



**Bruno Daniel Teixeira
da Costa**

**Terapia Intraoperatória com Células Estaminais:
Tradução e Glossário**



**Bruno Daniel Teixeira
da Costa**

**Terapia Intraoperatória com Células Estaminais:
Tradução e Glossário**

Projeto apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tradução Especializada, realizado sob a orientação científica do Prof. Doutor Reinaldo Francisco Silva, Professor Auxiliar do Departamento de Línguas e Culturas da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha família e amigos pelo apoio constante.

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria Teresa Murcho Alegre
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Anabela Valente Simões
Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Águeda, Universidade de Aveiro (arguente)

Prof. Doutor Reinaldo Francisco Silva
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro (orientador).

agradecimentos

Agradeço ao Prof. Doutor Reinaldo Francisco Silva, meu orientador, pelo apoio e revisões ao meu trabalho ao longo da elaboração deste projeto.

Agradeço aos meus pais e amigos o constante apoio e motivação que me deram.

palavras-chave

Célula estaminal, terapia intraoperatória, glossário, tradução

resumo

Inserido no âmbito do Mestrado em Tradução Especializada, o presente projeto consiste na tradução e criação de um glossário, bem como na análise crítica de todo este processo, e representa o culminar de mais uma etapa. As células estaminais e o seu potencial regenerativo estão cada vez mais na ordem do dia; de tal modo que têm vindo a surgir cada vez mais possibilidades de terapias e cada vez com melhores resultados clínicos. O texto aqui trabalhado resume-nos algumas dessas terapias, algumas das suas possíveis aplicações, e abre a porta a novas investigações que desenvolvam ainda mais o campo num futuro próximo.

keywords

Stem cell, intraoperative therapy, glossary, translation

abstract

For the purpose of fulfilling the requirements of the Master's Degree in Specialized Translation, the following project consists of a translation and a glossary, as well as a critical analysis of the translation process, thus representing the end of another stage.

More than ever, stem cells and their regenerative potential are gaining greater importance and the increase in a number of new therapies with positive clinical outcomes are clearly a substantiation of this trend.

The text hereby analysed in a meticulous manner summarises some of these therapies, and points to some of the possible clinical applications while leaving the possibility for further research that can develop this field even more in the near future.

Índice

1. Introdução.....	2
2. Enquadramento	7
3. As terapias com células estaminais	12
4. Recursos Utilizados	18
5. Análise textual.....	27
6. Dificuldades de tradução.....	33
7. Glossário.....	44
8. Conclusão	58
9. Bibliografia	61
10. Anexos	67
10.1 Tradução.....	69
10.2 Texto Original.....	98

1. Introdução

O presente projeto, elaborado no âmbito do Mestrado em Tradução Especializada, surge como um meio de aplicação, e porque não de revisão e recapitulação, de todas as técnicas e ferramentas adquiridas ao longo dos cinco anos de curso que compreendem a Licenciatura e o Mestrado, até esta data.

Representa por isso, o fim de uma etapa e, por consequência, o início de uma nova, que se quer iniciar no mundo do trabalho.

Sendo a área de especialização do Mestrado a saúde e as ciências da vida, foi feito um esforço para que o projeto, e obviamente a tradução, estivessem relacionados com esta temática. Apesar do Mestrado, referi, se focar na área da saúde e da ciência, e de ter trabalhado numa grande variedade de temáticas relacionados com essa mesma área, reparei não termos trabalhado no campo das células estaminais; pelo menos não a um nível tão aprofundado e específico, como veio a revelar-se o texto escolhido para tradução e análise. Por essa razão, e porque a nível pessoal me agrada bastante o tema, recaiu sobre ele a minha escolha. Depois de escolhido o tema, resolvi fazer uma pesquisa sobre esse campo. Como se sabe, a ciência tem evoluído a um ritmo bastante acelerado, e todos os dias ouvimos notícias de mais e mais avanços feitos e de conquistas alcançadas, e o campo das células estaminais não é exceção. É bem sabido o potencial deste tipo de células, que com a sua capacidade de se diferenciar e dar origem a novos tecidos como ossos, nervos, músculos ou sangue, por exemplo, representam o futuro das terapias no combate a doenças cardiovasculares ou neurodegenerativas, ou regeneração de tecidos. Foi exatamente sobre este tipo de aplicação das células estaminais que recaiu a escolha do texto a traduzir. Trata-se de um artigo, que se centra na revisão dos principais desenvolvimentos feitos nas abordagens intraoperatórias com células estaminais, e a discussão dos potenciais mecanismos por detrás do processo regenerativo.

O presente trabalho tem como base a tradução do inglês para o português de um artigo com um total de 27 páginas. O artigo, mais concretamente uma análise, intitula-se "*Intraoperative Stem Cell Therapy*", e é da autoria de Mónica Beato Coelho, Joaquim M.S. Cabral e Jeffrey M. Karp. O texto foi retirado da *Annual Reviews*, editora responsável pela publicação de mais de 40 revistas científicas, que abordam campos tão diversos como a

bioquímica, a medicina, a psicologia, a sociologia, a neurociência, etc. e pretendem manter a comunidade científica atualizada acerca das últimas pesquisas e avanços dentro dos diversos campos anteriormente mencionados. São, por isso, revistas altamente especializadas e o texto escolhido para tradução apresenta também essas características. Foi no entanto propositadamente escolhido devido às suas características, porque não só preenchia o requisito anteriormente estabelecido de trabalhar numa área relacionada com o meio científico, como por também representar um enorme desafio enquanto tradutor, devido à sua enorme especificidade e densidade terminológica.

O presente projeto tem como objetivo a reflexão acerca do que foi o processo de tradução, desde a escolha do tema e artigo a traduzir, até à elaboração de um glossário. Todos estes passos serão descritos, dando exemplos quando necessário.

Está por isso subdividido em diferentes capítulos, que abordarão qual o enquadramento do projeto, qual o domínio do texto de partida, quais foram os recursos utilizados (no processo de tradução e pós-tradução), a análise do texto de partida, as principais dificuldades de tradução, assim como o processo de construção de um glossário.

No primeiro capítulo, de enquadramento, pretende-se dar a conhecer as principais razões que levaram à escolha do artigo trabalhado e qual a utilidade da sua tradução para o português.

Como o artigo aborda um tema extremamente específico, no segundo capítulo tenta-se também dar mais ênfase sobre o que se trata e qual é, no fundo, o seu objetivo.

No terceiro capítulo pretende-se também demonstrar como foram utilizadas as diferentes estratégias de tradução e como foram empregues as diferentes ferramentas adquiridas ao longo do tempo no que diz respeito, não só à resolução de problemas de tradução e à tradução em si, como também aquelas que ajudam a dar um aspeto o mais parecido ao original possível. Entre as mais importantes é de destacar o programa de OCR Omnipage, utilizado para converter o ficheiro original que se encontrava em formato PDF, num formato de texto editável para a posterior tradução. É ainda de referir a ferramenta CAT utilizada durante a tradução, o memoQ.

