

Terapias Celulares e Bioengenharia

Cell Therapies and Bionengineering

Radovan Borojevic

Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro, RJ, Brasil

As Terapias Celulares e a Bioengenharia atuam no contexto da Medicina Regenerativa, procurando controlar e ampliar a capacidade natural da regeneração de tecidos. A regeneração mantém naturalmente a homeostasia tecidual, substituindo continuamente as células gastas. Uma intensa regeneração é natural e contínua nos tecidos altamente expostos ao estresse externo, como o epitélio intestinal ou cutâneo, assim como nos tecidos caracterizados pela alta taxa de renovação, como as células sanguíneas. Por outro lado, a regeneração pode eventualmente reparar os tecidos lesados por trauma, doença degenerativa ou senescência. A medicina regenerativa busca criar condições ideais para reparo, regeneração e/ou substituição de tecidos lesados fornecendo: (a) elementos celulares requeridos, (b) fatores de proliferação e diferenciação celular que podem garantir a geração de quantidade suficiente de células novas e (c) estruturas supramoleculares que providenciam a organização espacial plenamente funcional de novos tecidos gerados e a sua integração sistêmica. O conjunto dessas ações representa o campo de ação das terapias celulares e de bioengenharia, compreendendo a engenharia gênica, celular e tecidual, e a biomimética.

A importância crescente da medicina regenerativa no terceiro milênio é devida às modificações demográficas e sociais. O aumento progressivo da idade das populações humanas, e em particular das populações urbanas, gera a necessidade de garantir cada vez mais a qualidade da vida, compatível com uma carga social aceitável. O número total e a proporção de habitantes de terceira idade (65-85 anos) e em senectude avançada (>85 anos) estão aumentando continuamente e rapidamente: o número do primeiro grupo triplicará nos próximos 50 anos, e do segundo será multiplicado por seis. O segundo desses dois grupos consome vinte vezes mais custos da assistência médica e duas vezes mais internação hospitalar do que o primeiro. As doenças degenerativas são a causa essencial e crescente dessa carga social, causando a deterioração da qualidade de vida e aumento dos custos da assistência médica. A degradação ambiental e o aumento da idade associam-se para aumentar o risco de neoplasias, e o número de pacientes com doenças cancerosas aumenta em

proporção direta com a idade média das populações. Por outro lado, as populações jovens, vivendo em aglomerações de alta densidade, estão mais expostas a lesões traumáticas. Embora numericamente menos significativas, essas lesões têm um altíssimo custo social, gerando freqüentemente pessoas jovens debilitadas ou permanentemente incapacitadas para uma vida normal e produtiva. Em populações urbanas do Brasil, as lesões traumáticas são a primeira causa tanto da internação hospitalar quanto da morte na segunda e terceira décadas da vida dos jovens. Em 2004, foram gastos no SUS 585 milhões de reais somente com órteses e próteses. Estima-se que, no mundo todo, cerca de 11.750.000 pacientes poderão se beneficiar de uma terapia ortopédica associada com bioengenharia, com o valor de biomateriais usados em terapias de US\$3.250.000 (MEDTECH INSIGHT REPORT, 2004).

Ambas as situações exigem terapias que possam preservar, melhorar, e/ou restaurar as funções teciduais. Contrastando com os fármacos, antibióticos ou vacinas, que podem ser usados indistintamente por um grande número de pacientes, a medicina regenerativa é individual, dirigida especificamente a cada um dos casos atendidos, no seu contexto particular. Trata-se, portanto, de uma medicina individualizada, cuja ação pode envolver várias etapas, independentes ou associadas:

- Introdução de células, hormônios ou fatores de crescimento, ou de estruturas supramoleculares semelhantes aos elementos de matriz extracelular e mediadores intercelulares associados (biomateriais), facilitando *in situ* a mobilização, expansão e integração de populações de células regenerativas internas, fomentando o reparo de lesões ou de regeneração e renovação de tecidos degenerados (terapias celulares e biomiméticas).
- Manipulação *ex vivo* de células do próprio paciente, sua expansão, diferenciação e integração potencial em estruturas ordenadas superiores, que serão re-introduzidas nas regiões lesadas e integradas no processo de regeneração (bioengenharia ou engenharia tecidual).

