



AUTORIZAÇÃO Nº DE38662006MPC

ESCANAL

REVISTA DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE BIOQUÍMICA

n.º 7 DEZEMBRO 2010

ENCONTROS E SOCIEDADES CIENTÍFICAS



FICHA TÉCNICA

COORDENAÇÃO CIENTÍFICA

João Varela (CCMAR, U. Algarve)

EQUIPA EDITORIAL

Francisco Ambrósio (IBILI, U. Coimbra)

Graça Soveral (REQUIMTE, U. Lisboa)

Leonor Cancela (CCMAR, U. Algarve)

Claúdio Soares (ITQB, UNL)

Nuno Santos (FM, U. Lisboa)

DESIGN GRÁFICO E PAGINAÇÃO

Paulo Simão

(paulosimao@yahoo.com)

TIRAGEM

Versão electrónica

PERIODICIDADE

Quadrimestral

PROPRIETÁRIO

Sociedade Portuguesa de Bioquímica

E-MAIL

canalbq@spb.pt

URL

www.canalbq.spb.pt

ÍNDICE

3.
Editorial
João Varela

4.
?
?

7.
?
?

10.
?
?

12.
?
?

14.
?
?

15.
?
?

21.
?



João Varela

EDITORIAL



Graças ao convite do director cessante e actual presidente da Sociedade Portuguesa de Bioquímica, e com a aprovação da direcção da SPB, foi-me dada a oportunidade de continuar o projecto editorial da SPB, designado por Canal bq. Esta oportunidade é, sem dúvida, um desafio e traz grandes responsabilidades. Canal bq — daí o seu nome — foi concebido para ser um canal de comunicação da comunidade que ensina, investiga e negocia no grande mundo que é a bioquímica e campos afins, que vão desde a biotecnologia até à medicina. Desde o início que um dos objectivos deste canal de comunicação é expandir a bioquímica para além da academia e unidades de I&D e abraçar a Sociedade, explicando os impactos que a bioquímica tem e pode ter no “Mundo Real”.

Com este novo número, pretendo iniciar um rumo um pouco diferente dos anteriores, privilegiando mais os artigos de revisão científica, e menos as entrevistas e os artigos de opinião, embora estes não sejam excluídos completamente da política editorial do Canal bq. Porém, tenho a firme intenção de manter o carácter temático de cada número. Deste modo, este número é dedicado a um tema actual que, embora potencialmente polémico, oferece grandes promessas para o futuro, nomeadamente na área da medicina regenerativa: células estaminais.

É muito provável que a maioria de vós já tenha ouvido falar sobre células estaminais, mas talvez desconheça as várias propriedades que as caracterizam, aplicações, funções, interacções com a bioengenharia e nanotecnologia, e o número de grupos que trabalham em Portugal com este tipo de células. Com este número do Canal bq, pretende-se não só divulgar alguns grupos portugueses que realizam I&D sobre células estaminais, mas também explicar o que elas são, para que servem, e como são (ou poderão ser) cultivadas. Os primeiros dois artigos (Bragança et al. e Correia & Bragança) são propositadamente introdutórios ao tema, sendo escritos em português. Os restantes, escritos em português ou em inglês, são mais específicos e aprofundam o tema. Esta variedade de tratamentos científicos, relativamente acessíveis a estudantes e a profissionais que se interessam por ciência, não deixam de sumarizar o melhor que se faz em Portugal e no mundo. De modo a potenciar a compreensão dos artigos deste número, pedi aos autores que escrevessem um glossário com definições de termos chave, introduzidos a negrito.

Espero, sinceramente, que este número seja uma importante contribuição para uma melhor compreensão das potencialidades das células estaminais, mas também das consequências éticas a elas associadas. O modo como as células estaminais embrionárias humanas são obtidas tem repercussões muito semelhantes às levantadas pela Interrupção Voluntária da Gravidez (vulgo “aborto”), pois para as obter é necessário a destruição de blastocistos, um estágio do desenvolvimento que antecede a formação do embrião e a placenta. Porém, neste número são apresentadas alternativas muito promissoras às células estaminais embrionárias, que não implicam a desagregação de blastocistos, resolvendo, em larga medida, este problema bioético.

Por fim, desejo agradecer aos autores que contribuíram com o produto do seu esforço, tanto na forma de textos, como figuras e diagramas, que foram concebidas propositadamente para este número.

Células estaminais e medicina regenerativa

Um admirável mundo novo

José Bragança ^{1,2}, Álvaro Tavares ^{1,2} e José A. Belo ^{1,2}

1 Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

2 IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centro de Biomedicina Molecular e Estrutural, UAlg.

Correspondência: jebra@ualg.pt

RESUMO

O progresso da investigação no domínio das células estaminais mostrou o seu enorme potencial como fonte de células ou de tecidos para terapias regenerativas, terapias génicas, descoberta de novos fármacos, e identificação dos mecanismos de aparecimento e desenvolvimento de doenças. Nesta revisão, apresentamos os diversos tipos de células estaminais com as suas características específicas, destacando algumas das suas aplicações em medicina regenerativa e terapia celular.

INTRODUÇÃO

As células estaminais definem-se por duas propriedades básicas: a capacidade de se auto-renovarem indefinidamente num estado indiferenciado e a possibilidade de se diferenciarem num ou mais tipos de células especializadas (Fig. 1 e Tabela 1). O trabalho com **células estaminais embrionárias** (células ES, *Embryonic Stem cells*) de ratinho tem sido uma ferramenta inestimável na compreensão dos processos do desenvolvimento embrionário inicial, bem como no estabelecimento das bases moleculares da **pluripotência** e da **auto-renovação celular**. Para além disso, por permitir a criação de animais transgénicos (*knock-outs*) através de recombinação homóloga, estas são determinantes no estudo da função genética in vivo. Não menos importante, os estudos das células ES de ratinho abriram o caminho à investigação das células ES hu-

manas que, dada a sua capacidade de auto-renovação e diferenciação, têm um elevado potencial para uso em terapia celular [1, 2] (Fig. 2, Tabelas 1 e 2).

Para além das células estaminais embrionárias, há ainda as **células estaminais “adultas”**, que servem para manter as funções dos tecidos e órgãos onde estão presentes, bem como reparar lesões nos tecidos em caso de trauma [1, 2] (Fig. 2). A diminuição da população de células estaminais é característica de algumas doenças, por exemplo, em defeitos da medula óssea, devido à malignidade das células estaminais hematopoiéticas (resultando em leucemias e linfomas) ou a defeitos genéticos nas próprias células estaminais hematopoiéticas (anemia de Fanconi, por exemplo). Outras doenças envolvem a destruição de tecidos que não podem ser regenerados robustamente a partir da população

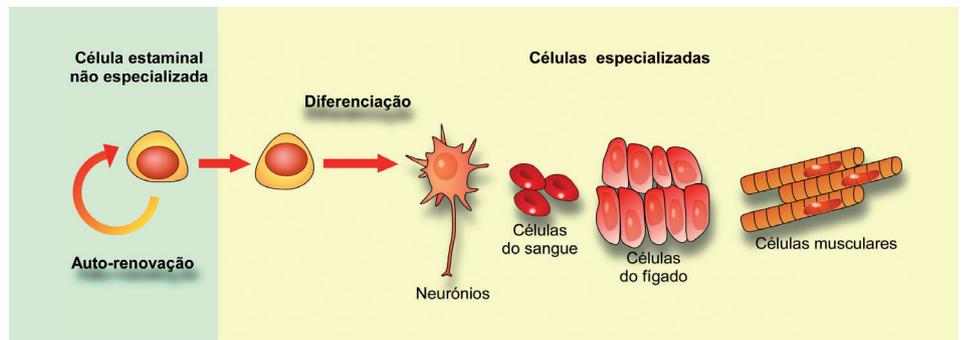


Figura 1. Propriedades das células estaminais. As células estaminais são células não especializadas que são capazes de se auto-renovar indefinidamente, e assim dar origem a novas células estaminais não especializadas (em fundo verde), mas também têm a possibilidade de se diferenciar em um ou múltiplos tipos de células especializadas sob condições definidas (em fundo amarelo).

Tabela 1 – Características das células estaminais.

Características	Células estaminais embrionárias	Células estaminais pluripotentes induzidas	Células estaminais adultas
Auto-renovação	Capacidade ilimitada para manter as propriedades estaminais quando se dividem	Capacidade ilimitada para manter as propriedades estaminais quando se dividem	Capacidade ilimitada para manter as propriedades estaminais quando se dividem
Potencial de diferenciação	Pluripotentes	Pluripotentes	Multipotentes ou unipotentes (células específicas dos tecidos ou órgãos onde estão localizadas)
Fonte de isolamento	Massa Celular Interna do epiblasto pre-implantado (células ES) ou pós-implantado (EpiSC)	Células somáticas diferenciadas	Tecidos adultos e fetais
Proliferação em cultura	Ilimitada	Ilimitada	Limitada
Crescimento celular em situação de confluência	Sem inibição de contacto	Sem inibição de contacto	Com inibição de contacto
Marcadores específicos*	Factores de transcrição: Oct4, Nanog, Sox2	Factores de transcrição: Oct4, Nanog, Sox2	Factores de transcrição: diferentes consoante os tipos celulares mas não há expressão de Nanog e Oct4
	Antígenos de superfície celular: SSEA1 (ratinho), SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 (humana)	Antígenos de superfície celular: SSEA1 (ratinho), SSEA3, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81 (humana)	Antígenos de superfície celular: diferentes consoante os tipos celulares mas não há expressão de antígenos SSEA e TRA
	Outros: fosfatase alcalina, telomerase	Outros: fosfatase alcalina, telomerase	Outros: diferentes consoante os tipos celulares mas não há expressão de fosfatase alcalina, telomerase
Vantagens para terapias	Fonte ilimitada de células indiferenciadas e grande capacidade de diferenciação	Fonte ilimitada de células autólogas indiferenciadas e grande capacidade de diferenciação, não apresentam considerações éticas	Fonte autólogas de células, não apresentam considerações éticas, não há riscos de formar teratomas
Limitações para terapias	Considerações éticas porque são isoladas a partir de embriões, risco de histoincompatibilidade e formação de teratomas	Riscos de formação de teratomas e outros cânceros por causa do processo de reprogramação	Existem em pequenas quantidades e são difíceis de isolar/caracterizar, com capacidade de diferenciação limitada e amplificação extensiva difícil <i>in vitro</i>

* SSEA - stage-specific embryonic antigen, TRA - tumor-rejection antigen.

residual de células estaminais, como por exemplo a diabetes tipo 1 (devida à destruição auto-imune das células pancreáticas beta). Em alguns casos, estas doenças podem ser tratadas por transplante do órgão em falência (para tratar insuficiências cardíacas, hepáticas ou pancreáticas, por exemplo), ou por substituição da população de células estaminais (como no caso de transplante de medula óssea). No entanto, o transplante de órgãos apresenta várias limitações, a maior sendo a falta de dadores de órgãos e de tecidos, com a dificuldade acrescida de restrições de compatibilidade entre dador e receptor. Houve, por isso, na década passada, um grande interesse em usar células estaminais clinicamente de modo a gerar células ou tecidos para reconstituir a população de células estaminais e para reparar os órgãos, respectivamente (Fig. 2, Tabelas 1 e 2). Finalmente, uma limitação importante ao transplante de órgãos tem sido a barreira imunológica, exigindo tratamentos de imunossupressão de modo a evitar a rejeição do enxerto. A possibilidade de efectuar o transplante de células ou tecidos derivados de células estaminais adultas isoladas do próprio paciente (células **autólogas**) reduz essa limitação.

Muito embora as células ES humanas tenham um enorme potencial para terapia celular, o seu uso clínico imediato tem sido dificultado por (i) considerações éticas, (ii) risco de originarem células indesejáveis no

caso de as células transplantadas estarem contaminadas com células indiferenciadas, e (iii) risco de rejeição imunológica quando transplantadas em pacientes imunologicamente incompatíveis (Tabela 1). Contudo, em 2009, a Food Drug Administration (FDA) permitiu a realização do primeiro ensaio clínico com células estaminais humanas para o tratamento de pacientes com lesão da medula espinal.

Recentemente foi descrita a criação de **células estaminais pluripotentes induzidas** (iPSC, *induced pluripotent stem cells*) a partir de células somáticas humanas ou de ratinho através da expressão forçada de factores de transcrição definidos como essenciais para a manutenção do estado de pluripotência das células ES [3-9]. De acordo com os últimos dados, as iPSC possuem propriedades de auto-renovação e de pluripotência semelhantes às células ES, e foram já diferenciadas *in vitro* com sucesso em vários tipos celulares. Em alguns casos, as células diferenciadas foram utilizadas para corrigir deficiências de patologias humanas em animais modelo. Assim, a reprogramação de iPSC permite a obtenção de células com as propriedades únicas das células ES, a partir de células diferenciadas adultas do próprio paciente. Por isso, as iPSC são promissoras para futuras terapias celulares tendo despertado a atenção generalizada de investigadores e médicos (Tabela 1). No entanto, será

necessário mais investigação para se definir protocolos de diferenciação mais eficientes, em que seja garantida a pureza e estabilidade das células diferenciadas que viabilize a sua utilização clínica.

Neste artigo de revisão, apresentamos a terminologia básica, definições e conceitos da biologia de células estaminais e destacamos algumas das suas aplicações em medicina regenerativa e terapia celular (Figs. 2 e 3, Tabela 2). Parecem ser inúmeras as oportunidades para o uso de células estaminais desde a terapia celular, terapia genética, engenharia e regeneração de tecidos, rastreio de novos fármacos e testes toxicológicos, até à compreensão de processos do desenvolvimento embrionário precoce. As células estaminais abrem o caminho a novas áreas de investigação em ciência fundamental, translacional e em medicina.

ORIGEM E FONTES DE CÉLULAS ESTAMINAIS

Durante a embriogénese inicial, observa-se uma limitação gradual do potencial de diferenciação das células constituintes do embrião (Fig. 2). O **zigoto** (oócito fecundado) e os **blastómeros** (células que constituem a mórula no estado de 2 a 8 células) são as únicas células **totipotentes** — isto é, células com capacidade de originar todas as células diferenciadas do organismo adulto, incluindo a parte fetal da placenta, o cordão umbilical e as membranas extra-embrionárias. Após alguns ciclos de divisão celular adicionais, estas células totipotentes formam o **blastocisto**, uma estrutura embrionária na qual as células começam a especializar-se, e a perder o potencial de se diferenciarem em todas as linhagens do organismo adulto. O blastocisto é uma esfera oca composto por uma parede de células externas (troblasto) que



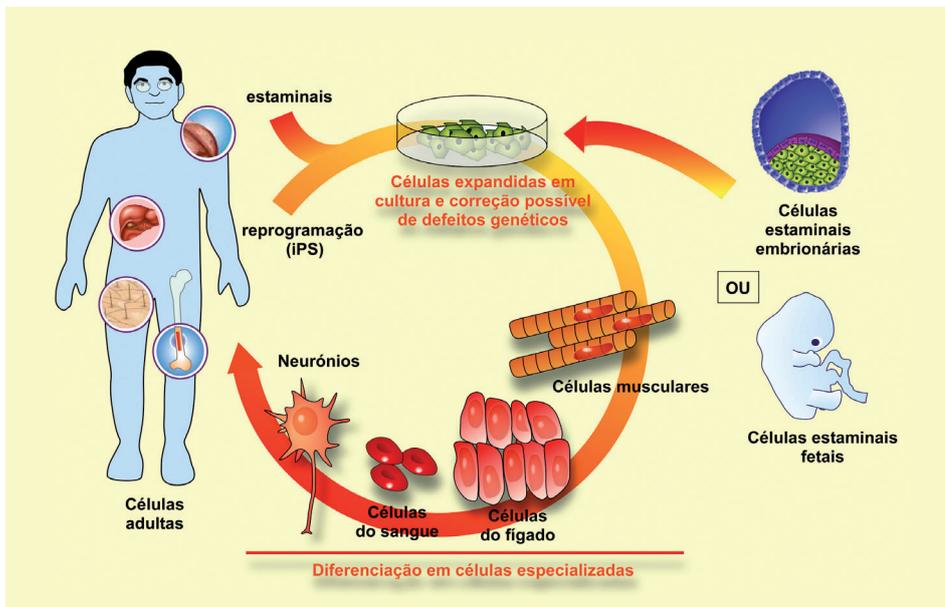


Figura 3. Células estaminais e terapia. Para utilização de células estaminais em terapia celular, é necessária a expansão de um grande número de células em cultura. As células estaminais embrionárias (ES), adultas e fetais e as iPS derivadas de células somáticas têm a capacidade de proliferar e de se auto-renovar em cultura. As células ES são as que proliferam melhor em cultura e que dão origem a todos os tipos de células derivadas das três camadas germinativas do embrião. As células ES são células já isoladas e estabelecidas que não são derivadas do paciente, e por isso, estas células têm um grande potencial para utilização terapêutica alogênica. As células estaminais fetais, tal como células as estaminais adultas ou somáticas contidas em muitos tecidos dos organismos adultos, podem ser usadas para fins terapêuticos autólogos quando derivadas e usadas no próprio paciente. Estas células adultas também podem servir para terapias de outros pacientes, neste caso sendo para transplantes alogênicos. No entanto, a capacidade de proliferação em cultura destas células fetais e adultas é variável e mais limitada do que a capacidade das células estaminais embrionárias. As iPS são células pluripotentes que poderiam ser originadas do próprio paciente e por isso seriam para fins terapêuticos autólogos e transplantes alogênicos. Depois da expansão das células estaminais em cultura, é preciso gerar tipos específicos de células diferenciadas, tais como células musculares cardíacas, células do sangue ou células nervosas, através de, por exemplo, protocolos que modificam as condições de cultura e a composição química dos meios de cultura. Uma vez diferenciadas, estas células de tipos específicos ou as estruturas que estas células formam poderiam ser transplantadas nos pacientes de maneira autóloga ou alogênica para substituir, reparar ou melhorar as funções de tecidos ou órgãos danificados.

que resultam da transformação de células adultas capazes de originar e manter a massa celular de tumores [21, 22].

Finalmente, foram recentemente reprogramadas **células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC)** a partir de células somáticas humanas ou de ratinho através da expressão forçada de factores de transcrição definidos [3-9]. As iPSC possuem as propriedades únicas (auto-renovação e pluripotência) das células ES que lhes conferem um enorme potencial para futuras terapias.

NICHO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS

Por "nichos" entende-se estruturas celulares em tecidos e órgãos formando microambientes que fornecem sinais extrínsecos (sejam moléculas de sinalização intercelulares, ou interações entre células estaminais e células vizinhas, ou ainda interações com a matriz extracelular) que, em combinação com factores intrínsecos, determinam o comportamento e o destino

das células estaminais [23] (Fig. 4). Este microambiente tridimensional influencia e controla a expressão dos genes que definem as propriedades estaminais, ou seja, a auto-renovação ou a diferenciação [24]. Até recentemente, os nichos eram um conceito teórico apoiado na observação de que as células estaminais transplantadas sobreviviam e cresciam somente em locais específicos, presentes em números limitados e saturáveis, nos tecidos transplantados. No entanto, tais estruturas foram recentemente caracterizadas em diversos tecidos de invertebrados e permitiram estabelecer princípios que provavelmente regem o comportamento de nichos noutros organismos. É provável que, nos organismos adultos, a maior parte das células estaminais estejam num estado quiescente, mas que possam ser activadas por factores exógenos, entrando em divisão e diferenciação e assim contribuam para a renovação de tecidos/órgãos ou para a reparação após lesão. Em alguns casos, as células estaminais ocupam um nicho único, que é espacialmente invari-



ável ao longo da vida adulta. Por exemplo, as células estaminais neurais do sistema nervoso central residem no ventrículo lateral na zona subventricular ao longo da vida pós-natal e no giro dentado do hipocampo [25, 26]. No entanto, noutros casos a localização das células estaminais pode ser muito mais dinâmica, como por exemplo as células do sistema hematopoiético que em condições quiescentes (*steady-state*) residem na medula óssea e ocupam nichos facultativos, dispersos na superfície trabecular do osso [23]. Por isso, as células estaminais hematopoiéticas estão constantemente em circulação de um compartimento da medula óssea para outro (por exemplo, do fémur à tíbia). Este movimento de um nicho para outro permite a manutenção de células estaminais hematopoiéticas em vários locais, e permite também uma mais eficiente expansão do número de células estaminais hematopoiéticas em resposta a estímulos. O baço e o fígado também contêm células estaminais hematopoiéticas, e, em condições normais ocorre apenas diferenciação limitada nesses órgãos. No entanto, a ocorrência de estímulos que induzem a hematopoiese pode provocar níveis elevados de formação de células sanguíneas no baço e no fígado, indicando que estes órgãos são capazes de activar nichos facultativos que apoiam a manutenção das células estaminais hematopoiéticas e hematopoiese a longo prazo. Esta capacidade de activação de nichos facultativos não se limita ao sistema hematopoiético; por exemplo, a lesão da pele de um adulto pode levar à formação de novos folículos capilares, que são depois colonizados por células estaminais [27]. Foi também demonstrado que a complexidade da organização espacial das células estaminais embrionárias em culturas, em conjunto com os factores exógenos (LIF, FGF e TGF- β), célu-



las de suporte) cria nichos ou microambientes heterogêneos que influenciam o destino das células estaminais embrionárias [28].

CÉLULAS ESTAMINAIS PLURIPOTENTES

Células estaminais embrionárias

As células pluripotentes encontram-se apenas transitoriamente nos embriões porque rapidamente se diferenciam em células somáticas ao longo do desenvolvimento (Fig. 2). Ainda assim, conseguiu-se pela primeira vez em 1981 derivar **células estaminais embrionárias (células ES) pluripotentes** do botão embrionário de blastocisto de ratinho antes da implantação no útero [12, 13, 29]. As células ES derivadas de uma célula única têm a capacidade de formar todos os 220 tipos de células que constituem um organismo adulto, e de formar teratomas quando injectadas em ratinhos. Células ES de ratinho foram também obtidas por isolamento de blastómeros individuais de embriões em estado de duas a oito células [30, 31]. As primeiras células ES isoladas foram cultivadas sobre camadas de fibroblastos inactivados mitoticamente, mas ainda capazes de produzir e secretar os factores de crescimento necessários para manter as capacidades de proliferação e de pluripotência das células ES. Estudos realizados para identificar os componentes secretados pelos fibroblastos inactivados e que permitiam às células ES de ratinho proliferar em cultura sem se diferenciar, conduziram à identificação do factor inibidor de leucemia (LIF), uma citocina que em complemento com o soro ou com BMP (*Bone Morphogenetic Protein*, outra molécula de sinalização), é capaz de manter as propriedades das células ES [32, 33].

As primeiras células ES humanas só foram derivadas em 1998 [34]. Este atraso deveu-se principalmente a diferenças relacionadas

Tabela 2. Aplicações terapêuticas potenciais de células para o tratamento de diversas patologias humanas adaptado da revisão feita por Mimeault e colegas [59].

Células estaminais/progenitoras, fonte e tipos*	Células diferenciadas	Patologias tratadas
ES, iPSC, tecidos fetais (CEH), SCU (CEH), CEH adultas, e CEN	Células hematopoiéticas	Doenças hematopoiéticas e imunológicas, anemia displásica, doenças auto-imunes, cancro
ES, iPSC, fígado fetal (CPE), CEMA, SCU (CEMA), CEMO (CPE), CEDA	Células endoteliais	Doenças do sistema vascular, doenças isquémicas do coração
ES, iPSC, tecidos fetais (CEM), SCU (CEM), CEA, CEMO, CEDA (CEM), CEDM	Osteoblastos, condrócitos, adipócitos	Osteoporose, osteogénese imperfeita, osteoartrite, defeitos da cartilagem
ES, iPSC, tecidos fetais (CEM), CEA, SCU (CEM), CEMO (CEM), CEDM, CEDA	Células musculares	Distúrbios musculares, defeitos esqueléticos
ES, iPSC, CEA, SCU (CEM, célulasCD133+), CEMO (CEM, célulasCD133+), CEDM, CEDA, CHO	Cardiomiócitos	Insuficiências cardíacas
ES, iPSC, tecidos fetais (CEN), SCU (CPM), CEA, CEN adultas, pele (CEECN), CEMO (CEH e CEM), CEDA	Neurónios, neurónios dopaminérgicos, oligodendrócitos, astrócitos	Doenças do sistema nervoso, doenças de Parkinson e da mielina
ES, iPSC, células de pulmão fetal, CEBA adultas, CEMO	Células do pulmão	Doenças pulmonares
ES, iPSC, células de fígado fetal (CEM), CEA, SCU, CHO adultas, CEMO (CEH), CEDA	Hepatócitos	Doenças hepáticas
ES, iPSC, pâncreas fetal (CIP), CEA, SCU, CEMDP, CEP, CHO, CEDA, CEH, CEM	Células beta produtoras de insulina	Diabetes mellitus de tipo 1 e 2
ES, iPSC, tecidos fetais (CEN), CECRE, CEEC límbais, CEMO (CEM)	Neurónios da retina, células progenitoras da retina, células epiteliais da córnea	Doenças retinianas e doenças da córnea
ES, iPSC, tecidos fetais, CEA, CEQ adultas, CESA, CEECN	Células da pele	Doenças da pele e do cabelo

* - CEA, células epiteliais amnióticas; CEBA, células estaminais bronchioalveolares; CECRE, células estaminais córneo-retino epiteliais; CEDA, células estaminais derivadas de tecido adiposo; CEDM, células estaminais derivadas de músculo; CEEC, células estaminais do epitélio corneano; CEECN, células estaminais da epiderme da crista neural; CEH, células estaminais hematopoiéticas; CEM, células estaminais mesenquimais; CEMA, células estaminais mesenquimais amnióticas; CEMDP, células estaminais multipotentes derivadas da placenta; CEMO, células estaminais derivadas da medula óssea; CEN, células estaminais neurais; CEP, células estaminais do pâncreas; CEQ, células estaminais dos queratinócitos; CESA, células estaminais do saco epitelial; CHO, células hepáticas ovas; CIP, células das ilhotas pancreáticas; CPE, células progenitoras endoteliais; CPM, células progenitoras multipotentes; ES, células estaminais embrionárias; iPSC, células pluripotentes induzidas; SCU, sangue do cordão umbilical

com as espécies, que existem entre as células ES de ratinho e humanas, e também ao uso de meios de cultura baseados nos utilizados para células de ratinho que não se adequaram a cultura de células ES humanas. De facto, ao contrário das células ES de ratinho que se mantêm pluripotentes na presença de LIF, a derivação de células ES humanas usando meio suplementado com soro e LIF resultou em linhas celulares instáveis que passavam rapidamente para um estado diferenciado. Para a derivação a partir do botão embrionário, e para o sustento das células ES humanas em cultura, foi necessário usar os factores de crescimento bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) e Activin/Nodal/TGFB (*Tumor Growth Factor beta*) que permitem a activação de vias de sinalização necessárias à auto-renovação e proliferação destas células em cultura [29]. Mais recentemente, foram estabelecidas linhas de células estaminais pluripotentes derivadas a partir do epiblasto (EpiSC) de embriões de ratinho em fase de pós-implantação (Fig. 2). Estas EpiSC diferem significativamente das células ES de ratinho, mas no entanto partilham propriedades chave com células ES humanas, tais como a derivação e a auto-renovação, que necessitam da activação das vias de sinalização FGF e Activin/Nodal, mas não da presença de LIF ou BMP [14, 15]. Em todo o caso, as células ES de ratinho e humanas, tal como as EpiSC, expressam os

factores de transcrição Nanog, Oct4 e Sox2, os factores chave para manter as células estaminais pluripotentes e que são necessários para repressão da expressão de genes promotores da diferenciação [14-16].