O quarto capítulo é dedicado à caracterização do texto de partida, fazendo-se inicialmente uma breve descrição do mesmo, e passando-se de seguida para a análise da sua macro e microestrutura.

No capítulo seguinte serão expostas as principais dificuldades de tradução encontradas ao longo do processo, bem como as soluções encontradas para as ultrapassar. Por último, o glossário, precedido pela explicação da sua elaboração e utilidade durante o processo de tradução.

Por fim, é apresentado no Apêndice o objeto de análise deste projeto, a tradução para o português do texto escolhido. Quanto ao texto original, é apresentado em Anexo.

2. Enquadramento

O presente capítulo pretende justificar, de certo modo, a escolha feita em relação ao texto traduzido no projeto em detrimento de um outro qualquer de uma outra temática.

No enquadramento do projeto final do Mestrado em Tradução Especializada, fomos dada a possibilidade de escolher um qualquer tema para tradução. Como o Mestrado se centra na temática da saúde e ciências da vida, o primeiro objetivo passou por encontrar um texto que se encaixasse nessa temática. De modo a reduzir o conjunto de opções, devido à grande variedade de temas que poderiam ser escolhidos dentro deste tema, procurou-se encontrar outros tópicos de seleção. Um deles foi o gosto pessoal pela área. Era fundamental para um projeto desta envergadura, que o texto escolhido despertasse um constante interesse e motivação da parte do tradutor. Por essa razão, e porque ultimamente têm vindo a aparecer campanhas televisivas, e não só, que anunciam, de forma mais ou menos ética, a colheita de células do cordão umbilical, para eventual utilização num futuro tratamento. Recorde-se a notícia desenvolvida no artigo do jornal Público com o título “O novo anúncio da Crioestaminal promove a culpa ou uma causa?”, escrito por Graça Barbosa Ribeiro. Este artigo relata o extremar de posições em relação a este mesmo anúncio. De um lado, o presidente do Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida (CNECV), Miguel Oliveira da Silva, classifica-o como “uma pouca-vergonha”. Uma opinião diferente apresenta o administrador da Crioestaminal, André Gomes, que diz que, “pelo contrário, o anúncio faz parte de uma campanha por uma causa”. Ora este tipo de células, as chamadas células estaminais, têm vindo a ser estudadas nos últimos anos devido ao seu enorme potencial para se transformarem noutras células e tecidos do corpo humano, reparando-os ou mesmo até substituindo-os. Tendo todos os elementos que me permitiam fazer a escolha, passei à fase de pesquisa. Como já conhecia a editora *Annual Reviews*, por já ter tido anteriormente de passar pelo mesmo processo de seleção de um texto a traduzir, decidi começar por aqui mesmo e introduzir algumas palavras-chave em inglês, visto ter sido esta a língua de partida escolhida. “*Stem cell therapy*” foram as palavras que me ajudaram a encontrar o texto que preenchia os requisitos previamente propostos. Isto a juntar ao facto de se tratar de um artigo recente, datado de agosto de 2012; sabe-se que a atualidade é um fator

importante a ter em conta na escolha deste tipo de texto, dado o ritmo a que este campo evolui. O texto escolhido intitula-se “Intraoperative Stem Cell Therapy”, e resume os últimos e mais importantes avanços feitos no campo dos tratamentos e terapias com células estaminais. Trata-se de um texto bastante denso e complexo a nível terminológico e linguístico, o que representou um enorme desafio na tarefa de tradução, tema que abordarei em detalhe mais à frente.

Enquanto tradutor, tive de fazer a pergunta a mim mesmo: porquê traduzir este texto para o português? Haverá alguma utilidade neste processo?

É sabido que hoje em dia a maioria das publicações científicas são redigidas na língua inglesa, mesmo por parte da comunidade científica que não tem o Inglês como sua língua materna. Esta realidade deve-se ao facto desta língua se ter tornado nos últimos anos a língua franca em várias áreas, e o campo científico não foi exceção. Contudo, como nos mostra Gouadec, o segmento de mercado da tradução científica é muitas vezes negligenciado:

This is generally a neglected segment of the translation markets. With notable exceptions, scientists tend to have little time and money for translation and are often loathe to admitting that they cannot write properly in English (which is what scientific translation is about). So they do it themselves – often having their papers turned down as ‘poor English’ – instead of having a qualified translator do it properly. (Gouadec, 2007: 32)

Como se pode depreender das palavras de Gouadec, a tradução científica é ainda um setor de mercado pouco explorado. Atendendo a este facto, a tradução deste documento para a língua portuguesa ganha ainda mais importância e relevância uma vez que permite o acesso, por parte do público, a uma publicação que de outro modo estaria apenas em inglês. O público a que me refiro são, antes de mais, as pessoas ligadas ao mundo da ciência e investigação e estudantes. Ainda mais relevante se torna, então, traduzir este documento devido à crescente importância que o campo das Células estaminais tem vindo a ganhar nos últimos anos. Porém, o artigo em português poderia também ser lido por um público menos especializado, mas que ainda assim tenha entre os seus interesses este tipo de matéria. Importa referir, no entanto, que apesar de

quebrada a barreira linguística para este público mais geral, outra surgiria na forma de terminologia e vocabulário muito específico.

Por isso, a apresentação à comunidade científica de um determinado avanço científico será então feita em inglês, para que todos tenham acesso a ele de igual modo, e em iguais condições. Contudo, será sempre melhor a existência a “nível interno” uma versão traduzida para a comunidade científica portuguesa, e estudantes, na sua língua materna, uma vez que a familiaridade com a língua vai ser incomparavelmente maior deste modo. O inglês servirá então para apresentar melhor a investigação à comunidade estrangeira, mas internamente e para o uso corrente em Portugal, por parte da comunidade científica e até mesmo académica, será melhor ter o artigo na língua materna.

Foi este, de modo geral, o conjunto de fatores que me ajudou a optar por traduzir o texto escolhido. Um misto de razões pessoais, o gosto pessoal pela área tratada, razões académicas, o facto de o Mestrado em Tradução ter a sua especialização no campo da saúde e ciências da vida, a atualidade do tema tratado e, por fim, a sua extrema relevância.

3. As terapias com células estaminais

O texto trabalhado é de caráter científico, mais propriamente uma revisão; a utilização do termo “revisão” prende-se com o facto de este ser uma síntese de várias pesquisas e artigos publicados por outros autores no campo das células estaminais, que são aí revistos e analisados por investigadores do mesmo campo, neste caso os autores mencionados.

Como aponta o site da *Annual Reviews*, “The critical review is an essential part of the scientific method.” Isto porque a revisão serve para isto mesmo, desencadear discussão e apontar falhas ou possíveis melhorias de uma determinada pesquisa ou método, com o intuito de levar ao aperfeiçoamento das mesmas e, em último caso, ao surgimento de novas pesquisas científicas. Ora a tradução deste texto para a língua portuguesa, e aqui volta a estar presente a questão da pertinência da tradução deste texto, será útil para que a comunidade científica portuguesa tenha também acesso a ele, na sua língua materna, o que facilitará muito mais a sua compreensão e possível participação no debate. Embora considere que o público-alvo deste texto em português poderá englobar os leitores menos especializados, mas que mesmo assim se interessam por estas questões, penso que neste caso será difícil para o comum dos leitores entender certos conceitos aqui apresentados.

