

5. Desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas com células estaminais

Actualmente, assiste-se a um impasse no desenvolvimento de tratamentos eficazes para as doenças oncológicas e degenerativas, devido à constatação de que os fármacos apenas conseguem minorar alguns dos sintomas de certas doenças, sendo totalmente ineficazes noutras.

Os resultados clínicos apontam, assim, para a necessidade de se desenvolverem novas estratégias de tratamento que incluam a terapia genética (correção do erro genético) e a medicina regenerativa (transplantes de órgãos ou enxertos de tecidos normais ou corrigidos).

Porém, devido à inovação tecnológica e riscos associados, não é lícito efectuar estas experiências nos doentes. Por outro lado, o uso de animais transgénicos (com indução artificial da doença) e de linhas celulares transformadas (células com o erro genético mas imortalizadas com recurso a vectores virais) apresenta limitações críticas no respeitante à aplicação das conclusões para os humanos.

A ausência de legislação não causa problemas de maior, porque os investigadores e as empresas podem comprar linhas celulares de células estaminais ao estrangeiro e trabalhar nelas.

Como Vice-presidente da Sociedade Portuguesa de Células Estaminais e Terapia Celular (SPCE-TC) e Presidente da Secção de BioÉtica, Legislação e Sociedade da SPCE-TC, encontro-me a estabelecer parcerias com os Organismos Públicos e as Fundações de modo a viabilizar uma Legislação permissiva que venha permitir um trabalho mais enquadrado e diferenciado na área. Essa Lei permissiva deverá respeitar os Direitos Humanos, a Constituição Portuguesa e a Legislação Europeia que Portugal enquadrou. De um modo geral, os investigadores deverão dedicar-se às células estaminais adultas e do cordão umbilical, sem problemas éticos. Em relação às células estaminais embrionárias pretende-se que a produção, certificação e distribuição de linhas celulares seja controlada mas permitida segundo critérios abaixo definidos.

Células estaminais e progenitoras adultas

Os tratamentos com células estaminais adultas têm já uma história muito longa, sendo o paradigma o uso da medula óssea em transplantes nas doenças hematopoiéticas. A esta terapêutica que veio revolucionar o tratamento oncológico em hematologia, juntaram-se os transplantes de órgãos, os enxertos de tecido (pele, córnea), a criopreservação e transplante de células estaminais adultas germinativas e os enxertos de biopolímeros.

Em todos os casos se têm obtido enormes sucessos, em que o nosso País se tem destacado.

Assim, na área dos transplantes de órgãos e dos transplantes de medula óssea, existe toda uma actividade devidamente certificada, com centro coordenador em Lisboa e delegações distritais (Lisboa, Coimbra, Porto), que incluem o Ministério da Saúde, a Organização Portuguesa de Transplantação (OPT), a Luso-Transplante (LT), os Centros de Histocompatibilidade (CHC), o Instituto Português do Sangue (IPS), o Centro Coordenador de Dadores de Células de Medula Óssea, Estaminais e de Sangue de Cordão Umbilical (CEDACE), e os Serviços de Transplante, de Hematologia/Imunohemoterapia e Oncologia dos diferentes Hospitais. Portugal também já dispõe da legislação necessária para o controle efectivo da protecção na Informação genética pessoal e informação de saúde. Nesta Lei, redigida sob orientação do Professor Doutor Jorge Sequeiros (ICBAS-IBMC-UP) está também explicitada a regulamentação sobre a terapia genética e os bancos de dados genéticos [70].

Em relação aos Biopolímeros, a Universidade do Porto iniciou desde há cerca de dez anos uma colaboração entre as Engenharias e a BioMedicina para a utilização dos biopolímeros nos transplantes hospitalares, havendo inúmeros pacientes já transplantados com sucesso, nomeadamente fruto da colaboração entre o Instituto Nacional de Engenharia Biomédica (INEB), o Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), o Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS; onde existem as facilidades de cirurgia experimental animal) e o Hospital Geral de Santo António (HGSA), com transplantes ósseos para ortopedia e otorrinolaringologia; entre o Departamento de Engenharia de Polímeros da Universidade do Minho e o Hospital de S. João; e entre o ICBAS, Empresas portuguesas de biopolímeros (Medmat Innovation, Materiais Médicos Lda; Catim, Centro de Apoio Tecnológico à Indústria Metalomecânica) e o Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia.

Na área da reprodução, o grupo pioneiro no tecido germinal feminino foi Belga [19] e no tecido germinal masculino foi o meu grupo (Prof. Doutor Mário Sousa) do ICBAS-UP numa parceria com a Faculdade de Medicina (FMUP: Prof. Doutor Alberto Barros) [1-9,11-17,20-22,24,25,28,33,36,39-55,58-65]. Em consequência, criamos na Universidade do Porto (Ministério da Ciência e do Ensino Superior) um Banco Público de Tecido Germinal, onde se processam e criopreservam gâmetas (espermatozóides, ovócitos) e células estaminais germinais (testiculares e ováricas) para auto-transplante. Em pormenor, o banco para sémen existe

desde 1985, o banco de tecido germinal masculino existe desde 1996, o banco de células estaminais e progenitoras masculinas existe desde 2002, o banco de tecido germinal feminino e de células estaminais e progenitoras femininas existe desde 2003 na FMUP, e o banco de células estaminais embrionárias existe desde 2003 na FMUP.