Ambos os processos se beneficiam dos grandes avanços da genômica, que geram potencialmente acesso às informações necessárias para definir o perfil do paciente, as necessidades de células envolvidas nos procedimentos planejados, e controlam a interação entre as células manipuladas, os tecidos internos e os elementos estruturais extracelulares. Os conhecimentos mais amplos da área de pós-genômica são a base conceptual dessa parte de medicina, requerendo uma extensão de conhecimentos genômicos para os das

Recebido em 20/12/2007

Aceito em 25/01/2008

Endereço para correspondência: Dr. Radovan Borojevic. Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências de Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Caixa Postal: 68021. 21941-970. Cidade Universitária, Ilha do Fundão. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel 21 2590 8736. Fax 21 2562 6483. Endereço eletrônico: radovan@histo.ufrj.br.

Gazeta Médica da Bahia

2008;78 (Suplemento 1):42-46.

© 2008 Gazeta Médica da Bahia. Todos os direitos reservados.

organizações celulares, das interações e de funções celulares no seu contexto tecidual, e da função das estruturas supracelulares. A complexidade do controle da expressão programada de conjuntos de genes do genoma, delineada em estudos pós-genômicos, torna essa tarefa particularmente árdua.

Células

Os elementos celulares são o ingrediente fundamental para as terapias celulares e a bioengenharia. O conceito de células tronco ou células progenitoras foi claramente definido desde o fim do século XIX, no contexto de regeneração tecidual. Organismos primitivos que possuem uma alta capacidade de regeneração serviram de modelos ricos para a compreensão dos processos morfogenéticos regenerativos (BEKKUM, 2004). A presença de células pluripotentes, com ampla capacidade de reconstituição de novos tecidos foi claramente definida nesses modelos. No fim do século XX, o conceito amplo de células tronco em animais superiores foi confirmado, e a sua aplicação em medicina regenerativa abriu novos caminhos de terapias celulares (BIANCO, P.; ROBEY, P.G., 2001; PRENTICE, 2006).

As células tronco embrionárias foram inicialmente isoladas e caracterizadas em roedores, estabelecidas *in vitro* e amplamente usadas em geração de linhagens de camundongos geneticamente modificados. Em 1998 foram estabelecidas primeiras linhagens de células tronco embrionárias humanas. Consideradas totipotentes (embora as células derivadas da massa central embrionária de blastocisto não possuam mais a capacidade de gerar trofoblasto e todas as estruturas extra-embrionárias como p.ex. a placenta), a possibilidade de gerar todos os tecidos de um organismo humano levantou esperança de terapias celulares ilimitadas. Amplos investimentos foram dedicados ao desenvolvimento tecnológico dessas terapias. Atualmente, seu uso em terapia de doenças genéticas é considerado promissor mesmo sendo distante, já que neste caso todas as células autólogas do paciente são portadoras do defeito inscrito no genoma e, entre as células alogênicas, as células tronco embrionárias são as mais promissoras. Em terapias de degeneração e trauma o seu uso está ainda limitado. Todos os modelos experimentais atestam a dificuldade de controlar a grande capacidade de proliferação e diferenciação dessas células, e o aparecimento de teratocarcinomas foi relatado com a frequência incompatível com seu uso amplo em terapias humanas. A falta de previsibilidade da sua evolução pós-terapêutica gera questionamentos éticos para aplicações médicas (BISHOP, A.E.; BUTTERY, L.D.K.; POLAK, J.M., 2002; PERA, M.F.; TROUNSON, A.O., 2004; VOGEL, 2005).

As células tronco adultas (incluindo as células derivadas de fetos em formação e as coletadas de estruturas extra-embrionárias no momento do parto) são atualmente objeto de amplos estudos. Seu uso terapêutico se baseia em décadas de experiência clínica em dois cenários. O transplante de

alogenéico e autólogo de medula óssea em hemoterapia é fundamentalmente um transplante de células tronco hematopoiéticas. Por outro lado, o uso amplo de transplante de osso e de tecido medular autólogos em ortopedia é fundamentalmente um uso de células tronco mesenquimais da medula em reparo de lesões dos tecidos do esqueleto. Ambas as aplicações remetem à presença de pelo menos dois tipos de células tronco na medula óssea adulta, que cooperam na manutenção da capacidade produtora e regenerativa das múltiplas linhagens celulares, essencialmente de origem mesodermal.