Após uma pesquisa sobre o tema da medicina regenerativa, área que abrange a questão das terapias com células estaminais, pude reparar que se trata de uma área em grade expansão. Para além disso, é uma área promissora envolta numa enorme expectativa em relação àquilo que poderá trazer de benéfico para a cura de certas doenças ou condições para as quais não existe atualmente um tratamento, ou para travar as doenças degenerativas. Entre elas estão a Doença de Parkinson, enfartes do miocárdio, diabetes, lesões na medula espinal ou mesmo queimaduras graves. Ora, o que se tem vindo a descobrir ao longo deste últimos anos de investigação é que as células estaminais têm o poder de se diferenciar em diferentes tipos de células e formar novo tecido, podendo assim reparar ou regenerar o antigo, ou danificado.

A Doença de Parkinson é uma das que tem desencadeado mais estudos e ensaios clínicos para testar e comprovar o potencial das células estaminais. De entre os estudos desenvolvidos, encontra-se um de Olle Lindvall, Zaal Kokaia e Alberto Martinez-Serrano,

que demonstra ser possível recuperar a função de certas áreas do cérebro afetadas pela doença. Segundo se pode ler no seu artigo:

Studies in animal models have nevertheless demonstrated that neuronal replacement and partial reconstruction of damaged neuronal circuitry is possible. There is also evidence from clinical trials that cell replacement in the diseased human brain can lead to symptomatic relief. (Lindvall et al., 2004: 24)

Contudo, são ainda necessários estudos adicionais neste campo, nomeadamente ao nível do controlo da proliferação e diferenciação deste tipo de células, bem como do conhecimento de como estas se conseguirão integrar nos circuitos sinápticos estabelecidos, para este tipo de terapia ser eficaz.

O artigo trabalhado neste projeto aborda, no entanto, outro tipo de terapia também possível com as células estaminais, mas sempre com o mesmo objetivo: devolver estrutura e função aos tecidos e órgãos danificados.

O texto centra-se, numa primeira parte, no tema das células estaminais e no relato das abordagens intraoperatórias desenvolvidas para várias aplicações clínicas, descrevendo ainda procedimentos técnicos e resultados clínicos.

Começa por analisar o papel das células estaminais na osteogénese, ou seja, no processo de formação óssea. Neste capítulo são descritas as várias experiências feitas no campo para melhorar este processo como, por exemplo, a adição de fragmentos ósseos, uma população heterogénea de células e vários fatores de crescimento ao osso esponjoso, que tem vindo a verificar-se a estratégia que produz os melhores e mais previsíveis resultados clínicos na regeneração óssea. Segundo o texto, também se tem verificado que a injeção de células de medula óssea autóloga (colhida do próprio paciente) se tem revelado menos invasiva e tem produzido melhores resultados quando comparada com o autoenxerto ósseo. Estes estudos desencadearam outros no que diz respeito à concentração celular, uma vez que se tem verificado que a concentração celular resulta numa maior eficácia deste tipo de terapias. De seguida são descritos alguns dos processos utilizados para a concentração celular, como a centrifugação e a retenção celular seletiva.

Estes são alguns dos exemplos dados pelo texto no que diz respeito à osteogénese, que são resumidos mais à frente numa tabela.

Mais abaixo, é abordada a Osteocondrogénese, processo de formação de cartilagem. Aqui, são propostos dois procedimentos cirúrgicos. O primeiro, proposto por Giannini et al. envolve a colheita de medula óssea, a concentração da camada leucoplaquetária, ao mesmo tempo que os cirurgiões começam a artroplastia, que inclui o desbridamento da lesão, a preparação de compostos (misturando a camada leucoplaquetária com colagénio em pó, ou combinando-a com uma membrana de ácido hialurónico) e a sua aplicação, assim como a estabilização dos compostos utilizando um gel de fibrina autólogo rico em plaquetas. Este processo resultou em melhorias na função das articulações dos pacientes, no entanto, as conclusões que se poderiam ter tirado deste estudo foram limitadas devido ao curto período de acompanhamento e ao reduzido número de pacientes.

De seguida, o texto aborda o processo de angiogénese, ou seja, o processo de formação de novos vasos sanguíneos e como este pode ser melhorado, com a inclusão na terapia, de células estaminais. Para ilustrar os benefícios desta terapia, faz-se o relato de várias experiências feitas com sucesso. Entre elas a injeção intramuscular de células dada a pacientes com isquemia bilateral da perna com resultados positivos em vários parâmetros de avaliação como o índice tornozelo-braço (a proporção entre a pressão sanguínea no tornozelo e a pressão sanguínea no braço), dor em repouso, pressão do oxigénio transcutâneo, e ausência de dor em períodos de movimento, por exemplo.

A utilização de células estaminais em aplicações cardíacas também é considerada. É relatado que a injeção intramiocárdica ou intracoronária possibilita o aumento da angiogénese e da reparação do miocárdio após uma cirurgia de bypass coronário. Contudo, faz-se um apelo para que haja rigor e critério no momento da injeção, visto que dependendo do local onde são administradas as células estaminais, os resultados podem variar e o sucesso clínico dessa administração pode ser maior ou menor.

No capítulo seguinte são enumerados os potenciais mecanismos regenerativos subjacentes ao sucesso clínico que tem sido obtido com a administração de células estaminais: "(a) as células progenitoras ou estaminais dentro do transplante repõem as

células progenitoras no hospedeiro; (b) as células no transplante diferenciam-se e produzem tecido novo; (c) as células sobreviventes (ou a morrer) transplantadas segregam fatores tróficos, angiogénicos, ou imunomodulatórios que fornecem sinais às células locais endógenas via sinalização parácrina ou para células distantes através de mecanismos endócrinos (o que pode resultar na mobilização e instalação de células hospedeiras distantes).”

De seguida são enunciadas as fontes celulares mais utilizadas. Apesar da medula óssea estar em primeiro lugar como a fonte mais comum de células estaminais, pela facilidade de acesso, por exemplo, esta oferece algumas limitações. São exemplo disso a pouca quantidade de material que pode ser colhido de cada vez, para além de que a colheita da medula óssea representa um procedimento altamente invasivo.

Para contornar estas limitações e inconvenientes, têm vindo a surgir alternativas como o tecido adiposo, uma vez que possui o potencial de diferenciação em multilinhagens e pode ser colhido através de técnicas menos invasivas. Para além disso pode ser colhido em maiores quantidades que o anterior, e possui também uma maior capacidade de proliferação das células.