Mais recentemente, o grupo do Hospital de Egas Moniz (NeuroPatologia, Neurologia, Neurocirurgia e OtorrinoLaringologia) iniciou os auto-transplantes de células estaminais do epitélio olfactivo (neurónios presentes na mucosa nasal) para as regiões da espinal-medula de pacientes paraplégicos e tetraplégicos. Apesar de os doentes não terem recuperado a função motora, não houve rejeição local e assistiu-se a pequenas melhoras, promissoras. Esse grupo chamou-me a Lisboa para aí iniciar a cultura de células estaminais a partir do epitélio olfactivo desses doentes. Após o estabelecimento dos procedimentos, a metodologia foi entregue a uma empresa de biotecnologia de Lisboa (ECBio Lda, ITQB).

Em Janeiro de 2005, consegui reunir todos os grupos de portugueses que trabalham em células estaminais e assim oficializar a constituição pública da Sociedade Portuguesa de Células Estaminais e Terapia Celular (SPCE-TC) [71]. Esta Sociedade conta com inúmeros grupos que, para além dos acima citados, compreende mais dois grandes grupos também empenhados nas células estaminais adultas e na Medicina Regenerativa, o Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem, IBILI, Universidade de Coimbra (retina) e o Centro de Engenharia Biológica e Química (CEBQ) do Instituto Superior Técnico de Lisboa (IST: Professores Doutores Fernando Ramôa Ribeiro e Joaquim Cabral).

Existem normas técnicas muito rigorosas documentadas pela CE e pela FDA no respeitante à produção e certificação de células e tecidos para transplantes [72].

Estas normas (instalações, procedimentos) ainda não estão totalmente aplicadas nas Unidades Universitárias e Privadas que trabalham com células estaminais adultas, pelo que se torna urgente um forte apoio de investimento nestas instituições de modo a dotá-las de salas adequadas à produção de produtos certificados para transplante bem como de mecanismos informáticos de protecção de dados.

Células estaminais e progenitoras do sangue do cordão umbilical

Os transplantes de medula óssea (MO: células estaminais e progenitoras hematopoiéticas adultas) constituem um marco histórico no tratamento oncohematológico. A esta realidade veio, desde 1989, juntar-se o transplante de sangue de cordão umbilical (CBU: Eurocord/Netcord), o qual introduziu diversas outras possibilidades: ser alternativa na ausência de medula óssea compatível, menor necessidade de correspondência em haplotipagem, menor taxa de reacções de rejeição, aplicação estável a crianças e adultos, possibilidade de armazenamento em criopreservação [73].

Os Bancos Públicos de CBU existem em todo o mundo ocidentalizado e destinam-se a uso em transplante heterólogo quando o paciente não dispõe de transplante de medula óssea compatível. A metodologia é muito rigorosa. Tem-se de excluir na mãe uma ampla listagem de doenças e apenas 1 em cada 10 sangues de cordão umbilical podem ser criopreservados (aqueles que possuem um determinado número de células estaminais e progenitoras) de modo a que o transplante seja um sucesso. Os transplantes de CBU destinam-se a doação benévola, anónima e heteróloga e aplicam-se essencialmente às doenças de oncohematologia. A manipulação deste produto está sujeita a normas muito estritas da CE (Eurocord, Netcord) com certificação obrigatória anual das instalações e procedimentos [72].

Como sabe, venho lutando neste nosso País desde 1995 pela criação de um Banco Público de Sangue de Cordão Umbilical, realidade que estará para breve no Porto com o apoio da Eurocord/Netcord. Para apoio a esta iniciativa, o nosso Serviço Universitário participa no Programa Europeu FP6 dedicado ao CBU (certificação de linhas celulares e desenvolvimento de novas estratégias para transplantes), e iniciei a Formação Avançada de dois licenciados, o Rui Neves (Bioquímico) que fica a trabalhar por 3 anos em Duesseldorf, Alemanha, na Netcord, enquanto que a Maria João Pinho (Bióloga) fica connosco apesar de tutorada pelos colegas alemães. Existe também um grupo em Lisboa dedicado à investigação em células estaminais e progenitoras de CBU, o da Professora Doutora Leonor Parreira, na Faculdade de Medicina de Lisboa, Hospital de Santa Maria.

As investigações actuais em CBU encontram-se dedicadas às seguintes actividades sob coordenação da Eurocord/Netcord:

- Produção de novas linhas celulares (Duesseldorf, Alemanha; Barcelona, Espanha; Milão, Itália; Paris, França).
- Certificação das novas linhas celulares (vários países incluindo a Universidade do Porto: Mário Sousa).

-Diferenciação em tecidos da mesma origem embrionária para aplicação em transplantes: tratamento das doenças cardíacas, produção de vasos sanguíneos, tratamento da diabetes, tratamento de doenças neurodegenerativas, tratamento de doenças hepáticas (vários países europeus).

-Anulação da rejeição nos transplantes por imunomodulação (Universidade do Porto: Mário Sousa)

Tal como recentemente afirmei aos Professores Doutores Hélder Trindade (Director do Centro de Histocompatibilidade do Sul, Centro Coordenador, Ministério da Saúde, Lusotransplante) e Manuel Abecassis (Coordenador Nacional, Ministério da Saúde, Organização Portuguesa de Transplantação), considero que devem existir três delegações do Banco Público de CBU (Lisboa, Coimbra, Porto), preferencialmente nas instalações do IPS.

É, pois, prioritário um forte apoio de investimento nestas instituições de modo a dotá-las de salas adequadas à produção de produtos certificados para transplante CBU bem como de mecanismos informáticos de protecção de dados.

Ao contrário do Banco Público de CBU, os Bancos Privados de CBU destinam-se a auto-transplante (o que impede o seu uso na maioria dos casos: doenças Onco-Hematológicas) e não triam os sangues pelos métodos acima descritos (a maioria não dispõe de número suficiente de células estaminais e progenitoras capazes de assegurarem o sucesso de um transplante), pelo que não podem ser utilizados num programa nacional de transplantação. Constituem apenas um seguro de saúde privado e individual na esperança da ciência poder vir a usá-lo em benefício do utente para outras doenças, nomeadamente as degenerativas.