Células estaminais pluripotentes induzidas

A clonagem da ovelha Dolly demonstrou ser possível, em mamíferos, alterar o estado epigenético de um núcleo diferenciado pela sua integração num oócito enucleado, sendo esta célula híbrida uma célula totipotente contendo o genoma da célula diferenciada original [35]. Propôs-se imediatamente que esta técnica de transferência de núcleo somático (SCNT, de *somatic cell nuclear transfer* em inglês) fosse usada para a produção de células estaminais (**autólogos**) específicas de pacientes para fins terapêuticos. No entanto, a aplicação de SCNT para material humano revelou-se difícil. Apenas muito recentemente a reprogramação de células humanas por esta técnica resultou em células capazes de se desenvolverem até ao estado de blastocisto em cultura [36]. Um aspecto positivo destes trabalhos foi a indicação que a reprogramação de células somáticas pode ser alcançada mediante a acção de factores externos e por isso alguns grupos de investigação continuaram a desenvolver rastreios para identificação de factores proteicos capazes de reprogramar células somáticas. Em 2006, publicou-se o primeiro trabalho

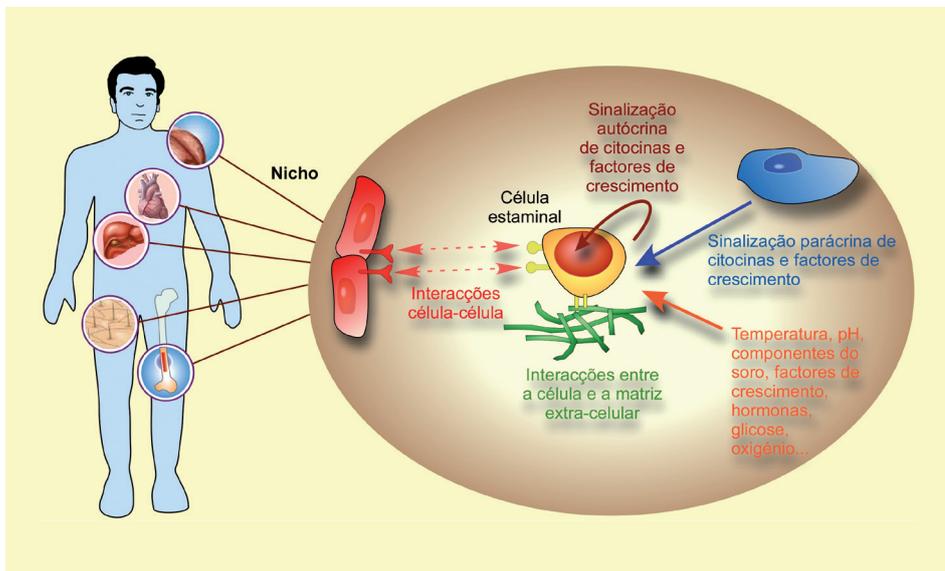


Figura 4. Nicho das células estaminais adultas. Os nichos formam microambientes fornecendo sinais extrínsecos (tal como moléculas de sinalização intercelulares, interações entre as células estaminais com a matriz extracelular, e com as células vizinhas) que em combinação com os factores intrínsecos das células estaminais determinam o comportamento e o destino das células estaminais. As condições externas (temperatura, pH, componentes do soro, factores de crescimento, hormonas, glicose e oxigénio, por exemplo) também podem influenciar o destino das células estaminais.

que demonstrou a possibilidade de induzir a reprogramação de fibroblastos de rato em células pluripotentes (iPSC) com propriedades semelhantes às das células ES. A reprogramação obteve-se por expressão forçada de quatro factores de transcrição: Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc [5]. Depois dessa primeira reprogramação, outros grupos já usaram com sucesso os mesmos factores, ou outras combinações, para reprogramar uma grande variedade de células somáticas de rato ou humanas [29, 37, 38]. Além disso, conseguiu-se diferenciar iPSC *in vitro*, numa variedade de tipos celulares que por sua vez foram utilizadas na correcção de deficiências em modelos animais de patologias humanas [39]. O avanço em células humanas tem sido grande e conseguiu-se, a partir de pacientes com várias doenças, reprogramar diversas iPSC [40]. Deste modo foi possível corrigir *in vitro* defeitos de células estaminais hematopoiéticas de pacientes com anemia de Fanconi [41]. As iPSC têm assim um potencial promissor para aplicações clínicas, porque poderiam ser reprogramadas a partir de células autólogas expandidas em massa e diferenciadas no tipo celular necessário para a terapia do paciente (Fig. 3 e Tabela 1). No entanto, antes da utilização clínica das iPSC é necessário melhorar ainda os processos de reprogramação e de diferenciação destas células.

Células de carcinoma embrionário

Os **teratocarcinomas** são tumores malignos de grande raridade compostos por uma mistura de células de carcinoma embrionário (CE) indiferenciadas e de células diferenciadas que podem incluir as três camadas germinais. Alguns trabalhos desenvolvidos em ratos demonstraram que as células CE indiferenciadas funcionam como células estaminais para originar as outras células que constituem o tumor. Assim, uma célula CE indiferenciada única é capaz de auto-renovação ilimitada e diferenciação em linhagens celulares múltiplas, o que também serviu para estabelecer a noção de pluripotência [42], e demonstrar a existência de células estaminais de cancro. As células CE de rato expressam **antigénios** e proteínas similares aos que estão presentes nas células do botão embrionário de blastocistos [43, 44]. Esta observação levou ao conceito de que as células CE são a contrapartida *in vitro* das células pluripotentes presentes no botão embrionário [45]. Algumas linhas celulares CE quando são injectadas em blastocistos de rato, podem contribuir para vários tipos de células somáticas do rato [46], embora a maioria das linhas de células CE tenham um potencial muito limitado de contribuição ao desenvolvimento de ratos quiméricos [47]. As células CE humanas foram derivadas posteriormente às células

equivalentes de rato e mostraram-se significativamente diferentes das células de carcinoma embrionário de rato. Por exemplo, a proteína SSEA-1, um marcador de superfície específico das células CE de rato, está ausente nas células CE humanas que por sua vez expressam as proteínas SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81 [48-50]. Além disso, ao contrário das células de rato, as células CE humanas são altamente **aneuplóides**, o que provavelmente é responsável pela incapacidade destas células humanas de se diferenciarem numa ampla gama de tipos de celulares somáticos. No entanto, algumas células CE humanas foram já diferenciadas em neurónios, que foram depois utilizados para tratamento de pacientes que tinham sofrido acidentes vasculares cerebrais (AVCs) [12], indicando um potencial das células de CE humanas para terapia.

Células germinais primordiais

Apesar de evidências obtidas na década 1952-1962 de que as células germinais primordiais poderiam dar origem a teratocarcinomas, só em 1992 foram derivadas com sucesso células embrionárias germinais (EG) [51, 52]. As células EG, que são também células estaminais pluripotentes, requerem uma combinação de *Stem Cell Factor* (SCF), LIF e FGF, e a presença de uma camada de células suporte para a derivação inicial em cultura. As células EG de rato em cultura são morfológicamente indistinguíveis das células ES e à semelhança destas expressam SSEA-1 e Oct4, e quando injectadas em blastocistos contribuem para o desenvolvimento de ratos quiméricos, incluindo células germinais [53, 54]. No entanto, ao contrário das células ES, as células EG mantêm algumas características originais das células germinais primordiais, tal como a inteira desmetilação do genoma, a remoção do **imprinting genómi-**



co, e a reactivação dos cromossomas X [53, 55, 56]. Mais recentemente derivaram-se, de testículos do ratinho neo-natal ou adulto, vários tipos de células estaminais pluripotentes ou multipotentes germinais com morfologia e marcadores celulares específicos típicos de células ES. Estas células germinais também se podem diferenciar em várias linhagens de células *in vitro*, formar teratomas, e contribuir para a formação de ratinhos quimeras, inclusivamente na constituição de células germinais, quando injectadas no blastocisto. No entanto, estas células germinais têm um estado epigenético distinto das células ES e das células EG [57-59].

A derivação de células EG humanas foi realizada pela primeira vez em 1998 [57], mas o potencial de proliferação destas células a longo prazo parece ser limitado [58]. No entanto, as células humanas EG com poucas passagens em cultura apresentam a capacidade de se diferenciar *in vitro* em múltiplas linhagens celulares. As células humanas EG têm uma morfologia muito distinta das células ES humanas e expressam o marcador de superfície SSEA-1, que está ausente nas células ES humanas, mas presente nas células germinais humanas precoces [29]. Até agora, nenhuma das linhas de células EG humanas isoladas possui capacidades de formação de teratomas e necessitam factores de crescimento diferentes daqueles necessários às células ES humanas, o que as distingue assim claramente das células ES. O potencial das células EG para terapia ainda está muito pouco explorado, mas estudos recentes em modelos animais demonstraram que as células germinais testiculares de ratinho podem ser transplantadas em animais recipientes estéreis e regenerar a espermatogénese, indicando que estas células têm um grande potencial para tratamento de infertilidade masculina.

CÉLULAS ESTAMINAIS ADULTAS E FETAIS

De forma geral, a cada tipo de tecido corresponde um dado tipo de célula estaminal adulta, e a lista de tecidos e órgãos dos quais foram isoladas células estaminais adultas cresce constantemente e inclui a medula óssea, o sangue periférico, o cérebro, a medula espinal, a polpa dentária, os vasos sanguíneos, o músculo esquelético, o epitélio da pele e do sistema digestivo, a córnea, a retina, o coração, o fígado e o pâncreas, entre outros. As células estaminais adultas estão também presentes em tecidos fetais, na placenta e no cordão umbilical. Nesta secção apresentamos algumas fontes principais de células estaminais adultas e fetais com potencial terapêutico (Fig. 2, Tabelas 1 e 2).

Células estaminais hematopoiéticas

As células estaminais adultas melhor caracterizadas são as células estaminais hematopoiéticas (EH), que originam todas as células sanguíneas tais como os eritrócitos, linfócitos e plaquetas. As células EH estão sobretudo localizadas na medula óssea, no sangue periférico, mas também em alguns órgãos (baço e fígado, por exemplo), e ainda no sangue do cordão umbilical e na placenta [59]. Os monócitos e macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrócitos, megacariócitos e plaquetas, e células dendríticas são gerados a partir da linhagem mieloide, enquanto a linhagem linfóide dá origem aos linfócitos T e B, e às células NK. As células EH são caracterizadas pela expressão de marcadores de superfície celulares específicos que permitem também o isolamento destas células. As células EH imaturas e quiescentes estão localizadas na superfície endosteal do osso (fina camada de células que reveste a cavidade medular de um osso), onde podem interagir através da formação de junções aderentes com os osteoblastos que regulam as funções das células EH [59]. As células EH também se co-localizam com células endoteliais na microvasculatura sinusoidal da medula óssea. Sob estímulos específicos, tais como lesões de tecidos,

uma rede complexa de factores de crescimento e de citocinas controla a transição entre o estado quiescente e o estado activado das células EH na medula óssea. A migração destas células activadas da superfície endosteal para os nichos vasculares, permite a libertação rápida das células EH na microvasculatura sanguínea da medula óssea, antes da migração destas células para a circulação periférica em condições fisiológicas e patológicas. As células EH derivadas da medula óssea e células derivadas das células EH foram localizadas na pele, músculo, pulmões, baço, fígado, tecidos do sistema nervoso e gastrointestinais, sugerindo que estas células podem participar na regeneração de tecidos periféricos, promovendo o sistema imunológico, por fusão celular adquirindo assim propriedades das células com as quais fusionam, ou por **transdiferenciação** em células envolvidas na reparação dos tecidos danificados, apesar deste último mecanismo não estar solidamente demonstrado [60].

Durante os últimos 50 anos, as células EH foram extensivamente usadas para transplante **alogenico** e para tratamento de uma variedade de doenças imunes hereditárias ou adquiridas, tal como talassemias, anemia falciforme, anemia de Fanconi, erros inatos do metabolismo, anemia aplástica severa, imunodeficiência combinada severa (SCID), e outras deficiências imunológicas primárias (Fig. 2 e Tabela 2). O transplante de células EH é também amplamente utilizado para o tratamento de doenças hematológicas malignas, como leucemias mielóides e linfóides, outros síndromes mielo-proliferativos, doenças mielo-displásicas, linfomas, mielomas, e tumores sólidos, como cancro de células renais, cancro da mama, carcinomas do ovário e neuroblastomas. No entanto, encontrar um dador histocompatível continua a ser um problema para muitos pacientes que necessitam deste tipo de procedimento terapêutico.

Células estaminais mesenquimais

As células estaminais mesenquimais (EM) são células adultas multipotentes, capazes

de originar vários tipos celulares por diferenciação, incluindo condrócitos, miócitos, células adiposas, células do tecido conectivo e osteoblastos. As células EM encontram-se geralmente presentes nos tecidos conjuntivos de quase todos os órgãos, mas para fins terapêuticos, são mais convenientemente isoladas da medula óssea e do sangue do cordão umbilical. No entanto, embora morfológicamente semelhantes, as células EM isoladas de diversas fontes podem ser funcionalmente diferentes. As células EM possuem uma grande capacidade de expansão em cultura podendo ser estimuladas para adquirir propriedades específicas. Através de secreção de factores solúveis (IL-6, TGF- β 1, factor de crescimento hepatócito, sintase induzível de óxido nítrico e prostaglandinas, por exemplo) e de interações directas com células do sistema imunológico, as células EM têm propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, suprimindo a actividade de células T citotóxicas, células B e células NK. Dadas essas propriedades, as células EM estão a ser testadas no tratamento de pacientes com lúpus eritematoso sistémico, esclerose múltipla, doença de Crohn, esclerose lateral amiotrófica e diabetes de tipo 1, que são doenças inflamatórias auto-imunes. Além das propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, mostrou-se que as células EM têm efeitos benéficos sobre a regeneração de órgãos (tal como o fígado e coração), provavelmente através de efeitos parácrinos, criando um ambiente favorável à recuperação funcional das células endógenas dos órgãos e tecidos, promovendo também a angiogénese e limitando a remodelação cardíaca [59, 61]. Em condições específicas de cultura, foi ainda demonstrada a capacidade destas células de se diferenciarem em outros tipos celulares, tais como cardiomiócitos, células neuronais, células pulmonares, células beta das ilhotas pancreáticas e células epiteliais, por exemplo. Por esses motivos, as células EM têm um grande potencial para terapias diversas e são cada vez mais testadas para um número maior de aplicações em medicina

regenerativa (Figs. 2 e 3; Tabela 2), embora as propriedades de diferenciação ainda não estarem demonstradas in vivo. Além, disso as células EM poderam ainda ser transplantadas nos pacientes de maneira autóloga.

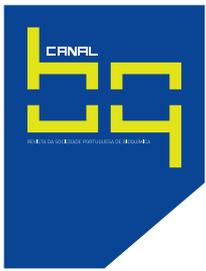
Muito recentemente, em 2008, realizou-se o primeiro transplante de um tecido humano produzido a partir de células estaminais adultas mesenquimais e epiteliais do próprio paciente [62]. O procedimento cirúrgico foi efectuado numa paciente cujo brônquio esquerdo tinha entrado em processo de falência após uma infecção de tuberculose. Condroblastos diferenciados a partir de células estaminais adultas mesenquimais e células epiteliais retiradas da mucosa brônquica da paciente foram capazes de gerar uma estrutura celular à volta de uma matriz cartilaginosa obtida da traqueia de um dador (limpa de todas as suas células originais). As células epiteliais e estaminais mesenquimais adultas (isoladas a partir da medula óssea da paciente) depositadas sobre a componente cartilaginosa entraram num processo de maturação e diferenciação e formaram um tubo brônquico em cultura. Uma secção desse tubo brônquico foi transplantada para substituir a parte atrofiada do brônquio esquerdo da paciente e conseqüentemente ajudar a paciente na recuperação de funções respiratórias. Este ensaio clínico, único até agora, demonstra que a conjugação da diferenciação de células estaminais adultas com biomateriais apropriados poderá, a médio prazo, gerar soluções terapêuticas funcionais na área da medicina regenerativa que não eram possíveis até agora. Terapias deste tipo também eliminam o risco de rejeição dos novos tecidos por parte dos pacientes, e evitando assim a necessidade de utilização de imunossuppressores cujos efeitos secundários podem ser graves (como a hipertensão arterial, insuficiência renal e mesmo aparecimento de tumores).

Células estaminais neurais

A zona subventricular dos ventrículos laterais e a zona subgranular do giro dentado do hipocampo contêm nichos com células

estaminais neurais (EN) derivadas do sistema nervoso capazes de auto-renovação. Estas células são multipotentes, podendo dar origem às três principais linhagens de células do sistema nervoso (neurónios, oligodendrócitos e astrócitos; Fig. 2). Em modelos de lesão cerebral, as células EN proliferam nessas regiões neurogénicas, a partir de onde são capazes de migrar para o local de lesão [59, 61]. A expressão específica de marcadores neurais, tal como a nestina, permite isolar e purificar células EN e progenitores neurais a partir de embriões, tecidos de cérebro fetais ou adultos, para serem expandidas em cultura. Evidentemente, para uma terapia celular autóloga baseada em células EN, estas fontes de células EN são de utilização pouco conveniente. No entanto, foram também encontradas células EN na polpa dentária, no periodonto [63, 64] (tecidos que rodeiam e suportam os dentes) e na mucosa olfactiva, que já foram facilmente recolhidas por meio de biopsias nasais. Os neurónios da mucosa olfactiva têm uma regeneração rápida e contínua, de modo que constituem uma fonte ideal de células EN para reparar lesões da medula espinal e do cérebro. O transplante de células de tipo neural que promovem o crescimento e regeneração dos axónios olfactivos (Olfactory Ensheathing Cells) isoladas da mucosa olfactiva, no local de lesão de pacientes com lesões da medula espinal — as quais resultam muitas vezes em deficiências motrizes permanentes, para- ou tetraplegia, e deficiências sensoriais, ou ambas — contribuiu para o melhoramento do estado clínico de alguns pacientes [65].

As células EN têm também um grande potencial para tratamento de várias doenças neurológicas e neurodegenerativas até agora incuráveis, tal como a doença



de Parkinson (degeneração progressiva dos neurónios produtores de dopamina, um neurotransmissor que tem como função estimular o sistema nervoso central). A “levodopa”, que é convertida em dopamina no cérebro, é a base actual do tratamento da maioria dos pacientes com a doença de Parkinson, mas a maior parte destes pacientes acaba por perder a capacidade de resposta a este tratamento. Por outro lado, o transplante de neurónios diferenciados, produtores de dopamina no cérebro, não é uma opção viável uma vez que só uma pequena percentagem de neurónios sobrevivem à transplantação. Por isso o transplante de progenitores neurais primários (isolados de tecidos ou órgãos) derivados por diferenciação de outras células estaminais (células ES, iPS, por exemplo) constituem o futuro para tratamento de doenças neurodegenerativas [65]. As células EN fetais humanas, isoladas do mesencéfalo geram neurónios dopaminérgicos funcionais após transplante no estriado de pacientes com a doença de Parkinson [66-68]. Além disso, as células EN fetais têm uma capacidade imuno-activadora e tumorigénica pouco elevada.

Células estaminais fetais do cordão umbilical

As células estaminais do cordão umbilical (ECU) são células que, consoante a sua proveniência, têm o potencial de se diferenciar em células da linhagem hematopoiética e mesenquimal. As células ECU multiplicam-se mais rapidamente em cultura do que as células homólogas isoladas da medula óssea em organismos adultos. Para além disso, as ECU possuem grande plasticidade pelo que são promissoras para terapias celulares. Estas células têm sido utilizadas no tratamento de doenças malignas (leucemias, linfomas, tumores sólidos) e não malignas (por exemplo, deficiências

metabólicas hereditárias, anemias e imunodeficiências). O potencial terapêutico das células ECU foi também confirmado em modelos animais de diabetes, doenças cardíacas (enfarte do miocárdio), doenças cerebrovasculares e neuronais (AVC e doença de Alzheimer, por exemplo), mas a utilidade clínica destas células em pacientes humanos ainda se encontra em análise, e neste momento decorrem vários ensaios clínicos para testar o seu efeito regenerativo.

As células do Sangue do Cordão Umbilical (SCU) contêm essencialmente células estaminais hematopoiéticas com capacidade de se diferenciar em células sanguíneas (glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas, tal como as células homólogas adultas), células vasculares (endoteliais e do músculo liso) bem como em outras linhagens não directamente ligadas ao sistema hematopoiético [59, 69]. A baixa incidência de rejeição das células do SCU por parte dos pacientes transplantados, em comparação com transplantes de células correspondentes dos organismos adultos (isoladas a partir da medula óssea ou sangue periférico), apresenta uma grande vantagem para utilização do sangue do cordão umbilical como fonte de células fetais EH para terapia. Esta propriedade permite, ainda, a utilização de células do SCU, em transplantes, com uma maior disparidade em termos do Complexo Maior de Histocompatibilidade (HLA) relativamente às células EH da medula óssea. No entanto, o número pouco elevado de células EH presente nas células SCU limita a utilização destas células em pacientes adultos, para o tratamento dos quais é preciso combinar células obtidas de fontes diferentes ou expandir as células ex vivo.

As outras células estaminais principais do cordão umbilical que estão presentes na Matriz do Cordão Umbilical (MCU) são células estaminais mesenquimais (EM) que constituem uma população de células variada, precursora de células de osso, cartilagem, tecido adiposo e fibroso conjuntivo, tal como as células EM dos organismos

adultos [70]. O isolamento das células da MCU pode ser facilmente efectuado a partir do estroma ou da matriz do cordão umbilical, bem como do subendotélio da veia do cordão umbilical. Microscopicamente estas células podem ser identificadas através da sua morfologia característica (parecida com os fibroblastos que crescem aderentes a uma superfície) e pela identificação de marcadores específicos presentes na membrana destas células. No entanto, a característica mais importante, para fins terapêuticos, das células EM do cordão umbilical, em relação às células EM isoladas em tecidos já adultos, é não possuírem um Complexo Maior de Histocompatibilidade completo, uma vez que os genes do subgrupo II e um gene do subgrupo I (HLA-DR) estão ausentes. Esta característica é extremamente importante quando se trata da compatibilidade entre o dador e o receptor para transplantes alogénicos (Fig. 3), porque assim, mesmo não havendo uma histocompatibilidade completa entre o dador e o paciente receptor, a probabilidade de ocorrer rejeição por parte do receptor é praticamente nula.

O esforço actual para se estabelecerem bancos públicos de células de sangue do cordão umbilical caracterizadas irá permitir uma disponibilização mais fácil e mais rápida de células EH e EM para transplantes e futuras terapias celulares.

Células estaminais de cancro

As células estaminais de cancro, inicialmente identificadas a partir de leucemias mielóides agudas, apresentam marcadores de superfície distintos das outras células tumorais também presentes no mesmo organismo e com potencial de proliferação mais limitado [71]. Propôs-se então que as células leucémicas estaminais resultariam da transformação de células estaminais hematopoiéticas, tornando-se malignas. As células leucémicas estaminais encontram-se em quantidades reduzidas nos pacientes, são resistentes à quimioterapia e radioterapia, e são capazes de recapitular leucemias



mielóides agudas quando transplantadas para ratinhos com deficiência imunológica combinada. Além do mais, foram já caracterizadas outras células estaminais de cancro em tumores sólidos tal como o cancro de mama, glioblastomas, cancro do pulmão, cancro dos ovários, cancro da próstata e cancro gástrico epitelial [69-75]. Com base nessas observações, foi proposto um modelo de formação do cancro baseado na existência de células estaminais. Segundo este conceito, a grande maioria das células num tumor teriam um potencial de proliferação limitado mas a pequena população de células estaminais de cancro possui capacidade de auto-renovação e de proliferação. Deste modo, as células estaminais de cancro poderiam originar e manter a massa de células que formam o tumor. Neste modelo, o cancro é uma doença que envolve a desregulação da auto-renovação das células estaminais normais por mutações oncogénicas e outros defeitos genéticos e epigenéticos [72]. As células estaminais de cancro resistentes a quimioterapia explicam ainda as recorrências de tumores e até as metástases, podendo expandir-se formando tumores secundários [73]. Procura-se agora identificar marcadores de superfície celular específicos das células estaminais tumorais que permitam o seu isolamento e expansão em cultura de modo a poder-se proceder ao seu estudo e a compreender-se as diferenças existentes nas vias de sinalização de células estaminais normais e tumorais. Espera-se que um conhecimento aprofundado dessas vias conduza à identificação de fármacos visando a destruição selectiva de células tumorais sem afectar as células normais, o que seria um avanço importante para terapias anti-cancro mais adaptadas às necessidades específicas de cada paciente.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As células ES, com a capacidade de proliferar de maneira eficaz em cultura e a possibilidade única de dar origem a todas as células e a todos os tecidos que consti-

tuem um organismo, apresentam grandes potencialidades para o desenvolvimento de novas terapias celulares. Assim, sob condições específicas, as células ES poderiam ser utilizadas para formação de tecidos em laboratório que serviriam consequentemente para transplante em pacientes com tecidos ou órgãos danificados. No entanto, além dos problemas técnicos ligados às condições de manutenção e de diferenciação eficiente das células ES para os tipos celulares pretendidos, subsistem problemas éticos que têm atrasado o estudo e o desenvolvimento de metodologias para aplicações clínicas destas células. A primeira aprovação pela FDA (U.S. Food and Drug Administration) para a fase I de ensaios clínicos com células derivadas de células ES humanas foi apenas consentida em Janeiro 2009 para tratamento de lesões da medula espinal, em pacientes com lesões de menos de duas semanas. Esta aprovação surgiu após um trabalho de investigação que mostrou que o transplante de células ES humanas em ratos com lesões da medula espinal induz a recuperação locomotora desses animais [74]. No entanto, este ensaio está suspenso desde Agosto 2009 pela FDA, devido a cistos microscópicos que foram observados em alguns dos animais transplantados. Mais recentemente, o transplante de células do epitélio pigmentar da retina, derivadas de células ES humanas, no espaço sub-retinal dos olhos de ratos com degeneração gradual do epitélio pigmentar da retina, resultou na recuperação da visão de todos os animais transplantados. Os ratos foram injectados com as células derivadas das células ES humanas antes da degeneração da retina ser iniciada, mostrando a capacidade das células humanas transplantadas em preservar os fotorreceptores cuja degeneração acontece inevitavelmente nos animais não tratados [75, 76]. Estes resultados promissores para tratamento de cegueiras causadas por degeneração da retina levaram a FDA aprovar, no início de 2010, o segundo ensaio clínico baseado em células derivadas de células ES humanas para tratamento da distrofia macular de Stargardt, uma doen-

ça hereditária que afecta a área central da retina (mácula) e que conduz à cegueira. Embora estes ensaios clínicos baseados em células ES estejam apenas na fase inicial, ou seja, são ensaios desenhados para testar não a eficácia das células pigmentadas mas sim a segurança de tal intervenção, eles constituem um passo essencial em medicina regenerativa. Esta nova abordagem terapêutica é particularmente atractiva em doenças originadas pela destruição e/ou falta de regeneração de células que constituem alguns tecidos (tais como as doenças de Alzheimer e Parkinson, diabetes, enfarte do miocárdio ou degeneração da retina) para as quais não existe actualmente nenhuma cura.

No entanto, a utilização de células estaminais adultas em medicina está mais adiantada, certamente dado ao facto que a utilização de células estaminais adultas levantou menores problemas éticos do que a utilização de células ES. A menor plasticidade e capacidade de proliferação das células estaminais adultas é uma desvantagem comparativamente às células embrionárias, limitando a possibilidade de expansão ex vivo que garanta a obtenção de bancos de células necessários para terapias celulares. Mas esta limitação pode também ser um factor positivo, evitando os problemas de formação de tumores inerentes as células ES. Infelizmente, a maior parte das células estaminais adultas estão presentes em pequenas quantidades e são difíceis de isolar e caracterizar pelo que a viabilização do uso deste tipo de células está dependente do órgão-fonte. Finalmente, a possibilidade de isolamento de certas células estaminais adultas do paciente, permite o seu uso em condições autólogas, limitando por isso a necessidade de imunossupressão.

As células estaminais isoladas da medula óssea apresentam actualmente uma maior



prevalência de utilização em terapia, por serem células mais facilmente identificadas, isoladas, e capazes de proliferar relativamente bem em cultura. No entanto, nos últimos anos, as células estaminais do sangue do cordão umbilical tornaram-se uma fonte alternativa, e por vezes preferida, de células estaminais hematopoiéticas para pacientes sem dadores de medula óssea compatíveis e para crianças. Estas células, bastante plásticas e menos imunogénicas do que as estaminais hematopoiéticas da medula óssea, são facilmente isoladas a partir do cordão umbilical, que foi durante muito tempo um tecido desaproveitado e considerado apenas como um excedente do parto. Por esta razão, estão agora a ser armazenadas e conservadas por criopreservação em bancos de instituições públicas e privadas, para possibilitar e facilitar o uso destas células de sangue do cordão umbilical em terapias. Considerando a variabilidade genética existente na população portuguesa, estima-se que 8 mil amostras seriam suficientes para abranger a diversidade desta população. Em Portugal, foi criado o Banco Público de Células do Cordão Umbilical nas instalações do Centro de Histocompatibilidade do Norte (Despacho n.º 14879/2009. DR 126 SÉRIE II), tendo sido já recolhidas e preservadas 1400 dádivas de cordão umbilical. Em Março de 2009 Portugal fez a transposição para a ordem jurídica interna das Directivas n.ºs 2004/23/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 31 de Março, 2006/17/CE (Lei n.º 12/2009. DR n.º 60, Série I) em que a Assembleia da República estabelece o regime jurídico da qualidade e segurança relativa à dádiva, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento, distribuição e aplicação de tecidos e células de origem humana. Noutros países, estão a ser desenvolvidas a criopreservação e a criação de bancos de outras células es-

taminais adultas humanas com potencial terapêutico, tais como as células de tecidos adiposo e polpa dentária [77].