O texto também faz referência aos métodos utilizados hoje em dia para isolar e concentrar produtos celulares: retenção celular seletiva, a seleção de células de base imunológica, gradiente de densidade e processador automático de células. Todos eles estão listados numa tabela, em baixo, com a respetiva descrição. Entre estes, o mais comum é o de gradiente de densidade, que funciona através da centrifugação e resulta na separação de partículas que se agrupam em zonas de acordo com as diferenças entre massas.

4. Recursos Utilizados

Existe hoje em dia uma grande diversidade de recursos à disposição do tradutor para o ajudar a efetuar não só uma melhor tradução, no sentido da correção linguística e sintática, mas também de um produto final o mais semelhante possível com o original em termos de aspeto. Segundo Gouadec:

A good translation also requires the translator to be proficient in all the communication techniques involved. This means mastering a complex set of tools, techniques and media, including word processing, desktop-publishing software, translation memory management systems, search engines, computer-assisted translation (CAT) tools, text aligners, Web site design tools, Web editors, and many more. (Gouadec, 2007: 91)

Isto significa que o tradutor tem à sua disposição várias ferramentas para o ajudar no seu trabalho, mas tem ao mesmo tempo de se desdobrar numa ampla gama de tarefas, que estão longe de incluir “apenas” o processo de tradução propriamente dito. A imagem que se tinha da tradução, atividade extremamente solitária, onde o tradutor dependia quase exclusivamente dos seus dicionários está cada vez mais desatualizada.

Em resultado da Tradução, no sentido mais amplo da palavra, se estar cada vez mais a informatizar, o tradutor tem de adquirir uma série de competências ao nível das tecnologias da informação. O autor aponta cinco razões para esta situação: o crescente número de materiais disponíveis apenas em formato digital. Os materiais a traduzir e as suas traduções são trocados através da internet. As aplicações de computador ajudam o tradutor a executar um número considerável de tarefas, o que representa por sua vez ganhos em termos de produtividade e tempo. Finalmente, a tradução é uma parte integrante da indústria da comunicação, muito informatizada nos tempos que correm, obrigando a que o tradutor possua grandes conhecimentos neste campo.

Este capítulo pretende apresentar quais foram as ferramentas utilizadas ao longo do processo de tradução para conseguir este objetivo.

Em primeiro lugar, e porque se trata de um texto complexo a nível da sua terminologia foi importante seleccionar o tipo de recurso que me ajudasse a compreender melhor a linguagem utilizada. Nesse sentido, os dicionários (monolingues e bilingues) e os glossários *on-line* foram uma importante ajuda. Os dicionários foram uma importante

ferramenta, como veremos mais à frente no capítulo “Dificuldades de tradução”, uma vez que ajudaram o tradutor a escolher qual seria o melhor termo a utilizar num determinado contexto, uma vez que a mesma palavra pode adquirir diferentes significados consoante a forma como é empregue, por exemplo.

Os mais utilizados durante o processo de tradução foram:

www.priberam.pt ;

www.infopedia.pt (para além do dicionário de língua portuguesa, este site também possibilita a consulta de um dicionário de termos médicos, que se revelou bastante útil em algumas ocasiões);

www.dictionary.com/ ;

www.thefreedictionary.com ;

www.iate.europa.eu.

Uma outra importante ferramenta de pesquisa e confirmação terminológica foram os glossários. Entre os mais utilizados estão:

www.merriam-webster.com/medlineplus ;

www.cytothera.pt/pt/InformaçãoCientífica/Glossário ;

<http://future-health3.red-z-web.co.uk/sobreo-banco-de-celulasestaminais/termos>

; <http://www.bioteca.pt/glossario.asp>

<http://medicosdeportugal.saude.sapo.pt/glossario>.

No que diz respeito à pesquisa e confrontação de terminologia específica deste ramo científico, foram utilizados diversos textos paralelos, encontrados em repositórios de Universidades como a de Lisboa ou do Minho, por exemplo.

<http://repositorio.ul.pt> ;

<http://repositorium.sdum.uminho.pt>.

Aqui a pesquisa foi feita utilizando algumas palavras-chave, quer em inglês quer em português: “células estaminais”, “terapias com células estaminais”, “terapias intraoperatórias com células estaminais”, “células estaminais regeneração” ou “stem cell therapy”, “intraoperative stem cell therapy”, que produziram inúmeros resultados e que se revelaram ser de elevada utilidade. Este tipo de pesquisa permitiu-me também elaborar um corpus com textos paralelos, ou seja, textos do mesmo domínio do texto de partida, que me possibilitaram confrontar não só a terminologia encontrada nos dicionários, como verificar o tipo de linguagem/discurso utilizado neste tipo de texto, ou até mesmo clarificar algum conceito que não se tivesse conseguido encontrar nos dicionários ou glossários. Em relação a estes textos, importa ainda assinalar que uma vez que foram retirados destes repositórios, foram todos escritos por pessoas qualificadas dentro da mesma área do texto a traduzir, ou supervisionados por tais, o que atesta a sua validade e, acima de tudo, a sua fiabilidade. A este propósito, Lynne Bowker propõe uma abordagem para a avaliação da qualidade de uma tradução através da sua confrontação com um corpus:

A corpus-based approach to translation evaluation has the following characteristics. Firstly, it is based on the analysis of a comparatively large and carefully selected collection of naturally occurring texts that are stored in machine-readable form (i.e., a corpus). Secondly, because it analyses actual patterns of language use in the corpus, it is empirical and therefore objective. Thirdly, the corpus-based approach takes advantage of computational tools and methods for manipulating the corpus, arranging the data in ways that make it possible to spot items and patterns that would be difficult to identify in other types of resources. (Bowker, 2001)

No artigo citado, a questão da qualidade de uma tradução é então colocada por Bowker em termos da correção de discurso e uso da língua, quando comparados a textos escritos no mesmo domínio, por nativos dessa mesma língua. Textos escolhidos criteriosamente, como a própria refere, que após inseridos numa CAT tool (Bowker sugere, a título de exemplo, o software *WordSmith*) permitirão analisar os padrões da linguagem, e verificar quando e em que circunstâncias certos termos são utilizados. Esta ferramenta também se revela útil quando se pretende verificar de que modo uma determinada palavra é habitualmente utilizada, e em que contexto.