Nos casos em que o paciente não dispõe de transplante de MO ou de CBU compatível, introduzi com o Prof. Doutor Alberto Barros, desde 2000 na Universidade do Porto, o Diagnóstico Genético Pré-Implantação (DGPI) com selecção HLA para os casos das crianças com doença Onco-Hematológica [3,11].

Células estaminais embrionárias

As células estaminais embrionárias são também muito úteis porque, ao contrário das restantes, são as mais indiferenciadas. Ou seja, as células estaminais adultas podem ser utilizadas na regeneração dos respectivos tecidos; as células estaminais CBU são mais imaturas e podem ser utilizadas na regeneração de tecidos afins, nomeadamente, da medula óssea (do sangue), sistema cardiovascular (vasos sanguíneos e coração), fígado e pâncreas (o fígado é o órgão que produz o sangue no feto) e nalguns tipos de células nervosas (neurónios); pelo contrário, as células estaminais embrionárias (hESC) podem dar origem a todo o tipo de tecidos. Por este motivo, considera-se da maior importância o investimento nas hESC, pois o futuro do mercado terapêutico vai estar nestas células.

A derivação de células estaminais embrionárias humanas (hESC) faz-se a partir de blastocistos (Fig. 27), especificamente a partir das células estaminais pluripotentes do epiblasto (massa celular interna). Estas células já não são totipotentes, uma vez que a totipotência está naturalmente restringida ao 3º dia do desenvolvimento embrionário. Os blastocistos podem ser derivados por clonagem de células somáticas adultas, por partenogénese química ou a partir de embriões de Reprodução Medicamente Assistida (RMA). Neste último caso, como os blastocistos derivam de fertilização entre gâmetas humanos, terão de ser doados.

A doação obriga a consentimento informado e poderá ocorrer nos seguintes casos:

-casais que tendo embriões excedentários, não os desejam criopreservar. Neste caso, como de cada blastocisto apenas se retiram 20-30 células estaminais (massa celular interna), o processo é similar à da doação de órgãos para transplante.

-casais com embriões excedentários criopreservados e que, por obtenção de gravidez de termo gemelar, não os desejam utilizar para nova gravidez. Neste caso, como de cada blastocisto apenas se retiram 20-30 células estaminais (massa celular interna), o processo é similar à da doação de órgãos para transplante.

-embriões diagnosticados com anomalias genéticas, após diagnóstico genético pré-implantação (Fig. 28) [3,11]. Neste caso, os embriões ou são doados para transplante ou são utilizados em confirmação diagnóstica. Havendo doação, o objectivo, neste caso, é o de derivar linhas hESC com defeitos cromossómicos ou génicos para desenvolvimento de modelos experimentais de estudo das doenças e para desenvolvimento de modelos experimentais de terapia genica ou cromossómica.

-casais com embriões excedentários de qualidade C/D, isto é, sem qualidade para transferência intra-uterina ou para criopreservação. Neste caso, os embriões ou são doados para transplante ou são descartados. Havendo doação, a probabilidade de não se conseguir derivar linhas celulares hESC ou de derivar linhas com anomalias será maior.

Técnica de derivação de linhas hESC

- Remoção suave da ZP com pronase (1mg/ml) ou tirode ácido.
- Incubação com soro contendo anticorpos anti-humanos (20 min), em que os Ac se ligam ao trofoblasto (as células mais externas).
- Incubação com complemento de coelho (30 min). O complemento liga-se aos Ac, induzindo a lise do trofoblasto e deixando íntegras as células da massa celular interna (MCI).
- Incubação da MCI com rhLIF (2000 UI) até à passagem 5 e depois com bFGF (4 ng/ml). Podem utilizar-se co-culturas (sobre monocamada de células de linhas celulares humanas certificadas) ou culturas em suspensão. Ocorrendo proliferação de hESC (1-30% dos blastocistos), cada colónia progride para 100-300 células.
- Passagens (repicagem): de 7/7 dias por tripsinização em meio sem Ca^{2+}/Mg^{2+} .
- Criopreservação: de $10^6/10^6$ células [17].

Crítérios de certificação das linhas

- Sobrevida de pelo menos 2 anos em cultura permanente sem contaminação, transformação, degeneração ou perda das capacidades de multipotência.
- Comprovação por DNA-fingerprinting da origem das linhas.
- Sobrevida após congelação-descongelação.
- Cariótipo normal.
- Manutenção de actividade telomerase.
- Manutenção do comprimento dos telómeros.
- Manutenção das expansões CAG.
- Manutenção da expressão génica dos genes housekeeping.
- Manutenção da expressão génica dos genes sujeitos a imprinting.
- Manutenção da expressão génica dos marcadores, internos e de superfície, característicos das células estaminais pluripotentes.
- Manutenção da expressão proteica de marcadores, internos e de superfície, característicos das células estaminais pluripotentes.
- Manutenção da capacidade de diferenciação in-vitro em células dos três folhetos embrionários, com demonstração por RT-PCR e Imunocitoquímica dos marcadores celulares dos mesmos.
- Manutenção da capacidade de diferenciação in-vivo em células dos três folhetos embrionários (formação de teratomas em ratinhos imunodeficientes).
- Manutenção da não-contaminação: culturas negativas para bactérias aeróbias e anaeróbias, parasitas e fungos; culturas negativas para bacilos álcool-ácido resistentes; serologias negativas para Wright, Widal, Weil-Félix, VDRL/TPHA, rubéola, toxoplasma, micoplasma, clamídea, HSV, HPV, CMV, EBV, HVA, HVB, HVC, HIV, HTLV e príões,

