrobiana das CEM humanas, mediada pelaIDO, não está limitada às bactérias, mas também é eficaz contra protozoários e vírus.¹⁶³

Para além disso, mais recentemente, Gupta *et al.*, 2013, descobriram que o tratamento com CEM aumentou a *clearance* bacteriana a partir do espaço alveolar, num modelo de rato com pneumonia induzida por *E. coli*. Esta redução da carga bacteriana persistiu por 24 horas e deveu-se, em parte, à sobre-regulação da proteína antibacteriana lipocalina 2 (LCN2).¹⁶⁴

Em conjunto, estes resultados sugerem que as CEM exercem efeitos diretos sobre as bactérias e modulam positivamente a capacidade fagocitária do hospedeiro. Assim, é evidente que estas células estão, direta e indiretamente, envolvidas na atividade antimicrobiana, e que esta capacidade se pode ser benéfica no tratamento de complicações microbianas no pulmão, potencialmente através da utilização de células estaminais alogénicas ou autólogas.

4.1.2.3.6 Microvesículas e Mitocôndrias

Para além dos fatores solúveis libertados pelas CEM, evidências crescentes sugerem um papel crítico de microvesículas nas terapias baseadas em células na SDRA e noutros modelos de doenças.

As microvesículas, pequenos fragmentos de membrana circular, são eliminadas a partir da superfície da célula ou libertadas a partir do compartimento da membrana da célula endossomal, e desempenham um papel importante na comunicação célula-célula. Este intrigante sistema de comunicação mediado por microvesículas surgiu muito cedo durante a evolução, e serviu como modelo para o desenvolvimento de mecanismos de interação intercelulares envolvendo mediadores bioativos solúveis e interações recetor-ligante aperfeiçoadas. As microvesículas podem, assim, ser responsáveis por transferir genes específicos ou pequenos organelos das CEM para os alvos lesados, de forma a exercer os seus efeitos protetores.¹⁶⁵

Mais recentemente, estas microvesículas mostraram mediar a transferência de mitocôndrias, derivadas de células estromais provenientes da medula óssea, para o epitélio alveolar num modelo de SDRA induzida por endotoxina. As células do estroma formaram canais de junção de hiato com o epitélio alveolar, libertando microvesículas contendo mitocôndrias, que o epitélio englobou. Estes canais de junção de hiato e as mitocôndrias transferidas desempenharam um papel fundamental na mediação dos efeitos terapêuticos das células do estroma.¹⁶⁶

Assim, as microvesículas agem como mediadores importantes da comunicação intercelular e exercem efeitos biológicos importantes sobre as células-alvo. Estudos futuros podem tentar a aplicação de microvesículas derivadas das CEM como uma possível abordagem terapêutica na SDRA.

4.1.2.4 Células modificadas geneticamente

Os primeiros estudos na biologia das células estaminais de adultos sugeriram que estas células poderiam ser geneticamente modificadas de forma a melhorar a sua deslocação para os tecidos lesados, particularmente para os locais de infeção. No entanto, tal como já foi referido, tem havido muita dificuldade em conseguir taxas de enxerto

substanciais o suficiente para alcançar o benefício terapêutico. Por esta razão, a utilização de genes modificados em células estaminais tem sido substituída pela utilização das células como veículos para a entrega de agentes terapêuticos. Tendo em conta as diversas proteínas e vias envolvidas nos mecanismos de proteção pulmonares já identificados, diversas estratégias de modificação genética têm sido desenvolvidas com o objetivo de melhorar a capacidade das CEM no combate à lesão pulmonar. Várias dessas estratégias têm como alvo os processos inflamatórios.¹⁵⁴

Numa nova abordagem para a administração de KGF no pulmão, Aguilar *et al.*, 2009, transduziram CEM derivadas da medula óssea e células estaminais hematopoiéticas de forma a expressarem KGF. Neste estudo, foi demonstrado que ambas as células protegeram contra a fibrose induzida por bleomicina, no entanto, as células estaminais hematopoiéticas atenuaram, em particular, danos histológicos tipicamente associados a este modelo de fibrose. Deste modo, este estudo apoia a utilização de células estaminais como vetores de agentes terapêuticos, mas também destaca a importância da especificidade da célula.¹⁶⁷

Mei *et al.*, 2007, administraram CEM com ou sem a transfeção do plasmídeo contendo o gene humano da Ang-1 em murganhos, 30 minutos após a instilação intratraqueal de endotoxina. A administração de CEM reduziu significativamente a inflamação pulmonar induzida, sendo que as células transfetadas com o gene da Ang-1 inverteram quase completamente o aumento de permeabilidade pulmonar induzida pela endotoxina. Isto foi demonstrado através da análise histológica, que confirmou uma diminuição acentuada no infiltrado inflamatório, no espessamento do septo interalveolar e no edema intersticial.¹⁶⁸

Xu *et al.*, 2008, foram os primeiros a usar CEM como veículos para a entrega de Ang-1 num modelo de rato com SDRA. Nas suas experiências, quer as CEM quer a Ang-1 sozinhas mostraram uma redução substancial na infiltração pulmonar de neutrófilos ou na expressão do TNF- α . No entanto, as CEM expressando Ang-1 reduziram estes parâmetros de forma mais marcada, o que significa que existe um efeito sinérgico das CEM e da Ang-1 no contexto da prevenção da inflamação induzida pela SDRA.¹⁶⁹

Mais recentemente, Saito *et al.*, 2011, produziram CEM geneticamente modificadas para não expressar CCL2^u. Estas células foram depois administradas por via intravenosa a ratos com fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Os resultados demonstraram que as CEM geneticamente modificadas reduziram substancialmente o infiltrado celular no pulmão, reduziram as IL-6 e IL-1 β , e melhoraram a sobrevida.¹⁷⁰

Em conjunto, estas técnicas fornecem excelentes evidências de que as células estaminais geneticamente modificadas, em particular as CEM, podem vir a constituir alternativas terapêuticas na SDRA. Outras investigações são, no entanto, necessárias para testar a eficácia e a segurança de abordagens individuais, bem como os possíveis efeitos sinérgicos de métodos combinados.