Além da sua permanência na medula óssea, as células tronco medulares têm a capacidade de circular pelo organismo, no nível basal baixo e permanente. Em resposta às agressões e lesões agudas, as vias de sinalização sistêmica, comandadas essencialmente pelos eixos de quimiocina SDF1-CXCR e de várias citocinas, induzem a entrada de células tronco na circulação. Elas identificam, pelo contato físico com a superfície endotelial, os tecidos envolvidos com a resposta inflamatória à agressão, migram dos vasos para o espaço tecidual e promovem o processo regenerativo (PALUMBO, R.; BIANCHI, M.E., 2004). Se a regeneração for eficiente, a volta à normalidade restitui o nível basal da circulação de células tronco medulares. Essa circulação já indica o envolvimento da árvore vascular na eficiência de regeneração mediada pelas células tronco. Além de permitir a distribuição sistêmica de células tronco medulares, a árvore vascular possui o seu próprio nicho perivascular que garante a manutenção permanente de células tronco mesenquimais (SILVAMEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDIN, B., 2006).

As células tronco circulantes e as células tronco perivascularares são, portanto, presentes em todos os tecidos vascularizados. Esse fato chama os seguintes comentários. Múltiplos estudos detectaram em vários tecidos a presença de células tronco residentes, capazes de “transdiferenciação” em outros tipos celulares quando adequadamente manipuladas. Em muitos senão em maioria dos casos trata-se de células tronco hematopoiéticas ou mesenquimais associadas à árvore vascular. As células mesenquimais podem ser isoladas e expandidas, com uma facilidade particular no caso de tecidos ricamente vascularizados e de estrutura maleável, como é o caso do tecido adiposo. Até que ponto essas células são equivalentes às células tronco mesenquimais da medula óssea permanece ainda uma questão aberta, mas evidências experimentais mostram que ambas podem ser amplamente usadas em terapias celulares (BAPTISTA, 2007).

A circulação de células tronco é relevante durante o desenvolvimento embrionário, quando permite a redistribuição de células progenitoras ao longo da formação de órgãos. Notadamente, o sistema hematopoiético e suas células tronco se deslocam da região aorta-gonada-mesonefron para o fígado fetal e placenta, alojando-se finalmente na medula óssea. A migração é intensa no período do parto, no qual são redistribuídas as funções respiratória, digestiva e circulatória.

No parto, uma fração do sangue circulante fica retida na placenta, e pode ser colhida pela punção do cordão umbilical. As células tronco obtidas dessa rica fonte podem ser purificadas e criopreservadas. A sua utilização em transplante autólogo e alogênico é factível, e essa fonte de células tronco jovens representa um potencial terapêutico relevante (VEN, 2007). Da mesma maneira, as células perivasculares podem ser purificadas da placenta e da geléia de Wharton, a bainha conjuntiva do próprio cordão umbilical, representando uma fonte interessante de células tronco mesenquimais (CAN, A.; KARAHUSEYINOGLU, S., 2007).

Os tecidos epiteliais, tanto de origem ectodérmica quanto endodérmica, e os derivados desses folhetos embrionários, possuem sistemas próprios de células tronco. Elas mantêm a sua renovação contínua, conseqüente ao desgaste da interface com meios externos. Seu nicho é geralmente associado com a membrana basal da interface com tecidos subjacentes. Uma hierarquia complexa define uma população celular menor de replicação muito lenta, que representa a reserva tecidual de progenitores com capacidade regenerativa alta, e que mostra a capacidade de gerar *in vitro* os holoclones de longa e ampla capacidade proliferativa e diferenciativa. Distanciando-se dos nichos, as células tronco de transição proliferam intensamente, geram a massa celular e perdem a amplitude de suas capacidades, gerando *in vitro* os meroclones e teloclones (PELLEGRINI, 1999). Os nichos de células tronco-epiteliais são bem delimitados, providos de uma matriz extracelular informativa, e abrigam geralmente um número muito pequeno de progenitores – não mais de quatro células no caso dos nichos de epitélio intestinal adjacentes às criptas de Lieberkühn (YEN, T.H.; WRIGHT, N.A., 2006).

A transição epitélio-mesenquimal ocorre regularmente no desenvolvimento embrionário e em certas situações patológicas. Ela é relevante na formação de vasos, gerando todas as células ecto-mesenquimais derivadas da crista neural de origem ectodérmica, incluindo células perivasculares em vários tecidos, assim como todas as células da vasculatura coronariana, incluindo as células tronco associadas, derivadas do proepicárdio de origem endodérmica (WESSELS, S.A.; PÉREZ-POMARES, J.M., 2004). As transições posteriores são *a priori* possíveis, tanto no sentido epitélio-mesenquimal quanto mesenquimo-epitelial. Esta última possibilidade é relevante para a potencial geração de células epiteliais glandulares, cujas células tronco podem ser de difícil acesso, como é o caso das Ilhotas de Langerhans. A possibilidade de obter as células secretoras a partir de uma fonte rica e de fácil acesso, como as células tronco mesenquimais, está estimulando numerosas pesquisas.