Esta questão da avaliação da qualidade de uma tradução é também abordada por Venuti, por um outro ponto de vista, que acaba por estar ligado ao conceito descrito por Bowker. Ou seja, tendo o tradutor conseguido efetuar, numa primeira fase, uma tradução que contém todas as características em termos de discurso e correção da língua, apoiado num corpus de trabalho bem elaborado e estruturado, vai conseguir, ou pelo menos aproximar-se do conceito de qualidade indicado por Venuti, o conceito da invisibilidade. Para este autor, uma tradução estará bem elaborada e será julgada como “aceitável” por publicadores, revisores e leitores se:

[...] it reads fluently, when the absence of any linguistic or stylistic peculiarities makes it seem transparent, giving the appearance that it reflects the foreign writer’s personality or intention or the essential meaning of the foreign text—the appearance, in other words, that the translation is not in fact a translation, but the “original.” (Venuti, 1995: 1)

ou ainda:

“A fluent translation is immediately recognizable and intelligible, “familiarised,” domesticated, not “disconcerting[ly]” foreign, capable of giving the reader unobstructed “access to great thoughts,” to what is “present in the original.” (Venuti, 1995: 5)

Para se conseguir esta ilusão de que se está a ler o original e não uma tradução, é necessário então que o tradutor consiga um discurso fluente, com o emprego da forma escrita corrente na língua de chegada. Segundo esta ideia, o tradutor não pode ser autor, ou seja, o foco tem de estar sempre em quem escreveu o texto, e não na pessoa que o traduziu. É por isso que é importante também que não haja, e esta tipologia de texto não dá azo a esse tipo de situações devido às suas características (abordadas em detalhe mais à frente), a que o tradutor dê o seu cunho pessoal à tradução. Aqui a sua função é, em primeiro lugar, transmitir a mensagem do texto sem qualquer interferência. Esta abordagem aproxima-se mais daquilo que Venuti define como “domestication”, em vez de “foreignisation”. Para explicar resumidamente o que implica cada uma destas abordagens respetivamente, este mostra-nos como a cultura do texto original tem de ser tida em conta, ficando a cargo do tradutor adaptá-la à cultura de chegada (trazer o texto ao leitor) ou, fazendo a língua de chegada adaptar-se ao texto original (levar o leitor ao

texto). Por outras palavras, com a estratégia da “domestication” o texto de partida é adaptado aos padrões linguísticos da cultura de chegada. Deste modo torná-lo-ia o mais parecido possível com um qualquer outro texto da mesma área, escrito nessa mesma cultura. Em último caso, não se notaria que tinha sido traduzido, o que num texto com estas características poderia ser considerado como positivo. Esta estratégia contrasta com outra defendida por Venuti no que toca aos textos de carácter literário. Desta feita, aplicar uma estratégia de “foreignisation” implicaria quebrar as convenções da cultura de chegada, para preservar o melhor possível os padrões da língua de partida. Neste caso, e por se tratar de um texto de carácter científico, onde não se observa uma grande carga cultural, penso que a estratégia da “domestication” se enquadra melhor. Isto porque o objetivo dos textos científicos é quase exclusivamente a passagem de conhecimento e informação, que se quer que seja feita da forma mais simples e direta possível, e obviamente, num discurso o mais familiar possível a quem o lê. Contudo, o conceito de “foreignisation” aplica-se melhor noutro tipo de textos onde existe uma maior carga cultural. Não faz sentido estes padrões culturais serem sacrificados em nome da fluência de leitura do destinatário. Isto acabaria por significar em último caso que haveria adulteração da mensagem original, e uma consequente perda de informação.

A internet e os motores de busca como o www.google.pt também foram úteis nesta fase de confrontação e confirmação de discurso e terminologia utilizada. Por exemplo, foram utilizados para procurar em textos do mesmo carácter textual, ou seja, textos científicos ou académicos e publicações semelhantes ao texto de partida, termos encontrados em dicionários ou glossários. Neste caso concreto a pesquisa foi restringida a páginas de Portugal. Isto ajudou, por exemplo, a excluir páginas de sites brasileiros, que apresentam, com acordo ortográfico ou não, especificidades diferentes daquelas das páginas escritas em português Europeu.

Uma outra ferramenta que se revelou bastante útil durante o processo de tradução, e que penso não se encaixar em nenhuma das categorias anteriormente mencionadas, foi o site <http://www.linguee.pt/>. Este site possibilita a pesquisa de determinados termos ou palavras-chave, que após uma pesquisa são apresentados em textos do mesmo meio, o que permite não só ver a pesquisa na língua de chegada, mas, e

penso que mais importante, vê-la em contexto. Como sempre, e em qualquer pesquisa, a confirmação de todos os termos e conceitos daqui retirados foram posteriormente confirmados em textos paralelos para me assegurar que estava a utilizar a terminologia adequada.

Para o processo de tradução propriamente dito, foi necessário selecionar uma ferramenta CAT, tendo a escolha recaído sobre o programa memoQ, da empresa Kilgray. Escolhi este programa por questões de familiaridade e experiência prática, uma vez que tem sido a ferramenta utilizada há já algum tempo, inclusive no estágio realizado no ano passado. Contudo, penso que a principal razão que me levou a optar por esta ferramenta em detrimento de qualquer outra no mercado foi a possibilidade que me foi dada de adquirir uma licença que me permite utilizar de forma totalmente gratuita o programa, até à conclusão do mestrado. Acabado esse período, existe a possibilidade de a adquirir por um preço que ronda os 100 euros, preço que para uma ferramenta desta qualidade, e indispensável para qualquer tradutor, me parece bastante razoável. De salientar ainda que a versão do programa que me foi dada através deste protocolo se trata da versão “Pro translator”, que me dá acesso a todas as funcionalidades e ferramentas incluídas neste programa. Estas funcionalidades incluem por exemplo, bases de dados terminológicas que podem ser criadas aquando do início de cada projeto ou importadas, e que podem ser editadas e enriquecidas ao longo da tradução, tudo dentro do ambiente de trabalho do memoQ. Isto evita, por exemplo, ter de trabalhar com um programa diferente para este efeito como acontece com o Trados, o que para mim representa uma grande vantagem, quer em termos de organização quer em poupança de tempo. Outra ferramenta também incluída no ambiente de trabalho do programa é a apresentação, numa janela, de sugestões dadas pela memória de tradução, quando se está perante uma frase semelhante a uma outra já traduzida anteriormente. Uma das características de que mais gosto no programa memoQ é a possibilidade que o tradutor tem de ver, em tempo real, a sua tradução e o aspeto final que esta terá após exportação, ainda dentro do ambiente de trabalho, na janela de pré-visualização. Tudo isto é facultado num só programa/ ambiente de trabalho, o que torna o processo de tradução muito mais fluido, prático e rápido, sem perder qualidade.

Finalmente, uma outra ferramenta bastante importante numa fase de pré-tradução foi o programa Omnipage. Trata-se de um programa de OCR (Optical Character Recognition), ou seja, permite a conversão de arquivos de imagens em texto editável. A versão profissional deste programa não é das mais acessíveis em termos monetários, por isso a que foi utilizada para trabalhar neste projeto foi a versão gratuita. Como o texto original se encontrava no formato PDF e continha várias tabelas e imagens, este programa foi útil para poder passar à sua edição e posterior tradução no memoQ. Esta fase pode ser um pouco demorada, porque há necessidade muitas vezes de se corrigir o OCR (ou seja, o reconhecimento de caracteres) feito pelo programa e de editar as tabelas contidas no texto, mas uma vez completo este processo, e tendo o ficheiro Word pronto a ser traduzido, este sairá do memoQ praticamente pronto, não sendo depois necessária muito mais edição para que este tome o aspeto do documento original.

Cada uma destas ferramentas contribuiu para que no final se tivesse conseguido uma melhor e mais rápida tradução e, de uma maneira geral, um melhor produto final, quer do ponto de vista visual quer textual.