As CEM têm gerado um grande entusiasmo ao longo da última década como uma nova estratégia terapêutica para uma variedade de doenças pulmonares, incluindo a SDRA. A comunidade científica está entusiasmada com o potencial terapêutico das CEM devido aos seus efeitos anti-inflamatório, antifibrótico, antiapoptótico, antibacteriano e pró-reparador.¹³⁶

De entre todos os tipos de células estaminais, as CEM foram sugeridas como as melhores candidatas para o transplante alogénico, devido às suas propriedades imunomoduladoras e à sua capacidade de secretar fatores tróficos. A este respeito, as CEM deslocam-se especificamente para o tecido lesado e exercem as suas atividades, promovendo um ambiente seguro para a recuperação das células hospedeiras, e reparando e regenerando o tecido lesado.¹³⁶

Assim, as CEM administradas exogenamente modulam a função das células hospedeiras no local da lesão e o microambiente reparativo, quer por mecanismos parácrinos quer por mecanismos dependentes do contato célula-célula, envolvendo a secreção de mediadores específicos e a transferência de materiais celulares, tais como proteínas, ácidos nucleicos, e organelos celulares (incluindo as mitocôndrias) para as células hospedeiras lesadas através de microvesículas. Com base nisto, estudos pré-

^u CCL2 - citocina pró-inflamatória que recruta monócitos, células T, células dendríticas e fibrócitos para áreas de inflamação, estando associada ao desenvolvimento de fibrose pulmonar.¹⁵⁴

clínicos apresentaram resultados promissores utilizando CEM para doenças pulmonares, incluindo a SDRA.¹³⁶

Para além disso, a migração predominante de CEM para o tecido lesado pode ser utilizada para conceber estratégias terapêuticas, como por exemplo, para aplicar estas células como vetores para a entrega de veículos farmacológicos para o pulmão lesado ou para melhorar a terapia baseada em células, através da modulação da migração das CEM.¹⁵⁰

Atualmente, consideram-se como propriedades mais relevantes das CEM a capacidade de se deslocarem para os locais da inflamação após a lesão tecidual quando injetadas por via intravenosa, a capacidade de se diferenciarem em diferentes tipos de células, a capacidade de secretar várias moléculas bioativas, capazes de estimular a recuperação das células lesadas e inibir a inflamação, e a ausência de imunogenicidade, bem como a capacidade de realizar funções imunomoduladoras.¹⁷¹

Com base nestes resultados pré-clínicos promissores, vários ensaios clínicos em fase inicial começaram a investigar o potencial terapêutico destas células na SDRA.

Os estudos clínicos, publicados até à data, têm relatado que a administração de CEM é segura, e apresenta poucos efeitos adversos. Atualmente, três estudos estão em curso com a finalidade de avaliar a segurança destas células em doentes com SDRA.

Um estudo na China, avaliou a segurança da administração intravenosa de CEM alogénicas derivadas de tecido adiposo, na dosagem de 1×10^6 células/kg de peso corporal, em 20 indivíduos, tendo confirmado que esta técnica é segura (NCT01902082).¹¹⁵

Subsequentemente, na Universidade da Califórnia, um ensaio clínico de fase I avaliou a segurança da administração intravenosa de CEM derivadas da medula óssea, em 69 indivíduos, onde foram administradas doses crescentes em cada uma das três coortes em estudo: 1×10^6 células/kg de peso corporal, 5×10^6 células/kg de peso corporal e 10×10^6 células/kg de peso corporal. (NCT01775774) Este estudo prosseguiu para a fase II, onde está a ser avaliada a eficácia, para além da segurança, da administração do mesmo tipo de células na dose de 10×10^6 células/kg de peso corporal. Estima-se que este estudo esteja completo em Junho de 2016 (NCT02097641).¹¹⁵

Por fim, um estudo está a avaliar a segurança e eficácia da administração autóloga de CEM, em 10 doentes com SDRA. Estima-se que o estudo esteja terminado em Dezembro de 2016 (NCT02112500).¹¹⁵

No entanto, devido ao número relativamente pequeno de doentes que receberam esta terapia até à data, investigações adicionais devem ser realizadas para caracterizar de forma mais eficiente o seu perfil de segurança. A determinação da eficácia terapêutica das CEM na SDRA exigirá ensaios clínicos de fase III em grande escala, internacionais e multicêntricos.¹³⁶

Para além disso, estudos clínicos recentes utilizaram CEM fabricadas por diferentes empresas e por repositórios de células não-comerciais; assim, regulamentos e normas para a produção das CEM clínicas precisam ser definidas, incluindo especificações quanto aos métodos e critérios de cultura, armazenamento, transporte e administração das CEM.¹³⁶

Por fim, de forma a garantir o controlo de qualidade das CEM utilizadas, testes bacteriológicos, testes de viabilidade e fenotípicos, testes de oncogenicidade e ensaios com endotoxinas devem ser realizados. Também o momento certo e a duração da administração, a dose e a fonte das CEM, a melhor via de administração, bem como a posologia devem ser avaliados. Responder a estas questões emergentes permitirá uma tradução clínica mais rápida, confiável e eficaz da terapia com CEM na SDRA.¹³⁶

4.1.3 Células estaminais pluripotentes induzidas

As iPSCs são células somáticas adultas, como por exemplo fibroblastos dérmicos, submetidas a diferenciação na sequência de reprogramação por transdução, de forma a expressar quatro fatores de transcrição.¹¹¹ A natureza autóloga das células elimina o problema da rejeição imunitária associada às ESCs, no entanto, as iPSCs são comparáveis às ESCs em termos de morfologia, expressão génica e formação de teratomas. As aplicações potenciais das iPSCs na SDRA são numerosas, tal como apresentado na **Figura 3.3.**^{90,95}