A utilização de células tronco adultas autólogas atualmente ultrapassou a utilização consagrada de transplante de medula óssea. Estudos clínicos, desde a fase I até a fase III, já estão sendo realizados, em procedimentos de regeneração da vascularização em patologias isquêmicas, reparo do tecido músculo-esquelético, conjuntivo, cutâneo, entre outros. Como já indicado, uma grande parte destas terapias dirige-se aos

pacientes idosos, vítimas de processos degenerativos associados à senectude ou às doenças degenerativas. Podemos questionar até que ponto as células tronco autólogas de um paciente idoso guardam a capacidade de regeneração, já que a erosão dos telômeros atinge todas as células e a lei de Hayflick nos ensina que a capacidade proliferativa de células se esgota com tempo e com a ampliação de células cultivadas *in vitro* (HAYFLICK, 1998). Duas linhas de estudos recentes podem responder a essa questão. As telomerasas que podem prevenir a erosão dos telômeros são ativas em células embrionárias, desativadas ao longo da diferenciação tecidual, mas podem ser reativadas, como ocorre em neoplasias cujas células são imortais. No transplante de medula óssea, o número de células tronco transplantadas após uma mieloablação radical é muito inferior ao normal. Para repor a cinética da hematopoiese e mantê-la para o resto da vida, o organismo pode transitoriamente reativar a telomerase em células tronco hematopoiéticas normais, até atingir o número e o estado equivalente ao normal de células plenamente capacitadas para uma proliferação longa e intensa. *A priori*, o mesmo pode ocorrer na participação de células tronco medulares nos processos de regeneração, na presença de uma demanda regenerativa intensa. Estudos atuais procuram estabelecer protocolos de ativação temporária da telomerase em células cultivadas *in vitro*, para ampliar esta capacidade natural de células tronco (KOBUNE, 2005; PETERSEN, T.; NIKLASON, L., 2007). Por outro lado, a característica de células tronco progenitoras teciduais é a sua proliferação lenta *in situ* com uma erosão dos telômeros menor do que no resto dos tecidos. Ela gera assim a sua reserva ampla de células com alta capacidade de proliferação e diferenciação durante a ampliação *in vitro* e *in vivo*, como mostrado em cultivo de holoclones.

Em conclusão, não devemos negligenciar a relevância dos estudos sobre as células tronco embrionárias. Entretanto, no momento atual, o uso de células tronco adultas autólogas mostra a vantagem da ausência de problemas de rejeição do implante, de segurança de uso e de previsibilidade de êxito terapêutico. Protocolos experimentais, pré-clínicos e clínicos mostraram amplamente a exequibilidade das terapias usando implante de células autólogas, ausência de eventos adversos, e resultados clínicos muitas vezes surpreendentes e duradouros de reparo e regeneração de processos degenerativos e lesões traumáticas (DOHMANN, 2007; MAO, 2006).

Mediadores de Crescimento e de Diferenciação Celular

A homeostasia celular em tecidos é garantida pelo equilíbrio entre a proliferação, diferenciação e apoptose. Esses fenômenos são garantidos pela sinalização parácrina, autócrina ou mediada pelos contatos intercelulares. Em processos degenerativos, o saldo global de celularidade é negativo, resultando em perda de volume e de função tecidual. Correções da sinalização podem ser necessárias, assim como a reposição exógena de uma reserva celular. Em trauma, a perda

física de tecidos gera uma sinalização de reparo intensa. O aporte de células e de estruturas tridimensionais de reposição geradas pela bioengenharia pode ser suficientemente estimulado na sua integração tecidual pelos mediadores internos. Entretanto, ela pode depender criticamente do tempo. A vascularização rápida dos implantes que deve prevenir a necrose, e a integração física e funcional do implante podem requerer estímulos adicionais.

Um grupo de mediadores celulares humano está disponível na forma recombinante, e eles podem ser usados como adjuvante em terapias celulares. Os cuidados devem incluir a sua difusão potencial pela circulação dos líquidos biológicos. Um dos exemplos são as proteínas morfogenéticas do osso (*bone morphogenetic proteins* – BMPs) cujo uso em estimulação da regeneração óssea é relevante. Essas proteínas possuem *in vivo* uma estabilidade longa, e após a difusão para a circulação sanguínea podem permanecer ativos durante semanas. A consequência será a calcificação ectópica dos vasos com deterioração funcional grave. Em muitos casos, a associação com as moléculas da matriz extracelular pode reter os fatores de crescimento em sítios previstos, evitando esse tipo de problemas.