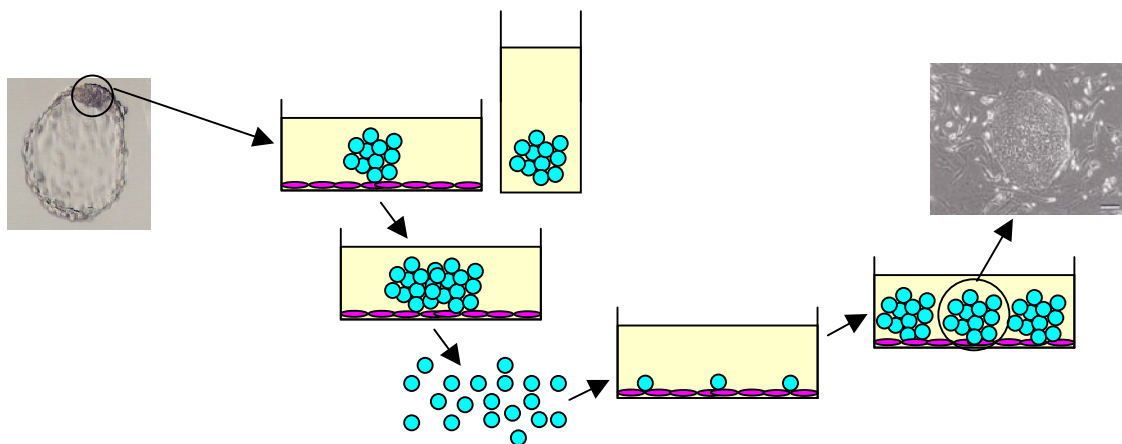


Figura 27. Derivação de linhas hESC.

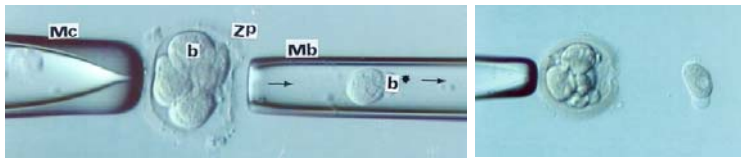


Figura 28. DGPI. Biópsia embrionária ao 3º dia de desenvolvimento embrionário, com remoção de 1-2 blastómeros. O embrião recupera bem da microcirurgia porque se encontra na fase de totipotência.

A comunidade europeia (CE) está associada à European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) e à European Society for Human Genetics (ESHG) e determinou regras para o uso destas células [72]. Portugal encontra-se aí representado pelo Professor Doutor Jorge Sequeiros (ICBAS-IBMC-UP) com o apoio da minha consultoria técnica em RMA e hESC. Para manter o respeito pela identidade humana do embrião, as resoluções são as seguintes:

-aconselha-se os países membros da CE a investir intensamente no estudo e na produção de linhas celulares de células estaminais embrionárias humanas (hESC) derivadas de embriões humanos obtidos por fertilização nos programas de Reprodução Medicamente Assistida (RMA) ou sem fertilização por clonagem terapêutica.

-aconselha-se a que a derivação de hESC a partir de embriões seja efectuada por organismos públicos certificados para o efeito, de modo a evitar o comércio de embriões.

-aconselha-se a que a diferenciação de hESC em tecidos para transplante seja partilhada e fomentada no meio empresarial de biotecnologia de cada país, com cedência das hESC pelos Institutos Públicos.

-é proibida a clonagem reprodutiva.

-é proibida a criação de embriões humanos por RMA apenas para fins de investigação.

-cada país membro da CE pode decidir livremente se autoriza ou não o uso de embriões humanos excedentários dos ciclos de tratamento de RMA para isolamento de hESC.

-cada país membro da CE pode decidir livremente se autoriza ou não o uso de embriões humanos produzidos por clonagem terapêutica para isolamento de hESC.

-nenhum país membro da CE que não autorize o isolamento de hESC pode caucionar os seus investigadores por utilizarem hESC compradas noutros países ou os seus investigadores que trabalhem em hESC noutros países.

Neste momento, vários países da CE autorizaram a produção de hESC, dedicando-lhes financiamento público substancial, como é o caso da Inglaterra (Dr. Glyn Stacey, Director of the UK Stem Cell Bank: gstacey@nibsc.ac.uk), Espanha (Center of Regenerative Medicine, Biomedical Research Park of Barcelona: <http://www.prbb.org>) e Suécia. Mas também em Israel, Índia, Singapura, Coreia do Sul, Japão e Austrália. Nos USA, só em empresas privadas [72].

Mário Sousa na Universidade do Porto é responsável pelo desenvolvimento na RMA da microinjecção (ICSI), pelas primeiras aplicações em RMA com células germinativas progenitoras (ELSI, ROSI), pela primeira aplicação clínica em transplantes de células estaminais adultas testiculares (TASC), pela primeira clonagem terapêutica e haploidização, pelo método de criopreservação de hESC e pelo trabalho em RMA e hESC em Espanha, servindo de consultor em RMA para Portugal, a CE e outros países [1-9,11-17,20-22,24-26,28,33,36,39-55,58-65]. Outros grupos portugueses trabalham em hESC compradas noutros países, ou trabalham com hESC noutros países [71].

Para relançar a biotecnologia portuguesa, as actividades económicas em áreas especializadas e tecnológicas, e para o fomento do tecido empresarial e o emprego qualificado, sugeria criar a seguinte legislação e infra-estruturas portuguesas:

-é proibida a clonagem reprodutiva.

-é proibida a criação de embriões humanos por RMA para fins de investigação.