Um estudo recente realizado por Yang *et al.*, 2011, relatou que as iPSCs administradas por via intravenosa têm um efeito protetor contra a SDRA quando os animais são lesados intratraquealmente com endotoxina. À semelhança de outros estudos, as iPSCs reduziram a resposta inflamatória mediada por NFkB e suprimiram a infiltração de neutrófilos no pulmão. Curiosamente, a administração intravenosa do meio de crescimento das iPSCs teve um efeito semelhante ao da inoculação de células inteiras, o que sugere que o efeito protetor observado pode resultar de fatores bioativos segregados.¹⁷²

Atualmente não existem estudos clínicos referentes à utilização de iPSCs na terapêutica de patologias respiratórias. A recente demonstração da diferenciação *in vitro* de iPSCs em células epiteliais alveolares do tipo II é, no entanto, um desenvolvimento importante.¹⁷³

Porém, há evidências que sugerem que as iPSCs não são tão pluripotentes como as ESCs. Além disso, as atuais técnicas de transdução de genes para a geração de células pluripotentes são impraticáveis no que respeita à produção de uma fonte de células estaminais clinicamente segura, especialmente para uma doença aguda, tal como a SDRA. Há ainda que considerar todos os aspetos relativos à utilização de iPSCs, assim como de ESCs, tais como a potencial formação de teratomas e os aspetos éticos.^{90,95}

5. Capítulo 5

5.1 Conclusão

A SDRA é a causa mais comum de insuficiência respiratória hipoxêmica aguda em doentes críticos, sendo desencadeada por uma diversidade de fatores e/ou doenças. Atualmente, o tratamento para a SDRA consiste apenas em cuidados de suporte, nomeadamente na aplicação de estratégias de ventilação de baixo volume corrente, dado ter sido até agora o único método terapêutico que apresentou melhorias nas taxas de mortalidade. Por este motivo, são necessários novos tratamentos.

Recentemente, vários investigadores têm demonstrado os efeitos benéficos da terapia baseada em células na SDRA. Dados os resultados iniciais obtidos em modelos pré-clínicos, nomeadamente no que concerne a uma melhoria nas taxas de mortalidade, houve um entusiasmo enorme por parte da comunidade científica para avançar com esta terapia em doentes com SDRA.

As primeiras observações do enxerto de células estaminais no pulmão foram um desenvolvimento promissor nos campos da biologia das células estaminais e da doença pulmonar. No entanto, não houve nenhum desenvolvimento para a melhoria do baixo número de células que podem realmente realizar este enxerto.

Muito do interesse atual nas células estaminais centra-se na secreção de fatores solúveis parácrinos, tais como fatores de crescimento, fatores que regulam a permeabilidade endotelial e epitelial, citocinas anti-inflamatórias e, mais recentemente, péptidos antimicrobianos. Isto porque estes fatores podem potencialmente tratar a maioria das anormalidades que fundamentam a SDRA, incluindo a debilitada clearance do fluído alveolar, o aumento da permeabilidade endotelial pulmonar, a inflamação desregulada e a infeção.

Atualmente, as CEM parecem mais próximas da tradução clínica, dada a evidência de que podem modular a resposta imunitária, mantendo a capacidade imune do hospedeiro, facilitando ainda a regeneração e a reparação pulmonares. Para além disso, de todas as células estaminais existentes, são aquelas que dispõem já de ensaios clínicos, com resultados promissores, que relatam a segurança da administração deste tipo de células.

Outras células estaminais, tais como as CEE e as CEPi, estão numa fase anterior do processo de tradução clínica, mas oferecem a esperança de substituir diretamente o

tecido pulmonar lesado. Também as células estaminais derivadas do pulmão podem oferecer a maior esperança para as doenças pulmonares, dado o seu papel na substituição e reparação dos tecidos pulmonares lesados.

No entanto, subsistem ainda lacunas no nosso conhecimento acerca das células estaminais. Em primeiro lugar, é necessária mais investigação para identificar a fonte, a dose, a via de administração e o tempo de administração ideais das células estaminais, a fim de se conseguir o tratamento mais eficiente e eficaz. Em segundo lugar, é importante compreender na integridade os mecanismos responsáveis pelos efeitos terapêuticos das células estaminais na SDRA, de modo a que a resposta fisiológica humana possa ser prevista com precisão. Em terceiro lugar, a falta de padronização para a preparação de células é um impedimento sério para a correlação dos resultados dos estudos clínicos e pré-clínicos. Finalmente, são necessários amplos estudos toxicológicos para aumentar a segurança das terapias baseadas em células.

Numa última análise, as células estaminais podem ser modificadas geneticamente e utilizadas como veículos para a entrega de agentes terapêuticos que desempenham um papel importante no controlo e na patogénese da SDRA, dada a deslocação destas células para os tecidos lesados, particularmente para os locais de infeção.

Deste modo, futuras investigações no campo da terapia baseada em células para o tratamento da SDRA devem continuar, e concentrar-se em elucidar os mecanismos básicos responsáveis pelos efeitos benéficos das células estaminais. Neste processo, uma nova e segura terapia para a síndrome pode surgir.

5.2 Referências Bibliográficas

1. Donahoe M. Acute respiratory distress syndrome: A clinical review. *Pulm Circ.* 2011;1(2):192–211. doi:10.4103/2045-8932.83454.
2. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, et al. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin Definition. *JAMA.* 2012;307(23):2526–33. doi:10.1001/jama.2012.5669.
3. Checkley W, Brower R, Korpak A, Thompson BT. Effects of a clinical trial on mechanical ventilation practices in patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(11):1215–22. doi:10.1164/rccm.200709-1424OC.
4. Johnson ER, Matthay MA. Acute Lung Injury: Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2010;23(4):243–252.
5. Bernard GR. Acute respiratory distress syndrome: a historical perspective. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(7):798–806. doi:10.1164/rccm.200504-663OE.
6. Ashbaugh D, Boyd Bigelow D, Petty T, Levine B. ACUTE RESPIRATORY DISTRESS IN ADULTS. *Lancet.* 1967;290(7511):319–323. doi:10.1016/S0140-6736(67)90168-7.
7. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1988;138(3):720–3. doi:10.1164/ajrccm/138.3.720.
8. Monchi M, Bellenfant F, Cariou A, et al. Early Predictive Factors of Survival in the Acute Respiratory Distress Syndrome A Multivariate Analysis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:1076–1081.
9. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al. *The American-European Consensus Conference on ARDS: Definitions, Mechanisms, Relevant Outcomes, and Clinical Trial Coordination.*; 1994:818–824.
10. Ferguson ND, Frutos-Vivar F, Esteban A, et al. Acute respiratory distress syndrome: Underrecognition by clinicians and diagnostic accuracy of three clinical definitions*. *Crit Care Med.* 2005;33(10):2228–2234. doi:10.1097/01.CCM.0000181529.08630.49.
11. Rubenfeld GD, Caldwell E, Granton J, Hudson LD, Matthay M a. Interobserver variability in applying a radiographic definition for ARDS. *Chest.* 1999;116(5):1347–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559098>.
12. Meade MO, Cook RJ, Guyatt GH, et al. Interobserver variation in interpreting chest radiographs for the diagnosis of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(1):85–90. doi:10.1164/ajrccm.161.1.9809003.
13. Villar J, Pérez-Méndez L, López J, et al. An early PEEP/FIO2 trial identifies different degrees of lung injury in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(8):795–804. doi:10.1164/rccm.200610-1534OC.