Uma das alternativas à administração de fatores de crescimento é a introdução das construções gênicas que codificam a sua síntese *in situ*. No caso de construções plasmidiais (*naked DNA*), a degradação dos vetores livres é rápida, eliminando o perigo da sua difusão sistêmica. Quando integrados dentro de células, eles promovem a síntese local de proteínas sinalizadoras, podendo atingir concentrações locais altas. Entretanto, a atividade sintética é curta (geralmente atingindo o máximo em 24-48 h, e voltando aos níveis basais em 7 dias). Esse fato permite um controle rígido da atividade estimuladora no tempo, evitando crescimento celular exagerado e prolongado (CARVALHO, 2007). Os mesmos vetores podem ser encaminhados aos alvos teciduais específicos através das nanopartículas seletivamente dirigidas para os ligantes teciduais, tornando o método extremamente específico e operacional (KOFRON, M.D.; LI, X.; LAURENCIN, C.T., 2004).

Biomateriais

Os biomateriais são usados em engenharia tecidual, em associação ou não com as células. Quando implantados devem guiar e sustentar os processos regenerativos. A bioengenharia visa produzir estruturas capazes de substituírem tecidos ou órgãos que perderam a sua estrutura e/ou função. Os materiais usados neste processo devem providenciar uma estrutura que garantirá a função e a integração do implante no organismo receptor, a sua interação com as células do leito tecidual e, idealmente, a sua substituição progressiva pelo tecido endógeno neoformado.

Nos tecidos de sustentação, as propriedades mecânicas dos biomateriais são fundamentais, e os materiais não celularizados como implantes metálicos são aceitáveis. Os

materiais cuja interface com tecidos vivos será mais próxima à natural, como as biocerâmicas, terão preferência, pois podem induzir a neoformação do osso ou dentina e a integração plena em estruturas endógenas. A velocidade da sua integração pode ser controlada pelas propriedades químicas e pela qualidade nano-estrutural da sua superfície que determina a sua interação com as células. Os biomateriais ideais devem ser osteocondutores e osteoindutores. A primeira propriedade permite a interação com osteoblastos e células envolvidas na integração do implante, como os vasos sanguíneos. A segunda induz a ativação da osteogênese, com a neoformação do tecido ósseo (DERUBEIS, A.R.; CANCEDDA, R., 2004).

Nos tecidos moles (conjuntivo) e contráteis (músculos), os biomateriais devem garantir e promover a ordem espacial da regeneração celular, e a sua função será necessariamente temporária. De mesmo, a reconstrução dos vasos ou de estruturas dos sistemas respiratório, digestório, genito-urinário, secretor e cutâneo deve garantir a separação física do meio interno estruturado dos meios líquidos ou gasosos. A continuidade física da cobertura superficial garantida pelo biomaterial deve ser associada com a seletividade da permeabilidade molecular dessas interfaces biológicas, para a qual a presença da camada celular reconstituída dentro de um tempo operacional é absolutamente necessária.

Nos sistemas de função complexa, como o nervoso, sensorial e cognitivo, a função essencial dos biomateriais é a proteção do espaço e a facilitação da regeneração celular, já que as suas funções são essencialmente dependentes das interações celulares (YARLAGADDA, P.K.; CHANDRASEKHARAN, M.; SHYAN, J.Y., 2005).

Os biomateriais podem ser de dois tipos:

- Materiais de sustentação ou preenchimento não integráveis nos tecidos vivos: implantes metálicos, plásticos não-degradáveis, derivados de silicone e similares para cirurgia plástica.
- Materiais integráveis mineralizados: biocerâmicas, materiais ósteo-miméticos. Materiais integráveis moles e elásticos: polímeros de carboidratos, proteínas estruturais, biomateriais condro-miméticos.