A reprogramação de células somáticas em iPSC, que têm um potencial semelhante ao das células ES, superaram quase todas as preocupações éticas ligadas à origem embrionária das células ES humanas, e deram um impulso novo à investigação para a utilização de células pluripotentes em terapia. As iPSC oferecem também a possibilidade de novos tratamentos terapêuticos autólogos com células reprogramadas a partir de células somáticas do próprio paciente. No entanto, vários obstáculos importantes devem ser ultrapassados antes das iPSC poderem ser usadas em aplicações clínicas. A maioria dos métodos actuais de reprogramação são baseados na expressão exógena de proteínas (factores de transcrição) com potencial oncogénico através de vectores retrovirais integrativos, que eles próprios podem causar cancro quando se integram no genoma e perturbam a expressão de genes endógenos. Porém, já foram desenvolvidos alguns métodos alternativos de disseminação dos factores de reprogramação, como a utilização de adenovírus (não integrativos) ou plasmídios, com ou sem o uso de pequenas moléculas inibidoras. Recentemente até foi conseguida com sucesso a reprogramação de células somáticas com proteínas recombinantes produzidas e purificadas em bactérias. Foi também demonstrado que, consoante o tipo de células utilizadas para reprogramação e a adição de compostos químicos, menos de quatro factores podem ser suficientes para a reprogramação das iPSC.

Além do potencial das iPSC para uso directo em terapias celulares, a reprogramação de células somáticas de pacientes que sofrem de doenças multi-factoriais complexas (como o diabetes mellitus tipo 1 juvenil e a doença de Parkinson) oferece uma oportunidade única para estudar e modelizar os acontecimentos e mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da. As

iPSC podem também ajudar a prevenção e gestão de doenças de forma personalizada para o paciente, permitindo revelar mecanismos sobre o desenvolvimento da doença e assim definir os fármacos mais apropriados para combater a doença. Podem ainda permitir a correcção de defeitos genéticos in vitro, antes de serem usados para transplante autólogo ou alogénico.

Em conclusão, as células estaminais, principalmente células estaminais adultas e fetais, já estão a ser utilizadas em diversas terapias. A reprogramação das células adultas em iPSC vai certamente contribuir para um rápido progresso na utilização de células estaminais pluripotentes em terapias futuras. No entanto, a possibilidade de utilização terapêutica das células estaminais está ainda sub-explorada, devido à falta de conhecimentos fundamentais sobre os mecanismos moleculares e biológicos que regem as propriedades de proliferação e de diferenciação destas células e, mais recentemente, da reprogramação de células adultas. Porém, os esforços actuais para compreender esses mecanismos, para estabelecer métodos mais seguros e mais eficazes para o isolamento, a purificação e a caracterização das células estaminais ou células derivadas das células estaminais vão contribuir, nos próximos anos, para o desenvolvimento de terapias celulares cada vez mais audaciosas e complexas. A grande promessa a alcançar com este domínio da tecnologia das células estaminais será o tratamento de doenças e lesões incuráveis até agora.

GLOSSÁRIO

Alogénico – Relativo a tecidos, células ou proteínas originados ou derivados de dadores que não são o próprio paciente (receptor).

Aneuplóide – Relativo a células que sofreram alterações do seu material genético, contendo um número de cromossomas diferente do normal.

Antigénio – Partículas ou moléculas capazes de provocar uma resposta imune.

Autólogo – Relativo a tecidos, células ou proteínas que foram originados ou derivados do próprio paciente, sendo este dador e receptor.

Auto-renovação – A capacidade das células estaminais de passar por diversos ciclos de divisão celular e manter o estado indiferenciado.

Blastocisto – Estrutura embrionária precoce esférica formada por uma camada externa de células (trofoblasto), que irá dar origem à placenta, e que encerra no seu interior uma população de células internas denominada massa celular interna, a partir do qual se derivam as células estaminais embrionárias.

Células estaminais adultas ou somáticas – Células estaminais localizadas em vários tecidos do organismo adulto que se mantêm num estado indiferenciado, ou não especializado, com capacidade de auto-renovação e de se diferenciar para originar todos os tipos de células especializadas do tecido onde estão presentes.

Células estaminais de cancro – Células cancerosas presentes nos tumores ou cancros hematológicos com características associadas às células estaminais normais, e que têm a capacidade de dar origem a todos os tipos celulares formando o tumor onde estão presentes.

Células estaminais embrionárias (ES) – Células indiferenciadas originadas da massa celular interna do blastocisto do embrião antes da implantação no útero, que têm o potencial de auto-renovação e de se diferenciar em todos os tipos de célula do organismo adulto, excepto a placenta.

Células estaminais do epiblasto – Células estaminais pluripotentes derivadas a partir de epiblastos de blastocistos logo a seguir à implantação com capacidade de auto-renovação.

Células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC) – Células somáticas reprogramadas em células com propriedades semelhantes às das células estaminais embrionárias através da expressão forçada de factores de transcrição.

Epiblasto – Tecido derivado da massa celu-

lar interna que se diferencia para formar as três camadas germinais do embrião das quais derivam todos os tecidos e órgãos.

Hematopoiético – Relativo às células do sangue.

Imprinting genómico – Mecanismo (epi)genético pelo qual certos genes são expressos somente por um alelo, enquanto o outro está inativado por metilação do DNA. Por exemplo, as células germinais masculinas e femininas de mamíferos têm padrões de *imprinting* genómico diversos mas complementares.

In vitro, In vivo e Ex vivo – Termo que descreve um processo que ocorre num tubo de ensaio em bioquímica, que também é usado pelos biólogos para se referir às células que crescem em cultura em condições controladas (*in vitro*) fora de um organismo (*in vivo*). O termo *ex vivo*, refere-se a experimentações ou medições feitas em tecidos ou células num ambiente artificial fora do organismo com o mínimo de alteração das condições naturais.

Multipotente – Propriedade das células que podem dar origem a um número limitado de tipos de células.

Nicho – Microambiente (*in vivo* ou *in vitro*) das células estaminais, que interage com as células estaminais para controlar o destino das células estaminais.

Pluripotência – Potencial das células estaminais embrionárias de dar origem a todos os tipos de célula diferenciada que constituem um organismo adulto, excluindo as células de placenta e anexos embrionários. Pluripotente - Propriedade de células capazes de diferenciar se em todos os tecidos do organismo adulto, excluindo a placenta e anexos embrionários.

Teratocarcinoma – tumor maligno de células germinais geralmente localizadas nas gónadas, constituído por elementos de tecido de uma ou mais das três camadas germinais, e derivado de células germinais pluripotentes.

Teratoma – forma benigna de teratocarcinoma.

Totipotente – Propriedade de células que

têm capacidade de dar origem a todas as células diferenciadas do organismo adulto, incluindo a parte fetal da placenta, o cordão umbilical e as membranas extra-embriónicas.

Transdiferenciação – Alteração de um tipo de célula diferenciada para outro tipo de célula com forma e função diferente.

Unipotente – Propriedade de células capazes de se diferenciarem num único tecido.

Zigoto ou Ovo – Célula diplóide que contém reservas nutritivas e que, resulta da união dos núcleos do óvulo e do espermatozóide. O zigoto dá origem a um novo indivíduo (embrião) através de várias divisões mitóticas.

AGRADECIMENTOS

Os autores desejam reconhecer o apoio do Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina durante a sua recente instalação na Universidade do Algarve, bem como o das suas Instituições anteriores, nomeadamente o ITQB/IBET, IST-UTL e IGC/FCG. O apoio financeiro ao Curso de Medicina e "Programa de Investigação em Medicina Regenerativa" da Universidade do Algarve, concedido pelo Ministério Ciência, Tecnologia e Ensino Superior através da UMIC, I.P. – Agência para a sociedade do conhecimento, e da FCT, I.P. – Fundação para a Ciência e Tecnologia. Os autores agradecem Dr Lino Ferreira (Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra), o Dr João Facucho-Oliveira (IBB/CBME, Universidade do Algarve) e o Dr João Varela (CCMAR, Universidade do Algarve) pela revisão crítica do manuscrito. José Bragança agradece a Câmara Municipal de Oeiras pela atribuição do prémio «Professor António Xavier 2009» e a Fundação Merck Sharp & Dhome - Portugal pela contribuição ao desenvolvimento do projecto "miPS: reprogramming mouse adult cells".



REFERENCIAS

1. Nirmalanandhan VS & Sittampalam GS (2009) Stem Cells in Drug Discovery, Tissue Engineering, and Regenerative Medicine: Emerging Opportunities and Challenges. *J Biomol Screen* **14**, 755-768.
2. Lerou PH & Daley GQ (2005) Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev* **19**, 321-331.
3. Bluelloch R, Venere M, Yen J & Ramalho-Santos M (2007) Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Drug Selection. *Cell Stem Cell* **1**, 245-247.
4. Okita K, Ichisaka T & Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313.
5. Takahashi K & Yamanaka S (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663-676.
6. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K & Yamanaka S (2007) Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861-872.
7. Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Golland R, Leibel RL & Melton DA (2009) Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 15768-15773.
8. Park I-H, Lerou PH, Zhao R, Huo H & Daley GQ (2008) Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* **3**, 1180-1186.
9. Wernig M, Zhao J-P, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O & Jaenisch R (2008) Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 5856-5861.
10. Battle-Morera L, Smith A & Nichols J (2008) Parameters influencing derivation of embryonic stem cells from murine embryos. *Genesis* **46**, 758-767.
11. Brook FA & Gardner RL (1997) The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 5709-5712.
12. Martin G (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 7634-7638.
13. Evans M & Kaufman M (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 15415-15416.
14. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL & McKay RDG (2007) New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**, 196.
15. Brons IGM, Smithers LE, Trotter MWB, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA & Vallier L (2007) Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**, 191.
16. Vallier L, Mendjan S, Brown S, Chng Z, Teo A, Smithers LE, Trotter MWB, Cho CHH, Martinez A, Rugg-Gunn P, Brons G & Pedersen RA (2009) Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* **136**, 1339-1349.
17. Beddington RS & Robertson EJ (1989) An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* **105**, 733-737.
18. Gardner RL & Rossant J (1979) Investigation of the fate of 4.5 day post-coitum mouse inner cell mass cells by blastocyst injection. *J Embryol Exp Morphol* **52**, 141-152.
19. Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W & Roder J (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**.
20. Bradley A, Evans M, Kaufman M & Robertson E (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**, 255-256.
21. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF & Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111.
22. Sagar J, Chaib B, Sales K, Winslet M & Seifalian A (2007) Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer Cell Int* **7**, 9.
23. Morrison SJ & Spradling AC (2008) Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell* **132**, 598-611.
24. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB & Ashammakhi N (2008) Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* **2**, 169-183.
25. Doetsch F (2003) A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 543-550.
26. Palmer TD, Takahashi J & Gage FH (1997) The Adult Rat Hippocampus Contains Primordial Neural Stem Cells. *Mol Cellular Neurosci* **8**, 389-404.
27. Ito M, Yang Z, Andl T, Cui C, Kim N, Millar SE & Cotzarelis G (2007) Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* **447**, 316-320.
28. Peerani R, Rao BM & Bauwens C YT, Wood GA, Nagy A, Kumacheva E, Zandstra PW. (2007) Niche-mediated control of human embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *EMBO J*.
29. Yu J & Thomson JA (2008) Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev* **22**, 1987-1997.
30. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu S-J, Johnson J, Meisner L & Lanza R (2006) Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* **439**, 216-219.
31. Wakayama S, Hikichi T, Suetsugu R, Sakaide Y, Bui H-T, Mizutani E & Wakayama T (2007) Efficient Establishment of Mouse Embryonic Stem Cell Lines from Single Blastomeres and Polar Bodies. *Stem Cells* **25**, 986-993.
32. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M & Rogers D (1988) Inhibition of pluripotent embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-690.
33. Ying Q-L, Nichols J, Chambers I & Smith A (2003) BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281-292.
34. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS & Jones JM (1998) Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147.
35. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ & Campbell KHS (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-813.
36. French AJ, Adams CA, Anderson L, S., Kitchen JR, Hughes MR & Wood SH (2008) Development of Human Cloned Blastocysts Following Somatic Cell Nuclear Transfer with Adult Fibroblasts. *Stem Cells* **26**, 485-493.
37. Jaenisch R & Young R (2008) Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* **132**, 567-582.
38. Lengerke C & Daley GQ (2009) Disease Models from Pluripotent Stem Cells. *Annals NY Acad Sci* **1176**, 191-196.
39. Hanna J, Wernig M, Markoulakis S, Sun C-W, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu L-C, Townes TM & Jaenisch R (2007) Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin. *Science* **318**, 1920-1923.



40. Park I-H, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch WT, Cowan C, Hochedlinger K & Daley GQ (2008) Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* **143**, 877-886.
41. Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castella M, Rio P, Sleep E, Gonzalez F, Tiscornia G, Garreta E, Aasen T, Veiga A, Verma IM, Surrallés J, Bueren J & Belmonte JCI (2009) Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* **460**, 53-59.
42. Kleinsmith LJ & Pierce GB, Jr. (1964) Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res* **24**, 1544-1551.
43. Gachelin G, Kemler R, Kelly F & Jacob F (1977) PCC4, a new cell surface antigen common to multipotential embryonal carcinoma cells, spermatozoa, and mouse early embryos. *Dev Biol* **57**, 199-209.
44. Solter D & Knowles BB (1978) Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci USA* **75**, 5565-5569.
45. Martin G (1980) Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* **209**, 768-776.
46. Brinster R (1974) The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J Exp Med* **140**, 1049-1056.
47. Atkin N, Baker M, Robinson R & Gaze S (1974) Chromosome studies on 14 near-diploid carcinomas of the ovary. *Eur J Cancer* **10**, 144-146.
48. Andrews P, Banting G, Damjanov I, Arnaud D & Avner P (1984) Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Hybridoma* **3**.
49. Andrews P, Goodfellow P, Shevinsky L, Bronson D & Knowles B (1982) Cell-surface antigens of a clonal human embryonal carcinoma cell line: morphological and antigenic differentiation in culture. *Int J Cancer* **29**, 523-531.
50. Kannagi R, Cochran NA, Ishigami F, Hakomori S, Andrews PW, Knowles BB & Solter D (1983) Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J* **2**, 2355-2361.
51. Matsui Y, Zsebo K & Hogan BLM (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* **70**, 841-847.
52. Resnick JL, Bixler LS, Cheng L & Donovan PJ (1992) Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* **359**, 550-551.
53. Labosky PA, Barlow DP & Hogan BL (1994) Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development* **120**, 3197-3204.
54. Stewart C, Gadi I & Bhatt H (1994) Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Dev Biol* **161**, 626-628.
55. Tada M, Tada T, Lefebvre L, Barton S & Surani M (1997) Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J* **16**, 6510-6520.
56. Shovlin TC, Durcova-Hills G, Surani A & McLaren A (2008) Heterogeneity in imprinted methylation patterns of pluripotent embryonic germ cells derived from pre-migratory mouse germ cells. *Dev Biol* **313**, 674-681.
57. Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR & Gearhart JD (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13726-13731.
58. Turnpenny L, Brickwood S, Spalluto C, M, Piper K, Cameron IT, Wilson DI & Hanley NA (2003) Derivation of Human Embryonic Germ Cells: An Alternative Source of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* **21**, 598-609.
59. Mimeault M, Hauke R & Batra SK (2007) Stem Cells: A Revolution in Therapeutics Recent Advances in Stem Cell Biology and Their Therapeutic Applications in Regenerative Medicine and Cancer Therapies. *Clin Pharmacol Ther* **82**, 252-264.
60. Masson S, Harrison DJ, Plevis JN & Newsome PN (2004) Potential of Hematopoietic Stem Cell Therapy in Hepatology: A Critical Review. *Stem Cells* **22**, 897-907.
61. Brignier AC & Gewirtz AM (2010) Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* **125**, 336-344.
62. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Hollander AP, Mantero S, Conconi MT & Birchall MA (2008) Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *The Lancet* **372**, 2023-2030.
63. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG & Shi S (2002) Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dental Res* **81**, 531-535.
64. Silvério K, Benatti B, Casati M, Sallum E & Nociti F (2008) Stem Cells: Potential Therapeutics for Periodontal Regeneration. *Stem Cell Rev Rep* **4**, 13-19.
65. Kim SU & de Vellis J (2009) Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: A review. *J Neurosci Res* **87**, 2183-2200.
66. Lindvall O & Björklund A (2004) Cell Therapy in Parkinson's Disease. *NeuroRx* **1**, 382-393.
67. Lindvall O & Kokaia Z (2009) Prospects of stem cell therapy for replacing dopamine neurons in Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 260-267.
68. Lindvall O & Kokaia Z (2010) Stem cells in human neurodegenerative disorders — time for clinical translation? *J Clin Invest* **120**, 29-40.
69. O'Donoghue K & Fisk NM (2004) Fetal stem cells. *Best Pract Res Clin Obstetrics Gynaecol* **18**, 853-875.
70. Walther G, Gekas J & Bertrand OF (2009) Amniotic stem cells for cellular cardiomyoplasty: Promises and premises. *Catheter Cardiovasc Interventions* **73**, 917-924.
71. Dick JE (2005) Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Annals NY Acad Sci* **1044**, 1-5.
72. Wang JCY & Dick JE (2005) Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* **15**, 494-501.
73. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F & Kirchner T (2005) Migrating cancer stem cells an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* **5**, 744-749.
74. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K & Steward O (2005) Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Remyelinate and Restore Locomotion after Spinal Cord Injury. *J Neurosci* **25**, 4694-4705.
75. Lund RD, Wang S, Klimanskaya I, Holmes T, Ramos-Kelsey R, Lu B, Girman S, Bischoff N, Sauvé Y, Yves & Lanza R (2006) Human Embryonic Stem Cell-Derived Cells Rescue Visual Function in Dystrophic RCS Rats. *Cloning Stem Cells* **8**, 189-199.
76. Idelson M, Alper R, Obolensky A, Ben-Shushan E, Hemo I, Yachimovich-Cohen N, Khaner H, Smith Y, Wisser O, Gropp M, Cohen MA, Even-Ram S, Berman-Zaken Y, Matzrafi L, Rechavi G, Banin E & Reubinoff B (2009) Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Functional Retinal Pigment Epithelium Cells. *Cell Stem Cell* **5**, 396-408.
77. Thirumala S, Goebel WS & Woods EJ (2009) Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis* **5**, 143-154.

RESUMO

Todos os tecidos e órgãos presentes no nosso organismo são constituídos por células especializadas, que se diferenciaram a partir de células menos especializadas do embrião, as chamadas células estaminais. É também com elas que contamos, para a regeneração dos nossos órgãos e tecidos ao longo da vida. As células estaminais responsáveis pela manutenção dos nossos tecidos e órgãos são as chamadas células estaminais adultas ou somáticas. As células estaminais adultas são classificadas em inúmeros tipos, dado cada tipo de tecido ou órgão ter uma população característica de células estaminais adultas.

Muitos dos estudos pioneiros com células estaminais adultas, incidiram, principalmente, na sua identificação e isolamento a partir da enorme variedade de tecidos e órgãos que constitui o nosso organismo. Para além da compreensão dos mecanismos celulares associados às células estaminais adultas, durante o desenvolvimento, renovação celular e resposta aos mais diversos traumas celulares, o conhecimento da sua biologia, bem como a nossa capacidade de delas tirarmos partido, tem vastíssimas aplicações terapêuticas na área da medicina, quer através da sua utilização terapêutica em várias patologias e episódios de trauma ou na descoberta de novos fármacos e análise experimental de doenças.

Células estaminais adultas em medicina

Ricardo Correia¹ e José Bragança^{1,2}

¹ Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina. Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

² IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centro de Biomedicina Molecular e Estrutural. Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal

Correspondência: jebragança@ualg.pt

INTRODUÇÃO

Propriedades das Células Estaminais Adultas

As células estaminais são células capazes de se auto-renovarem e de se diferenciarem em diferentes tipos de células ou tecidos, durante o desenvolvimento e na idade adulta [1]. As células estaminais podem ser classificadas em dois grandes grupos, relativamente à sua origem: **células estaminais embrionárias e células estaminais adultas**.

As células estaminais embrionárias têm uma origem embrionária e são isoladas a partir da massa interna de blastócitos pré-implantados [2]. Têm um potencial de diferenciação quase ilimitado, podendo originar quase todos os tipos celulares, salvo algumas exceções, não podendo, por exemplo, originar células da placenta, e são consideradas células estaminais pluripotentes [1]. A maioria das células estaminais embrionárias foi isolada a partir de blastócitos excedentários dos processos de fertilização *in vitro* e que acabam por ser doados para fins de pesquisa científica com o consentimento informado dos doadores.

As células estaminais adultas estão presentes nos órgãos e tecidos fetais e adultos, e assim correspondem a um grupo heterogéneo composto por células de diferentes proveniências, desde as isoladas a partir do sangue do cordão umbilical e da placenta até às provenientes de tecidos maduros [3].

As células estaminais adultas possuem as mesmas características básicas de todas as células estaminais, como a capacidade de se auto-renovarem e de se diferenciarem em alguns tipos de células especializadas. A principal função das células estaminais adultas é a manutenção e reparação dos tecidos específicos e órgãos onde se encontram. Elas constituem um repositório celular que é usado constantemente na renovação dos vários tecidos e pontualmente na reparação dos mesmos, aquando de qualquer episódio que interfira com o seu normal funcionamento [4, 5]. O seu potencial de diferenciação é, intrinsecamente, mais reduzido, comparativamente às células estaminais embrionárias [4].

Normalmente, as células estaminais adultas, em processo de diferenciação, geram um tipo de célula transitória antes de atingir o seu estágio final de diferenciação. Essas células intermediárias são chamadas de células precursoras ou progenitoras e são células parcialmente diferenciadas que, por divisão celular, originam apenas células diferenciadas (Fig. 1).

Identificação e Isolamento

A Identificação de células estaminais adultas é actualmente efectuada numa enorme variedade de tecidos e órgãos e efectua-se através de vários critérios histológicos, morfológicos e bioquímicos. Em condições fisio-

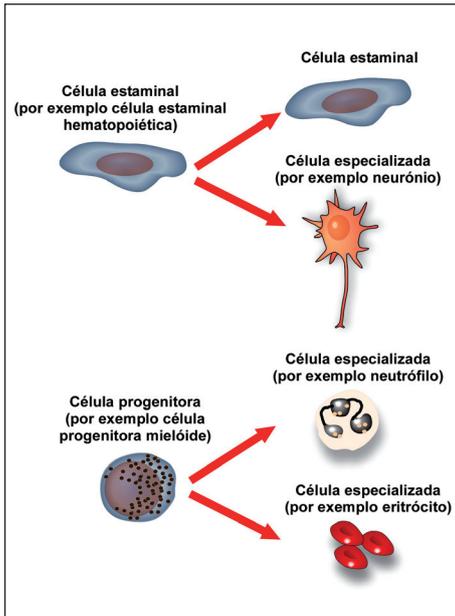


Figura 1. Características distintas das células estaminais adultas e células progenitoras. Uma célula estaminal adulta é uma célula capaz de se auto-renovar e diferenciar em células mais especializadas. A divisão celular de uma célula estaminal adulta resulta sempre em pelo menos uma célula estaminal adicional com as mesmas características. Uma célula progenitora é também ou parcialmente uma célula não especializada mas por divisão celular produz apenas duas células especializadas. Um exemplo de uma célula progenitora é a células mielóide que por divisão celular origina apenas células diferenciadas como leucócitos ou eritrócitos.

lógicas normais, as células estaminais adultas existem nos vários tecidos em pequenos nichos celulares, sendo por isso de difícil isolamento [6]. A dimensão das suas populações celulares é muito reduzida, podendo nalguns casos, como por exemplo as células estaminais hematopoiéticas, existirem em proporções de uma célula estaminal para cem mil células diferenciadas [7].

Na maioria das vezes, as células estaminais adultas são morfologicamente idênticas ou muito semelhantes às células dos tecidos onde se encontram, o que torna o seu isolamento microscópico impossível. A resposta a este problema de identificação estaminal, baseia-se na utilização de marcadores bioquímicos para células estaminais. As proteínas ou factores de transcrição que são característicos de células estaminais, ou específicos para um determinado tipo de célula estaminal adulta, são usados como marcadores citológicos nos processos de identificação e posteriormente, ou em simultâneo, nos processos de isolamento estaminal.

Os marcadores estaminais mais recorrentes

são normalmente proteínas que estão presentes na superfície celular, particularmente proteínas da membrana, como por exemplo receptores membranares. Cada tipo de célula tem um certo arranjo de receptores à sua superfície, que a torna distinta de outros tipos celulares. Os cientistas tiraram depois partido dessa idiosincrasia biológica nos processos de identificação estaminal.

Moléculas fluorescentes, muito comumente anticorpos específicos capazes de reconhecer e aderir de forma específica aos receptores característicos das células a isolar são usados para marcar as células. Os marcadores fluorescentes que emitem energia luminosa (quando activada por uma fonte de energia, como uma luz ultravioleta ou feixe de laser) permitem a visualização das células estaminais alvo (Fig. 2).

O facto de cada tipo de célula estaminal ter marcadores característicos em conjugação com a utilização de moléculas fluorescentes (fluorocromos) permite a identificação das mesmas através de duas técnicas principais: triagem de células activada por fluorescência (FACS; do inglês fluorescence-activated cell sorting) e microscopia de fluorescência. Na técnica FACS, uma suspensão de células às quais foram adicionados moléculas fluorescentes, que reconhecem marcadores estaminais, passa sob pressão através de um orifício suficientemente estreito que permite a passagem de uma única célula de cada vez. Ao sair do orifício, as células passam então individualmente através de uma fonte de luz, geralmente um laser, e em seguida, através de um campo eléctrico. As células estaminais pretendidas correspondem a células fluorescentes que vão ser carregadas com uma carga eléctrica, enquanto as células não fluorescentes não são carregadas, sendo as mesmas depois separadas de acordo com a sua carga (Fig. 3).

Por sua vez, a microscopia de fluorescência utiliza moléculas fluorescentes capazes de reconhecer os marcadores característicos das células estaminais alvo (que após activação por uma fonte luminosa emitem fluorescência) para identificá-las microscopi-

camente no seio do tecido ou órgão original. Para além das técnicas acima referidas, muitas outras técnicas de biologia molecular são utilizadas no processo de identificação de células estaminais adultas como por exemplo a reacção em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), análises northern e western ou a utilização de genes repórteres.

Plasticidade, Diferenciação e Transdiferenciação

As células estaminais adultas apresentam dois tipos de divisão celular: a **divisão celular simétrica** e a **divisão celular assimétrica**. É através da divisão celular simétrica, que as células estaminais garantem a sua capacidade de auto-renovação e mantêm o seu repositório celular, já que este tipo de divisão origina duas células filhas idênticas e que mantêm as propriedades estaminais da célula estaminal progenitora. As células estaminais exibem este tipo de divisão celular durante vários ciclos celulares até ao momento que recebem instruções de diferenciação celular por parte do ambiente celular onde se encontram. Após a recepção desses estímulos de diferenciação as células estaminais deixam de dividir-se simetricamente e passam a exibir uma divisão celular assimétrica que conduzirá à

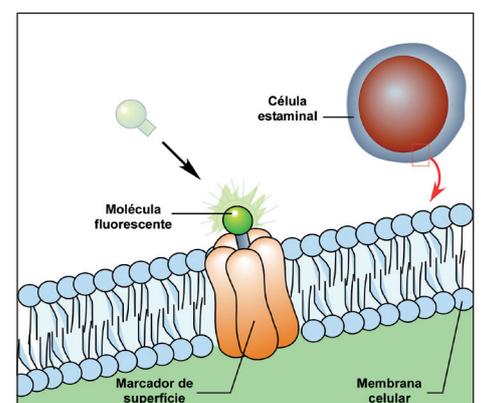


Figura 2. Identificação de marcadores estaminais através da ligação de moléculas florescentes à molécula sinalizadora.

sua diferenciação em células mais especializadas. Acredita-se que é a segregação diferencial das proteínas membranares entre as células filhas que estará na origem da passagem das divisões celulares simétricas para assimétricas e consequentemente da diferenciação celular [6]. Apesar da capacidade de diferenciação ser menor nas células estaminais adultas, sob condições especiais, especialmente *in vitro*, as mesmas podem gerar linhas de células que não gerariam em condições fisiológicas normais. Esse processo celular é induzido através da cultura das células estaminais em meios de crescimento diferentes daqueles que seriam expostas *in vivo* ou quando as mesmas são transplantadas para um órgão ou tecido ou órgão diferente do qual foram isoladas originalmente [8].

Tipos de Células Estaminais Adultas

A lista que dos tecidos e órgãos dos quais foram isoladas células estaminais adultas cresce constantemente e inclui a medula óssea, o sangue periférico, o cérebro, a medula espinhal, a polpa dentária, os vasos sanguíneos, o músculo-esquelético, o epitélio da pele e do sistema digestivo, a córnea, a retina, o fígado e o pâncreas, entre outros [9]. Dado que de uma forma geral, a cada tipo de tecido corresponde um dado tipo de célula estaminal adulta, para além dos muitos tipos de células estaminais já identificados, pensa-se que existirão muitos mais, dado que teoricamente, em cada tecido específico existirá uma pequena população estaminal característica. As células estaminais adultas estão também presentes em tecidos fetais, na placenta e no cordão umbilical [3]. As células estaminais adultas mais estudadas e usadas são as células estaminais hematopoiéticas, mesenquimais, neurais e epiteliais [2].