14. Gajic O, Dabbagh O, Park PK, et al. Early identification of patients at risk of acute lung injury: evaluation of lung injury prediction score in a multicenter cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(4):462–70. doi:10.1164/rccm.201004-0549OC.
15. Wiedemann HP, Wheeler AP, Bernard GR, et al. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *N Engl J Med*. 2006;354(24):2564–75. doi:10.1056/NEJMoa062200.
16. Walkey AJ, Summer R, Ho V, Alkana P. Acute respiratory distress syndrome: epidemiology and management approaches. *Clin Epidemiol*. 2012;4:159–69. doi:10.2147/CLEP.S28800.
17. Villar J, Blanco J, Añón JM, et al. The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. *Intensive Care Med*. 2011;37(12):1932–41. doi:10.1007/s00134-011-2380-4.
18. Ferguson ND, Fan E, Camporota L, et al. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care Med*. 2012;38(10):1573–82. doi:10.1007/s00134-012-2682-1.
19. Gao L, Barnes KC. Recent advances in genetic predisposition to clinical acute lung injury. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2009;296:713–725. doi:10.1152/ajplung.90269.2008.
20. Christie JD, Wurfel MM, Feng R, et al. Genome wide association identifies PPF1A1 as a candidate gene for acute lung injury risk following major trauma. *PLoS One*. 2012;7(1):e28268. doi:10.1371/journal.pone.0028268.
21. Meyer NJ, Li M, Feng R, et al. ANGPT2 genetic variant is associated with trauma-associated acute lung injury and altered plasma angiopoietin-2 isoform ratio. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(10):1344–53. doi:10.1164/rccm.201005-0701OC.
22. Glavan BJ, Holden TD, Goss CH, et al. Genetic variation in the FAS gene and associations with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(3):356–63. doi:10.1164/rccm.201003-0351OC.
23. Gong MN. Gene association studies in acute lung injury : replication and future direction. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2009;296(3):711–712. doi:10.1152/ajplung.90269.2008.5.
24. Kangelaris KN, Sapru A, Calfee CS, et al. The association between a Darc gene polymorphism and clinical outcomes in African American patients with acute lung injury. *Chest*. 2012;141(5):1160–9. doi:10.1378/chest.11-1766.
25. Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet*. 2007;369(9572):1553–64. doi:10.1016/S0140-6736(07)60604-7.
26. Iribarren C, Jacobs DR, Sidney S, Gross MD, Eisner MD. Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of ARDS: a 15-year cohort study in a managed care setting.

- Chest*. 2000;117(1):163–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10631215>.
27. Calfee CS, Matthay M a, Eisner MD, et al. Active and passive cigarette smoking and acute lung injury after severe blunt trauma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(12):1660–5. doi:10.1164/rccm.201011-1802OC.
 28. Anzueto a, Frutos-Vivar F, Esteban a, et al. Influence of body mass index on outcome of the mechanically ventilated patients. *Thorax*. 2011;66(1):66–73. doi:10.1136/thx.2010.145086.
 29. Gong MN, Bajwa EK, Thompson BT, Christiani DC. Body Mass Index is Associated with the Development of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Thorax*. 2011;65(1):44–50. doi:10.1136/thx.2009.117572.Body.
 30. Reilly JP, Meyer NJ, Shashaty MGS, et al. ABO blood type a is associated with increased risk of ards in whites following both major trauma and severe sepsis. *Chest*. 2014;145(4):753–761. Available at: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.13-1962>.
 31. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1685–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24158166>.
 32. Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M, et al. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(6):1849–61. doi:10.1164/ajrccm.159.6.9808136.
 33. Bersten AD, Edibam C, Hunt T, Moran J, The Australian and New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials Group. Incidence and Mortality of Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome in Three Australian States. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:443–448. doi:10.1164/rccm.2101124.
 34. MacCallum NS, Evans TW. Epidemiology of acute lung injury. *Curr Opin Crit Care*. 2005;11(1). Available at: http://journals.lww.com/cocriticalcare/Fulltext/2005/02000/Epidemiology_of_acute_lung_injury.7.aspx.
 35. Li G, Malinchoc M, Cartin-Ceba R, et al. Eight-year trend of acute respiratory distress syndrome: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(1):59–66. doi:10.1164/rccm.201003-0436OC.
 36. Frutos-Vivar F, Nin N, Esteban A. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care*. 2004;10:1–6.
 37. Estenssoro E, Dubin A, Laffaire E, et al. Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2002;30(11):2450–2456.
 38. Esteban A, Anzueto A, Frutos F, et al. Characteristics and Outcomes in Adult Patients Receiving Mechanical Ventilation A 28-Day International Study. *JAMA J Am Med Assoc*. 2002;287(3):345–355.