-é autorizado o uso de embriões humanos excedentários dos ciclos de tratamento de RMA (casais que não desejam a criopreservação; casais que por terem tido uma gravidez de gémeos, já não necessitam dos embriões excedentários criopreservados) para derivação de hESC pelos Institutos Públicos devidamente certificados para o efeito.

-é autorizado a produção de embriões humanos por clonagem terapêutica, haploidização e partenogénese pelos Institutos Públicos devidamente certificados para o efeito.

-é autorizado o uso de embriões humanos por clonagem terapêutica, haploidização e partenogénese para derivação de hESC pelos Institutos Públicos devidamente certificados para o efeito.

-é autorizada a diferenciação de hESC para transplantes desde que as linhas celulares sejam cedidas pelos Institutos Públicos devidamente certificados para o efeito.

-é autorizada a actividade de investigação sobre linhas celulares hESC compradas noutros países.

-é autorizada aos investigadores trabalharem em hESC noutros países.

-os Institutos Públicos dedicados ao isolamento, derivação, processamento, testagem, certificação, armazenamento, manutenção e disponibilização de hESC devem ter três secções:

Sul (Lisboa):

Centro de Engenharia Biológica e Química (CEBQ) do Instituto Superior Técnico de Lisboa (IST: Professores Doutores Fernando Ramôa Ribeiro e Joaquim Cabral). Poderia englobar a UÉvora e a UAlgarve.

Centro (Coimbra):

Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem, IBILI, Universidade de Coimbra (Professor Doutor Francisco Ambrósio), e Centro de Neuro-Ciências da FCT-UC. Poderia englobar a UBeira Interior.

Norte (Porto):

ICBAS-IBMC e FMUP-IPATIMUP (Mário Sousa-ICBAS, Alberto Barros-FMUP, Jorge Sequeiros-IBMC, Sobrinho Simões-IPATIMUP). Poderia englobar a UAveiro, a UMinho e a UTAD.

-aconselha-se um forte investimento público na área das células estaminais para criação de facilidades (instalações, equipamentos, segurança e formação técnica).

-aconselha-se um forte investimento do sector empresarial de biotecnologia na área da diferenciação de células estaminais para transplantação.

Na ausência de Legislação específica, faço as linhas celulares de hESC em Espanha. No Porto, efectuo o mesmo mas com embriões doentes. Trata-se de uma alternativa legal e excepcional, com um fim benévolo e de franca aplicação médica. Neste sistema, utilizam-se embriões de ciclos de DGPI que não são transferidos para os pacientes devido ao teste genético ter revelado doença transmissível. In vitro, estas células permitirão efectuar experiências de terapia genética para desenvolver a melhor estratégia de cura da doença (reparação do erro genético), bem como experiências de expansão e diferenciação celular para desenvolver a melhor estratégia de produção de tecidos para transplante nos doentes.

Por exemplo, muitos dos casais portadores de doenças neurodegenerativas transmissíveis à descendência utilizam o diagnóstico genético pré-implantação (DGPI) para conseguirem alcançar uma gravidez, sem risco da sua doença ser transmitida à descendência. A Universidade do Porto desenvolveu em 1998 uma Unidade de DGPI (Mário Sousa, ICBAS) que se tornou a referência mundial para, por exemplo, a doença de Corino de Andrade (polineuropatia amiloidótica familiar), tendo obtido as primeiras gravidezes livres de doença em Portugal (2000, 2005) e Espanha (2004) [3,11].

Nos ciclos de DGPI, os embriões obtidos por RMA (ICSI) são biopsados ao 3º dia. Aqueles que apresentarem doença não são, obviamente, transferidos para a cavidade uterina materna, sendo descartados para análise genética. Uma alternativa mais consentânea com a medicina humanística, seria a de utilizar estes embriões com doença para deles isolar células estaminais que permitissem vir a desenvolver novos tratamentos para os doentes e a possibilidade de se desenvolverem estratégias de correcção da doença desses mesmos embriões, os quais poderiam ser utilizados pelo casal em vez de terem de ser descartados.

A SPCE-TC e os seus objectivos

Em Junho de 2004 tive uma ideia, a de criar no nosso País um movimento de investigadores na área das células estaminais de modo a unir esforços em defesa desta área em que trabalhamos.

Contactamos todos os investigadores portugueses a trabalhar em células estaminais no País e no estrangeiro.

Reunimos esses colegas e criamos oficialmente a SPCE-TC em 8 de Janeiro de 2005.

Os objectivos da SPCE-TC são os seguintes:

- Promover a partilha de saberes, esforços e colaborações entre os colegas que trabalham na área das células estaminais.
- Promover na sociedade em geral o conhecimento sobre as actividades de I&D na área das células estaminais.
- Exercer pressão positiva sobre os poderes públicos.
- Criar na FCT uma nova Área Prioritária, a de I&D em Células Estaminais.
- Promover o financiamento pela FCT de projectos de I&D em células estaminais.
- Criar na FCT um programa doutoral em células estaminais, usando a SPCE-TC como Unidade de I&D em rede (partilha de infra-estruturas, equipamentos e conhecimentos).
- Promover Candidaturas comuns a projectos de I&D nacionais e internacionais, públicos e privados, usando a SPCE-TC como Unidade de I&D em rede (partilha de infra-estruturas, equipamentos e conhecimentos).
- Promover a criação de Cursos Anuais de Treino Avançado em células estaminais, usando a SPCE-TC como Unidade de I&D em rede (partilha de infra-estruturas, equipamentos e conhecimentos).
- Conseguir incluir a SPCE-TC como parceiro de consultoria técnica nas decisões sobre o desenvolvimento tecnológico do País.
- Conseguir incluir a SPCE-TC como parceiro de consultoria técnica nas decisões de Política Internacional.
- Conseguir incluir a SPCE-TC como parceiro de consultoria técnica nas decisões de Bioética e de Legislação.