5. Análise textual

Análise do texto de partida

Os textos não são todos iguais, têm características e detalhes específicos e, por isso, nem todos pertencem ao mesmo género. Esta é uma noção básica, recorda-nos Berkenkotter e Huckin, mas que é fundamental ter em conta na prática da tradução:

Because it is impossible for us to dwell in the social world without repertoires of typified social responses in recurrent situations – from greetings to thank yous to acceptance speeches and full-blown, written expositions of scientific or scholarly investigations - we use genres to package our speech and make of it a recognizable response to the exigencies of the situation. (Berkenkotter and Huckin 1995: 7)

Esta ideia demonstra a necessidade e a utilidade de se dividirem os géneros textuais em diferentes categorias. Cada género textual obedece normalmente a um tipo de estrutura convencional. Através desta divisão, e do conhecimento daquilo que são os padrões de cada género textual, será muito mais fácil identificar o tipo de texto que temos em mãos, ajudando-nos assim a adotar mais eficazmente o tipo de estratégia de tradução adequada a cada situação.

Este capítulo pretende definir, em primeiro lugar, a que género pertence o texto traduzido. Em seguida assinala quais das principais características inerentes a esse género foram possíveis de observar ao longo do mesmo.

O texto de partida, um artigo de revisão, ou seja, a apresentação de várias teorias ou experiências feitas, neste caso, com terapias com células estaminais, para posterior análise crítica e apresentando possíveis melhorias a implementar. Num sentido mais amplo, enquadra-se dentro da tipologia de texto científico. Também é comum a sugestão de investigação em determinadas áreas ainda não exploradas, com vista ao aperfeiçoamento destas mesmas teorias e processos. É este também o seu principal objetivo.

Este tipo de publicação, que somente aceita contribuições de cientistas, caracteriza-se então, e em primeiro lugar, por conter um tipo de linguagem objetiva, clara e precisa, tentando evitar ao máximo qualquer tipo de ambiguidade. Não existe, por isso,

o emprego de figuras de estilo que possam dar azo a esse tipo de situação como a metáfora, por exemplo. Relativamente à subjetividade, pode verificar-se ainda, que não existe o emprego de sinais de pontuação como: a exclamação, a interrogação ou mesmo as reticências. O texto, de carácter científico, evidencia ao longo do mesmo, as características inerentes a esta tipologia de texto. Há uma série de parâmetros, que delimitam a sua macroestrutura, ou seja, o seu aspeto mais gráfico. De seguida, irei especificar aqueles que pude encontrar no texto alvo da tradução.

A forma como a mancha de texto é apresentada, isto é, de forma corrida, podendo apresentar em alguns casos duas colunas lado a lado, embora neste caso isso não se verifique. É também bastante comum a utilização de elementos não-verbais como gráficos, esquemas, fotografias ou tabelas. Este tipo de elemento é utilizado sobretudo para clarificar certas informações dadas no decorrer do texto e muitas vezes fornecer informações, que seriam difíceis de transmitir de outro modo. A utilização de legendas, também é frequente, e é utilizada muitas vezes para complementar e acrescentar informação aos elementos anteriormente mencionados. A forma como este tipo de artigo costuma estar estruturado, em termos de apresentação da informação, também é bastante comum. Em primeiro lugar temos uma introdução, que pretende esclarecer o assunto que vai ser tratado ao longo do texto. De seguida são apresentadas as ideias dos autores, de forma desenvolvida (neste caso maioritariamente ideias e ensaios clínicos levados a cabo por outros investigadores), bem como os métodos utilizados para os alcançar. Por fim uma conclusão que resume as principais ideias tratadas anteriormente, bem como sugestões daquilo que podem ser as próximas investigações a serem realizadas para o aperfeiçoamento do campo em questão.

De seguida irei analisar o texto no que diz respeito à microestrutura, ou seja, a nível sintático e lexical.

A construção frásica é feita através de frases longas, e com grande carga informativa. A presença de um elevado número de terminologia acrescenta ainda mais complexidade às frases. O que nitidamente contrasta com aquilo que é tipicamente um texto de cariz informativo, onde, por regra, imperam as frases curtas e simples. Exigiu este facto uma grande atenção por parte do tradutor para tentar perceber e conseguir

imprimir o mesmo sentido das frases para a língua de chegada. Ainda em relação à construção frásica, e como já foi referido anteriormente, o tipo de frases encontradas ao longo do texto é predominantemente, ou mesmo até exclusivamente neste caso, do tipo declarativo, não existindo a utilização de outro tipo de frases como a interrogativa ou exclamativa.

Outra característica deste tipo de texto é a utilização regular da segunda pessoa do plural e da voz passiva. Isto deve-se ao facto do texto ter sido elaborado por um conjunto de investigadores e não se querer estar a individualizar ninguém no momento da apresentação dos resultados da investigação.

A nível lexical e quanto à terminologia utilizada, esta é bastante frequente e algo complexa, fazendo-se recorrer várias vezes de nomes de compostos (os chamados grupos nominais) e expressões específicas da área como “macroporous poly(L-lactide-cocaprolactone)”, e “porous natural type I/III collagen”, o que torna o texto bastante complexo aquando da sua tradução. Isto fica a dever-se como já foi referido anteriormente, a algum desconhecimento da área, o que levou a uma extensa pesquisa terminológica, que culminou na elaboração de um glossário.

Ainda em termos lexicais, a questão das siglas, bastante frequentes no texto, também tem de ser alvo de análise. Há alguma discussão acerca da pertinência ou não da sua tradução. Há quem defenda que se deve adaptar a sigla à tradução da palavra. Pessoalmente, penso que se deve optar pela opção que for mais comum encontrar-se na língua de chegada. Tomemos como exemplo a palavra “**ácido desoxirribonucleico**”, ADN. Nesta palavra, é igualmente frequente encontrar-se tanto a forma traduzida ADN, como o seu correspondente em inglês DNA. Noutros casos encontrados ao longo do texto, como por exemplo “**Platelet-derived growth factor**” (PDGF) que aparece com grande frequência ao longo do texto, optei por traduzir o seu significado para português, Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas, mantendo contudo a sigla em inglês – PDGF. A razão para a não tradução desta, e de outras siglas ao longo do texto, é exatamente a frequência com que aparecem na língua de chegada. Neste caso, depois de feita uma pesquisa no motor de busca Google.pt, praticamente não foi possível encontrar o seu equivalente em português, ou seja, FCDP, e uma vez que o público-alvo deste texto são

cientistas, que pelo que tive a oportunidade de ver, mesmo em publicações em português, utilizam na esmagadora maioria das vezes a sigla PDGF. Contudo, algumas siglas formadas ao longo do texto para expressões como “doença vascular periférica - DVP” e “células estaminais mesenquimais - CEM”, representam um caso semelhante ao do exemplo do ácido desoxirribonucleico que tanto podem ser encontradas na sua forma em inglês ou em português. Neste caso, porém, pode tornar-se mais fácil fazer a associação da palavra à sigla correspondente e perceber-se mais facilmente qual o conceito por de trás da sigla, se ambas estiverem em português.