39. Stapleton RD, Wang BM, Hudson LD, Rubenfeld GD, Caldwell ES, Steinberg KP. Causes and timing of death in patients with ARDS. *Chest*. 2005;128(2):525–32. doi:10.1378/chest.128.2.525.
40. Flori HR, Glidden D V, Rutherford GW, Matthay MA. Pediatric acute lung injury Prospective Evaluation of Risk Factors Associated with Mortali. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:995–1001.
41. Eisner MD, Thompson T, Hudson LD, et al. Efficacy of low tidal volume ventilation in patients with different clinical risk factors for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(2):231–6. doi:10.1164/ajrccm.164.2.2011093.
42. Erickson SE, Martin GS, Davis JL, Matthay MA, Eisner MD. Recent Trends in Acute Lung Injury Mortality: 1996-2005. *Crit Care Med*. 2009;37(5):1574–1579. doi:10.1097/CCM.0b013e31819fefdf.Recent.
43. Herridge MS, Tansey CM, Sc M, et al. Functional Disability 5 Years after Acute Respiratory Distress Syndrome. 2011;364(14):1293–1304.
44. Wang CY, Calfee CS, Paul DW, et al. One-year mortality and predictors of death among hospital survivors of acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med*. 2014;40(3):388–96. doi:10.1007/s00134-013-3186-3.
45. Wilcox ME, Patsios D, Murphy G, et al. Radiologic outcomes at 5 years after severe ARDS. *Chest*. 2013;143(4):920–6. doi:10.1378/chest.12-0685.
46. Cox CE, Docherty SL, Brandon DH, et al. Surviving Critical Illness: The Acute Respiratory Distress Syndrome as Experienced by Patients and Their Caregivers. *Crit Care Med*. 2009;37(10):2702–2708. doi:10.1097/CCM.0b013e3181b6f64a.Surviving.
47. Matthay M a, Zimmerman G a. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;33(4):319–27. doi:10.1165/rcmb.F305.
48. Bosma K, Taneja R, Lewis J. Pharmacotherapy for Prevention and Treatment of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Drugs*. 2010;70(10):1255–1282. doi:10.2165/10898570-000000000-00000.
49. Zemans RL, Colgan SP, Downey GP. Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;40(5):519–35. doi:10.1165/rcmb.2008-0348TR.
50. Cepkova M, Matthay MA. Pharmacotherapy of Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Intensive Care Med*. 2006;21(3):119–143. doi:10.1177/0885066606287045.Pharmacotherapy.
51. Ginzberg HH, Cherapanov V, Dong Q, et al. Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281(3):G705–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518683>.

52. Tsushima K, King LS, Aggarwal NR, De Gorordo A, D'Alessio FR, Kubo K. Acute Lung Injury Review. *Intern Med*. 2009;48(9):621–630. doi:10.2169/internalmedicine.48.1741.
53. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2731–2740. doi:10.1172/JCI60331.on.
54. Fanelli V, Vlachou A, Ghannadian S, Simonetti U, Slutsky AS, Zhang H. Acute respiratory distress syndrome: new definition, current and future therapeutic options. *J Thorac Dis*. 2013;5(3):326–34. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2013.04.05.
55. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, et al. Effect of Mechanical Ventilation on Inflammatory Mediators in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Am Med Assoc*. 1999;281(1):54–61.
56. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000;342(18):1301–1308.
57. Caironi P, Cressoni M, Chiumello D, et al. Lung opening and closing during ventilation of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(6):578–86. doi:10.1164/rccm.200905-0787OC.
58. Briel M, Meade M, Mercat A, et al. Higher vs Lower Positive End-Expiratory Pressure in Patients With Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Am Med Assoc*. 2010;303(9):865–873.
59. Gattinoni L, Tognoni G, Pesenti A, et al. Effect of prone positioning on the survival of patients with acute respiratory failure. *N Engl J Med*. 2001;345(8):568–573.
60. Taccone P, Pesenti A, Latini R, et al. Prone Positioning in Patients With Moderate and Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Am Med Assoc*. 2009;302(18):1977–1984.
61. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley M a, et al. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*. 1991;88(6):1976–81. doi:10.1172/JCI115523.
62. Albert RK. The role of ventilation-induced surfactant dysfunction and atelectasis in causing acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(7):702–8. doi:10.1164/rccm.201109-1667PP.
63. Kerr CL, Ito Y, Manwell SEE, et al. Effects of surfactant distribution and ventilation strategies on efficacy of exogenous surfactant. *J Appl Physiol*. 1998;85:676–684.
64. Kaisers U, Busch T, Deja M, Donaubaue B, Falke KJ. Selective pulmonary vasodilation in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2003;31(4 Suppl):S337–42. doi:10.1097/01.CCM.0000057913.45273.1A.
65. Cornet AD, Hofstra JJ, Swart EL, Girbes ARJ, Juffermans NP. Sildenafil attenuates pulmonary arterial pressure but does not improve oxygenation during ARDS. *Intensive Care Med*. 2010;36(5):758–64. doi:10.1007/s00134-010-1754-3.

66. Rossaint R, Falke KJ, López F, et al. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 1993;328(6):399–405.
67. Rimar S, Gillis CN. Selective pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide is due to hemoglobin inactivation. *Circulation*. 1993;88(6):2884–2887. doi:10.1161/01.CIR.88.6.2884.
68. Afshari A, Brok J, Am M, Wetterslev J. Inhaled nitric oxide for acute respiratory distress syndrome (ARDS) and acute lung injury in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(7).
69. Infarmed. Infomed - Base de dados de medicamentos de uso humano. 2013. Available at: <https://www.infarmed.pt/infomed/inicio.php>.
70. Afshari A, Brok J, Am M, Wetterslev J. Aerosolized prostacyclin for acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(8).
71. Sawheny E, Ellis AL, Kinasewitz GT. Iloprost improves gas exchange in patients with pulmonary hypertension and ARDS. *Chest*. 2013;144(1):55–62. doi:10.1378/chest.12-2296.
72. Davis WB, Wilson HE, Wall RL. Eosinophilic Alveolitis in Acute Respiratory Failure A Clinical Marker for a Non-Infectious Etiology. *Clin Investig*. 1986:7–10.
73. Meduri GU, Golden E, Freire AX, et al. Methylprednisolone infusion in early severe ARDS: results of a randomized controlled trial. *Chest*. 2007;131(4):954–63. doi:10.1378/chest.06-2100.
74. The National Heart Lung and Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Clinical Trials Network. Efficacy and Safety of Corticosteroids for Persistent Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*. 2006;354(16):1671–1684.
75. Tang BMP, Craig JC, Eslick GD, Seppelt I, McLean AS. Use of corticosteroids in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*. 2009;37(5):1594–603. doi:10.1097/CCM.0b013e31819fb507.
76. Meduri GU, Marik PE, Chrousos GP, et al. Steroid treatment in ARDS: a critical appraisal of the ARDS network trial and the recent literature. *Intensive Care Med*. 2008;34(1):61–9. doi:10.1007/s00134-007-0933-3.
77. Peter JV, John P, Graham PL, Moran JL, George IA, Bersten A. Corticosteroids in the prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in adults: meta-analysis. *BMJ*. 2008;336(7651):1006–9. doi:10.1136/bmj.39537.939039.BE.
78. Matthay M a, Folkesson HG, Clerici C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev*. 2002;82(3):569–600. doi:10.1152/physrev.00003.2002.