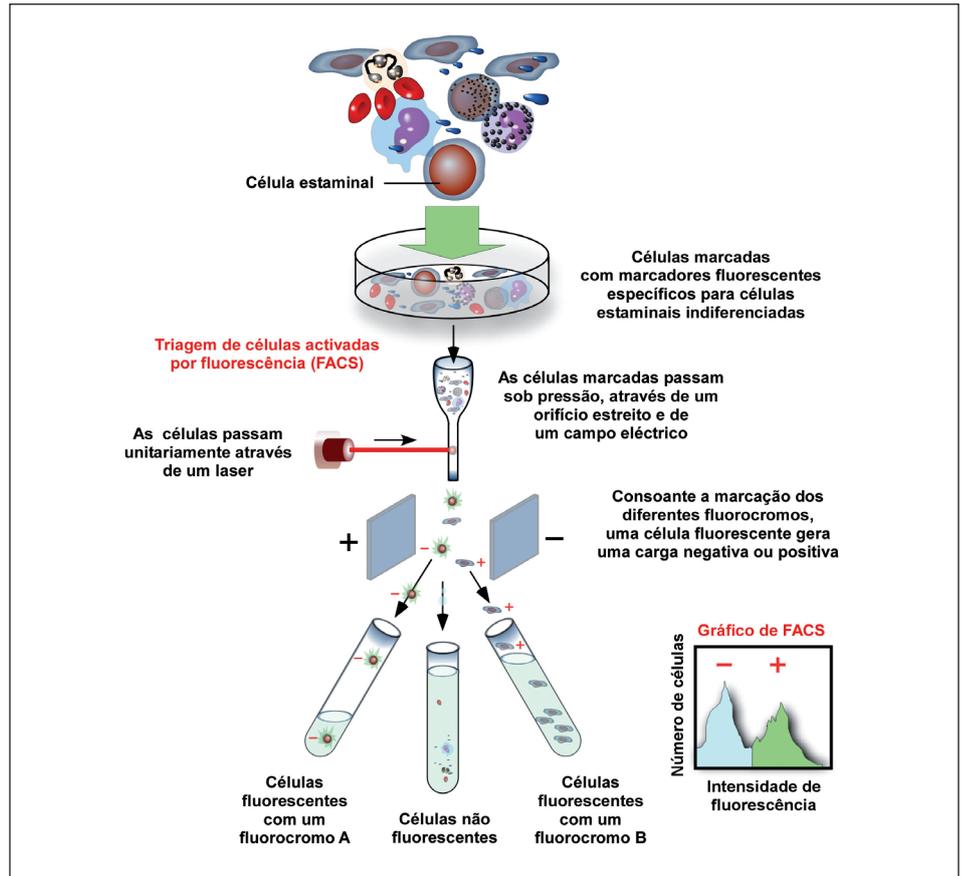


Figura 3. Representação esquemática da triagem de células activada por fluorescência.

As células estaminais hematopoiéticas podem originar todos os elementos sanguíneos, quer eritrócitos, quer linfócitos e plaquetas. Encontram-se, sobretudo, na medula óssea, mas também no sangue circulante, bem como no sangue do cordão umbilical e na placenta. Tipicamente origina dois tipos de células progenitoras: a mielóide e linfóide. Da linhagem linfóide são gerados monócitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrócitos, megacariócitos / plaquetas e células dendríticas. Da linhagem linfóide são derivados linfócitos T e B e células NK [2].

As células estaminais mesenquimais originam por diferenciação condrócitos, miócitos, células adiposas, células do tecido conectivo e osteoblastos e encontram-se geralmente em tecidos conectivos, em especial na medula óssea, tecido adiposo e no sangue do cordão umbilical e encontram-se entre as células estaminais adultas mais fáceis de isolar [10].

As células estaminais neurais encontram-se, predominantemente, nas zonas sub-ventriculares cerebrais e zona sub-granular do hipocampo e originam neurónios, oligodendrócitos e astrócitos [11].

As células estaminais epiteliais originam 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 [2].

Células Estaminais Adultas versus Embrionárias

Muito do interesse emergente no uso de células estaminais adultas em medicina, deve-se ao facto da sua utilização levantar menores questões éticas do que as levantadas pela utilização de células estaminais embrionárias, já que a mesma pode ser considerada, embora de forma simplificada, como apenas um mero transplante.



Para além da ausência de problemas éticos, a menor plasticidade e capacidade proliferativa das células estaminais adultas, comparativamente às embrionárias, é paradoxalmente também um factor positivo. Apesar das células estaminais embrionárias se apresentarem, aparentemente, como uma solução mais vantajosa, dado a sua pluripotência natural, capacidade proliferativa e ao facto de, teoricamente, possuírem uma gama de aplicações mais extensa do que as células estaminais adultas, a sua enorme plasticidade e capacidade proliferativa são propensas à formação de tumores no local alvo ou periféricamente sob a forma de metástases. O uso das células estaminais embrionárias é também limitado pelas dificuldades técnicas em conduzir a sua diferenciação para o tipo celular pretendido [12].

Para além de serem menos propensas à formação de tumores, as células estaminais adultas têm ainda outros pontos a seu favor, como por exemplo o facto de já estarem programadas para originar células diferenciadas o que potencia regenerações ou integrações mais eficazes. Por outro lado, apresentam algumas desvantagens, como a sua menor capacidade de proliferação em relação às células estaminais embrionárias e o facto de poderem conter um maior número de erros genéticos (devido a possíveis exposições a agentes mutagénicos ou erros durante a replicação) e são de mais difícil identificação e isolamento (visto existirem em pequenas populações celulares no seio dos tecidos e órgãos de interesse) [12].

TERAPIA ESTAMINAL

Produção

O facto das células estaminais adultas existirem sob a forma de pequenas populações celulares no seio de tecidos muitas vezes complexos, como por exemplo o cérebro, dificulta em grande medida a sua identificação, isolamento e produção. De um modo geral, após a sua identificação é necessário seleccioná-las, expandi-las *in vitro* e promover a sua diferenciação nos diversos

tipos de células diferenciadas, através do uso de factores de crescimento e outras moléculas reguladoras.

Aplicações Clínicas

Há mais de 40 anos que são usadas células estaminais adultas em medicina, nomeadamente células estaminais hematopoiéticas e mais recentemente células estaminais isoladas a partir do sangue do cordão umbilical, em doenças como a leucemia e anemia aplástica ou em linfomas [13].

A comunidade médica e científica prevê que num futuro próximo, será possível utilizar células estaminais no tratamento de cancro, diabetes, doença de Parkinson, doenças auto-imunes, insuficiência cardíaca, traumas musculares e até em perturbações neurológicas entre muitas outras patologias [14-22]. É no entanto necessário que se saiba mais sobre a biologia das células estaminais bem como sobre os mecanismos das patologias que queremos tratar, até que a utilização das células estaminais seja uma prática clínica comum.

Reposição Celular

A utilização de células estaminais na reposição celular, em tecidos ou órgãos danificados, é um procedimento terapêutico utilizado com sucesso há vários anos e que tem como expoente máximo o transplante de medula óssea. As células estaminais adultas hematopoiéticas, utilizadas nos transplantes de medula óssea, após proliferação e diferenciação, restabelecem os níveis normais de todos os elementos sanguíneos em pacientes com anemias aplásticas ou leucemias leucemias [19].

A utilização de outros tipos de células estaminais é também cada vez mais uma opção clínica, dados os bancos de órgãos ou tecidos destinados a transplante serem insuficientes e os mesmos terem um potencial limitado em órgãos mais complexos como o cérebro. A reposição celular por células estaminais efectua-se, basicamente, através de três processos distintos: por injeção directa nos tecidos afectados, por transferência de célu-

las diferenciadas *in vitro* a partir de células estaminais ou através da estimulação da diferenciação das células estaminais adultas presentes nos tecidos ou órgãos danificados.

Transplante de Órgãos

Para além da utilização de células estaminais na reposição celular de tecidos danificados, as mesmas podem ser utilizadas na produção *ex vivo* de tecidos e órgãos com posterior transplante. Para além da supressão dos problemas associados à escassez de órgãos e tecidos nos bancos de transplante, os tecidos e órgãos gerados por diferenciação estaminal eliminam os riscos de rejeição e os seus efeitos colaterais [13].

Em 2008 foi realizado o primeiro transplante de um órgão humano produzido a partir de células estaminais adultas [23]. O procedimento cirúrgico foi efectuado numa paciente, em que um dos brônquios tinha entrado em colapso, devido a uma tuberculose, o que conduziria inevitavelmente à falência do pulmão por ele arejado.

O transplante brônquico não é medicamente recomendado, dados os brônquios serem dos órgãos mais propensos à rejeição imunológica, mas o Professor Macchiarini e colaboradores decidiram avançar com um pioneiro transplante brônquico autólogo [23]. Um tubo brônquico híbrido foi produzido a partir de uma componente cartilaginosa acelular de um dador, de condroblastos (diferenciados a partir de células estaminais adultas mesenquimais da paciente) e de células epiteliais (retiradas da mucosa brônquica da paciente). Foi colhida uma secção de traqueia de um dador, da qual foi removida toda a componente celular pertencente ao dador e apenas permaneceu a componente cartilaginosa. Foram então depositadas células epiteliais e células estaminais mesenquimais adultas (isoladas a partir da

medula óssea da paciente) sobre essa componente cartilaginosa e procedeu-se durante quatro dias a um processo de maturação e diferenciação *in vitro*. O novo tubo brônquico foi depois transplantado, substituindo com sucesso o brônquio esquerdo da paciente, com a conseqüente recuperação da função respiratória no pulmão esquerdo (Fig. 4).

A conjugação da diferenciação de células estaminais adultas e os biomateriais apropriados, poderá a médio prazo gerar soluções terapêuticas funcionais na área dos transplantes de tecidos e órgãos. Para além da eliminação dos riscos de rejeição por parte pacientes dos novos tecidos, esta prática elimina a necessidade de utilização de imunossuppressores cujos efeitos secundários podem ser graves, tais como: hipertensão arterial, insuficiência renal e mesmo tumores.

Terapia Genética

A terapia genética baseia-se na inserção de genes em células ou tecidos de modo a tratar as mais diversas patologias. Geralmente um gene normal é inserido em células ou tecidos nos quais a expressão do gene é anormal e origina uma patologia específica, como por exemplo em doenças hereditárias nas quais um alelo mutante e pernicioso é substituído por um alelo funcional [8]. A inserção do gene pode ser de difícil execução e frequentemente-

te usam-se vírus como vectores de inserção genética. Embora a terapia genética seja uma tecnologia recente, ela tem sido utilizada com sucesso em alguns campos da medicina humana [24, 25].

As células estaminais adultas apresentam um enorme potencial no âmbito da terapia genética devido às suas capacidades de auto-renovação, inclusão histológica e posterior diferenciação. Essas características celulares torna-as vectores muito apetecíveis em terapia genética, já que o número de processos de inserção genética poderia ser reduzido e a sua acção amplificada ao longo do tempo devido aos mecanismos de proliferação estaminal adulta [12].

A primeira utilização, com sucesso, de células estaminais adultas em terapia genética com humanos ocorreu em 1992, quando Bordignon realizou o primeiro procedimento de terapia genética clínica, utilizando células estaminais hematopoiéticas como vectores de entrega de um gene para a adenosina desaminase em crianças com a síndrome de imunodeficiência combinada severa [26]. Este trabalho culminou em 2002, com a publicação do processo como acto terapêutico da mesma síndrome [27].

As células estaminais adultas hematopoiéticas apresentam-se como as células estaminais de eleição em terapia genética, dado serem facilmente isoladas do sangue e, após modificação genética, serem de fácil inserção nos pacientes através de transplantes autólogos. Elas oferecem ainda a possibilidade de corrigir defeitos em todas as linhagens hematopoiéticas, dado poderem originar to-

dos os tipos de células hematológicas [25]. Porém, a potencial utilização de células estaminais adultas, em terapia genética, não se limita apenas a doenças do foro hematológico. Estudos de terapia genética recentes, em ratinhos, com células estaminais mesenquimais e neurais, mostram resultados animadores em alguns tipos de distrofias musculares e em gliomas, respectivamente [28]. As células estaminais mesenquimais isoladas a partir da medula óssea, após diferenciação em mioblastos *in vitro*, incorporam-se muito bem por injeção no tecido muscular, diferenciam-se em miócitos maduros e associam-se perfeitamente às fibras musculares originais. Estas células estaminais poderão facilmente ser modificadas geneticamente e ser usadas como ferramenta de terapia genética através da expressão de genes causadores de miopatologias, como por exemplo a distrofina na distrofia de Duchenne [29]. Recentemente, foram também utilizadas células estaminais neurais em terapia genética no tratamento de gliomas. As células estaminais foram modificadas *in vitro* de modo a expressarem uma enzima que catalisa a formação de uma substância tóxica para as células tumorais e que despoleta a sua morte celular [30].

Descoberta de Fármacos e Análise de Doenças

Duas das valências das células estaminais adultas, potencialmente importantes para a medicina, são a sua utilização em processos de descoberta de novos fármacos e na análise de doenças. Os investigadores poderão usar as células estaminais adultas como

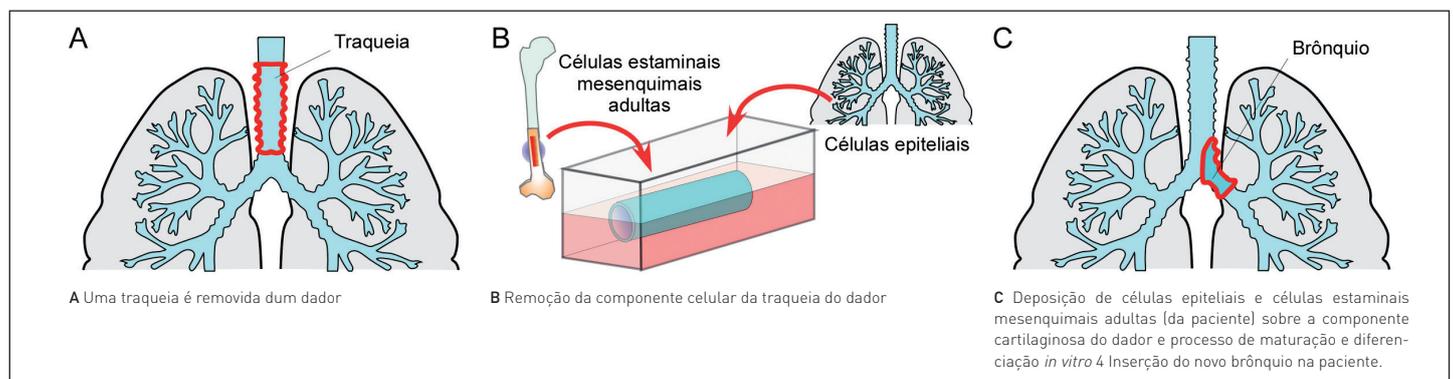


Figura 4. Transplante brônquico autólogo.



“tubo de ensaio” para testar a segurança e qualidade de novos medicamentos.

Populações homogêneas de células diferenciadas, a partir de células estaminais adultas, poderão ser usadas para testar os efeitos farmacológicos, específicos para cada tipo de tecido, sob o efeito de um extenso número de compostos químicos. Essas populações celulares poderão também ser criadas a partir de células isoladas de pacientes que padeçam de uma determinada doença e serem usadas na descoberta de novos fármacos que possam ser úteis no tratamento da doença bem como na compreensão dos seus mecanismos patológicos.

FUTUROS DESENVOLVIMENTOS E CONCLUSÕES

A utilização de células estaminais adultas é em medicina é claramente um campo muito promissor. Transplantes baseados em células estaminais adultas começam a ser usados frequentemente e são constantemente aperfeiçoados no âmbito clínico dando mostras de uma versatilidade superior à que se lhes era inicialmente vaticinada. Contudo, os estudos e ensaios clínicos envolvendo células estaminais adultas encontram-se ainda numa fase muito seminal e serão necessários alguns anos e vários estudos científicos e ensaios clínicos até que possamos tirar partido das enormes potencialidades clínicas das células estaminais adultas.

Apesar dos imensos problemas técnicos, que ainda têm que ser debelados, a utilização de células estaminais adultas em medicina humana trará benefícios inimagináveis, quer através do melhoramento dos mecanismos naturais de regeneração, transplante de órgãos, terapia génica e até na descoberta de novas drogas e análise de doenças.

AGRADECIMENTOS

Os autores desejam reconhecer o apoio do Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina durante a sua recente instalação na Universidade do Algarve. O apoio finan-

ceiro ao Curso de Medicina e “Programa de Investigação em Medicina Regenerativa” da Universidade do Algarve, concedido pelo Ministério Ciência, Tecnologia e Ensino Superior através da UMIC, I.P. – Agência para a sociedade do conhecimento, e da FCT, I.P. – Fundação para a Ciência e Tecnologia. José Bragança agradece a Câmara Municipal de Oeiras pela atribuição do prémio «Professor António Xavier 2009» e a Fundação Merck Sharp & Dhome - Portugal pela contribuição ao desenvolvimento do projecto “miPS: reprogramming mouse adult cells”.

REFERÊNCIAS

1. Jaenisch R & Young R (2008) Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* **132**, 567-82.
2. Kasper D. et al. (2008) *Harrison's Principles of Internal Medicine 17th Edition*. p. 425-435.
3. Tuch BE (2006) Stem cells--a clinical update. *Aust Fam Physician* **35**, 719-21.
4. Leeper NJ, Hunter AL & Cooke JP (2010) Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells. *Circulation* **122**, 517-26.
5. Janssens S (2010) Stem cells in the treatment of heart disease. *Annu Rev Med* **61**, 287-300.
6. He S, Nakada D & Morrison SJ (2009) Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 377-406.
7. Health National Institutes (2006) *Stem Cells: Scientific Progress And Future Research Directions*. NIH.
8. Comyn O, Lee E & MacLaren RE (2009) Induced pluripotent stem cell therapies for retinal disease. *Curr Opin Neurol* **23**, 4-9.
9. Thirumala S, Goebel WS Woods EJ (2009) Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis* **5**, 143-54.
10. Djouad F et al. (2009) Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* **5**, 392-9.
11. Frank RT et al. (2009) Neural stem cells as a novel platform for tumor-specific delivery of therapeutic antibodies. *PLoS One* **4**(12), e8314.
12. Watt FM & Driskell RR (2009) The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **365**, 155-63.
13. Singec I et al. (2007) The leading edge of stem cell therapeutics. *Annu Rev Med* **58**, 313-28.
14. Totey S & Pal R (2009) Adult stem cells: a clinical update. *J Stem Cells* **4**, 105-21.
15. Ferrari M et al. (2007) Adult stem cells: perspectives for therapeutic applications. *Vet Res Commun* **31 Suppl 1**, 1-8.
16. Coulombel L (2007) [Adult stem cells: their scientific interest and therapeutic future]. *Gynecol Obstet Fertil* **35**, 806-10.
17. Hamilton CG (2005) Advances and challenges in the therapeutic use of stem cells. *Nurs Times* **101**, 21-3.
18. Schafer R et al. (2008) Basic research and clinical applications of non-hematopoietic stem cells, 4-5 April 2008, Tübingen, Germany. *Cytotherapy* **11**, 245-55.
19. Perl L et al. (2010) Cellular therapy in 2010: focus on autoimmune and cardiac diseases. *Isr Med Assoc J* **12**, 110-5.
20. Brignier AC & Gewirtz AM (2010) Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* **125 (Suppl 2)**, S336-44.
21. Doetsch F (2003) A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 543-50.
22. Gomperts BN & Strieter RM (2007) Stem cells and chronic lung disease. *Annu Rev Med* **58**, 285-98.
23. Macchiarini P et al. (2008) Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* **372**, 2023-30.
24. Knoell DL & Yiu IM (1998) Human gene therapy for hereditary diseases: a review of trials. *Am J Health Syst Pharm* **55**, 899-904.
25. Nathwani AC, Davidoff AM & Linch DC (2005) A review of gene therapy for haematological disorders. *Br J Haematol* **128**, 3-17.
26. Abbott A (1992) Gene therapy. Italians first to use stem cells. *Nature* **356**, 465.
27. Aiuti A et al. (2002) Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* **296**, 2410-3.
28. Health National Institutes (2006) *Regenerative Medicine*. NIH.
29. Cossu G & Mavilio F (2000) Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective? *J Clin Invest* **105**, 1669-74.
30. Aboody KS et al. (2000) Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 12846-51.



Células estaminais neurais

A caminho da reparação cerebral?

João O. Malva e Liliana Bernardino

Neuroprotecção e Neurogénese na Reparação Cerebral, Centro de Neurociências e Biologia Celular, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, 3004-504 Coimbra, Portugal.

Correspondência: jomalva@fmed.uc.pt

AS DOENÇAS DO CÉREBRO – A URGÊNCIA DA REPARAÇÃO CEREBRAL

As doenças do cérebro na Europa

As doenças do cérebro representam um dos principais problemas de saúde com que se debatem as Sociedades modernas. No seu conjunto, constituem uma das principais fontes de sofrimento tanto para os doentes como para os seus familiares e são responsáveis pelo consumo de uma parte muito significativa do orçamento da União Europeia para o sector da saúde [1]. As doenças do sistema nervoso atingem cerca de 35% da população europeia e representam a principal causa de incapacidade e a segunda causa de mortalidade na União Europeia. Além do impacto directo das doenças do sistema nervoso no paciente, mais ou menos profundo e mais ou menos incapacitante, estas doenças ainda são muito pouco compreendidas e despertam sentimentos que levam à rejeição social. Por outro lado, as pessoas afectadas por este grupo de doenças tornam-se frequentemente doentes crónicos, o que potencia o sofrimento do paciente e contribui

para uma grande dependência dos seus familiares, cuidadores e profissionais de saúde.

Um estudo da European Brain Council concluiu que em 2004 as doenças do Sistema Nervoso foram responsáveis pelo consumo de 386 biliões de euros, numa população de 466 milhões de habitantes, em 28 países da Europa. Estes números permitem concluir que em média o custo das doenças do sistema nervoso é de 829 euros por habitante, repartidos pelos gastos com os cuidados de saúde, os transportes, serviços de acção social, baixas médicas e aposentações antecipadas. Este estudo indica ainda que os custos económicos, com este grupo de doenças, irão aumentar fortemente nos próximos anos, devido sobretudo ao aumento da prevalência das diversas doenças do sistema nervoso com o aumento da esperança de vida [1].

Verifica-se que o investimento europeu na investigação do “cérebro”, tratamento e apoio aos doentes e seus familiares é claramente insuficiente face ao peso que as doenças do sistema nervoso têm

no contexto geral da saúde dos cidadãos europeus. As doenças do sistema nervoso representam 35% dos problemas de saúde da Europa, e no total são mais dispendiosas que o conjunto “cancro e diabetes”. No entanto, a União Europeia só atribuiu ao cérebro 8% do orçamento disponível para financiar as ciências da vida, relativamente ao V Programa Quadro, o que representou menos de 0,01% do custo total das doenças do cérebro no período 1998-2002.

Estes números são bem exemplificativos do enorme desfazamento entre o peso real das doenças do sistema nervoso (social e económico) e o investimento na sua investigação nas sociedades europeias. Muitos factores contribuem para este desfazamento. O desconhecimento da Sociedade no que respeita à base fisiológica do funcionamento do cérebro contribui para o estigma social das doenças cerebrais. Devido à abrangência de disciplinas biológicas que estudam o cérebro criou-se uma área interdisciplinar de estudo do cérebro designada Neurociência que engloba diversas especialidades científicas e clínicas, nomeadamente, neurologia, psicologia, psiquiatria, neuroendocrinologia, entre outras. Para este cenário muito contribui a grande diversidade de manifestações que vão desde predominantemente físicas até quase exclusivamente neuropsicológicas. Entre as principais doenças do cérebro encontram-se: ansiedades, enxaquecas, depressões, toxicodependências, demências, epilepsias, esquizofrenia, doença de Parkinson, acidentes vasculares cerebrais, traumatismos, esclerose múltipla e tumores cerebrais. Esta diversidade de patologias, com todos os custos sociais e económicos associados, deveria contribuir para mobilizar a sociedade e os decisores políticos para a urgência de compreender o cérebro e desenvolver tratamentos eficientes para as suas doenças. No entanto, a diversidade nem sempre contribui para a eficiência. Bons exemplos (pela positiva) de eficiência

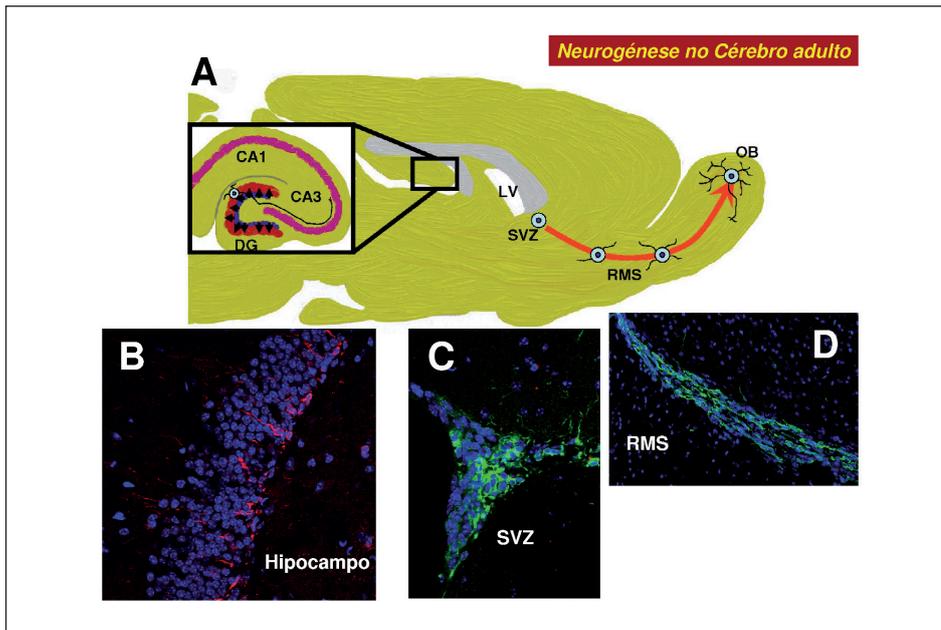


Figura 1. Neurogênese no cérebro adulto. (A) Representação ilustrativa de um corte sagital do cérebro adulto de roedor mostrando a localização dos nichos neurogênicos: região subventricular [SVZ] e região subgranular [SGZ] do giro dentado no hipocampo. As células estaminais/progenitoras presentes na SVZ dão origem a novos neurónios que migram pela via rostromigratória (RMS) em direcção ao bulbo olfactivo (OB) onde se diferenciam em interneurónios e se integram nos circuitos neurais pré-existentes. Fotografias representativas de microscopia confocal de novos neurónios [identificados a verde ou vermelho pelo marcador DCX - "doublecortin"] no giro dentado do hipocampo (B), na região SVZ (C) e na via rostromigratória (D).

e unidade na transmissão de mensagens, e de "lobby" positivo eficiente, encontram-se na área do cancro ou da SIDA. Nestes casos o foco ajuda à transmissão da mensagem e claramente favorece positivamente o "lobby" e a colheita de dividendos no que respeita ao maior investimento relativo que estas áreas da ciência recebem em comparação com o cérebro.

A European Brain Council e os movimentos nacionais emergentes, com a constituição de grupos de acção ou de conselhos nacionais para o cérebro, procuram reforçar o "lobby" social e político do "cérebro", juntando profissionais, doentes, familiares e companhias farmacêuticas dedicadas ao estudo do cérebro. Através de acções educativas concertadas procura-se desmistificar o cérebro e aumentar o investimento em investigação científica e em cuidados de saúde dedicados ao sistema nervoso.

O tratamento das doenças do cérebro – estado actual

O conhecimento científico insuficiente sobre o funcionamento do cérebro contribuiu de forma determinante para a ausência de

terapêuticas curativas para a maioria das doenças do sistema nervoso. Numa perspectiva histórica, as doenças do cérebro foram inicialmente tratadas com recurso a técnicas cirúrgicas ou químicas agressivas e pouco eficientes que provocavam efeitos secundários incapacitantes para os doentes. Com o aumento do conhecimento sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos na comunicação entre as células do cérebro foram criadas condições para o desenvolvimento racional da neurofarmacologia. As companhias farmacêuticas colocaram grande esforço de investigação e desenvolvimento em novos fármacos mais robustos e selectivos, que permitiram controlar vários sintomas das doenças do sistema nervoso. O desenvolvimento de novos fármacos com acção no sistema nervoso teve particular importância na segunda metade do século XX e continua uma actividade relevante no início do Século XXI. Paralelamente com o desenvolvimento de novos fármacos e com a evolução de técnicas de imagiologia cerebral funcional a comunidade médica contribuiu com o desenvolvimento de novas técnicas

cirúrgicas mais eficientes e menos debilitantes. Neste conjunto de técnicas cirúrgicas podemos destacar a estimulação cerebral profunda, pela robustez de efeitos e pelos seus efeitos secundários mínimos. No entanto, como referimos anteriormente, a comunidade científica e médica continua a não dispôr de boas estratégias para curar o sistema nervoso doente.