Posso afirmar então, que os critérios pelos quais me regi para as escolhas que fiz se basearam na qualidade e quantidade. Ou seja, na validade e correção de um termo e na sua frequência de utilização.

Por apresentar estas características, pode concluir-se que este artigo não foi escrito para o comum dos leitores. Ou seja, na altura de apontar o seu público-alvo, penso que este texto foi escrito, em primeiro lugar, para um público especializado e com grande conhecimento acerca do tema abordado. Por isso, apontaria para especialistas da mesma área, ou seja, investigadores e cientistas como principal alvo deste artigo.

6. Dificuldades de tradução

Centrando-se este capítulo em assinalar as principais dificuldades de tradução encontradas ao longo do texto, é importante referir, em primeiro lugar e de um modo geral, quais foram as principais ferramentas utilizadas durante esse processo: dicionários bilingues, os glossários sobre o tema e os repositórios de algumas universidades, que permitiram confrontar a informação pesquisada com textos escritos por pessoas do mesmo campo. Mas analisarei mais concretamente acerca da sua importância, com exemplos, mais abaixo.

O campo onde se insere o texto de partida é bastante específico, ou seja, aborda um tema bastante particular e, por isso, com uma linguagem também ela bastante específica e característica. Havia por isso, à partida, e embora este se enquadre no âmbito da temática do Mestrado em Tradução Especializada, algum desconhecimento e, por isso, alguma dificuldade em lidar com a terminologia utilizada, por exemplo. A acrescentar a este facto, e devido a este ser um texto bastante recente, continha terminologia que não era facilmente encontrada com uma simples pesquisa num dicionário bilingue, por exemplo.

A nível de sintaxe, também encontrei algumas dificuldades, sobretudo a nível da existência de frases bastante longas e com uma elevada carga de informação e terminologia, o que dificultou muitas vezes a sua compreensão e tradução.

Por fim, o elevado número de siglas e nomes de compostos levou a alguma discussão acerca da pertinência e utilidade da sua tradução ou não, e a uma grande pesquisa para tentar encontrar o equivalente na língua de chegada.

De seguida serão apresentadas as principais dificuldades encontradas ao longo do processo de tradução, acompanhadas por um pequeno texto explicativo, daquilo que foram as técnicas e ferramentas utilizadas para as ultrapassar.

Cell delivery

“The intraoperative cell therapy process typically includes tissue harvesting and processing to obtain the desired cell product, surgical intervention depending on the clinical application, and **cell delivery** (see Figure 1).”

Numa primeira fase, optei por traduzir a expressão como “entrega de células”, após uma pesquisa naqueles que são os recursos que me poderiam dar uma resposta mais imediata, ou pelo menos uma pista para a resolução deste problema. Recursos como dicionários bilingues, por exemplo. Como se pode comprovar na definição retirada de um desses dicionários “delivery” significa “the act or manner of delivering something”. Todas as entradas referiam a entrega, ou o ato de entregar alguma coisa a alguém, definição que não se adequava ao contexto.

Obviamente não satisfeito com os resultados da fase de confrontação do termo depois da sua pesquisa em textos da área na língua de chegada decidi tentar perceber o seu significado na língua de partida. Depois de percorrer alguns textos semelhantes ao texto de partida, consegui perceber que se tratava, no fundo, do processo de aplicação das células num determinado local específico do corpo, como uma fratura num osso, por exemplo.

Optei, então, por traduzir como “aplicação de células”, opção que tentei confirmar posteriormente em textos paralelos. Um exemplo é esta revisão de um estudo sobre a utilização de biomateriais no tratamento de lesões ósseas, intitulada “Substitutos Ósseos Conceitos Gerais e Estado Actual”, retirada do site *Scientific Electronic Library Online* onde se utiliza precisamente a expressão “aplicação”.

Solução: “O processo de terapia celular intraoperatório inclui normalmente a colheita e processamento de tecido para a obtenção do produto celular desejado, a intervenção cirúrgica dependendo da aplicação clínica, e a **aplicação das células** (ver Figura 1).”

Cell culture

“It may be beneficial to avoid **cell culture** to limit phenotype changes that can occur when cells are removed from their native microenvironment for an extended time frame.”

No início da pesquisa não tinha a certeza se o termo “culture” poderia ser traduzido por “cultura” e se seria adequado ao contexto particular desta tradução. Por isso, fiz uma pesquisa no site linguee.pt para tentar tirar esta dúvida. “Cultura de células” e “Cultura celular” foram os resultados mais frequentes. Para me ajudar a escolher entre um e outro, recorri ao IATE, que exibiu estes dois exatos resultados, com um bom grau de fiabilidade, pelo que concluí que ambos poderiam ser encarados como opções válidas e ambos seriam igualmente compreendidos na língua de chegada.

Solução: “Pode ser benéfico evitar a **cultura de células** de modo a limitar alterações no fenótipo, que podem ocorrer quando as células são removidas do seu microambiente nativo durante um longo período de tempo.”

Bone powder

“Percutaneous injections of whole bone marrow mixed with demineralized **bone powder** were also delivered to bone cysts to successfully halt the expansion phase and promote cyst ossification (10, 11).”

Desconhecendo completamente esta expressão, à partida, para a tradução do texto, decidi recorrer às duas ferramentas que até aqui tinham sido as mais utilizadas e as que melhores resultados me tinham dado, o linguee.pt e o IATE. Não tendo obtido qualquer resultado da pesquisa feita nestes sites, decidi tentar uma pesquisa na Infopédia. Na pesquisa feita com a palavra-chave “powder” estava entre os resultados “milk powder - leite em pó”. Decidi então fazer uma pesquisa no motor de busca

Google.pt, com a expressão “osso em pó” tendo daí resultado algumas correspondências, ainda que de sites brasileiros. Por exemplo artigo do site Diário da Saúde intitulado “Brasileiros desenvolvem osso artificial em pó”, datado de 29 de junho de 2012.

Apesar de não ter conseguido correspondências em sites de Portugal, e tendo conferido que o contexto se adequava ao do texto original (implantologia e enxertos ósseos), decidi optar por esta opção para o texto de chegada.

Solução: “Injeções percutâneas com medula óssea integral misturada com **osso em pó** desmineralizado foram também aplicadas nos quistos ósseos para travar, com sucesso, a fase de expansão e promover a ossificação do quisto (10, 11).”

Scaffold

“These approaches include the concentration and selection of stem cell or progenitor populations, along with the incorporation of biomaterials including **scaffolds** or matrices with appropriate chemical and physical properties to promote rapid attachment of specific cell types or to direct cell fate in vivo.”

Mais uma vez, esta é uma palavra que dependendo do contexto, assume diferentes significados. Para mim, e porque ainda não tinha visto a palavra noutra contexto, “scaffold” significava “andaime”. Contudo, no site da infopedia, surgiu uma definição, ligada à anatomia, que definia “scaffold” como um “esqueleto” ou “armação”. Depois de ver o contexto da palavra e de ver esta definição fiquei com a ideia que se tratava de um suporte. Como ainda não tinha recorrido ao site iate para esta dificuldade, resolvi fazer uma pesquisa, que entre os resultados, me sugeriu exatamente a palavra “suporte”.