6. Banco Público de Células Estaminais

6.1. Na Universidade do Porto (FMUP-ICBAS)

- sémen (oncologia, preservação da fertilidade).
- ovócitos (oncologia, preservação da fertilidade).
- embriões (FIV, ICSI, DGPI; clonagem terapêutica; haploidização).
- tecido testicular, células estaminais e progenitoras (oncologia, preservação da fertilidade).
- tecido ovárico, células estaminais e progenitoras (oncologia, preservação da fertilidade).

6.2. Na Universidade do Porto (FMUP-ICBAS)-IPS

- células estaminais e progenitoras do sangue de cordão umbilical.
- Apresentação das Instalações, 23 de Abril de 2005, Sábado, 9h, com o Alto Patrocínio da Universidade do Porto e da NETCORD.
- Início de actividades previsto para Janeiro de 2006.

7. Referências

- 1.Almeida C, Cardoso M, Sousa M, Viana P, Gonçalves A, Silva J, Barros A (2005) Quantitative study of caspase-3 activity in the ejaculate and swim-up regarding semen quality. *Hum Reprod* 10: pages on line (in press)
- 2.Alves C, Carvalho F, Cremades N, Sousa M, Barros A (2002) Unique (Y;13) translocation in a male with oligozoospermia. *Cytogenetic and molecular studies. Eur J Hum Genet*, 10:467-474.
- 3.Alves C, Sousa M, Silva J, Barros A (2002) Preimplantation genetic diagnosis using FISH for carriers of robertsonian translocations: the portuguese experience. *Prenatal Diagnosis* 22:1153-1162.
- 4.Barros A, Sousa M, Silva J, Almeida V, Rocha E (1997) Aging, hyaluronidase removal of the cumulus, and microinjection do not affect the sperm binding potential of human oocytes. *J Assisted Reprod Genetics* 14:97-101.
- 5.Barros A, Sousa M, Oliveira C, Silva J, Almeida V, Beires J (1997) Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection with totally immotile sperm from the ejaculate. *Fertil Steril* 67:1091-1094.
- 6.Barros A, Sousa M, Angelopoulos T, Tesarik J (1997) Efficient modification of intracytoplasmic sperm injection technique for cases with total lack of sperm movement. *Hum Reprod* 12:1227-1229.
- 7.Barros A, Sousa M, Andrade MJ, Oliveira C, Silva J, Beires J (1998) Birth after electroejaculation coupled to intracytoplasmic sperm injection in a gun-shot spinal-cord injured man. *Arch Androl* 41:5-9.
- 8.Barros A, Sousa M (2000) IFFS surveillance 98. The Portuguese ART Centers Data. *Fertil Steril* 73:1064-1065.
- 9.Bernabeu R, Cremades N, Takahashi K, Sousa M (1998) Pregnancy after elongated spermatid injection. *Hum Reprod* 13:1898-1900.
- 10.Chang C-C, Nagy ZP, Abdelmassih R, Yang X, Tian XC (2004) Nuclear and microtubule dynamics of G2/M somatic nuclei during haploidization in germinal vesicle-stage mouse oocytes. *Biol Reprod* 70, 752-758.
- 11.Carvalho F, Sousa M, Fernandes S, Silva J, Saraiva MJ, Barros A (2001) Preimplantation genetic diagnosis for familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Prenatal Diagnosis* 21:1093-1099.
- 12.Cremades N, Bernabeu R, Barros A, Sousa M (1999) In vitro maturation of round spermatids using coculture on Vero cells. *Hum Reprod* 14:1287-1293.
- 13.Cremades N, Bernabeu R, Barros A, Sousa M (1999) Structured review of international studies on spermatid microinjection in non-obstructive azoospermia. The Spanish experience. *Rev IberoAmer Fertil Reprod Hum* 16:369-374.
- 14.Cremades N, Silva J, Alves C, Bernabeu R, Barros A, Sousa M (2000) Genetical and developmental potential of germinal vesicle stage human oocytes matured in vitro. *Rev IberoAmer Fertil Reprod Hum* 17:1-8.
- 15.Cremades C, Sousa M, Bernabeu R, Barros A (2001) Developmental potential of elongating and elongated spermatids obtained after in-vitro maturation of isolated round spermatids. *Hum Reprod* 16:1938-1944.
- 16.Cremades N, Sousa M (2003) Haploidization in mammals. *ASEBIR* 8:44-45.
- 17.Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sónia S, Oliveira C, Teixeira da Silva J, Barros A (2004) Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine plastic micropipettes. *Hum Reprod* 19:300-305.
- 18.Czolowska R, Modlinski JA, Tarkowski AK (1984) Behaviour of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes. *J Cell Sci* 69, 19-34.
- 19.Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A (2004) Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *The Lancet* 364, 1405-1410.
- 20.El.Shafie M, Sousa M, Windt M-L, Kruger TF (2000) *An Atlas of the Ultrastructure of Human Oocytes. A Guide for Assisted Reproduction.* Parthenon Publishing Group, New York.
- 21.Fernandes S, Huellen K, Gonçalves J, Dukal H, Zeisler J, de Meyts ER, Skakkebaek NE, Habermann B, Krause W, Sousa M, Barros A, Vogt PH (2002) High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 8:286-298.
- 22.Ferrás C, Fernandes S, Marques CJ, Carvalho F, Alves C, Silva J, Sousa M, Barros A (2004) AZF and DAZ gene copy specific deletion analysis in maturation arrest and Sertoli cell only syndrome. *Mol Hum Reprod* 10:755-761.
- 23.Galli C et al (1999) Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. *Cloning* 1, 161-170.
- 24.Grangeia A, Niel F, Ardalán A, Carvalho F, Fernandes S, Girodon E, Silva J, Sousa M, Barros A (2004) Characterization of CFTR mutations and IVS8-T variants in Portuguese patients with CAVD. *Hum Reprod* 19: 2502-2508.