Medicina Regenerativa do cérebro – esperança para o futuro?

A falta de tratamentos eficientes para as doenças do cérebro contribuiu muito significativamente para o seu impacto na Sociedade, uma vez que a maior parte das terapias existentes está muito mais vocacionada para o alívio de sintomas do que para a sua cura propriamente dita. Por outro lado, estas doenças são muito desconhecidas tanto do ponto de vista das suas causas primárias como do ponto de vista da eficácia terapêutica.

Assim, é essencial desenvolver novas terapias para reparar o tecido nervoso lesado, o que poderá constituir um elemento central no desenvolvimento futuro das Neurociências. Neste contexto, novas estratégias neuroprotectoras, com capacidade de prevenir a morte neuronal resultante da agressão do cérebro, e o desenvolvimento de novas estratégias reparadoras do tecido nervoso afectado, recorrendo a células estaminais, poderão contribuir determinadamente para a futura terapia do cérebro doente.

A ideia dogmática de que o cérebro é desprovido de capacidade regenerativa mudou drasticamente nos últimos anos com a descoberta de nichos de células estaminais neurais com capacidade de gerar novos neurónios no cérebro adulto de mamíferos, incluindo nos Humanos. A presença



de células estaminais e progenitoras residentes no cérebro adulto, e o avanço vertiginoso no conhecimento sobre o seu funcionamento e manipulação, alimentam a esperança do desenvolvimento futuro de novas estratégias para a eficiente reparação cerebral. Em particular, é necessário desenvolver esforços para compreender os processos de modulação do desenvolvimento, diferenciação e migração das células imaturas, de modo a obter um processo de substituição de neurónios mortos e integração funcional de novas células nos circuitos neuronais [2].

Neurogénese no cérebro adulto

A **neurogénese** no cérebro adulto é um processo que ocorre continuamente ao longo a vida. Em nichos restritos do sistema nervoso existem células estaminais neurais e células progenitoras que proliferam continuamente e que produzem células do sistema nervoso, que se integram funcionalmente em circuitos neurais. Este processo de diferenciação constitutiva de novos neurónios, astrócitos e oligodendrócitos ocorre em duas regiões principais: a região subventricular, que ladeia os ventrículos laterais, e a camada subgranular do giro dentado do hipocampo [2-4] (Figura 1).

Este processo de renovação e integração de novas células no sistema nervoso central, e mais especificamente no cérebro, ocorre de modo constitutivo, produzindo células que desempenham um papel activo na fisiologia do tecido nervoso. Por outro lado, a neurogénese também pode ser estimulada em resposta à agressão cerebral. O tecido cerebral danificado produz um ambiente permissivo para a neurogénese, estimulando a produção de novas células neurais e facilitando a migração de progenitores das zonas neurogénicas

para as zonas de lesão. Esta neurogénese estimulada pela lesão contém um enorme potencial reparador do cérebro e lança um desafio importante aos neurocientistas: o aproveitamento deste potencial reparador para desenvolver novas estratégias terapêuticas para as patologias que afectam o sistema nervoso [5-7].

Neurogénese no hipocampo

Na camada subgranular do **giro dentado** existem células estaminais neurais e células progenitoras que se diferenciam em astrócitos e em células granulares do giro dentado. Nesta estrutura o nicho neurogénico inclui células estaminais e células progenitoras do tipo 1, do tipo 2 e do tipo 3, com capacidade proliferativa e que apresentam marcadores de imaturidade/célula estaminal como a nestina, Sox2 e GFAP ("Glial Fibrillary Acid Protein"). Os progenitores do tipo 3 encontram-se em fase proliferativa mas começam a perder os marcadores de imaturidade e adquirem características fenotípicas da linha neuronal (PSA-NCAM, "Poly-Sialated Neural Cell Adhesion Molecule"), num processo que leva à diferenciação funcional de neurónios jovens. O nicho neurogénico está intimamente associado a lâmina basal da vasculatura que fornece contacto físico e químico essencial à manutenção do estado de imaturidade estaminal. Os neuroblastos resultantes da divisão assimétrica dos progenitores saem do ciclo de divisão celular e migram localmente para a camada granular do giro dentado, onde se integram funcionalmente como novos neurónios granulares. Este processo de neurogénese constitutiva desempenha um papel muito importante na renovação da arquitectura sináptica do hipocampo e provavelmente desempenha um papel importante na formação e recordação de memórias armazenadas [3,8].

Neurogénese na região subventricular

A **região subventricular** (SVZ) do cérebro adulto é um local onde ocorre activamente

um processo de neurogénese constitutiva. Este nicho neurogénico ladeia os ventrículos laterais e é o local de formação de neuroblastos que migram para os bolbos olfactivos, onde se diferenciam e integram como novos neurónios funcionais. O nicho neurogénico da SVZ está organizado em rosetas celulares constituídas por três tipos distintos de células. As células B que são as células com propriedades estaminais, e fenótipo próximo dos astrócitos. Estas células proliferam lentamente e são muito ramificadas, o que lhes permite entrar em contacto com os outros parceiros celulares e moleculares do nicho neurogénico, que inclui a lâmina basal da vasculatura sanguínea da SVZ. As células B possuem ainda um prolongamento especial em forma de cílio que atravessa o espaço apertado entre as células endoteliais, ciliadas, que revestem a parede do ventrículo lateral. Através desta estrutura as células B têm acesso directo ao líquido cefalorraquidiano dos ventrículos laterais. As células B dão origem às **células C** que são células com grande capacidade proliferativa e que são responsáveis pela grande dinâmica proliferativa da SVZ. As células C dão origem às **células A** que saem do ciclo celular e formam neuroblastos que se organizam em cadeias migratórias em direcção ao bolbo olfactivo. Estas cadeias de neuroblastos são rodeadas por estruturas tubulares formadas por astrócitos que saem da SVZ e se juntam na região anterior da SVZ formando a via rostromigratória. As cadeias migratórias de neuroblastos (células A) da **via rostromigratória** organizam-se intimamente com uma rede muito rica de vasos sanguíneos. Assim, para que ocorra a migração dos neuroblastos através da via rostromigratória parece ser muito importante o suporte físico e químico (que inclui sinalização pelo factor neurotrófico BDNF - "Brain derived neurotrophic factor") fornecido pelos astrócitos e pelos vasos sanguíneos. Além disso, parece haver um gradiente químico na via rostromigratória com propriedades

repulsivas com origem na SVZ e quimio-atractivas com origem no bolbo. Actualmente em conjunto, estes factores forçam a migração rostral dos neuroblastos em direcção ao bolbo olfactivo. Ao chegarem ao bolbo olfactivo os neuroblastos abandonam a sua migração tangencial e migram radialmente para as diferentes camadas celulares do bolbo, onde se diferenciam como neurónios granulares e glomerulares. Este processo de neurogénese constitutiva do bolbo olfactivo é muito importante para a discriminação de odores em roedores [2,9-11].

Neurogénese e lesão cerebral

Vários estudos publicados recentemente indicam que há uma estimulação da diferenciação de neurónios e de oligodendrócitos em várias patologias do sistema nervoso. Esta neurogénese tem potencial "reparador" pois pode vir a constituir uma fonte regeneradora do tecido cerebral; assim os neurocientistas aprendam a manipular os processos de controlo de diferenciação, migração, integração e sobrevivência de novas células no parênquima cerebral [7].

Em resposta a agressões isquémicas cerebrais há uma estimulação da proliferação de células nos nichos neurogénicos e posterior migração de neuroblastos para regiões onde a neurogénese não é constitutiva como no córtex cerebral ou no estriado. Esta migração "atípica" de neuroblastos parece ser favorecida por modificações do parênquima cerebral lesado (incluindo resposta inflamatória) que se torna permissivo à migração e diferenciação de neurónios. Por outro lado, foi demonstrado que a migração de neuroblastos para as zonas de lesão cerebral ocorre em estreita associação com a diferenciação de novos vasos sanguíneos, que poderão fornecer substrato físico e químico para a migração de neuroblastos [12-14].

No entanto, é muito importante ter em mente que a adição de mais neurónios às redes neuronais não é necessariamente

um processo benéfico. Assim, o estudo da neurogénese no hipocampo em condições de epilepsia é um bom exemplo para as enormes dificuldades que se vislumbram para a Medicina Regenerativa do cérebro [3,15-17]. No giro dentado do hipocampo verifica-se que as crises epilépticas potenciam a diferenciação de novos neurónios granulares. No entanto, nestas condições as células apresentam uma menor compactação e inserção na camada granular do giro dentado, e formam sinapses aberrantes que contribuem para o fenómeno de "sprouting" das fibras musgosas, bem descrito em modelos animais e humanos de epilepsia do lobo temporal.

Os nichos neurogénicos do cérebro, especialmente a região SVZ, não fornecem exclusivamente neurónios para o parênquima cerebral. Há, de facto, uma produção muito activa de células que expressam GFAP e que constituem uma reserva de células imaturas e de diferenciação em astrócitos. Por outro lado, verificou-se que em modelos animais de doenças desmielinizantes há diferenciação de novas células da linha oligodendrocítica, o que pode revelar o carácter bipotente da diferenciação de células SVZ (na linha neuronal e oligodendrocítica) [5]. A estimulação de diferenciação de novos oligodendrócitos em doenças desmielinizantes tem uma importância acrescida no corpo caloso e pode vir a revelar-se uma linha de investigação de importância crescente para futuras abordagens reparadoras do cérebro em pacientes com esclerose múltipla [12]. Recentemente ganhou força uma nova ideia que lança enorme esperança sobre o verdadeiro potencial reparador do cérebro adulto doente. Verificou-se que em áreas de lesão cerebral existem astrócitos reactivos que apresentam marcadores fenotípicos de imaturidade, como marcação para nestina ou Sox-2. Além disso, verificou-se que é possível reprogramar geneticamente estas células para adquirirem a capacidade de se diferenciar em neurónios com diferentes fenótipos. Esta desco-

berta constitui em si um facto espantoso, e além disso promete novos e fascinantes desenvolvimentos científicos. Estas células, já descritas por Ramón e Cajal, permaneceram "adormecidas" para a neurociência durante décadas revelando agora o seu potencial "estaminal", que inclui a associação física à rede vascular angiogénica da zona de lesão. Se a comunidade científica desenvolver estratégias farmacológicas ou genéticas de manipulação dos astrócitos reactivos para que estes adquiram propriedades de diferenciação, nos fenótipos celulares de interesse para cada patologia particular, então o próprio cérebro já resolveu um grande problema aos neurocientistas... como colocar células reparadoras na zona de lesão!

No entanto, como acontece em tantos fenómenos biológicos, também o potencial estaminal do cérebro apresenta a sua dupla face de Janus. Dados recentes indicam que os nichos neurogénicos além de representarem uma fonte de produção constitutiva e fisiológica de células neurais, e ainda uma fonte de células com potencial reparador, podem também ser uma fonte de problemas e contribuir directamente ou indirectamente para a geração de alguns tipos de tumores cerebrais, especialmente gliomas. As células tumorais cerebrais apresentam muitas características semelhantes às células imaturas/estaminais do cérebro. Estas características incluem autorenovação e grande capacidade proliferativa; elevada associação funcional à lâmina basal da vasculatura sanguínea; marcação fenotípica de imaturidade que inclui nestina, Sox-2, CD133; sinalização por EFG ("Epidermal Growth Factor") e PDGF ("Platelet-derived Growth Factor"); pluripotência (revisto por Agasse et al. [2]). Por outro lado, têm sido identificados ca-

tos clínicos em que os gliomas parecem ter uma localização estreitamente associada com os nichos neurogênicos, especialmente em SVZ. Em conjunto, estes dados levam a supôr que em determinadas circunstâncias, favorecidas por susceptibilidade genética, a desregulação do ambiente químico ou físico do nicho neurogênico pode ser um elemento determinante na desregulação do controlo do ciclo celular das células imaturas e levá-las a adquirir propriedades cancerosas.

No laboratório desenvolvemos uma metodologia que nos p ermite identificar funcionalmente, em tempo real, uma diversidade de tipos celulares derivados de culturas de células estaminais neurais da SVZ (Figura 2). Desenvolvemos um protocolo de estimulação das culturas SVZ que nos permite induzir e registar alterações de cálcio intracelular em células individuais. Esta plataforma permite associar função a fenótipo, célula a célula, e revela-se de grande importância para estudos farmacológicos e conseqüentemente para a descoberta de novos alvos terapêuticos de doenças do cérebro (Figura 3).

O futuro...

Neste artigo não se pretende concluir que a utilização de recursos neurogênicos endógenos do cérebro ou que terapias celulares recorrendo ao transplante de outras fontes de células estaminais/progenitoras irão resultar, a curto e médio prazo, em avanços concretos da Medicina com aplicação em doenças do Sistema Nervoso humano. No entanto, não é menos verdade que a grande dinâmica da investigação científica nesta área, e o enorme avanço no conhecimento que daqui resulta, permite alimentar esperanças, bem fundamentadas, para novos desenvolvimentos

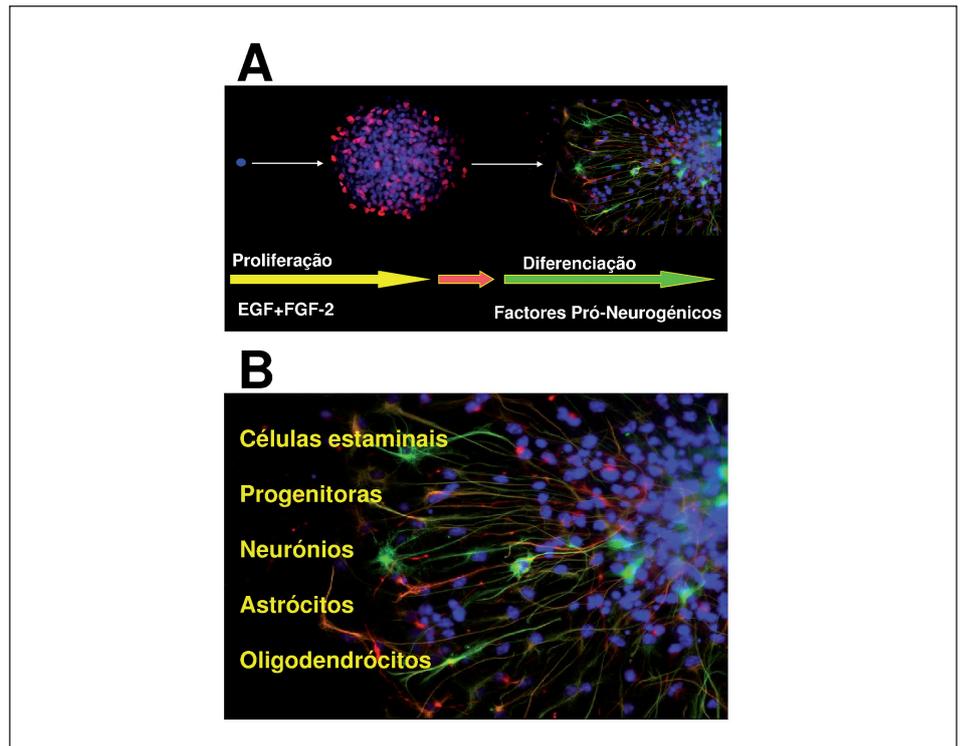


Figura 2. Cultura de células estaminais neurais. As células estaminais neurais e progenitoras de roedores [pós-natal] podem ser cultivadas em laboratório. Suspensões celulares são isoladas a partir de fatias coronais de cérebro de onde se extraem as células da região adjacente aos ventrículos laterais (região subventricular - SVZ). As células com potencial mitótico proliferam em cultura (na presença de fatores de crescimento como EGF e FGF-2) e originam agregados clonais designados neuroesferas. As neuroesferas derivadas das células da SVZ têm grande potencial proliferativo e podem atingir muitas dezenas de células no espaço de uma semana. Numa segunda fase, é possível inibir a proliferação das células e promover a sua diferenciação. Para isso, retiram-se os fatores de crescimento e depositam-se as neuroesferas sobre uma lamela de vidro revestida com substrato adequado como poli-lisina ou laminina. Nestas condições, as neuroesferas aderem ao substrato e um conjunto de células migra radialmente para fora da neuroesfera, formando uma pseudo-monocamada de células que diferencia (A e B). Nesta pseudo-monocamada é possível identificar uma diversidade de células que incluem: células imaturas, progenitores, astrócitos, oligodendrócitos e neurónios (B).

que nos levarão a aplicações clínicas concretas.

Ainda há poucas centenas de anos quem iria imaginar que o homem poderia cruzar Oceanos em máquinas voadoras? Há poucas dezenas de anos quem poderia imaginar que o Homem poderia reprogramar fibroblastos, de tecido adulto, vindo estes a adquirir propriedades de células pluripotentes? Em ambos os casos, a ciência desafia constantemente a nossa imaginação impelindo-nos para esta missão científica, cívica e cultural, que se projecta para além das fronteiras do conhecimento actual e nos ajuda a moldar e a construir o futuro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração sempre activa e generosa dos membros

da equipa de investigação do grupo "Neuroprotecção e Neurogênese na Reparação Cerebral". Agradecimento especial para Fabienne Agasse, Sofia Grade, Alexandra Rosa, Maria Francisca Eiriz, Sara Xapelli, Tiago Santos e Bruno Silva pelo seu envolvimento na concepção e execução dos trabalhos que permitiram otimizar procedimentos e técnicas experimentais e solidificar um grupo de investigação. Financiado por PTDC/SAU-NEU/68465/2006, PTDC/SAU-NEU/104415/2008 e FEDER.

REFERÊNCIAS

1. Olesen J, Baker MG, Freund T, di Luca M, Mendlewicz J, Ragan I and Westphal M (2006) Consensus document on European brain research. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **77** (suppl 1): i1-i49.
2. Agasse F, Bernardino L and Malva JO (2007) *Subven-*

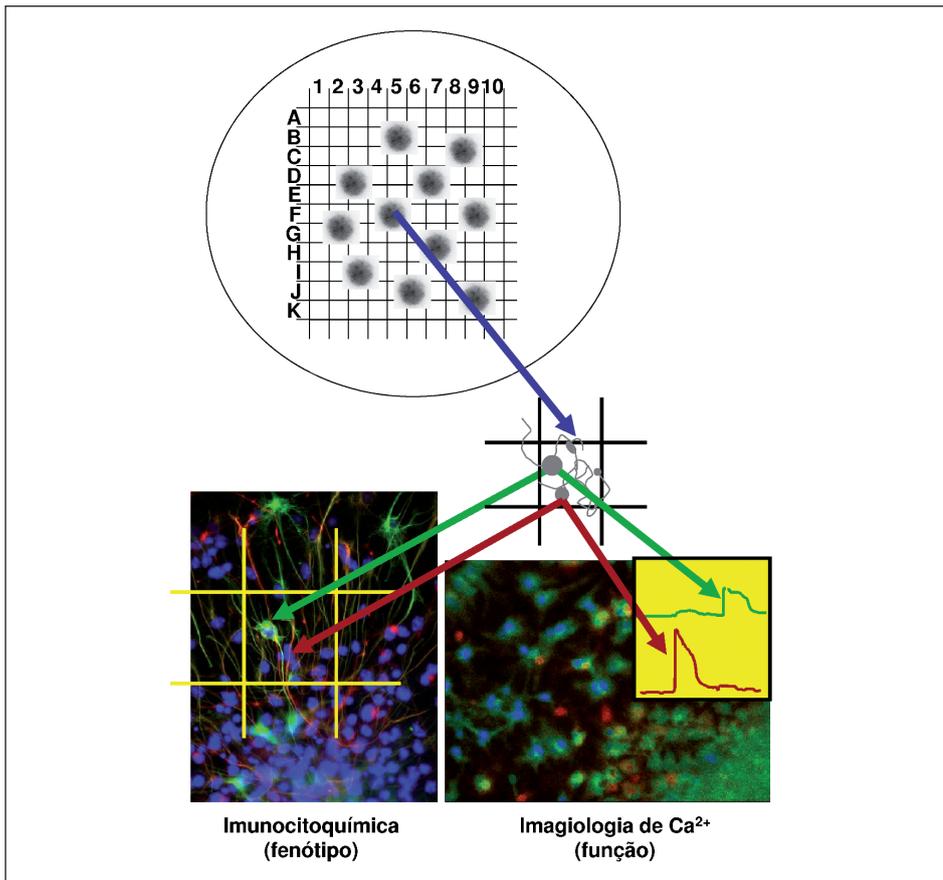


Figura 3. Imagiologia de cálcio intracelular em células individuais: associação fenótipo-função. No laboratório desenvolvemos uma metodologia que nos permite identificar funcionalmente, em tempo real, uma diversidade de diferentes tipos celulares derivados de culturas de células estaminais neurais. Recorrendo a imagiologia de cálcio intracelular em célula individual, usando para isso a sonda fluorescente "Fura-2", desenvolvemos um protocolo de estimulação das culturas SVZ que nos permite induzir e registrar respostas celulares selectivas. Através do recurso a lamelas de vidro marcadas com uma micro-grelha pudémos localizar conjuntos de células submetidos às experiências de cálcio intracelular em célula individual e, posteriormente, as mesmas células são tratadas para experiências de imunocitoquímica e o seu fenótipo é revelado. Esta plataforma permitiu otimizar um método que nos permite identificar em tempo real, e no espaço de cerca de 15 minutos, o fenótipo funcional de cerca de centena e meia de células, que incluem: células imaturas, astrócitos, progenitores, oligodendrócitos, neuroblastos e neurónios. Esta plataforma tecnológica mostra-se particularmente robusta para estudos funcionais e farmacológicos pois tira partido de células vivas e permite revelar o seu fenótipo – assim, abrem-se novas oportunidades para a descoberta de novos fármacos selectivos para alvos moleculares restritos a linhagens celulares que derivam de células estaminais neurais.

tricular zone cells as a tool for brain repair in: Interaction between neurons and glia in aging and disease; pp. 81-108; Edited by JO Malva, AC Rego, RA Cunha and CR Oliveira; Springer, New York.

3. Gray WP and Laskowsky A (2007) Glia and hippocampal neurogenesis in the normal, aged and epileptic brain *in: Interaction between neurons and glia in aging and disease*; pp. 375-390; Edited by JO Malva, AC Rego, RA Cunha and CR Oliveira; Springer, New York.

4. Ma DK, Ming G-I, Gage FH and Song H (2008) Neurogenic niches in the adult mammalian brain *in: Adult neurogenesis*; pp. 207-226; Edited by F Gage, G Kempermann and H Song; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

5. Bruce CC, Franklin RJM and Relvas JB (2007) Remyelination of the central nervous system *in: Interaction between neurons and glia in aging and disease*; pp. 427-

444; Edited by JO Malva, AC Rego, RA Cunha and CR Oliveira; Springer, New York.

6. Deierborg T, Li J-Y and Brundin P (2007) Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases *in: Interaction between neurons and glia in aging and disease*; pp. 445-460; Edited by JO Malva, AC Rego, RA Cunha and CR Oliveira; Springer, New York

7. Galvão RP, Álvarez-Buylla A and García-Verdugo JM (2008) Adult neural stem cells: prospects for brain repair *in: Cell Therapy*; pp.309-336; Edited by D García-Olmo, JM García-Verdugo, J Alemany and JA Gutiérrez-Fuentes. Mc Graw Hill, Madrid.

8. Kempermann G, Song H and Gage FH (2008) Neurogenesis in the adult hippocampus *in: Adult neurogenesis*; pp. 159-174; Edited by F Gage, G Kempermann and H Song; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

9. Kohwi M, Galvão RP and Alvarez-Buylla A (2006) Birth, migration and function of SVZ-derived neurons in the adult brain *in: Mammalian subventricular zones*; pp. 84-116; Edited by SW Levison; Springer, New York.

10. Lledo P-M (2008) Adult neurogenesis in the olfactory bulb *in: Adult Neurogenesis*; pp. 425-444; Edited by F Gage, G Kempermann and H Song; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

11. Lim DA, Huang Y-C and Alvarez-Buylla A (2008) Adult subventricular zone and olfactory bulb neurogenesis *in: Adult neurogenesis*; pp. 176-206; Edited by F Gage, G Kempermann and H Song; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

12. Nait-Oumesmar B, Decker L, Picard-Riera N and Evercooren AB (2006) Responses of the SVZ to demyelinating diseases *in: Mammalian subventricular zones*; pp. 260-280; Edited by SW Levison; Springer, New York.

13. Lie DC and Götz M (2008) Adult neurogenesis: similarities and differences in stem cell fate, proliferation, migration, and differentiation in distinct forebrain regions *in: Adult Neurogenesis*; pp. 227-266; Edited by F Gage, G Kempermann and H Song; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

14. Lindvall O and Kokaia Z (2008) Neurogenesis following stroke affecting the adult brain *in: Adult Neurogenesis*; pp. 549-570; Edited by F Gage, G Kempermann and H Song; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

15. Bernardino L, Ferreira R, Cristóvão AJC, Sales F and Malva JO (2005) Inflammation and Neurogenesis in *Temporal Lobe Epilepsy. Current Drug Targets – Central Nervous System & Neurological Disorders* 4: 349-360.

16. Jessberger S and Parent JM (2008) Epilepsy and adult neurogenesis *in: Adult Neurogenesis*; pp. 535-548; Edited by F Gage, G Kempermann and H Song; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

17. Sperk G, Drexel M, Tasan R and Wieselthaler A (2007) Epilepsy, brain injury and cell death *in: Interaction between neurons and glia in aging and disease*; pp. 365-376; Edited by JO Malva, AC Rego, RA Cunha and CR Oliveira; Springer, New York.



Bioengineering strategies for stem cell expansion and differentiation

Margarida Serra^{1,2}, Catarina Brito^{1,2}, Paula M. Alves^{1,2*}

1 Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal

2 Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Oeiras, Portugal;

*Corresponding author: Paula Marques Alves

ITQB-UNL/IBET, Apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal (Phone: +351 21 446 94 12; FAX: +351 21 442 11 61; e-mail: marques@itqb.unl.pt; website address: <http://tca.itqb.unl.pt>)

ABSTRACT

Human stem cells, with their unique characteristics for indefinite proliferation and multi-lineage differentiation, are an appealing source for cell replacement therapies, tissue engineering, drug discovery and *in vitro* toxicology. For the clinical implementation of these cells, there is the need for translating the culture protocols developed at research laboratories into validated bioprocesses that can guarantee reproducibility, scalability, standardization, robustness and safety.

The success of stem cell utilization relies on the i) development of scalable and robust bioreactor devices, ii) design of flexible culture strategies and iii) monitoring and control of the culture environment. This article provides an overview of current bioengineering strategies that could be used to generate large numbers of stem cells and/or their derivatives with potential application in regenerative medicine and drug discovery.

INTRODUCTION

The search for effective therapies for a myriad of degenerative diseases considered incurable, such as Parkinson's disease and Type I diabetes, has been a long-lasting challenge for the scientific community. In the last decade, the potential of stem cell therapy has become well established and it is envisioned that in a near future stem cells will be used as a new source of neurons or insulin producing cells to replace the degenerating tissues and/or impaired cells.

In addition to cell therapy applications, stem cell technology platform holds enormous prospective for the development of novel strategies in tissue engineering, drug screening and *in vitro* toxicology [1-4].

In order to fulfill such promise large numbers of high quality cells are needed. This demand for stem cells requires, on a first approach, the implementation of scalable and affordable culture systems for the production of pure populations of undifferentiated cells without compromising their stem cell characteristics (self-renewal ability and differentiation potential). In the next step, consisting in generating particular cell types for specific ap-

plications, it is critical to exactly direct stem cell differentiation to the desired lineage; increasing differentiation efficiency, population purity and improving cell functionality are the major technological challenges.

This review will address current developments in stem cell bioprocessing. We will focus on the identification of the essential requirements for the successful transition of stem cells into cell therapy and industrial applications. The impact of the stem cell source as well as of the culture conditions, including bioreactors, culture strategies and operation parameters, for controlling stem cell fate decisions will be discussed.

Stem Cell Sources

There are several classes of stem cells including embryonic and adult stem cells, and more recently induced stem cells, each one presenting its own benefits, limitations and challenges in bioprocess development (Fig. 1). All of them share as common features the ability to proliferate indefinitely (unlimited self-renewal capacity) and vary in their differentiation potential.