A eficiência de ambos os tipos depende do estabelecimento das interações célula-célula e célula-matriz que ocorrem em escala nanométrica. As nano-estruturas são informativas e determinam o comportamento celular. Os biomateriais usados em bioengenharia devem, portanto, possuir a nano-estrutura biomimética ou indutora da resposta célula desejada. O conhecimento e desenvolvimento de materiais nano-estruturados é atualmente o grande desafio da biotecnologia aplicada à medicina. Como as interações entre as células e os substratos ocorrem na escala nanométrica, o conhecimento e a capacidade de manipular os biomateriais nessa escala podem permitir a melhoria ou o desenvolvimento de novas propostas (VENUGOPAL, J.; RAMAKRISHNA, S., 2005). Uma das dificuldades é o parco conhecimento que temos da nanotoxicologia e dos efeitos potencialmente adversos dos biomateriais nano-estruturados (CURTIS, 2006). Uma das

possibilidades é o estudo e profundo conhecimento de matrizes nanoestruturadas biógenas, obtidas de tecidos vivos, que podem servir de exemplo para aperfeiçoar os biomateriais sintéticos com propriedades biomiméticas.

Em conclusão, as terapias celulares, a bioengenharia e a ciência de biomateriais são novas áreas, repletas de promessas e de desafios. Pelo caráter multidisciplinar do desafio, somente a cooperação entre as ciências biológicas básicas, ciências exatas e clínica médica poderão trazer propostas que servirão para melhorar a qualidade de vida e adequar o custo social da medicina às realidades do novo milênio.

Referências

1. BAPTISTA, L.S. *et al.* Bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: how close are they? *J Stem Cells*, 2: 73-90, 2007.
2. BEKKUM, D.W. Phylogenetic aspects of tissue regeneration: role of stem cells. A concise overview. *Blood Cells Mol Dis*, 32: 11-16, 2004.
3. BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Stem cells in tissue engineering. *Nature*, 414: 118-121, 2001.
4. BISHOP, A.E.; BUTTERY, L.D.K.; POLAK, J.M. Embryonic stem cells. *J Pathol*, 197: 424-429, 2002.
5. CAN, A.; KARAHUSEYINOGLU, S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells*, 25: 2886-2895, 2007.
6. CARVALHO, L.P. *et al.* Hydrodynamics- and ultrasound-based transfection of heart with naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther*, 2007 Nov 20; [Epub ahead of print].
7. CURTIS, J. *et al.* Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians. *Toxicol Rev*, 25: 245-60, 2006.
8. DERUBEIS, A.R.; CANCEDDA, R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng*, 32: 160-165, 2004.
9. DOHMANN, H.F. *et al.* Bone-marrow mononuclear cell therapy of severe ischemic heart failure. *C R Biol*, 330: 543-549, 2007.
10. HAYFLICK, L. How and why we age. *Exp Gerontol*, 33:639-653, 1998.
11. KOBUNE, M. *et al.* Telomerized human bone marrow-derived cell clones maintain the phenotype of hematopoietic-supporting osteoblastic and myofibroblastic stromal cells after long-term culture. *Exp Hematol*, 33: 1544-1553, 2005.
12. KOFRON, M.D.; LI, X.; LAURENCIN, C.T. Protein- and gene-based tissue engineering in bone repair. *Curr Opin Biotechnol*, 15: 399-405, 2004.
13. MAO, J.J. *et al.* Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res*, 85: 966-79, 2006.
14. PALUMBO, R.; BIANCHI, M.E. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochem Pharmacol*, 68: 1165-1170, 2004.
15. PELLEGRINI, G. *et al.* The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. *Transplantation*, 68: 868-79, 1999.
16. PERA, M.F.; TROUNSON, A.O. Human embryonic stem cells: prospects for development. *Development*, 131: 5515-5525, 2004.
17. PETERSEN, T.; NIKLASON, L. Cellular lifespan and regenerative medicine. *Biomaterials*, 28: 3751-3756, 2007.
18. PRENTICE, D.A. Current science of regenerative medicine with stem cells. *J Invest Med*, 54: 33-37, 2006.
19. SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 119: 2204-13, 2006.
20. VEN, C. *et al.* The potential of umbilical cord blood multipotent stem cells for nonhematopoietic tissue and cell regeneration. *Exp Hematol*, 35: 1753-1765, 2007.
21. VENUGOPAL, J.; RAMAKRISHNA, S. Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. *Appl Biochem Biotechnol*, 125: 147-58, 2005.
22. VOGEL, G. Ready or not. Human ES cells head toward the clinic. *Science*, 308: 1534-1538, 2005.
23. WESSELS, S.A.; PÉREZ-POMARES, J.M. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat Rec*, 276A: 43-57, 2004.
24. YARLAGADDA, P.K.; CHANDRASEKHARAN, M.; SHYAN, J.Y. Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Biomed Mater Eng*, 15: 159-177, 2005.
25. YEN, T.H.; WRIGHT, N.A. The gastrointestinal tract stem cell niche. *Stem Cell Rev*, 2: 203-312, 2006.