25. Grangeia A, Carvalho F, Fernandes S, Silva J, Sousa M, Barros A (2005) A novel missense mutation P1290S at exon 20 of the CFTR gene in a portuguese patient with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 83 (2): 448-451.
26. Heyers S, Sousa M, Cangir O, Schmoll F, Schellander K, van der Ven H, Montag M (2000) Activation of mouse eggs requires multiple sperm factors but not sperm PLC γ 1. *Mol Cell Endocrinol* 166:51-57.
27. Hochedlinger K, Jaenisch R (2002) Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* 415, 1035-1038.
28. Kamp C, Huellen K, Fernandes S, Sousa M, Schlegel PN, Mielnik A, Kleiman S, Yavetz H, Krause W, Kupker W, Johannisson R, Schulze W, Weidner W, Barros A, Vogt PH (2001) High deletion frequency of the complete AZFa sequence occurs only in men with Sertoli-cell-only-syndrome. *Mol. Hum Reprod* 7:987-994.
29. Kimura Y and Yanagimachi R (1995) Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol Reprod* 53, 855-862.
30. Kono T, Ogawa M, Nakahara T (1993) Thymocyte transfer to enucleated oocytes in the mouse. *J Reprod Dev* 39: 301-307.
31. Lacham-Kaplan O, Daniels R, Trouson A (2001) Fertilization of mouse oocytes using somatic cells as male germ cells. *Reprod BioMed Online* 3, 205-211.
32. Mann MRW, Chung YG, Nolen LD, Verona RI, Latham KE, Bartlomei MS (2003) Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod* 69: 902-914.
33. Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A (2004) Altered genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 363:1700-1702.
34. Ogura A, Wakayama T, Suzuki O, Shin T-Y, Matsuda J, Kobayashi Y (1997) Chromosomes of mouse primary spermatocytes undergo meiotic divisions after incorporation into homologous immature oocytes. *Zygote* 5, 177-182.
35. Palermo GD, Takeuchi T, Rosenwaks Z (2002) Oocyte-induced haploidization. *Reprod BioMed Online* 4, 237-242.
36. Pinho MJ, Neves R, Sousa M, Barros A (2005) Unique (Yq12;1q12) translocation with loss of the heterochromatic region of chromosome 1 in a male with azoospermia due to meiotic arrest. *Hum Reprod* 20 (3): 689-696.
37. Sasagawa I, Kuretake S, Eppig JJ, Yanagimachi R (1998) Mouse primary oocytes can complete two meiotic divisions within the oocyte cytoplasm. *Biol Reprod* 58, 248-254.
38. Soltynska MS, Szollosi D, Czolowska R (1986) Post-fusion reaction of mouse oocyte cortex to incorporated thymocyte cells. *Biol Cell* 57, 135-142.
39. Sousa M, Carneiro J (1994) Silver staining of the nucleolus during human spermiogenesis. *Anat Embryol* 190:479-487.
40. Sousa M, Tesarik J (1994) Ultrastructural analysis of fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 9:2374-2380.
41. Sousa M, Barros A, Tesarik J (1996) The role of ryanodine-sensitive calcium stores in the calcium-oscillation machine of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 2:265-272.
42. Sousa M, Barros A, Mendoza C, Tesarik J (1996) Effects of protein kinase C activation and inhibition on sperm-, thimerosal-, and ryanodine-induced calcium responses of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 2:699-708.
43. Sousa M, Barros A, Tesarik J (1996) Human oocyte activation after intracytoplasmic injection of leucocytes, spermatocytes and round spermatids: comparison of calcium responses. *Mol Hum Reprod* 2:853-857.
44. Sousa M, Barros A, Tesarik J (1996) Developmental changes in calcium dynamics, protein kinase C distribution and endoplasmic reticulum organization in human preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod* 2: 967-977.
45. Sousa M, Barros A, Silva J, Tesarik J (1997) Developmental and cell-cycle-related changes in calcium content of ultrastructurally distinct subcellular compartments of preimplantation human embryos. *Mol Hum Reprod* 3:83-90.
46. Sousa M, Barros A, Mendoza C, Tesarik J (1997) Role of Ca²⁺ oscillations during human preimplantation embryo development. *Ass Reprod Rev* 7: 139-150.
47. Sousa M, Barros A, Tesarik J (1998) Current problems with spermatid conception. *Hum Reprod* 13:255-258.
48. Sousa M, Barros A, Takahashi K, Oliveira C, Silva J, Tesarik J (1999) Clinical efficacy of spermatid conception. Analysis using a new spermatid classification scheme. *Hum Reprod* 14:1279-1286.