Human embryonic stem cells (hESCs), iso-

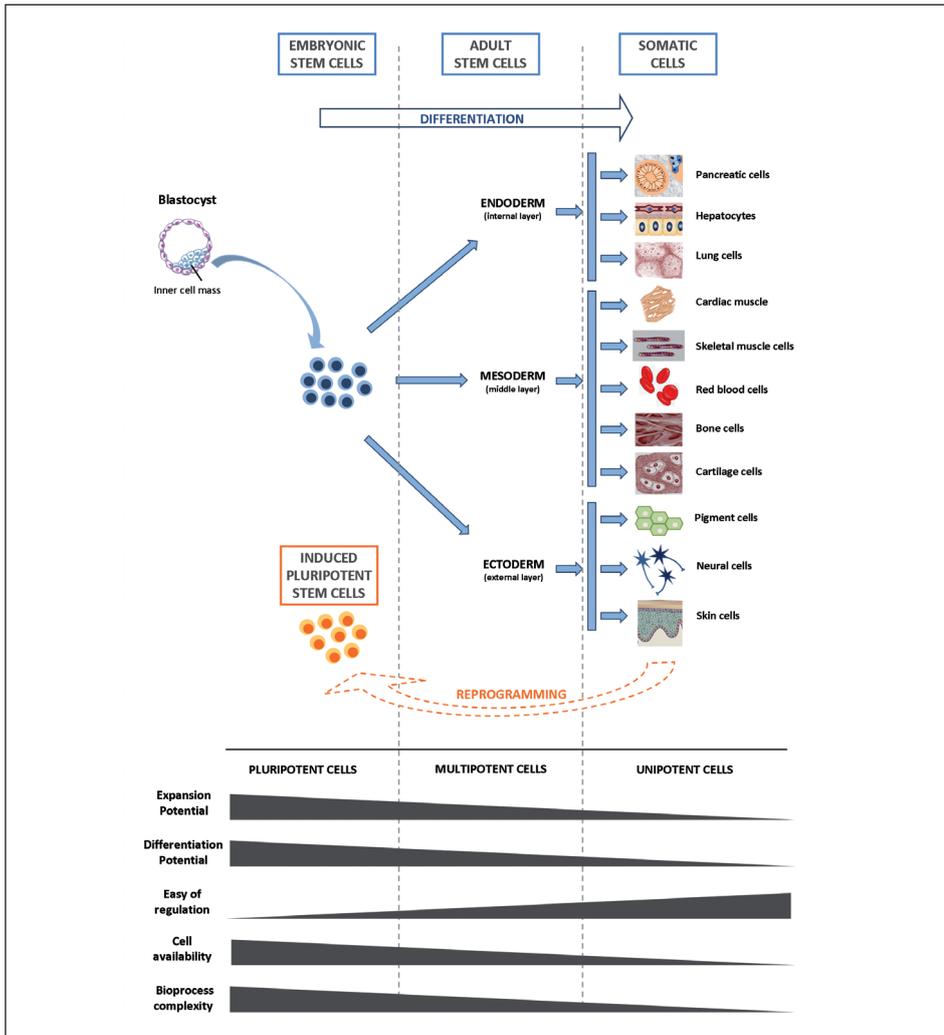


Figure 1. Stem cell sources and characteristics (Adapted from Placzek et al., 2009).

lated from the inner cell mass of blastocysts (Thomson et al, 1998), are pluripotent cells, i.e., they can differentiate into all cell types that compose an adult body, derived from the three germ layers — e.g. cardiomyocytes, neurons, pancreatic islets, hepatocytes, and chondrocytes [5-9]. However, hESCs are difficult to control with respect to their stem cell fate, and elicit ethical considerations, requiring the manipulation of human embryos. For clinical applications, these cells still present limitations related with immune rejection and the possibility of teratoma formation. On the other hand, **adult stem cells** (ASCs) do not present immunogenic complications on implantation since they can be isolated directly from the patient. ASC exist in specific niches in the different organs (e.g. bone marrow, peripheral blood, pancreas, lung, brain, liver)

contributing to the regeneration/repair of the tissue/organ where they reside [10]. Depending on the source, ASCs can be isolated with relative ease. However, they presently have major limitations, such as the difficulty in obtaining pure populations, their limited expansion capacity and the restricted differentiation potential, as they are often committed to their original cell lineage (multipotent cells). One of the most promising achievements in the stem cell field was the reversion of somatic cells (e.g. fibroblasts, keratinocytes) to a state of pluripotency using defined reprogramming strategies [11-13]. The creation of these **induced pluripotent stem cells** (iPSCs) elicited an explosion of scientific curiosity and industrial interest. This is mainly because iPSCs are similar to ESCs [11,12] and thereby could potentially replace ESCs for

clinical applications, circumventing the ethical concerns regarding the use of embryos. Additionally, iPSCs present the benefit of being patient-derived cells, avoiding immune rejection in cell therapy applications. iPSC research is expanding rapidly, including modeling complex diseases *in vitro* and pursuing novel therapeutics [14]. Currently, the possibility of reprogram somatic cells into less immature developmental stages that could be more directly applicable to therapeutic applications is being intensely explored [15-17].

Bioreactors for stem cell cultivation

Traditionally, culture of stem cells is performed on flat two-dimensional (2D) surfaces (well-plates and tissue culture flasks) (Fig. 2) due to their simplicity, low cost and easy handling. However, scale-up through the generation of multiple, parallel manual processes is unattractive because of the high labor cost and potential variability of output; rather, the use of more efficient, robust and scalable culture configurations is highly desirable to generate cells on a scale suitable for clinical/industrial applications. Stem cell bioprocessing will require the use of specialized devices that facilitate mass/gas transport, environment monitorization and control, as well as able to support high cell densities. Moreover, automation and the use of reproducible platforms are imperative for the creation of cell-based products.

An optimal and universal stem cell culture system does not exist so far; however bioreactor development throughout the last decades has brought technological advances into the field. Microfluidic devices, rotary cell culture (RCC) systems and stirred culture vessels have been the main bioreactors explored in this field (Table 1) and are described in detail in the following sections. There is however, a large range of designs available, which

include fluidized bed, packed bed, airlift and disposable wave bioreactors (revised in [18]).

Microfluidic culture systems

Microfluidic devices, or micro-bioreactors, are efficient small-scale systems mainly used for the optimization of culture conditions for cell growth and differentiation while also providing the precise control over the cell microenvironment [19,18]. Arrays of micro-bioreactors have been developed to study growth and differentiation of hESC and ASC in a three dimensional (3D) perfusion system [20-26]. The microenvironment can be controlled by adjusting specific operating parameters such as the perfusion rate, resulting in a high-throughput system for evaluating the effects of concentration gradients of soluble factors on various cell processes. However, the main limitations of these culture systems are the high shear stress associated to perfusion as well as and the continuous removal of important factors secreted by the cells that could ultimately compromise stem cell performance.

Rotary cell culture systems

Developed by NASA, RCC bioreactors are composed by a rotating 3D chamber in which cells remain suspended in near free-fall, simulating microgravity conditions. These low shear stress bioreactors can provide a well mixed environment for cell growth as well as efficient gas transfer through a silicon mem-

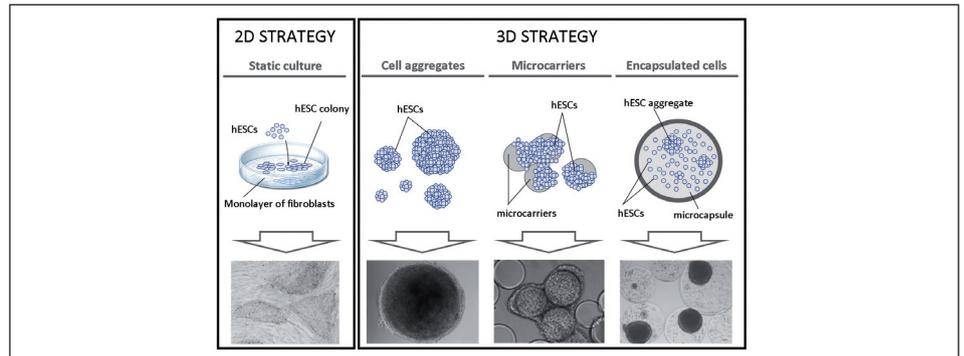


Figure 2. 2D and 3D strategies for cultivation of human embryonic stem cells.

brane. Rotary cell culture systems have been used for expansion of aggregates of differentiated cells formed by hESC (human **embryoid bodies** – hEB) and for multiple ASC using scaffolds [27-29]. Amongst the main disadvantages of RCC are the limited control of aggregate size and nutrient/gas concentrations throughout the vessel. This may result in the formation of necrotic centers, leading to cell death inside the aggregates, and uncontrolled microenvironments, caused by the concentration gradients resulted from mass transfer limitations. In addition the working volume of these bioreactors is still low, thus limiting their use in a clinical and/or larger scale.

Stirred culture vessels

Stirred culture vessels including spinner vessels and stirred tank bioreactors have been widely used in research laboratories and industries for the scale up of animal cells for the production of recombinant proteins, enzymes, vaccines, antibodies, virus. The knowledge cumulated from this previous experience facilitated their transition to stem cell bioengineering, in which the cells are the main products. Stirred culture vessels are scalable and hydrodynamically well

characterized, enable culture homogeneity and easy non-invasive sampling for continuous culture monitoring. In particular, fully controlled stirred tank bioreactors provide an automated control of the environment (temperature, pH and dissolved oxygen) mandatory for reproducible stem cell cultivation. These bioreactors are highly flexible as they can operate in different culture operation modes (batch, fed-batch, perfusion), can be adapted to different type of bioprocesses (stem cell expansion and/or differentiation) and can be accommodated to different 3D culture strategies (cell aggregates, microcarriers, encapsulated cells), presenting widespread potential in stem cell bioengineering [15,30-32]. The main limitation of stirred culture vessels is the hydrodynamic stress promoted by stirring. In addition, the minimal volume required to set up the experiments is very high (approximately 50 mL), demanding higher starting cell numbers, increasing the costs associated to optimization studies and compromising the use of stirred bioreactors for high-throughput applications.

As discussed below, the combination of stirred tank bioreactor technology with 3D culturing approaches has demonstrated sig-

Bioreactor type	Working volume/area	Scalability	Easy of sampling	Non-invasive sampling	Monitoring & Control	Mass transfer	Shear stress	Operation mode		Culture approach	
								batch	perfusion	2D	3D
Static systems (T-flasks, dishes)	2 – 225 cm ²	+	+++	×	+	+	+	✓	×	✓	×
Microfluidic systems	0.1 - 2 mL	++	++	×	++	++	+++	×	✓	✓	✓
Rotary cell culture systems	10 - 500 mL	++	++	×	++	++	+	×	✓	✓	✓
Stirred culture systems	50 mL – 200 L	+++	+++	✓	+++	+++	+++	✓	✓	✓	✓

Legend: + low, ++ medium, +++ high, ✓ yes, × no

Table 1. Culture systems for stem cell expansion and differentiation (Adapted from Placzek et al. [18] and Azarin and Palecek [19]).



nificant advances in stem cell bioprocessing by increasing the yields of stem cell expansion, enhancing differentiation efficiency and improving cell functionality.

3D cell culture strategies

ESCs and ASCs are traditionally cultured in 2D systems. In particular, hESCs are usually propagated as colonies on a top of a feeder layer of inactivated fibroblasts (Fig. 2). The inherent variability, lack of control and low cell production yields associated to these methodologies make them unattractive and unsuitable for a clinical or industrial scale.

Therefore, moving stem cell culture protocols from 2D cell monolayers to 3D cultures is fundamental to enhance their performance and fully exploit their potential. The general recognition of the importance of the spatiotemporal cell environment for cell behavior has contributed for acceptance that 3D provides a cellular context closer to what actually occurs *in vivo*. Mechanical and chemical properties, such as surface tension, gravity, cell adhesion and movement are key players in determining cell/tissue/organ functions, as cells integrate external signals, including those from cell-cell direct interaction, secretion/exchange of soluble factors and/or metabolites. **Extracellular matrices** (ECM) provide not only a physical support for cell growth and maintenance but are also critical for cell-cell communication within the 3D microstructures, improving cell behavior, identity and function [33-35].

Thus, engineered 3D microstructures have the potential to provide a higher degree of efficiency, robustness, consistency and more predictive cultures. A variety of microstructures have today been established. Examples are self-aggregated spheroids (3D cell aggregates), microcarriers and more complex scaffolds based on natural, non-animal polymers such as gels and sponges, like alginate and cellulose microfibers or synthetic materials [36-41] (Fig. 2).

Culture of stem cells as aggregates

The cultivation of ESCs as 3D aggregates is usually associated with differentiation; the

most robust method for generating differentiated cell from ESCs is through the formation of EBs, where ESC cultured in suspension self-aggregate and spontaneously differentiate into multiple tissues [42]. EB differentiation has been shown to recapitulate aspects of early embryogenesis, including the formation of a complex 3D arrangement where cell-cell and cell-matrix interactions are thought to support the development of three embryonic germ layers and their derivatives [43,44]. The main limitation of this system is, in fact, the lack of control in directing stem cell differentiation towards a specific lineage, thus resulting in a mixture of different cell types. This drawback demands the need of efficient integrative downstream approaches to further purify the culture outcome into a desired cell type population.

Results from our lab have shown that the differentiation process of human embryonal teratocarcinoma stem cells (NT2 cells – cell model system of hESCs) into neurons is highly improved when cells are cultivated as 3D aggregates using stirred bioreactors. In fact, when compared to 2D protocol the effect is striking - by integrating both expansion and differentiation steps in a controlled bioprocess, we were able to increase significantly the neuronal differentiation efficiency by 10-fold while reducing drastically, by 30%, the time required for the differentiation process [1,31,45].

In the last two years, many efforts were done to develop of 3D aggregate systems for controlled expansion of undifferentiated hESCs [46-48] and their directed differentiation into functional cell types, such as neurons [49] and cardiomyocytes [30].

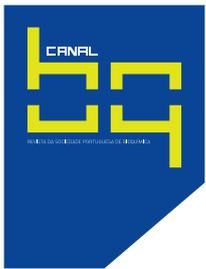
The cultivation of ASCs as 3D aggregates has also been explored. For instance, the efficient expansion of human neural stem cells as neurospheres [4, 50-51] and neonatal porcine pancreatic cells as islet-like tissue [52] represents a significant milestone towards cell therapy applications by providing sufficient numbers of functional cells required to treat neurodegenerative diseases (such as Parkinson's disease) and Type 1 diabetes.

Cultivation of stem cells in microcarriers

A microcarrier is a support matrix allowing for the growth of anchorage-dependent cells in suspension systems. Microcarrier cultures are characterized by high surface-to-volume ratio, accommodating higher cell densities than those obtained in static cultures; the area available for cell growth can be adjusted easily by changing the amount of microcarriers, which further facilitates the process scale-up. From industrial/commercial/clinical points of view, this feature has a tremendous impact in reducing the costs of cell manufacturing by reducing the amount of media, growth factors and other expensive supplements required in stem cell cultivation. For each stem cell type and bioprocess it is important to optimize specific parameters including microcarrier type, concentration and inoculum density.

A wide range of microcarrier types are commercially available today; supports can be porous or non-porous, composed by gelatin, glass, collagen, cellulose, presenting dimensions within the range of 170 to 6000 µm. In addition, these microcarriers can be functionalized with different coating materials (ECM proteins, small molecules) in order to further improve cell culture performance (attachment and growth). Thus, microcarrier technology allows the flexibility of culturing the cells in different conformations and on different matrixes.

Cells cultured in macroporous beads (e.g. Cytopore2, CultisphereS) are cultured in 3D, protected from the shear stress, although the diffusion of oxygen and nutrients within the bead could be limited. These systems have been used for the expansion and differentiation of mouse embryonic stem cells [53,54] and for propagation of mesenchymal stem cells [55]. In non-porous microcarriers (e.g. Cytodex 1 and Cytodex 3), cells are attached to the surface of the beads, assuming a simi-



lar configuration to that of 2D monolayers. In this case, cells are equally exposed to the bulk medium avoiding the existence of diffusion gradients in the cell culture. Adult stem cells including mesenchymal and pancreatic stem cells demonstrated higher expansion yields while keeping their phenotype and differentiation potential on non-porous microcarriers [32,56]. One of the challenges that still need to be addressed is the optimization of cell harvesting protocols after expansion/differentiation process, to guarantee efficient cell-bead separation and high cell recovery yields without compromising their viability, potential and/or functionality.

Results from our laboratory as well as from other teams have shown that human hESCs exhibit improved cell growth and retain their differentiation potential when cultured on dextran or cellulose-based microcarrier supports, coated with matrigel or denatured collagen [57-61]. Seeding hESC as single cells into microcarriers avoided formation of EBs and the consequent uncontrolled differentiation. Furthermore, after microcarrier colonization, there is the formation of hESC-microcarriers aggregates in culture (Fig. 2). This 3D cell growth results in additional increase in cell yields, when compared to 2D culture systems. These cells retained the ability to differentiate into cells of the 3 germ layers [59,61].

Cultivation of encapsulated stem cells

Cell encapsulating strategies offer the possibility of customizing/designing the scaffold environment with specific biomaterials (ex: alginate, poly lactic-co-glycolic acid, poly L-lactic acid, hyaluronic acid), thus creating microenvironments that may be suitable for the self-renewal of stem cells or for directing their differentiation along with promoting the organization of cells in 3D configurations

similar to those of native tissues. Within this context, several scaffolds have been used in stirred bioreactors to enhance the formation of 3D structures and the differentiation of stem cells to myocardium [62], hepatocytes [37,38], pancreatic islets [63,40], bone [64], cartilage [65], hematopoietic cells [66], neuronal cells [67] and vascular grafts [68].

Another benefit of encapsulating cells is the possibility to circumvent the harmful effects associated to shear stress.

It is important to highlight that encapsulation technology will also contribute for the success of transplantation tests. In contrast to cells in suspension, encapsulated tissue constructs are less susceptible to immunorejection, their delivery is better target and the *in vivo* degradation kinetics can be tuned permitting a more efficient and functional integration of cells in the host organ [67,39].

Bioprocess parameters

Successful stem cell bioprocessing, in terms of expansion and differentiation, depends on the control of key process variables: (i) nutrients and metabolites concentration, (ii) growth factors composition and (iii) the physiological environment, i.e. temperature, pH and oxygen.

The concentration of nutrients and metabolites should be strictly monitored and controlled during cultivation since it affects cell growth, viability and differentiation. The outcome of stem cell culture depends on the presence/concentration of growth factors which provide survival, proliferation, differentiation signals to the cells.

In order to enhance stem cell metabolism and further improve culture performance different operation modes can be adopted, including fed-batch and perfusion. The fed-batch strategy is often considered the most suitable for tuning and optimizing cell metabolism; by providing nutrients in a rational manner, their uptake and consumption are energetically more efficient leading to reduced accumulation of metabolites in culture supernatant [31,69]. However, in the case of stem cells, growth factors play a crucial role

in regulation of cell behavior, providing survival, proliferation and differentiation signals. Thus perfusion mode has been preferentially adopted in the majority of stem cell bioprocesses since it assures the continuous renewal of nutrients and other factors as well as the continuous removal of metabolic byproducts [62,31].

The interactions between growth factors and other process parameters are not fully understood. It is therefore critical to quantify and clarify these effects and their interactions in order to design the culture process for optimal production of a specific cell type population.

Finally, the propagation and differentiation of stem cell cultures have also been found to be dependent of physicochemical conditions including temperature, pH and dissolved oxygen (pO₂). Up to now few studies have been conducted on the effect of temperature and pH in stem cell culture. For instance, it has been shown that mesenchymal stem cell differentiation is enhanced at lower temperatures (32°C) than in 37°C conditions [70] while high temperatures (39°C) demonstrated to enhance megakaryopoiesis in CD34-enriched cord blood cells [71]. Concerning pH, it was shown that high values (pH 7.60) enhance differentiation and maturation of megakaryocyte progenitors [72] whereas low pH values (7.1) increase their expansion capacity [73].

Oxygen is a critical factor in hESC culture [18] and there is emerging evidence suggesting that reducing oxygen concentration towards low levels [74,75] is beneficial for the *in vitro* maintenance of pluripotent hESCs, supporting self-renewal, reducing spontaneous differentiation and maintaining karyotypic integrity, [76,77] in contrast to normoxia conditions (20%). Within this context, we recently developed a robust strategy for the mass production of undifferentiated hESC using pO₂-controlled bioreactors [61]. In this work, a 12-fold improvement in the expansion yield was observed, over the standard 2D protocols, when dissolved oxygen was controlled at low levels. Overall, these developments highlight the fact that process variations in the culture environ-



ment could be strategically applied to direct and manipulate stem cell behavior *in vitro*.

CONCLUSION

Along with the opportunities offered by ESCs, ASCs and iPSCs, together with the tremendous advances in manipulating their pluripotency and differentiation, many technological issues remain to be solved. Culturing stem cells relies still on both "science and art" and defining the optimal and robust cultivation strategies and culture conditions to manipulate stem cell fate decisions are yet to be determined. The definition of engineering principles and practices towards achievement of control, automation, standardization, validation, reproducibility and safety of the process and the product will be critical for implementation of therapeutic and industrial applications.

An optimal/universal stem cell-based bioprocess capable of embracing all the applications of these cells does not exist so far. Nonetheless, the knowledge gained during the last years, in which the quantitative characterization of expansion and differentiation processes is included, provides important insights for the implementation of such universal stem cell production platforms.

Over the next few years, we anticipate significant developments in this field, that will include innovative culture systems that allow the integration of sophisticated monitoring platforms in order to ensure continuous culture evaluation at a cellular level. These advances in stem cell bioprocessing will surely contribute to the implementation of novel therapies and fulfill at least the expectations posed by stem cells.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support received from the Portuguese Foundation for Science and Technology (PTDC/BIO/72755/2006 and SFRH/BD/42176/2007) and from the European Commission (Cell Programming by Nanoscaled Devices, NMP4-

CT-2004-500039; Clinigene Network of Excellence, LSHB-CT-2006-018933; HYPERLAB - high yield and performance stem cell lab, 223011).

GLOSSARY

ASC – Adult stem cells: undifferentiated cells, found in tissues or organs of the body after embryonic development, that are capable of self-renewal and differentiate into specialized cells to replenish dying cells and regenerate damaged tissues.

Bioreactor – Devices or systems used to grow large quantities of biochemical cultures, as to produce enzymes, antibiotics, virus, vaccines or cells (bacteria, yeast, animal and vegetal cells as well as stem cells).

Differentiation – A process by which a pluripotent or multipotent stem cell becomes a more specialized cell type.

EB – Embryoid body: aggregate of cells derived from embryonic stem cells. Upon aggregation, the cells spontaneously differentiated into multiple cell types derived from the three germ layers, recapitulating embryonic development.

ESC – Embryonic stem cells: undifferentiated cells derived from a preimplantation embryo (inner cell mass of blastocyst) that are capable of self-renewal, and can develop into cells and tissues of the three primary germ layer.

iPSC – Induced pluripotent stem cells: stem cells generated from somatic cells differentiation by the induced expression of specific reprogramming factors.

Microcarriers – Bead matrix that supports attachment and growth of anchorage dependent cells in suspension culture.

Multipotent – The ability of cell to develop into more than one cell type of the body. Multipotent cell types in the body comprise lineage-committed progenitors, including organ-specific adult stem cells.

Pluripotent – The ability of a cell to give rise to all different cell types of the body except extra-embryonic tissues. Pluripotent cells include ES and iPSC cells.

Reprogramming – A process by which a differentiated cell reverts to a pluripotent state

Self-renewal – The capacity of a cell to divide into cells that are identical to the original stem cell.

Teratoma – A tumor which is made up of a heterogeneous mixture of tissues, such as bone, cartilage, muscle, neuronal cells, etc.

Totipotent – The ability of the cell to give rise to all cell types of the body. The zygote is totipotent.

Unipotent – The ability of a cell to develop into only one type of cell or tissue.

REFERENCES

1. Davila JC, Cezar GG, Thiede M, Strom S, Miki T & Trosko J (2004) Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicol Sci* **79**, 214-23.
2. Jensen J, Hyllner J & Bjorquist P (2009) Human embryonic stem cell technologies and drug discovery. *J Cell Physiol* **219**, 513-519.
3. Krtolica A, Illic D, Genbacev O & Miller RK (2009) Human embryonic stem cells as a model for embryotoxicity screening. *Regen Med* **4**, 449-59.
4. Nirmalanandhan VS & Sittampalam GS (2009) Stem cells in drug discovery, tissue engineering, and regenerative medicine: emerging opportunities and challenges. *J Biomol Screen* **14**, 755-68.
5. Hay DC, Zhao D, Ross A, Mandalam R, Lebkowski J & Cui W (2007) Direct differentiation of human embryonic stem cells to hepatocyte-like cells exhibiting functional activities. *Cloning Stem Cells* **9**, 51-62.
6. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK & Baetge EE (2008) Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* **26**, 443-52.
7. Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Opthof T, Pera M, de la Riviere AB, Passier R & Tertoolen



L (2003) Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* **107**, 2733-40.

8. Toh WS, Guo XM, Choo AB, Lu K, Lee EH & Cao T (2009) Differentiation and enrichment of expandable chondrogenic cells from human embryonic stem cells in vitro. *J Cell Mol Med* **13**, 3570-90.

9. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O & Thomson JA (2001) In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **19**, 1129-33.

10. Lanza R, Blau H, Melton D, Moore M, Thomas ED, Verfaillie C, Weissman I & West M, (2004) "Handbook of Stem Cells, Volume 2: Adult and Fetal Stem Cells," Elsevier Academic Press, Boston, Massachusetts.

11. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K & Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-72.

12. Takahashi K & Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-76.

13. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II & Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-20.

14. Selvaraj V, Plane JM, Williams AJ & Deng W (2010) Switching cell fate: the remarkable rise of induced pluripotent stem cells and lineage reprogramming technologies. *Trends Biotechnol* **28**, 214-23.

15. Jang S, Cho HH, Cho YB, Park JS & Jeong HS (2010) Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biol* **11**, 25.

16. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC & Wernig M (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463**, 1035-41.

17. Zhu XQ, Pan XH, Wang W, Chen Q, Pang RQ, Cai XM, Hoffman AR & Hu JF (2010) Transient in vitro epigenetic reprogramming of skin fibroblasts into multipotent cells. *Biomaterials* **31**, 2779-87.

18. Placzek MR, Chung IM, Macedo HM, Ismail S, Mortera

Blanco T, Lim M, Cha JM, Fauzi I, Kang Y, Yeo DC, Ma CY, Polak JM, Panoskaltis N & Mantalaris A (2009) Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. *J R Soc Interface* **6**, 209-232.

19. Azarin SM & Palecek SP (2010) Development of Scalable Culture Systems for Human Embryonic Stem Cells. *Biochem Eng J* **48**, 378.

20. Cimetta E, Figallo E, Cannizzaro C, Elvassore N & Vunjak-Novakovic G (2009) Micro-bioreactor arrays for controlling cellular environments: design principles for human embryonic stem cell applications. *Methods* **47**, 81-9.

21. Fong WJ, Tan HL, Choo A & Oh SK (2005) Perfusion cultures of human embryonic stem cells. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **27**, 381-387.

22. Gerlach JC, Hout M, Edsbacke J, Bjorquist P, Lubberstedt M, Miki T, Stachelscheid H, Schmelzer E, Schatten G & Zeilinger K (2010) Dynamic 3D culture promotes spontaneous embryonic stem cell differentiation in vitro. *Tissue Eng Part C Methods* **16**, 115-21.

23. Gerlach JC, Lubberstedt M, Edsbacke J, Ring A, Hout M, Baun M, Rossberg I, Knospel F, Peters G, Eckert K, Wulf-Goldenberg A, Bjorquist P, Stachelscheid H, Urbaniak T, Schatten G, Miki T, Schmelzer E & Zeilinger K (2010) Interwoven four-compartment capillary membrane technology for three-dimensional perfusion with decentralized mass exchange to scale up embryonic stem cell culture. *Cells Tissues Organs* **192**, 39-49.

24. Gottwald E, Lahni B, Thiele D, Giselbrecht S, Welle A & Weibezahn KF (2008) Chip-based three-dimensional cell culture in perfused micro-bioreactors. *J Vis Exp* **21**.

25. Zhao F, Grayson WL, Ma T & Irsigler A (2009) Perfusion affects the tissue developmental patterns of human mesenchymal stem cells in 3D scaffolds. *J Cell Physiol* **219**, 421-9.

26. Zhao F & Ma T (2005) Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: dynamic cell seeding and construct development. *Biotechnol Bioeng* **91**, 482-493.

27. Come J, Nissan X, Aubry L, Tournois J, Girard M, Perrier AL, Peschanski M & Cailleret M (2008) Improvement of culture conditions of human embryoid bodies using a controlled perfused and dialyzed bioreactor system. *Tissue Eng Part C Methods* **14**, 289-98.

28. Gerecht-Nir S, Cohen S & Itskovitz-Eldor J (2004) Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (hEB) formation and differentiation. *Biotechnol Bioeng* **86**, 493-502.

29. King JA & Miller WM (2007) Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation. *Curr Opin Chem Biol* **11**, 394-398.