79. Perkins GD, McAuley DF, Thickett DR, Gao F. The beta-agonist lung injury trial (BALTI): a randomized placebo-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(3):281–7. doi:10.1164/rccm.200508-1302OC.
80. Gao Smith F, Perkins GD, Gates S, et al. Effect of intravenous β -2 agonist treatment on clinical outcomes in acute respiratory distress syndrome (BALTI-2): a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;379(9812):229–35. doi:10.1016/S0140-6736(11)61623-1.
81. Papazian L, Forel J-M, Gacouin A, et al. Neuromuscular Blockers in Early Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*. 2010;363(12):1107–1116.
82. Craig TR, Duffy MJ, Shyamsundar M, et al. A randomized clinical trial of hydroxymethylglutaryl- coenzyme a reductase inhibition for acute lung injury (The HARP Study). *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(5):620–6. doi:10.1164/rccm.201003-0423OC.
83. Walkey AJ, Wiener RS. Macrolide antibiotics and survival in patients with acute lung injury. *Chest*. 2012;141(5):1153–9. doi:10.1378/chest.11-1908.
84. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ketoconazole for Early Treatment of Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome A Randomized Controlled Trial. *J Am Med Assoc*. 2000;283(15):1995–2002.
85. Bernard GR, Wheeler AP, Arons MM, et al. A Trial of Antioxidants N-acetylcysteine and Procysteine in ARDS. *J Clin Invest Crit Care*. 1997;112:164–172.
86. Heyland D, Muscedere J, Wischmeyer PE, et al. A randomized trial of glutamine and antioxidants in critically ill patients. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1489–97. doi:10.1056/NEJMoa1212722.
87. The ARDS Clinical Trials Network, The National Heart Lung and Blood Institute, National Institutes of Health. Randomized, placebo-controlled trial of lisofylline for early treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 2002;30(1). Available at: http://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2002/01000/Randomized,_placebo_controlled_trial_of.1.aspx.
88. Bernard GR, Wheeler AP, Russell JA, et al. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. *N Engl J Med*. 1997;336(13):912–918.
89. Sylvester KG, Longaker MT. Stem Cells - Review and Update. *Arch Surg*. 2004;139.
90. Sanders S. The Future is Now. In: *Stem Cells in Review*. Science; 2012:2.
91. Avasthi S, Srivastava RN, Singh A, Srivastava M. Stem Cell: Past, Present and Future - A Review Article. *Internet J Med Updat*. 2008;3(1):22–30.
92. Tuch BE. Stem cells--a clinical update. *Aust Fam Physician*. 2006;35(9):719–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16969445>.

93. Brignier AC, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S336–44. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.032.
94. Borge OJ. Embryonic and Adult Stem Cells. *Acta Vet Scand.* 2002;99:39–43.
95. Liras A. Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects. *J Transl Med.* 2010;8(1):131. doi:10.1186/1479-5876-8-131.
96. Jones M. Stem cells diagram. 2006. Available at: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3c/Stem_cells_diagram.png. Accessed February 11, 2014.
97. Zech NH, Shkumatov A, Koestenbauer S. The magic behind stem cells. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24(6):208–14. doi:10.1007/s10815-007-9123-z.
98. Abreu SC, Maron-Gutierrez T, Garcia CSNB, Morales MM, Rocco PRM. Stem Cells and Respiratory Diseases. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2008;51:23–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652321>.
99. Vazin T, Freed WJ. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci.* 2010;28(4):589–603. doi:10.3233/RNN-2010-0543.
100. Thomson J a. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science (80-).* 1998;282(5391):1145–1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145.
101. Yabut O, Bernstein HS. The promise of human embryonic stem cells in aging-associated diseases. *Aging (Albany NY).* 2011;3(5):494–508. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3156600&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
102. Lovell-badge R. The future for stem cell research. *Nature.* 2001;414:88–91.
103. Leist M, Bremer S, Brundin P, et al. The biological and ethical basis of the use of human embryonic stem cells for in vitro test systems or cell therapy. *ALTEX.* 2008;25(3):163–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18841314>.
104. Leeb C, Jurga M, McGuckin C, et al. New perspectives in stem cell research: beyond embryonic stem cells. *Cell Prolif.* 2011;44 Suppl 1:9–14. doi:10.1111/j.1365-2184.2010.00725.x.
105. Koch C a, Jordan CE, Platt JL. Complement-dependent control of teratoma formation by embryonic stem cells. *J Immunol.* 2006;177(7):4803–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982921>.
106. Prentice DA. Adult stem cells. *Issues Law Med.* 2004;19:265–94.
107. Alison M, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol.* 2009;217(November 2008):144–160. doi:10.1002/path.

108. Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25(4):818–27. doi:10.1634/stemcells.2006-0589.
109. Gruh I, Martin U. Transdifferentiation of Stem Cells : A Critical View. In: *Engineering of Stem Cells*.; 2009:73–106. doi:10.1007/10.
110. Eberhard D, Tosh D. Transdifferentiation and metaplasia as a paradigm for understanding development and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(1):33–40. doi:10.1007/s00018-007-7428-9.
111. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
112. Sommer C a, Mostoslavsky G. Experimental approaches for the generation of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(3):26. doi:10.1186/scrt26.
113. Obokata H, Wakayama T, Sasai Y, et al. Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature*. 2014;505(7485):641–647. doi:10.1038/nature12968.
114. Regateiro F, Soares J, Antunes JL, Fevereiro P, Cabral RA, Renaud CM. *Relatório sobre a investigação em células estaminais*.; 2005:1–46.
115. US National Institutes of Health. Clinical Trials. 2014. Available at: <https://clinicaltrials.gov/>.
116. Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001;105(3):369–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348593>.
117. Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, et al. Bone Marrow-Derived Progenitor Cells Are Important for Lung Repair after Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury. *J Immunol*. 2004;172(2):1266–1272. doi:10.4049/jimmunol.172.2.1266.
118. Hayes M, Curley G, Ansari B, Laffey JG. Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome - hope or hype? *Crit Care*. 2012;16(2):205. doi:10.1186/cc10570.
119. Mei SHJ, Haitsma JJ, Dos Santos CC, et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(8):1047–57. doi:10.1164/rccm.201001-0010OC.
120. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells*. 2010;28(12):2229–38. doi:10.1002/stem.544.
121. Mei SHJ, 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. doi:10.1371/journal.pmed.0040269.

122. Roszell B, Mondrinos MJ, Seaton A, et al. Efficient derivation of alveolar type II cells from embryonic stem cells for in vivo application. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(11):3351–65. doi:10.1089/ten.TEA.2008.0664.
123. Wang D, Haviland DL, Burns AR, Zsigmond E, Wetsel R a. A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(11):4449–54. doi:10.1073/pnas.0700052104.
124. Van Vranken B, Romanska H, Polak J, Rippon H, Shannon J, Bishop A. Coculture of Embryonic Stem Cells with Pulmonary Mesenchyme: A Microenvironment That Promotes Differentiation of Pulmonary Epithelium. *Tissue Eng*. 2005;11(7-8):1177–1187. doi:10.1089/ten.2005.11.1177.
125. Wang D, Morales JE, Calame DG, Alcorn JL, Wetsel R a. Transplantation of human embryonic stem cell-derived alveolar epithelial type II cells abrogates acute lung injury in mice. *Mol Ther*. 2010;18(3):625–34. doi:10.1038/mt.2009.317.
126. Toya S, Li F, Bonini M, et al. Interaction of a specific population of human embryonic stem cell-derived progenitor cells with CD11b+ cells ameliorates sepsis-induced lung inflammatory injury. *Am J Pathol*. 2011;178:313–324.
127. Hemmen K, Reinl T, Buttler K, et al. High-resolution mass spectrometric analysis of the secretome from mouse lung endothelial progenitor cells. *Angiogenesis*. 2011;14(2):163–172.
128. Lam C-F, Liu Y-C, Hsu J-K, et al. Autologous transplantation of endothelial progenitor cells attenuates acute lung injury in rabbits. *Anesthesiology*. 2008;108(3):392–401. doi:10.1097/ALN.0b013e318164ca64.
129. Mao M, Wang S-N, Lv X-J, Wang Y, Xu J-C. Intravenous delivery of bone marrow-derived endothelial progenitor cells improves survival and attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. *Shock*. 2010;34(2):196–204. doi:10.1097/SHK.0b013e3181d49457.
130. Burnham EL, Taylor WR, Quyyumi A a, Rojas M, Brigham KL, 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. doi:10.1164/rccm.200410-1325OC.
131. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(7):1185–9. doi:10.1161/01.ATV.0000073832.49290.B5.
132. Giangreco A, Arwert EN, Rosewell IR, Snyder J, Watt FM, Stripp BR. Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(23):9286–91. doi:10.1073/pnas.0900668106.
133. Kajstura J, Rota M, Hall SR, et al. Evidence for Human Lung Stem Cells. *N Engl J Med*. 2011;364(19):1795–1806.

134. Chapman HA, Li X, Alexander JP, et al. Integrin $\alpha 6\beta 4$ identifies an adult distal lung epithelial population with regenerative potential in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2855–2862. doi:10.1172/2855.
135. Hegab AE, Ha VL, Gilbert JL, et al. Novel stem/progenitor cell population from murine tracheal submucosal gland ducts with multipotent regenerative potential. *Stem Cells*. 2011;29(8):1283–93. doi:10.1002/stem.680.
136. Antunes M a, Laffey JG, Pelosi P, Rocco PR. Mesenchymal Stem Cell Trials for Pulmonary Diseases. *J Cell Biochem*. 2014;(February). doi:10.1002/jcb.24783.
137. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7. doi:10.1080/14653240600855905.
138. Li W-W, Wei Y-H, Li H, Lai D-M, Lin T-N. Isolation and characterization of a novel strain of mesenchymal stem cells from mouse umbilical cord: potential application in cell-based therapy. *PLoS One*. 2013;8(8):e74478. doi:10.1371/journal.pone.0074478.
139. Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 11):2204–13. doi:10.1242/jcs.02932.
140. Ostanin AA, Petrovskii YL, Shevela EY, Chernykh ER. Multiplex Analysis of Cytokines, Chemokines, Growth Factors, MMP-9 and TIMP-1 Produced by Human Bone Marrow, Adipose Tissue, and Placental Mesenchymal Stromal Cells. *Bull Exp Biol Med*. 2011;151(1):133–141. doi:10.1007/s10517-011-1275-2.
141. Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A, Howard JP, Matthay MA. Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: Role of paracrine soluble factors. *Natl Institutes Heal*. 2011;29(6):913–919. doi:10.1002/stem.643.Concise.
142. Moodley Y, Manuelpillai U, Weiss DJ. Cellular therapies for lung disease: a distant horizon. *Respirology*. 2011;16(2):223–37. doi:10.1111/j.1440-1843.2010.01914.x.
143. Prockop DJ, Kota DJ, Bazhanov N, Reger RL. Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). *J Cell Mol Med*. 2010;14(9):2190–9. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01151.x.
144. Pittenger MF, Mackay a M, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102814>.
145. Kotton DN, Ma BY, Cardoso W V, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*. 2001;128(24):5181–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11748153>.
146. Suratt BT, Cool CD, Serls AE, et al. Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(3):318–22. doi:10.1164/rccm.200301-145OC.