- 49.Sousa M, Barros A (1999) How to prepare biopsed testicle samples from non obstructive patients, how to establish the anatomopathologic diagnosis in the fresh testicular tissue, and how to recognize, culture and microinject immature spermatids. *ASEBIR* 4:6-14.
- 50.Sousa M, Fernandes S, Barros A (2000) Prognostic factors for successful testicle spermatid retrieval. *Mol Cell Endocrinol* 166:37-43.
- 51.Sousa M, Cremades C, Alves C, Silva J, Barros A (2002) Developmental potential of human spermatogenic cells cocultured with Sertoli cells. *Hum Reprod* 17:161-172.
- 52.Sousa M, Cremades N, Silva J, Oliveira C, Teixeira da Silva J, Viana P, Ferrás L, Barros A (2002) Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. *Hum Reprod* 17:1800-1810.
- 53.Sousa M, Cremades N, Alves C, Silva J, Viana P, Carvalho F, Fernandes S, Oliveira C, Teixeira da Silva J, Ferrás L, Barros A (2003) Secretory azoospermia: in vitro maturation and clinical use of immature male germ cells. *Rev Int Androl* 1 (Suppl 1):4-11.
- 54.Sousa M (2004) In Vitro Culture of Testicular Stem Cells. In: Testicular stem cells: from basics to clinic. ESHRE Andrology Special Interest Group's Pre-Congress Course Book.
- 55.Sousa M, Barros A (2004) Ethics, social, legal, counselling. A moral case study for discussion: designer babies and tissue typing. *Reprod BioMed Online* 9 (6): 596-597.
- 56.Szollosi D, Czolowska R, Szollosi MS, Tarkowski AK (1988) Remodeling of mouse thymocyte nuclei depends on the time of their transfer into activated, homologous oocytes. *J Cell Sci* 91, 603-613.
- 57.Tateno H Akutsu H, Kamiguchi Y, Latham KE, Yanagimachi R (2003) Inability of mature oocytes to create functional haploid genomes from somatic cell nuclei. *Fertil Steril* 79, 216-218.
- 58.Tesarik J, Sousa M, Testart J (1994) Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 9:511-518.
- 59.Tesarik J, Sousa M (1994) Comparison of Ca^{2+} responses in human oocytes fertilized by subzonal insemination and by intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 62: 1197-1204.
- 60.Tesarik J, Sousa M (1995) Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique: Ca^{2+} fluxes and oocyte cytoplasmic dislocation. *Fertil Steril* 64:770-776.
- 61.Tesarik J, Sousa M (1995) More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. *Fertil Steril* 63:343-349.
- 62.Tesarik J, Sousa M, Mendoza C (1995) Sperm-induced calcium oscillations of human oocytes show distinct features in oocyte center and periphery. *Molec Reprod Develop* 41:257-263.
- 63.Tesarik J, Sousa M (1996) Mechanism of calcium oscillations in human oocytes: a two-store model. *Mol Hum Reprod* 2:383-386.
- 64.Tesarik J, Sousa M, Greco E, Mendoza C (1998) Spermatids as gametes: indications and limitations. *Hum Reprod* 13 (Suppl. 3):89-111.
- 65.Tesarik J, Nagy ZP, Sousa M, Mendoza C, Abdelmassih R (2001) Fertilizable oocytes reconstructed from patients somatic cell nuclei and donor ooplasts. *Reprod Biomed Online* 2: 160-164.
- 66.Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998) Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369-374.
- 67.Wilmot I, Schnieke AE, Mcwhir J, Kind AD, Campbell KHS (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813-66.
- 68.Wilmot I (2002) Are there any normal cloned mammals? *Nature Med* 8: 215-216.
- 69.Windt M-L, Coetzee K, Kruger TF, Marino H, Kitshoff MS, Sousa M (2001) Ultrastructural evaluation of recurrent and in vitro maturation resistant metaphase I arrested oocytes. *Hum Reprod* 16:2394-2398.
70. Legislação em testes genéticos
-Diário da República, I Série, Nº 18, 26 de Janeiro de 2005, Lei nº 12/2005 de 26 de Janeiro, páginas 606-611.
-EU 21120-25; -EUR 20977 EN.
71. SPCE-TC
-Email da Presidência e moradas dos membros: rgreis@dep.uminho.pt
-Email do Vice-Presidente e Presidente da Secção de Bioética, Lei e Sociedade: msousa@icbas.up.pt.
72. Normas
-International standards for cord blood collection, processing, testing, banking, selection and release NETCORD and FAHCT ACCREDITATION OFFICE
University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-6065, USA, www.factwebsite.org.
-EC-Bioethics-Stem Cells
-Line Matthiessen-Guyader, Email: line-gertrud.matthiessen-guyader@cec.eu.int.

- Books (vols I and II) of the EC on Bioethics and Legislation in the different EC countries on stem cells.
- EC-hESC
 - SEC (2003) 441: livro da EC dedicado a esclarecer o que são as hESC, para que servem e os seus potenciais terapêuticos.
 - EUROSTEM, Bioethics in hESC research.
 - EC-ESHRE-ESHG on ART and hESC
- Prof. Dra. Helena Kaariainen, helena.kaariainen@utu.fi; Dr. Sirpa Soini, Sirpa.t.soini@saunalahti.fi.
73. CBU
- Barker and Wagner (2003) Critical Reviews in Oncology and Hematology 48, 35-43.
 - Burgio et al (2003) The Lancet 361, 250-252.
 - Work Group on Cord Blood Banking (1999) Pediatrics 104, 116-118.

Mário Sousa

MD, PhD, Prof. Catedrático, de nomeação definitiva e em regime de exclusividade a tempo completo e integral.

-Especialização Médica em Medicina da Reprodução Laboratorial pelo American Hospital of Paris, França.

-Director de Serviço, Laboratório de Biologia Celular, ICBAS-UP, Ministério da Ciência, da Tecnologia e do Ensino Superior. -Regente, Disciplina de Biologia Celular, Licenciaturas de Medicina e de Medicina Veterinária.

-Director Científico:

Serviço de Genética, FMUP

Centro de Genética da Reprodução Prof Alberto Barros, Porto

Unidade de Reprodução Medicamente Assistida, Hospital de S. João do Porto

Unidade de Reprodução Medicamente Assistida, Serviço de Obstetrícia e Ginecologia, Hospital Académico de Alicante, Espanha