30. Niebruegge S, Bauwens CL, Peerani R, Thavandiran N, Masse S, Sevaptisidis E, Nanthakumar K, Woodhouse K, Husain M, Kumacheva E & Zandstra PW (2009) Generation of human embryonic stem cell-derived mesoderm and cardiac cells using size-specified aggregates in an oxygen-controlled bioreactor. *Biotechnol Bioeng* **102**, 493-507.

31. Serra M, Brito C, Costa EM, Sousa MF & Alves PM (2009) Integrating human stem cell expansion and neuronal differentiation in bioreactors. *BMC Biotechnol* **9**, 82.

32. Serra M, Brito C, Leite SB, Gorjup E, von Briesen H, Carrondo MJ & Alves PM (2009) Stirred bioreactors for the expansion of adult pancreatic stem cells. *Ann Anat* **191**, 104-115.

33. Cukierman E, Pankov R & Yamada KM (2002) Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 633-9.

34. Lund AW, Yener B, Stegemann JP & Plopper GE (2009) The natural and engineered 3D microenvironment as a regulatory cue during stem cell fate determination. *Tissue Eng Part B Rev* **15**, 371-80.

35. Pampaloni F, Reynaud EG & Stelzer EH (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 839-45.

36. Dean SK, Yulyana Y, Williams G, Sidhu KS & Tuch BE (2006) Differentiation of encapsulated embryonic stem cells after transplantation. *Transplantation* **82**, 1175-84.

37. Maguire T, Davidovich AE, Wallenstein EJ, Novik E, Sharma N, Pedersen H, Androulakis IP, Schloss R & Yarmush M (2007) Control of hepatic differentiation via cellular aggregation in an alginate microenvironment. *Biotechnol Bioeng* **98**, 631-44.

38. Maguire T, Novik E, Schloss R & Yarmush M (2006) Alginate-PLL microencapsulation: effect on the differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes. *Biotechnol Bioeng* **93**, 581-91.

39. Murua A, Portero A, Orive G, Hernandez RM, de Castro M & Pedraz JL (2008) Cell microencapsulation technology: towards clinical application. *J Control Release* **132**, 76-83.

40. Wang N, Adams G, Buttery L, Falcone FH & Stolnik S (2009) Alginate encapsulation technology supports embryonic stem cells differentiation into insulin-producing cells. *J Biotechnol* **144**, 304-12.

41. Xing Q, Zhao F, Chen S, McNamara J, Decoster MA & Lvov YM (2009) Porous biocompatible three-dimensional scaffolds of cellulose microfibril/gelatin composites for cell culture. *Acta Biomater* **6**, 2132-9.

42. Dang SM, Gerecht-Nir S, Chen J, Itskovitz-Eldor J & Zandstra PW (2004) Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells* **22**, 275-82.



43. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H & Benvenisty N (2000) Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* **6**, 88-95.
44. Keller GM (1995) In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 862-9.
45. Serra M, Leite SB, Brito C, Costa J, Carrondo MJ & Alves PM (2007) Novel culture strategy for human stem cell proliferation and neuronal differentiation. *J Neurosci Res* **85**, 3557-3566.
46. Amit M, Chebath J, Margulets V, Laevsky I, Miropolsky Y, Shariki K, Peri M, Blais I, Slutsky G, Revel M & Itskovitz-Eldor J (2010) Suspension culture of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev* **6**, 248-59.
47. Krawetz R, Taiani JT, Liu S, Meng G, Li X, Kallos MS & Rancourt D (2009) Large-Scale Expansion of Pluripotent Human Embryonic Stem Cells in Stirred Suspension Bioreactors. *Tissue Eng. Part C Methods*
48. Singh H, Mok P, Balakrishnan T, Rahmat SN & Zweigerdt R (2010) Up-scaling single cell-inoculated suspension culture of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* **4**, 165-79.
49. Steiner D, Khaner H, Cohen M, Even-Ram S, Gil Y, Itsykson P, Turetsky T, Idelson M, Aizenman E, Ram R, Berman-Zaken Y & Reubinoff B (2010) Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension. *Nat Biotechnol* **28**, 361-4.
50. Baghbaderani BA, Behie LA, Sen A, Mukhida K, Hong M & Mendez I (2008) Expansion of human neural precursor cells in large-scale bioreactors for the treatment of neurodegenerative disorders. *Biotechnol Prog* **24**, 859-70.
51. Baghbaderani BA, Mukhida K, Sen A, Kallos MS, Hong M, Mendez I & Behie LA (2010) Bioreactor expansion of human neural precursor cells in serum-free media retains neurogenic potential. *Biotechnol Bioeng* **105**, 823-33.
52. Chawla M, Bodnar CA, Sen A, Kallos MS & Behie LA (2006) Production of islet-like structures from neonatal porcine pancreatic tissue in suspension bioreactors. *Biotechnol Prog* **22**, 561-7.
53. Akasha AA, Sotiriadou I, Doss MX, Halbach M, Winkler J, Baunach JJ, Katsen-Globa A, Zimmermann H, Choo Y, Hescheler J & Sachinidis A (2008) Entrapment of embryonic stem cells-derived cardiomyocytes in macroporous biodegradable microspheres: preparation and characterization. *Cell Physiol Biochem* **22**, 665-72.
54. Fernandes AM, Fernandes TG, Diogo MM, da Silva CL, Henrique D & Cabral JM (2007) Mouse embryonic stem cell expansion in a microcarrier-based stirred culture system. *J Biotechnol* **132**, 227-36.
55. Eibes G, dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL & Cabral JM (2010) Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. *J Biotechnol* **146**, 194-7.
56. Sart S, Schneider YJ & Agathos SN (2009) Ear mesenchymal stem cells: an efficient adult multipotent cell population fit for rapid and scalable expansion. *J Biotechnol* **139**, 291-9.
57. Lock LT & Tzanakakis ES (2009) Expansion and differentiation of human embryonic stem cells to endoderm progeny in a microcarrier stirred-suspension culture. *Tissue Eng. Part A* **15**, 2051-2063.
58. Nie Y, Bergendahl V, Hei DJ, Jones JM & Palecek SP (2009) Scalable culture and cryopreservation of human embryonic stem cells on microcarriers. *Biotechnol Prog* **25**, 20-31.
59. Oh SK, Chen AK, Mok Y, Chen X, Lim UM, Chin A, Choo AB & Reuveny S (2009) Long-term microcarrier suspension cultures of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* **2**, 219-230.
60. Phillips BW, Horne R, Lay TS, Rust WL, Teck TT & Crook JM (2008) Attachment and growth of human embryonic stem cells on microcarriers. *J Biotechnol* **138**, 24-32.
61. Serra M, Brito C, Sousa MF, Jensen J, Tostoes R, Clemente J, Hyllner J, Strehl R, Carrondo MJT & Alves PM (2010) Improving expansion of pluripotent human embryonic stem cells in perfused bioreactors through oxygen control. *J Biotechnol* **148**, 208-215.
62. Bauwens C, Yin T, Dang S, Peerani R & Zandstra PW (2005) Development of a perfusion fed bioreactor for embryonic stem cell-derived cardiomyocyte generation: oxygen-mediated enhancement of cardiomyocyte output. *Biotechnol Bioeng* **90**, 452-461.
63. Lee SH, Hao E, Savinov AY, Geron I, Strongin AY & Itkin-Ansari P (2009) Human beta-cell precursors mature into functional insulin-producing cells in an immunisolation device: implications for diabetes cell therapies. *Transplantation* **87**, 983-91.
64. Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, Gustin MC & Mikos AG (2001) Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* **22**, 1279-88.
65. Kuo CK, Li WJ, Mauck RL & Tuan RS (2006) Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol* **18**, 64-73.
66. Liu H & Roy K (2005) Biomimetic three-dimensional cultures significantly increase hematopoietic differentiation efficacy of embryonic stem cells. *Tissue Eng* **11**, 319-30.
67. Delcroix GJ, Schiller PC, Benoit JP & Montero-Menei CN (2010) Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. *Biomaterials* **31**, 2105-20.
68. Nieponice A, Soletti L, Guan J, Deasy BM, Huard J, Wagner WR & Vorp DA (2008) Development of a tissue-engineered vascular graft combining a biodegradable scaffold, muscle-derived stem cells and a rotational vacuum seeding technique. *Biomaterials* **29**, 825-33.
69. Xie L & Wang DI (1994) Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies. *Biotechnol Bioeng* **43**, 1175-89.
70. Stolzing A & Scutt A (2006) Effect of reduced culture temperature on antioxidant defences of mesenchymal stem cells. *Free Radic Biol Med* **41**, 326-338.
71. Proulx C, Dupuis N, St-Amour I, Boyer L & Lemieux R (2004) Increased megakaryopoiesis in cultures of CD34-enriched cord blood cells maintained at 39 degrees C. *Biotechnol Bioeng* **88**, 675-80.
72. McAdams TA, Miller WM & Papoutsakis ET (1998) pH is a potent modulator of erythroid differentiation. *Br J Haematol* **103**, 317-25.
73. Yang H, Miller WM & Papoutsakis ET (2002) Higher pH promotes megakaryocytic maturation and apoptosis. *Stem Cells* **20**, 320-8.
74. Fischer B & Bavister BD (1993) Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* **99**, 673-679.
75. Ottosen LD, Hindkaer J, Husth M, Petersen DE, Kirk J & Ingerslev HJ (2006) Observations on intrauterine oxygen tension measured by fibre-optic microsensors. *Reprod Biomed Online* **13**, 380-385.
76. Ezashi T, Das P & Roberts RM (2005) Low O2 tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 4783-4788.
77. Prasad SM, Czepiel M, Cetinkaya C, Smigielska K, Weli SC, Lysdahl H, Gabrielsen A, Petersen K, Ehlers N, Fink T, Minger SL & Zachar V (2009) Continuous hypoxic culturing maintains activation of Notch and allows long-term propagation of human embryonic stem cells without spontaneous differentiation. *Cell Prolif* **42**, 63-74.

Stem cell research meets nanotechnology

Ricardo Pires das Neves,^{1,2} e Lino Ferreira^{1,2}

¹ CNC - Center of Neurosciences and Cell Biology, University of Coimbra, Portugal

² Biocant - Center of Innovation in Biotechnology, Cantanhede, Portugal

Corresponding Author Contact: lino@biocant.pt

SUMMARY

The recent application of nanotechnologies into the stem cell field promises to open new avenues in regenerative medicine. Nanotechnologies can be a valuable tool to track and image stem cells, to drive their differentiation into specific cell lineages, and ultimately to understand their biology. This will hopefully lead to stem cell-based therapeutics for the prevention, diagnosis, and treatment of human diseases. Despite these opportunities, nanotechnologies also pose several risks since they can be cytotoxic and affect the differentiation program of stem cells. Here, we discuss the future opportunities and challenges that face this young field of research.

INTRODUCTION

The existence of a multipotent hematopoietic stem cell was demonstrated for the first time by Till and McCulloch in 1961. They demonstrated that a single hematopoietic stem cell could (i) give rise to a mixed population of blood cells (granulocytes, macrophages, red blood cells, etc...) and (ii) had the ability to self-renew [1]. The isolation of mouse embryonic stem cells by Martin Evans in 1981, human embryonic stem cells by James Thomson in 1998, and inducible pluripotent stem cells by Shinya Yamanaka in 2006, propelled the scientific community to understand the properties of these cells and evaluate their therapeutic effect in the context of the regenerative medicine.

The first observation of nanomaterials was made by Richard Adolf Asigmondy in 1914. He performed a detailed study of gold sols

and other nanomaterials with sizes down to 10 nm. In 1959, Richard Feynman launched the foundation of the nanotechnology field. Since then, several extraordinary discoveries have been made: Richard Smalley discovered fullerenes in 1985, Sumio Iijima discovered carbon nanotubes in 1991, and Louis Brus the quantum dots in 1996.

The intersection of nanotechnologies with stem cell research is recent and has been reviewed by us elsewhere [2, 3]. In this work we will review the current research topics in this area: **stem cell microenvironment and tissue engineering, stem cell tracking and imaging, stem cell transfection, isolation and sorting, and molecular detection** (Fig. 1). When appropriate, we will describe some examples about the research that we are conducting at Centre for Neuroscience and Cell Biology (CNC) and Biocant in this research area.

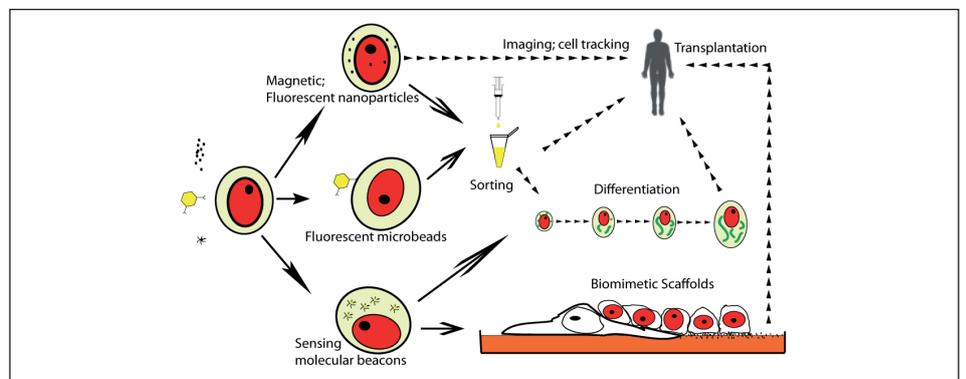


Figure 1. Nanotechnology applications in Stem Cell Biology and Medicine. Nanodevices can be used in stem cell tracking and imaging but also in isolation and sorting of stem cells, both for basic science and translational medicine. Stem cell fate can be modulated by internalization of nanocarriers with biological molecules or by external cues given by biomimetic scaffolds. Stem cell transfection and molecular detection make use of nanodevices for intracellular access but also for intelligent delivery and sensing of biomolecules. These technologies have a great impact in stem cell microenvironment and tissue engineering studies and have a great potential for biomedical applications.



Modulation of stem cell-fate by the microenvironment

Stem-cell biology has been studied mainly *in vitro* with cells cultured on flat substrates coated, for example, with collagen or laminin, or in co-culture systems where feeder-cell layers are used to support stem cell growth. These culture conditions are very different from the environment that stem cells experience in the body. For example, the **extracellular matrix** (ECM) is difficult to mimic in plastic dishes; most frequently stem cells are cultured in rigid polystyrene tissue-culture plastic where cells are exposed to soluble factors in liquid media. This is different in the body where the ECM creates a soft microenvironment where these molecules are anchored in close proximity to cell surfaces. This much more constrained **three-dimensional (3D) niche** is a unique microenvironment that has a prominent role in the maintenance and differentiation of stem cells. This micro-environment is formed by different components including cell-cell interactions, extracellular matrix, mechanical properties and secreted factors. Collectively, they constitute a complex microenvironment that is difficult to recapitulate *in vitro*. Stem cell niche research uses nanotechnologies to mimic this microenvironment in order to determine what are the mechanisms underlying the conversion of a stem cell into different cell types. On the other hand, these **biomimetic** approaches to create synthetic microenvironments are very challenging because there is much we do not understand about the natural stem cell niche. Several researchers believe that it may be possible to create synthetic stem cell niches that are more bioinspired than biomimetic and potentially more efficient than those observed in nature. Therapeutically, it may be more useful to take this **bioinspired** approach in the design of the synthetic niche so that it acts on the stem cells in an unnatural way to achieve a therapeutic goal [4]. Current research efforts in both biomimetic and bioinspired strategies are focussing in

the following aspects: (i) Laser fabricated nanogrooves to study cell-cell interactions; (ii) nanowires to study intra- and intercellular biological processes; (iii) nanophase thin film to study cell adhesion and proliferation; (iv) Lab-on-a-chip with nanoreservoir to study environmental cues; (v) Self-assembly peptides and nanofibers to mimic ECM; (vi) Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials; (vii) Micro/nanopatterned surface to study stem cell response to topography and mechano-transduction; and (viii) Nanoparticles to control release growth factors and biochemicals.

It is clear from this previous list that biomaterial design for stem cell applications is progressively abandoning the strategy of developing an inert mechanical support and adopting the notion that this type of cells need a more dynamic substrate capable of directing interactions at the cell-material interface and may stimulate and commit cell behaviour through physical forces, biochemical interactions or topography. This interaction of biomaterials with the chemical and physical features of stem cells occurs at the micro- and nano scales.

Cell-cell interaction studies generally rely on co-culture strategies where the effects of particular molecules are hidden in the great complexity of the culturing system. It is therefore difficult to discern the role of soluble or tethered molecules in terms of cell-cell interactions. In tissues, the ECM contains many macromolecules such as proteoglycans, collagens, laminins, fibronectin and sequestered growth factors. This molecular repertoire is responsible for the bioactivity of the ECM. For example, the sequences of many ECM proteins or receptor ligands are presented to stem cells and are recognized by dimeric cell-surface receptors known as integrins. Binding of integrins to these molecules can trigger a cascade of signalling events that will impact the gene expression pattern of the stem cell. Therefore, the type of ECM molecules that a stem cell encoun-

ters in a given tissue is critical in determining how cells behave within that tissue. The ECM can be reproduced *in vitro* by the use of 3D scaffolds. For that purpose, several natural (fibrin, collagen, hyaluronic acid, etc...) or synthetic (polyethylene glycol, poly(lactic acid-co-glycolic acid), poly(glycerol sebacate) etc...) biomaterials can be used. Recently, we have prepared a hyaluronic acid-based gel to create a 3D microenvironment for the self-renewal of human embryonic stem cells [5].

When a greater control over the properties of the material is required the best option is to produce synthetic bioactive scaffolds. Issues like immunogenicity, pathogen transmission and purification difficulties have encouraged this option. An example of a synthetic scaffold is (polyethylene glycol) (PEG) gels which can be chemically modified to incorporate a compendium of bioactive molecules [6]. Immobilization seems to increase the stability of the molecules, promote persistent signalling and induce receptor clustering [7]. It was recently shown that the covalent attachment of fibroblast growth factor 2 (FGF2) to a synthetic nanofibrillar surface composed of a network of polyamide nanofibers resulted in the stabilization of the growth factor and increased its potency 100-fold relative to FGF2 in solution. In response to the tethered FGF2, embryonic stem cells exhibited increased proliferation through activation of mitogenic pathways [8]. Another example that illustrates the importance of ligand presentation in stem-cell fate and function is the immobilization of leukaemia inhibitory factor (LIF), which led to more efficient and prolonged activation of LIF targets and maintenance of embryonic stem cells in an undifferentiated state when compared with soluble LIF [9].



A major challenge in tissue engineering is to vascularise the transplanted tissue constructs to meet the metabolic demands of recovery and integration into the organism. Therapeutic application of the main vascular signalling molecules (e.g. vascular endothelial growth factors (VEGFs), FGFs, TGFs, angiopoietins, ephrins and various chemokines) can be a promising approach to enhance blood supply and neovascularisation processes around the transplanted tissue. For example, the immobilization of VEGF onto a metal substrate using a biomimetic polymer film was able to promote the survival and proliferation of endothelial cells and to induce the differentiation of hMSCs into endothelial cells [10].

In order to discover novel biomaterials that have effects on stem cells, high-throughput approaches are likely needed. Recent efforts have used acrylate-based polymers spotted in arrays composed of hundreds of different polymer combinations and found several platforms that could promote embryonic stem cell attachment, proliferation and differentiation [11]. Similar studies must be conducted this time aiming at incorporating many other biophysical and biochemical parameters in this type of high throughput approaches. Different matrices, natural and/ or synthetic, can be produced to generate cell-culture substrates with defined physical characteristics like rigidity (stiffness) and topography. Unlike regular tissue culture plastic substrates, they provide diffusion of soluble molecules to the basal surface, as well as the apical surface. They are especially interesting in the context of studies of homeostatic and disease-related matrix stiffness impact on stem-cell behaviour. A groundbreaking study by Engler and collaborators [12] found that matrix stiff-

ness has a primary role in stem cell lineage specification. This study reported that human mesenchymal stem cells (MSCs) were able to differentiate into tissues that had their mechanical properties more closely mimicked by the polyacrylamide substrate upon which they were cultured. Thus, MSCs that were cultured on rigid (bonelike) gels differentiated into osteoblasts, those that were cultured on medium stiffness (muscle-like) gels differentiated into muscle cells, and those that were cultured on more elastic gels (neural-like) differentiated into neural cells [12]. The acknowledgment that matrix mechanical properties impact on stem-cell fate led to the exploration of further links between stem cell behaviour and matrix elasticity. Since then, several studies have reported that substrate stiffness modulates the proliferation and differentiation of embryonic stem cells and certain types of adult stem cells. For example, adult neural stem cells cultured on a relatively soft matrix to mimic brain tissue gave origin to more neurons than cells grown on a stiffer synthetic matrix, where glial cells were predominant [13]. Another study found that the rate of adult skeletal-muscle stem-cell proliferation increased with substrate stiffness [14]. We predict that more studies will show that the physical properties of culture substrate have a major impact on stem-cell fate. With time different culture platforms based on soft biomaterials are likely to largely replace those made of the standard, rigid, tissue-culture plastic in order to specifically modulate differentiation into different fates.

Usually stem cell cultures are presented with soluble growth factors and biochemicals in their culture media. This approach may not always be possible due to specific chemical properties of the molecules to be delivered. Instead, it may be more beneficial to deliver these molecules directly inside the cell to better control their bioavailability. Nanoparticles that can carry molecular payloads of proteins, growth

factors, and small chemicals present an excellent tool to control the differentiation of stem cells. Some of these biomolecules/chemicals have (i) poor solubility, (ii) can be quickly cleaved by cellular enzymes, (iii) and have side effects when administered systemically. Therefore, biodegradable and biocompatible nanoparticles able to target stem cells and release the payload in their cytoplasm with consequent activation of signalling cascades will be of great interest. Recently, we have reported the successful delivery of vascular growth factors into hESCs, by incorporating growth factor-release particles in human **embryoid bodies** (EBs) [15]. These biodegradable nanoparticles are compatible with cell viability and proliferation and are extremely effective in terms of differentiation. In some cases, the effect on vascular differentiation of particles containing growth factors was superior to the one observed by exposing EBs to large extrinsic doses of the same growth factors. Moreover, nanoparticles were taken up by human embryonic stem cells and accumulated in the perinuclear region indicating that they could constitute a delivery platform not only for growth factors but also for other type of biomolecules [15].

Stem Cell Engineering

Various micro-/nanofabrication technologies have been used to design scaffolds able to drive the differentiation of stem cells into specific cell lineages. For example, nanofibers are able to provide an in vivo-like extracellular scaffolding to promote regeneration of specific tissues. Nanopatterned or nanostructured scaffolds are designed to trigger stem cells to become specific cell types comprising the tissues and organs in the body. Current research efforts in nanotechnology applications in tissue engineering are focussing in the following aspects: (i) Micro/nano structured scaffolds for tissue engineering; (ii) magnetic nanoparticles for magnetic force-based tissue engineer-



ing; (iii) nanocomposites for bone tissue engineering; and (iv) micro/nanoencapsulation for cell therapy

The ultimate goal of tissue engineering is to recreate the right conditions to support the massive growth, physical folds and twists and cellular and molecular events of great complexity that occur during regeneration or replacement of a tissue. The general strategy is to grow cells in a scaffold engineered to define the geometry of the replacement tissue and provide the right environmental cues that promote tissue regeneration.

Stem cell research has been showing that stem cells or at least progenitor cells can be isolated from almost every tissue in the body. With the appropriate conditions it may be possible to stimulate these cells to form new tissue. Several studies have tried to use this biologic intrinsic regenerative potential. Stevens and collaborators have injected alginate gels or modified hyaluronic acid gels into an artificial space between the tibia and the periosteum (the outer lining of the bone). This stimulated bone and cartilage formation from resident progenitor cells in the inner layer of the periosteum [16]. This is an example of how simple biomaterials can support the generation of complex tissue by using the body as a bioreactor and without the need of exogenous cell transplants. In situations where the regenerative potential is low due to different factors like age, trauma, scarring or inflammation like the ones that follow myocardial infarction or brain stroke for example, biomaterial interventions that include cells of external origins must be included.

Several clinical studies with stem cell-based therapies are currently being performed worldwide. Despite the considerable knowledge gathered in the last years in stem cells biology, further pre-clinical and clinical studies are needed to clarify what is the best stem cell source for certain medical applications, the mechanism underlying their regenerative effect, the

timing and delivery methods, etc...It is of utmost importance to demonstrate the long-term safety of these cell-based therapies. For example, studies in mice have showed that stem cells injected into the heart following myocardial infarction gave origin to mineralized tissue [17]. This was possibly due to the reaction of the transplanted cells to the stiffer mechanical environment of the scar tissue that was not appropriate to induce cardiogenesis.

Stem cell based therapy is in hand when compared with the major challenge that is replacing an entire organ with a complex repertoire of cell types carefully organized to maximize its functional output.

Self-organization seems to be an intrinsic characteristic of cells; cells will cluster and communicate with cells that express the same cellular adhesion molecules and under the right conditions can form complex structures like the sprouting tubular networks formed by endothelial cells lining blood vessels. Simple artificial cell adhesions have been engineered using biotin conjugated to cell surfaces and the addition of avidin to trigger the assembly of multicellular clusters due to the biotin-avidin interaction in order to aid in the development of more complex cellular interactions [18].

Communication between cells in the tissue is essential but a lot of information is also coming to cells from their extracellular environment; the scaffold that surrounds and separates cells within a tissue is a complex material called the Extracellular Matrix (ECM). Tissue engineering takes lessons from the characterization of natural bioactive scaffolds in order to construct artificial ones. When possible, a very efficacious strategy is to use cadaver- or animal-derived decellularized ECM because these products have an inherent bioactivity to induce regeneration. This type of approach has found clinical applications in routine medical procedures and in life-saving scenarios. Products derived from the small intestinal submucosa of pigs are used routinely in reconstructive surgery,

and ECM derived from the pericardium of horses can be used as a reconstructive material in the dura mater layer of the brain meninges following a craniotomy. In a recent development, it was possible to engineer a bioartificial heart through a decellularization process with detergents to produce a biocompatible cardiac ECM scaffold with a perfusable vascular tree, patent valves and a four-chamber-geometry template for biomimetic tissue engineering. These researchers managed to populate this ECM scaffold with an appropriate cell composition, and the maturation of this construct developed a nascent pump function [19]. Almost at the same time another group reported the transplant of a tissue engineered airway confirming that this approach can in fact produce whole-organ tissue engineering products that are clinically relevant [20]. The scaffold in this case was a decellularized human donor trachea that was seeded with the patient's own bone marrow cells that had been differentiated into cartilage cells. In contrast with traditional transplant surgery, the decellularization process solved the problem of tissue rejection because it removed human leukocyte antigen traces that are major determinants in tissue compatibility with the advantage that the patient did not need any immunosuppressive drugs [20].

Both decellularized tissues and synthetic scaffolds offer distinct and important benefits for tissue engineering. Typically, biomaterials-engineering approaches focus on chemical and/ or physical mechanisms by which the ECM influences cells and try to reproduce those effectively for a given tissue. For instance, it may be sometimes necessary to work the **anisotropic** features of the culturing system to better



mimic the tissue. **Nanogrooves** induced by laser irradiation are an example of this type of approach in bone differentiation studies. The alignment of bone cells and collagen matrix is closely related to the mechanical properties of bone. Scaffolds that are able to promote osteoblast differentiation and modulate their orientation to generate mineralization in a preferred direction are essential for the generation of biomimetic bone tissue. Bangshang Zhu and collaborators, used nanogrooves to induce alignment of rabbit mesenchymal stem cell (MSC)-derived osteoblast-like cells and collagen fibres. Nanoscale groove-ridge patterns (300 nm in periodicity, 60–70 nm in depth) on the surface of polystyrene were made by polarized laser irradiation. The cells and actin stress fibers were aligned and elongated along the direction of the nanogrooves. The results suggested that nanoscale fibrous cues in the longitudinal direction might contribute to the aligned formation of bone tissue [21]. A recent study has shown that osteoblasts are responsive to nanopatterns down to 75 nm in width and 33 nm in depth. Nanotexture-driven mineral deposition is induced and responsive to even smaller nanopatterns of 50 nm in width and 17 nm in depth. In addition, gene expression of osteoblast specific markers is upregulated by nanogrooves [22]. These studies indicate that nanogrooves can be a very promising tool to direct the bone response at the interface between an implant and the bone tissue, which can benefit the installation of implants in compromised patients. Although various models have been proposed for how this alignment of cells in response to nanopatterns occurs, much remains to be clarified. Studies with fixed cells do not lend themselves to answering these questions. The dynamics of the in-

teraction of cells with these nanogrooved surfaces was recently analysed by live cell imaging [23]. These studies have shown that cells acquire elongated morphologies on a surface with nanogrooved patterns and align along that pattern. In this study, the dynamic behaviours of living mesenchymal stem cells on a nanogroove substrate with a 200 nm groove depth, an 870 nm ridge width and a 670 nm groove width were observed using time-lapse microscopy. These researchers found that **filopodia** moved as if they were probing the surroundings of the cell protrusion, and then some cell protrusions invaded the probed areas. Cell protrusions that extended perpendicular to the nanogroove direction tended to retract more rapidly than those that were parallel to it. From these observations, the authors hypothesize that the retracting phase of cell protrusions play a role in cell alignment along the nanogroove patterns. Further studies using similar live cell imaging strategies are required to clearly elucidate the role of filopodia-mediated cell alignment in these nanopatterned substrates.