147. Ortiz L a, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8407–11. doi:10.1073/pnas.1432929100.
148. Rojas M, Xu J, Woods CR, 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. doi:10.1165/rcmb.2004-0330OC.
149. Wang Y-Y, Li X-Z, Wang L-B. Therapeutic implications of mesenchymal stem cells in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):45. doi:10.1186/scrt193.
150. Xu F, Hu Y, Zhou J, Wang X. Mesenchymal stem cells in acute lung injury: are they ready for translational medicine? *J Cell Mol Med*. 2013;17(8):927–35. doi:10.1111/jcmm.12063.
151. Lee JW, Gupta N, Fang X, Frank JA, Briot R, Matthay MA. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:16357–16362.
152. Fang X, Neyrinck AP, Matthay MA, Lee JW. Allogeneic human mesenchymal stem cells restore epithelial protein permeability in cultured human alveolar type ii cells by secretion of angiopoietin-1. *J Biol Chem*. 2010;285:26211–26222.
153. Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay M a. Intrapulmonary Delivery of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Survival and Attenuates Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Mice. *J Immunol*. 2007;179(3):1855–1863. doi:10.4049/jimmunol.179.3.1855.
154. W. Bonvillain R. Battling Inflammation in Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome: Stem Cell-Based Therapy Targeting the Root Cause of Acute Lung Injury. *J Pulm Respir Med*. 2011;01(02):1–8. doi:10.4172/2161-105X.S2-001.
155. Iyer SS, Rojas M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Cell- Tissue-based Ther*. 2008:569–582.
156. Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther*. 2012;20(1):14–20. doi:10.1038/mt.2011.211.
157. Ortiz L a, Dutreil M, Fattman C, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(26):11002–7. doi:10.1073/pnas.0704421104.
158. Kim ES, Chang YS, Choi SJ, et al. Intratracheal transplantation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells attenuates Escherichia coli-induced acute lung injury in mice. *Respir Res*. 2011;12(1):108. doi:10.1186/1465-9921-12-108.
159. Li J, Li D, Liu X, Tang S, Wei F. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce systemic inflammation and attenuate LPS-induced acute lung injury in rats. *J Inflamm (Lond)*. 2012;9(1):33. doi:10.1186/1476-9255-9-33.

160. Curley GF, Hayes M, Ansari B, et al. Mesenchymal stem cells enhance recovery and repair following ventilator-induced lung injury in the rat. *Thorax*. 2012;67(6):496–501. doi:10.1136/thoraxjnl-2011-201059.
161. Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One*. 2010;5(2):e9252. doi:10.1371/journal.pone.0009252.
162. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen P, Mayer B, Parmelee A. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin e(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009;15:42–49.
163. Meisel R, Brockers S, Heseler K, et al. Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia*. 2011;25(4):648–654. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2010.310>.
164. Gupta N, Krasnodembskaya A, Kapetanaki M, et al. Mesenchymal stem cells enhance survival and bacterial clearance in murine Escherichia coli pneumonia. *Thorax*. 2013;67(6):533–539. doi:10.1136/thoraxjnl-2011-201176.Mesenchymal.
165. Ratajczak MZ. The emerging role of microvesicles in cellular therapies for organ/tissue regeneration. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(5):1453–6. doi:10.1093/ndt/gfr165.
166. Islam MN, Das SR, Emin MT, et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med*. 2012;18(5):759–765. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2736>.
167. Aguilar S, Scotton CJ, McNulty K, et al. Bone marrow stem cells expressing keratinocyte growth factor via an inducible lentivirus protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 2009;4(11):e8013. doi:10.1371/journal.pone.0008013.
168. McCarter SD, Mei SHJ, Lai PFH, et al. Cell-based angiopoietin-1 gene therapy for acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(10):1014–26. doi:10.1164/rccm.200609-1370OC.
169. Xu J, Qu J, Cao 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):472–481. doi:10.1002/path.2302.
170. Saito S, Nakayama T, Hashimoto N, et al. Mesenchymal stem cells stably transduced with a dominant-negative inhibitor of CCL2 greatly attenuate bleomycin-induced lung damage. *Am J Pathol*. 2011;179(3):1088–94. doi:10.1016/j.ajpath.2011.05.027.
171. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*. 2012;5(1):19. doi:10.1186/1756-8722-5-19.
172. Yang K-Y, Shih H-C, How C-K, et al. IV delivery of induced pluripotent stem cells attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Chest*. 2011;140(5):1243–53. doi:10.1378/chest.11-0539.

173. Alipio Z a, Jones N, Liao W, et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) induced by bleomycin or TGF(b1)/EGF in murine induced pluripotent stem cell-derived alveolar Type II-like cells. *Differentiation*. 2011;82(2):89–98. doi:10.1016/j.diff.2011.05.001.
174. Givertz MM. Noncardiogenic pulmonary edema. *UpToDate*. 2014. Available at: <http://www.uptodate.com/contents/noncardiogenic-pulmonary-edema>. Accessed September 8, 2014.
175. National Library of Medicine - Medical Subject Headings (MeSH). Lung compliance. 2011. Available at: http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2011/MB_cgi?mode=&term=Lung+compliance. Accessed September 8, 2014.
176. Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary. Positive End-Expiratory Pressure (PEEP). 2007. Available at: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/positive+end-expiratory+pressure+%28PEEP%29>. Accessed September 8, 2014.
177. Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida. *Modelo de Consentimento Informado para a Criopreservação de Embriões.*; 2013:1–2.
178. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, et al. Cecal Ligation and Puncture. *Shock*. 2005;24(Supplement 1):52–57. doi:10.1097/01.shk.0000191414.94461.7e.