Stem Cell Tracking and Imaging

To better understand stem cell biology and realize the full potential of stem cell therapy, it is essential to monitor the trafficking of labelled stem cells by molecular and cellular imaging. Monitorization and tracking of these cells inside an organism is a difficult task. This is why stem cells are usually tracked invasively by immunohistochemistry after removal of tissues or organs from small animals. On the other hand, for pre-clinical and clinical trials, it will be fundamental to track stem cells noninvasively in order to assess their grafting and therapeutic effect. Research in this area is focussing on the development of the following nanotechnologic approaches: (i) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for stem cell labelling and diagnostics; (ii) quantum dots and fluorophore nanocrystals for stem cell tracking and imaging; (iii) nanoprobes for stem cell detection and

electrophysiological application; and (iv) photothermal nanospectroscopy to identify stem cells in the body.

Nanotechnology enables labelling stem cells using magnetic, genetic or fluorescent probes which can be monitored by **magnetic resonance imaging** (MRI) or fluorescence imaging. For example, superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles can be used to label stem cells and analyse their fate in transplantation assays by MRI. In fact, several SPIO nanoparticle formulations (e.g., Feridex/ Endorem and Ferucarbotran) have FDA (United States Food and Drug Administration) approval for human use as MRI contrast agents. The development of nanoparticles for cell tracking is a multidisciplinary task that needs highly skilled biological, physical and chemical expertise. In most cell types, the nanoparticles are taken up through endocytosis during *in vitro* cell cultivation and accumulate in the endosomes. Although, some cell types are easier to label than others, one has to take into account the biological features of the cells to be labelled and sometimes use chemical tricks to promote the internalization of the nanoparticles; e.g. mononuclear blood cells are easier to label because by their nature they are primed for internalization of other cells or molecules by phagocytosis. Also, quite often the internalization of nanoparticles requires the use of **excipients**, which may include peptides and cationic agents [2]. The labelling of stem/progenitor cells and their transplantation and tracking inside the organism may enlighten the dynamics of stem cell differentiation, migration and therapeutic benefit in several disease scenarios like myocardial infarction, cancer and neurological conditions. In fact, not so long ago, Lewis and collaborators succeeded in demonstrating that stem/progenitor cells labelled with magnetic nanoparticles when injected in the blood stream of small animals can later be isolated by magnetic separation after *in vivo* migration to study the differentiation of the cells exposed to a



biological environment [24]. Although feasible these type of studies are still limited by technical challenges. In some cases, it is difficult to distinguish SPIO-labelled cells from other hypointense regions on MRI images. Such signals can arise from regions containing blood hemoglobin, or blood clots/trombi [25]. The development of new nanoparticle formulations based on probes other than iron oxide will be of great interest for stem cell applications. Some examples have been recently reported based on nanoparticles containing fluorine or manganese [26].

Stem cell differentiation programs are highly regulated processes that may be sensitive to nanoparticle internalization. Therefore, it will be essential to evaluate the long-term effects of these nanomaterials in the biology of stem cells. It is possible that the intracellular degradation of the nanoparticles produces molecules that are bioactive and have potential to activate signalling cascades that can change the differentiation program of the stem cells. The prospect of tracking stem cells with nanoparticle labelling technologies is dependent on a careful evaluation of their impact on stem cell biology and solving issues like dilution of nanoparticle content (and consequent decrease of signal) during cell division and release by exocytosis. Therefore, complementary techniques like fluorescence must be developed to validate the MRI results. Our group is developing nanoparticle formulations that escape the endosome and combine fluorescent and magnetic labelling to circumvent these issues.

Other nanoparticles that are increasingly used in cell biology are **quantum dots** (qdots). These are another class of nanomaterials usually in the size range of 2-10 nm that can be used for long-term labelling of stem cells. Qdots have become a commercial success because they exhibit a brighter fluorescent signal, have higher photostability (hours) and large Stokes shift (difference between excitation and emission wavelengths) than organic dyes and fluorescent proteins. They have nar-

row emission and broad excitation spectrum which allows simultaneous analysis of multiple cell targets by using a single wavelength activation [27]. Qdot conjugation has been used to follow biomolecules like growth factor receptors, integrins, phospholipids, and enzymes among others, when stem cells are exposed to different environments or soluble factors [28].

In vivo, small animal-tracking of delivered stem cells has been difficult due to technical limitations in terms of labelling but also due to the autofluorescent nature of animal tissues. With imaging platforms like Caliper's IVIS it is now possible to do qdot-tracking in whole animals. Rosen and collaborators (2007) have reported the optimization and validation of a qdot long-term tracking technique of labelled mesenchymal stem cells (MSCs) in the mammalian heart. These researchers found that bright qdot crystals were able to illuminate MSCs in histological sections for at least 8 weeks following delivery enabling the complete three-dimensional reconstruction of the locations of all stem cells following injection into the heart [29]. The use of these nanocrystals for stem cell-labelling depends on their origin and surface modification, mode of internalization and type of stem cells used [30]. Stem cells are labelled with qdots in several ways, including receptor-mediated uptake, lipofection, electroporation, or passive loading. Under appropriate conditions, qdots are effective at labelling stem cells without affecting their self-renewal and differentiation potentials. For example, hMSCs labelled with qdots (0.250 to 16 nM) maintained their osteogenic differentiation potential [30]. Also, intravenous injection of Qdots-labelled mesenchymal stem cells into NOD/SCID mice (1×10^6 cells) showed an accumulation after 24 h in the lungs, liver and spleen, but not in the heart, brain or kidneys [31]. At the moment, most studies were dedicated to labelling multipotent mesenchymal stem cells. Therefore, it will be important to extend these studies

to pluripotent embryonic stem cells. Also, the long-term effects of these nanoparticles and their degradation products on stem cells should be also assessed at gene and protein level. Indeed, qdots may induce cytotoxic effects due to release of cadmium triggered by their oxidative degradation [32]. This metal can bind to the sulfhydryl groups of critical mitochondrial proteins and induce the production of reactive oxygen species, leading to mitochondrial dysfunction and ultimately cell death [33]. However, it might be possible to coat qdots in a way that circumvents their *in vivo* degradation.

Stem Cell Transfection

Efficient gene delivery systems are required to fully manipulate stem cell behaviour. This ability is essential for studies of gene function, control of stem cell differentiation, cellular labelling and purification, and cellular secretion of therapeutic drugs. Viral methods have been widely used and have good transduction efficiencies; however they integrate into the genome of the host cell. Because of safety issues, non-viral gene delivery systems are preferred for stem cell transfection. The key challenge in this case is to deliver genes to stem cells with high efficiency and low cytotoxicity. Nanotechnology provides invaluable tools for stem cell transfection. The main efforts in this area are focussing on: (i) Nanomaterials for *in vivo* gene delivery; (ii) nanowires for gene delivery to stem cells; and (iii) micro/nanofluidic devices for stem cell electroporation.

Nanoparticles have been shown to be effective vectors for gene transfection. Green and collaborators developed a class of polymers (poly(B-amino esters)) that are able to condense DNA into nanoparticles that



facilitate cellular uptake and endosomal escape. These particles can be coated for ligand-specific delivery, are biodegradable and have low toxicity [34]. Another approach used specific recognition of cell surface molecules coupled to an organic-inorganic hybrid carrier where carbonate apatite nanoparticles were coated electrostatically with fibronectin and E-cadherin producing an efficient gene delivery system for embryonic stem cells [35, 36]. These studies with nanoparticles reported higher efficiencies for gene delivery and expression than the ones obtained with the leading commercially available transfection agent, Lipofectamine 2000 [34-36].

Nucleic acids (DNA and RNA) can be delivered in the cytoplasm by the nanoparticles in a gradual release profile or suddenly, depending if the genetic modulation is intended to be sustained in time or not. This is of great advantage when compared with the commercially available options. Indeed, nanoparticles with covalently immobilized DNA or siRNA were shown to be a very effective strategy to regulate gene expression [37,38]. Rosi and collaborators have shown that DNA-gold nanoparticles can have effective intracellular target recognition and binding and can be used for antisense gene regulation on stem cells [37]. For somatic cells, it has been reported that these systems have high resistance to nuclease degradation and high cellular uptake as a result of their oligonucleotide functionalization. These nanoparticle systems offer exciting opportunities for gene expression regulation and the control of stem cell fate. Our research group has several projects in this area aiming to modulate the differentiation of pluripotent stem cells by the use of nanomaterials.

Other good delivery strategies to transfect stem cells are **carbon nanotubes** (CNTs).

These nanodevices are helical structures of approximately 1–30 nm in diameter with lengths \rightarrow 100 nm [39], that are able to encapsulate drugs and genetic material. These CNTs are internalized by an endocytosis independent way and reach the perinuclear region after a few hours of contact with the cells [40]. After 24 h, a significant number of CNTs have been observed at the cell nucleus of mesenchymal stem cells [41]. Recent advances on this type of strategy have produced a novel platform for intracellular delivery of genetic material and nanoparticles, based on vertically aligned carbon nanosyringe arrays of controllable height. Using this technology, Park and collaborators have shown that plasmid and quantum dots can be efficiently delivered to the cytoplasm of cancer cells and human mesenchymal stem cells [42].

Stem Cell Isolation and Sorting

A key challenge in stem cell research is to identify and isolate stem cells from a heterogeneous cell population by a low cost, fast and easy procedure. Magnetic or fluorescent nanoparticles can be used to label stem cells followed by magnetic force or flow cytometry sorting. In the stem cell biology research field the MACS® technology, briefly described below, is the leading commercial brand and has made the separation of certain stem and progenitor cells a routine procedure.

The MACS® System is characterized by the use of nano-sized superparamagnetic particles (approx. 50 nm in diameter), cell separation columns, and MACS Separators which provide the required strong magnetic field [43]. Magnetic cell separation is performed in three steps:

1) Labelling: cell preparation and labelling methods are similar to those used in flow cytometry. Each target cell in a cell suspension is immunomagnetically labelled using MACS MicroBeads, which typically are covalently conjugated to a monoclonal antibody (mAb) or to a ligand specific for a certain cell type.

2) Separation: the cell suspension is passed through the separation column that contains

a ferromagnetic matrix and is placed in a MACS Separator. The separator contains a strong permanent magnet creating a high-gradient magnetic field in the magnetisable column matrix. Labelled target cells are retained in the column via magnetic force, whereas unlabeled cells flow through. By simply rinsing the column with buffer, the entire untouched cell fraction can be eluted.

3) Elution of the labelled cell fraction: after removing the column from the magnetic field of the MACS Separator, the retained labelled cells can easily be eluted with buffer.

The entire procedure can be performed in less than 30 min, and both cell fractions, magnetically labelled and untouched cells, are immediately ready for further use, such as flow cytometry, molecular analysis, cell culture, transfer into animals, or clinical cell therapy applications.

MACS MicroBeads are superparamagnetic particles made of an iron oxide core and a dextran coating. They are nano-sized, ranging between 20 and 150 nm in diameter, and form colloidal solutions, i.e., they remain dispersed [43]. Superparamagnetism means that in a magnetic field the iron oxide cores magnetize strongly like ferromagnetic material, but when removed from the magnetic field the particles do not retain any residual magnetism. The dextran coating of the MicroBeads permits chemical conjugation of biomolecules. Numerous highly specific mAb, fluorochromes, oligonucleotides and various other moieties have all been covalently linked to MicroBeads, thereby transferring additional biochemical and physical properties to them [43]. The nano-sized iron-dextran particles confer several unique features on MACS Technology. MACS MicroBeads are biodegradable and do not alter cell function. Effects on the functional status of cells by magnetic labelling with MicroBeads are primarily dependent on the target cell surface antigen and on the degree of crosslinking by mAb or ligands conjugated to the MicroBeads, but not on the MicroBeads themselves. Cells labelled with MicroBeads have been used for numerous functional in vitro assays, experi-



mental transfers into animals, and therapeutic transplantations in humans.

Molecular Detection and Biosensors

In addition to detect labelled stem cells, it is of paramount importance to detect particular molecules in the stem cell pathway at the cellular level. Nanotechnology provides advanced probes and devices for molecular detection. For example, (i) carbon nanotube optical probes for single molecule detection in living cells; (ii) carbon nanotube nanoelectrode array for deep brain stimulation; (iii) nanoparticles for neurochemical detection and biosensors; (iv) nanowires for molecular detection in stem cells; (v) self-assembly polymeric micelle-based bioassays; (vi) nanoarrays in mass spectrometry for proteomic and metabolomic applications; (vii) nanofluidic device for single cell genomic analysis on a chip.

The aim of these tools is to monitor biomolecules in real time without using invasive or endpoint procedures. Currently, most strategies to analyse intracellular biochemical processes rely on several steps of cell-processing like fixation, permeabilization and labelling, which are time consuming and expensive when scale-up or high throughput screening is needed. Nanoparticles can be an appropriate solution for "bio-sensing" inside stem cells. **Sensors** are usually composed of two parts: one that recognizes and binds the target molecule and another that signals the binding event. One way of doing this is to immobilize the recognition molecule to the surface of a nanoparticle. This type of approach was used by Hwang and collaborators to monitor neuronal differentiation *in vivo* using a molecular beacon [44]. They have generated a quencher-based fluorescent beacon system to sense the neuron-specific miR124a expression. Moreover this beacon was built upon a cobalt ferrite magnetic core which enables the dual-imaging nanoparticle beacon system to be used for *in vivo* cellular tracking by magnetic resonance as well as for monitoring the changes in the expression of intracellular targets with

the fluorescence-quenching beacon [44]. Other examples include pH nano-sensors [45] and nanoparticles able to quantify enzymatic activities [46]. A recent study reported the preparation of polymeric nanoparticles bearing a kinase peptide substrate and near-infrared fluorophore chemically coupled to the nanoparticle. In the nonphosphorylated state, these nanoparticles have low levels of fluorescence because of the short distance between each fluorescence probe in the nanoparticle. Upon kinase phosphorylation of the phosphate groups that are incorporated into the peptide substrate the polymeric nanoparticles dissolve due to charge unbalance and the fluorescence is recovered [46].

CONCLUSION

This report identifies challenges and opportunities where nanotechnology can be utilized to advance stem cell research. Although stem cell nanotechnology is still a young discipline, it is already contributing for new discoveries in stem cell research and the development of better stem cell technology. This survey of research topics in stem cell nanotechnology will allow non-nano-experts to realize the impact that nanotechnology is having in both basic stem cell biology and in translational applications of stem cell research into medicine.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the support of Crioestaminal, MIT- Portugal Program, Marie Curie Reintegration Grant, and FCT funding (PTDC/SAU-BEB/098468/2008; PTDC/CTM/099659/2008; PTDC/SAU-ENB/113696/2009).

REFERENCES

1. Weissman IL & Shizuru JA (2008) The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* **112**, 3543-3553.

2. Ferreira L, Karp JM, Nobre L & Langer R (2008) New opportunities: the use of nanotechnologies to manipulate and track stem cells. *Cell Stem Cell* **3**, 136-146.
3. Ferreira L (2009) Nanoparticles as tools to study and control stem cells. *J Cell Biochem* **108**, 746-752.
4. Fisher OZ, Khademhosseini A, Langer R & Peppas NA (2010) Bioinspired materials for controlling stem cell fate. *Acc Chem Res* **43**, 419-428.
5. Gerecht S, Burdick JA, Ferreira LS, Townsend SA, Langer R & Vunjak-Novakovic G (2007) Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 11298-11303.
6. Kraehenbuehl TP, Ferreira LS, Zammaretti P, Hubbell JA & Langer R (2009) Cell-responsive hydrogel for encapsulation of vascular cells. *Biomaterials* **30**, 4318-4324.
7. Irvine DJ, Hue KA, Mayes AM & Griffith LG (2002) Simulations of cell-surface integrin binding to nanoscale-clustered adhesion ligands. *Biophys J* **82**, 120-132.
8. Nur EKA, Ahmed I, Kamal J, Babu AN, Schindler M & Meiners S (2008) Covalently attached FGF-2 to three-dimensional polyamide nanofibrillar surfaces demonstrates enhanced biological stability and activity. *Mol Cell Biochem* **309**, 157-166.
9. Alberti K, Davey RE, Onishi K, George S, Salchert K, Seib FP, Bornhauser M, Pompe T, Nagy A, Werner C & Zandstra PW (2008) Functional immobilization of signaling proteins enables control of stem cell fate. *Nature Methods* **5**, 645-650.
10. Poh CK, Shi ZL, Lim TY, Neoh KG & Wang W (2010) The effect of VEGF functionalization of titanium on endothelial cells in vitro. *Biomaterials* **31**, 1578-1585.
11. Anderson DG, Levenberg S & Langer R (2004) Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **22**, 863-866.
12. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL & Discher DE (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677-689.
13. Saha K, Keung AJ, Irwin EF, Li Y, Little L, Schaffer DV & Healy KE (2008) Substrate modulus directs neural stem cell behavior. *Biophys J* **95**, 4426-4438.
14. Boonen KJ, Rosaria-Chak KY, Baaijens FP, van der



Schaft DW & Post MJ (2009) Essential environmental cues from the satellite cell niche: optimizing proliferation and differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, C1338-1345.

15. Ferreira L, Squier T, Park H, Choe H, Kohane DS & Langer R (2008) Human embryoid bodies containing nano- and microparticulate delivery vehicles. *Advanced Materials* **20**, 2285-+.

16. Stevens MM, Marini RP, Schaefer D, Aronson J, Langer R & Shastri VP (2005) In vivo engineering of organs: the bone bioreactor. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 11450-11455.

17. Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JW, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SE & Fleischmann BK (2007) Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* **110**, 1362-1369.

18. De Bank PA, Kellam B, Kendall DA & Shakesheff KM (2003) Surface engineering of living myoblasts via selective periodate oxidation. *Biotechnol Bioeng* **81**, 800-808.

19. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI & Taylor DA (2008) Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* **14**, 213-221.

20. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Hollander AP, Mantero S, Conconi MT & Birchall MA (2008) Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* **372**, 2023-2030.

21. Zhu B, Lu Q, Yin J, Hu J & Wang Z (2005) Alignment of osteoblast-like cells and cell-produced collagen matrix induced by nanogrooves. *Tissue Eng* **11**, 825-834.

22. Lamers E, Walboomers XF, Domanski M, te Riet J, van Delft FC, Lutjge R, Winnubst LA, Gardeniers HJ & Jansen JA (2010) The influence of nanoscale grooved substrates on osteoblast behavior and extracellular matrix deposition. *Biomaterials* **31**, 3307-3316.

23. Fujita S, Ohshima M & Iwata H (2009) Time-lapse observation of cell alignment on nanogrooved patterns. *J R Soc Interface* **6 Suppl 3**, S269-277.

24. Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT & Weissleder R (2000) Tat peptide-deriva-

tized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol* **18**, 410-414.

25. Gilad AA, Walczak P, McMahon MT, Na HB, Lee JH, An K, Hyeon T, van Zijl PC & Bulte JW (2008) MR tracking of transplanted cells with "positive contrast" using manganese oxide nanoparticles. *Magn Reson Med* **60**, 1-7.

26. Ruiz-Cabello J, Walczak P, Kedziorek DA, Chacko VP, Schmieder AH, Wickline SA, Lanza GM & Bulte JW (2008) In vivo "hot spot" MR imaging of neural stem cells using fluorinated nanoparticles. *Magn Reson Med* **60**, 1506-1511.

27. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS & Weiss S (2005) Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **307**, 538-544.

28. Chen H, Titushkin I, Strosio M & Cho M (2007) Altered membrane dynamics of quantum dot-conjugated integrins during osteogenic differentiation of human bone marrow derived progenitor cells. *Biophys J* **92**, 1399-1408.

29. Rosen AB, Kelly DJ, Schuldt AJ, Lu J, Potapova IA, Doronin SV, Robichaud KJ, Robinson RB, Rosen MR, Brink PR, Gaudette GR & Cohen IS (2007) Finding fluorescent needles in the cardiac haystack: tracking human mesenchymal stem cells labeled with quantum dots for quantitative in vivo three-dimensional fluorescence analysis. *Stem Cells* **25**, 2128-2138.

30. Chakraborty SK, Fitzpatrick JA, Phillippi JA, Andreko S, Waggoner AS, Bruchez MP & Ballou B (2007) Cholera toxin B conjugated quantum dots for live cell labeling. *Nano Lett* **7**, 2618-2626.

31. Lei Y, Tang H, Yao L, Yu R, Feng M & Zou B (2008) Applications of mesenchymal stem cells labeled with Tat peptide conjugated quantum dots to cell tracking in mouse body. *Bioconjug Chem* **19**, 421-427.

32. Derfus AM, Chan WCW & Bhatia SN (2004) Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters* **4**, 11-18.

33. Lovric J, Cho SJ, Winnik FM & Maysinger D (2005) Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chem Biol* **12**, 1227-1234.

34. Green JJ, Zhou BY, Mitalipova MM, Beard C, Langer R, Jaenisch R & Anderson DG (2008) Nanoparticles for gene transfer to human embryonic stem cell colonies. *Nano Lett* **8**, 3126-3130.

35. Kutsuzawa K, Akaike T & Chowdhury EH (2008) The influence of the cell-adhesive proteins E-cad-

herin and fibronectin embedded in carbonate-apatite DNA carrier on transgene delivery and expression in a mouse embryonic stem cell line. *Biomaterials* **29**, 370-376.

36. Kutsuzawa K, Chowdhury EH, Nagaoka M, Maruyama K, Akiyama Y & Akaike T (2006) Surface functionalization of inorganic nano-crystals with fibronectin and E-cadherin chimera synergistically accelerates trans-gene delivery into embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **350**, 514-520.

37. Rosi NL, Giljohann DA, Thaxton CS, Lytton-Jean AKR, Han MS & Mirkin CA (2006) Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science* **312**, 1027-1030.

38. Giljohann DA, Seferos DS, Prigodich AE, Patel PC & Mirkin CA (2009) Gene Regulation with Polyvalent siRNA-Nanoparticle Conjugates. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 2072-+.

39. Iijima S (1991) Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature* **354**, 56-58.

40. Kostarelos K, Lacerda L, Pastorin G, Wu W, Wieckowski S, Luangsivilay J, Godefroy S, Pantarotto D, Briand JP, Muller S, Prato M & Bianco A (2007) Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nat Nanotechnol* **2**, 108-113.

41. Mooney E, Dockery P, Greiser U, Murphy M & Barron V (2008) Carbon nanotubes and mesenchymal stem cells: biocompatibility, proliferation and differentiation. *Nano Lett* **8**, 2137-2143.

42. Park S, Kim YS, Kim WB & Jon S (2009) Carbon nanosyringe array as a platform for intracellular delivery. *Nano Lett* **9**, 1325-1329.

43. Miltenyi S, Muller W, Weichel W & Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**, 231-238.

44. Hwang DW, Song IC, Lee DS & Kim S (2010) Smart Magnetic Fluorescent Nanoparticle Imaging Probes to Monitor MicroRNAs. *Small* **6**, 81-88.

45. Coupland PG, Fisher KA, Jones DR & Aylott JW (2008) Internalisation of polymeric nanosensors in mesenchymal stem cells: analysis by flow cytometry and confocal microscopy. *J Control Release* **130**, 115-120.

46. Kim JH, Lee S, Park K, Nam HY, Jang SY, Youn I, Kim K, Jeon H, Park RW, Kim IS, Choi K & Kwon IC (2007) Protein-phosphorylation-responsive polymeric nanoparticles for imaging protein kinase activities in single living cells. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**, 5779-5782.

ESPERAMOS A SUA CONTRIBUIÇÃO

Serão considerados para publicação artigos de revisão, divulgação científica, aplicação pedagógica, opinião ou investigação social e/ou histórica sobre bioquímica ou ciências afins. Artigos de opinião são particularmente preferidos desde que com argumentação sustentada que reduza o factor meramente especulativo.

A comissão editorial aceita apreciar para publicação artigos escritos em português ou inglês com as características supra-mencionadas, desde que submetidos por correio electrónico para canalbq@spb.pt. Os artigos terão que seguir escrupulosamente as directivas de formatação indicadas em seguida. Artigos aceites para publicação têm de ser fornecidos em formato electrónico apropriado.

FORMATAÇÃO DE MANUSCRITOS

As submissões, independentemente do seu tipo (de comunicações rápidas a artigos de fundo), devem compreender duas partes:

Carta de submissão explicando o mérito associado ao artigo na óptica dos autores e a escolha da revista Canal BQ como um meio adequado de publicação. O autor deve declarar nesta carta a cedência de direitos de reprodução do seu artigo à Sociedade Portuguesa de Bioquímica, em suporte papel e suporte digital. Caso o artigo tenha mais que um autor, todos os autores devem assinar a carta ou, alternativamente, o autor signatário deve explicitamente mencionar que age com o conhecimento e em nome dos restantes autores. A cedência deste direito não implica a sua transferência: os direitos de autor para outros fins são mantidos pelo(s) autor(es).

Manuscrito em folhas A4 escritas a 2 espaços com margem de 3 cm em todo o redor. O manuscrito deve constar de um único ficheiro MS-Word. Nas versões preliminares do manuscrito para revisão, as figuras podem ser incorporadas no ficheiro Word, mas a versão final para publicação deverá ser acompanhada de versões individualizadas das figuras em ficheiros que garantam boa impressão [e.g. TIFF].

Caso os autores usem material de terceiros protegidos por direitos de autor ou de qualquer outra natureza que delimite o uso de propriedade intelectual, é dever dos autores garantir que os seus manuscritos/artigos estão conformes as exigências legais.

O MANUSCRITO DEVE COMPREENDER:

Página do título. Título conciso, autor(es), afiliação, título sinóptico (até 50 caracteres) e o endereço de correio electrónico do autor para correspondência. Resumo (excepto artigos de opinião). Em página separada e até 250 palavras. Corpo de texto com as referências bibliográficas numeradas sequencialmente e listadas no final com o formato exigido no FEBS J., nomeadamente:

1. Tsubokawa M, Tohyama Y, Tohyama K, Asahi M, Inazu T, Nakamura H, Saito H & Yamamura H (1997) Interleukin-3 activates Syk in a human myeloblastic leukemia cell line, AML193. *Eur J Biochem* 249, 792-796.
2. Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
3. Langer T & Neupert W (1994) Chaperoning mitochondrial biogenesis. In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto RI, Tissières A & Georgopoulos C, eds), pp. 53-83. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.

As legendas das figuras devem ser condensadas numa secção autónoma a inserir imediatamente antes das referências bibliográficas. As figuras, se inseridas no texto, devem ser devidamente identificadas e colocadas depois das referências bibliográficas. A decisão final sobre a publicação ou não do manuscrito é da comissão editorial, eventualmente suportada pela opinião arbitral de terceiros.

MANUSCRIPT SUBMISSION

SPB accepts manuscripts in Portuguese, Spanish and English.

If you wish to submit a manuscript, please after following the instructions below carefully, send your manuscript to canalbq@spb.pt .

MANUSCRIPT FORMAT

Submission is composed of two documents, regardless of the manuscript type:

A submission letter stating why the author(s) think Canal BQ is appropriate to publish the manuscript. The letter should include an explicit statement giving the Portuguese Biochemical Society the right to reproduce your manuscript in print or in digital support. All authors should sign this letter, or alternatively, the main author must clearly mention (s)he is acting on the behalf of all authors. The copyright is kept by the authors for other purposes.

Manuscripts should be prepared in MS-Word and A4 pages with double spacing between the lines. Three cm margins all over the page are required. Embedded pictures are allowed for submission but should the manuscript be accepted for publication, graphics and pictures should be made available in individual files with adequate quality for printing (e.g. TIFF format).

In case the authors are using protected material from third parties, it is the authors' duty to make sure that all the legal authorizations have been obtained.

THE MANUSCRIPT MUST INCLUDE:

Title page. Concise title, author(s) and synoptic title (up to 50 characters, including spaces).

Abstract (except discussion papers). In a separate page and limited to no more than 250 words.

References must be numbered sequentially and listed in the end of the manuscript with the format demanded for FEBS J, namely:

1. Tsubokawa M, Tohyama Y, Tohyama K, Asahi M, Inazu T, Nakamura H, Saito H & Yamamura H (1997) Interleukin-3 activates Syk in a human myeloblastic leukemia cell line, AML193. *Eur J Biochem* 249, 792-796.
2. Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
3. Langer T & Neupert W (1994) Chaperoning mitochondrial biogenesis. In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto RI, Tissières A & Georgopoulos C, eds), pp. 53-83. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.

Figure legends should be gathered in a single section of the manuscripts, and placed before the reference list. When figures are embedded in the text file, they should be placed after the reference list. The final decision on publication or rejection of the manuscript rests with the Editorial Board, which will make use of the peer review system for advice.