Como o resultado tinha um elevado grau de fiabilidade, e porque se adequava ao contexto do texto de chegada, decidi optar por esta palavra para a tradução.

Solução: “Estas abordagens incluem a concentração e seleção de células estaminais ou populações progenitoras, juntamente com a incorporação de biomateriais incluindo **suportes** ou matrizes com as propriedades químicas e físicas apropriadas, para promover a rápida fixação de tipos de células específicos ou para determinar o destino das mesmas in vivo.”

Buffy Coat

“After bone marrow collection, the **buffy coat** is concentrated using Harvest Technologies’ SmartPReP BMAC TM system.”

Após uma primeira pesquisa em dicionários bilingues, para tentar perceber o significado deste termo (trata-se de uma camada de componentes sanguíneos, constituída por plaquetas e leucócitos, obtida após centrifugação), decidi tentar encontrar o seu equivalente em português na base de dados IATE. Foram-me sugeridas duas hipóteses: *camada leucocitária* e *crosta inflamatória*. Contudo, depois de tentar encontrar textos na língua de chegada, que me pudessem confirmar a validade de uma ou outra opções, isso não se revelou possível, sendo que apareciam esporadicamente em textos em português do Brasil. O primeiro termo “*camada leucocitária*” revelou ser desde o início pouco fiável até no próprio site IATE, que lhe atribuía uma classificação de “fiabilidade mínima”. Também reparei que a entrada do termo datava de 2001, mais um indicador da fraca qualidade da solução. Quanto ao outro termo, não foi sequer possível encontrá-lo em qualquer texto na língua de chegada.

Impunha-se então uma outra tentativa, num outro site. Foi o que fiz no site linguee.pt. O resultado da pesquisa, foi a expressão “camada leuco-plaquetária”, termo que pode ser confirmado na DIRECTIVA 2004/33/CE DA COMISSÃO de 22 de Março de 2004, emitida pela União Europeia.

A definição deste termo pode também ser confirmada no glossário do site octapharma.pt, cuja entrada refere que se trata de “um componente sanguíneo preparado por

centrifugação de uma unidade de sangue total e que contém uma fração considerável dos leucócitos e das plaquetas. Mesmo que Buffy coat”.

Solução: “Após a colheita de medula óssea, a **camada leuco-plaquetária** é concentrada utilizando o sistema SmartPReP BMACTM da Harvest Technologies.”

Erros no texto de partida

“(b) cells in the transplant differentiate and **produce de novo tissue;**”

Desta vez não se trata tanto de uma dificuldade de tradução, mas antes de um erro no texto de partida. É crucial que o tradutor esteja atento a este tipo de erros, porque qualquer informação errada no texto de chegada, ser-lhe-á sempre atribuída. No exemplo em concreto, nem é muito difícil tentar perceber o que se pretendia ter dito na frase. Contudo surgem por vezes situações semelhantes, que se revelam verdadeiros becos sem saída para o tradutor.

Solução: “(b) as células no transplante diferenciam-se e **produzem tecido novo;**”

Siglas

Exemplos:

1. Platelet derived growth factor (PDGF)
2. Epidermal growth factor (EGF)
3. Transforming growth factor β (TGF- β);

O texto original é bastante rico em nomes de componentes químicos, como os exemplos encontrados em cima, que representaram uma dificuldade aquando da sua tradução, uma vez que havia a dúvida se a sigla formada a partir deles deveria ou não ser traduzida. A título de exemplo, podemos falar da sigla formada a partir do composto ácido desoxirribonucleico; ADN. Na língua de chegada do texto traduzido, ou seja, o

português, é igualmente frequente encontrar tanto a sigla ADN, como o seu equivalente em Inglês DNA. Pode então dizer-se que ambos representam opções válidas.

Para as siglas do texto, o fator de decisão para a sua tradução, ou não, foi então a frequência com que estas aparecem na língua de chegada. Uma das siglas que surgem com maior frequência é **Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas – PDGF**. A razão para a não tradução desta, e de outras siglas ao longo do texto, é exatamente a frequência com que aparecem na língua de chegada. Neste caso, depois de feita uma pesquisa no motor de busca Google.pt, praticamente não foi possível encontrar o seu equivalente em português, tendo exibido muito poucos resultados para a sigla **FCDP** seguida do nome do composto **Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas**.

Outra das razões porque estou convicto de que é melhor manter a sigla original em inglês, é o facto de a comunidade científica, e todas as pessoas que lidam com este tipo de texto, e este texto em particular, que relembro, não tem um público-alvo tão abrangente como outros do mesmo tipo, estão habituados a encontrar a sigla representada de uma determinada maneira. Estão também habituados, pela pesquisa que fiz, a associa-la mais facilmente ao nome do composto correspondente. Trata-se então, para além de uma questão de frequência de utilização, de “familiaridade” ou aceitação. Os textos intitulados: “Regeneração e Cicatrização” e “Substitutos Ósseos, Conceitos Gerais e Estado Actual”, retirados do repositório da Universidade do Porto e do site *Scientific Electronic Library Online*, respectivamente, ajudam também a corroborar esta opção.

Solução:

1. Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas - PDGF
2. *Fator de Crescimento Epidérmico - EGF*
3. *Fator de Crescimento Transformante- β - TGF- β*

Macroporous poly(L-lactide-cocaprolactone)

“Biodegradable polymeric scaffolds, **macroporous poly(L-lactide-cocaprolactone)**, and porous natural type I/III collagen were proposed for a one-step surgical procedure for cartilage and bone tissue engineering applications.”

Este foi dos problemas de tradução que mais dificuldade me causou. Não foi possível encontrar resultados nas ferramentas de pesquisa habituais, contudo, através da decomposição deste composto nas várias palavras que o constituem, e com recurso a um texto encontrado no repositório da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra intitulado “Biomateriais em cirurgia ortopédica reconstrutiva”, foi possível chegar a um resultado na língua de chegada. A palavra “macroporous” foi traduzida como “macroporoso” e confirmada posteriormente num outro texto, desta feita no repositório da Universidade de Aveiro intitulado “Titânio macroporoso para osteointegração: replicação inversa de esponjas poliméricas”. “Poly” que vem da palavra “polymer”, ou seja, “polímero”, um material utilizado para a fixação de próteses de substituição das articulações dos membros, foi traduzido como “poli”. Foi encontrada uma correspondência para “L-lactide” e “caprolactone” no linguee.pt, “L-lactida” e “caprolactona”, também confirmadas no texto da Universidade de Coimbra mencionado em cima.

Solução: “Suportes poliméricos biodegradáveis, **poli(L-lactida-co-caprolactona) macroporoso**, e colagénio poroso natural tipo I/III foram propostos para um procedimento cirúrgico de uma etapa para aplicações na engenharia de cartilagem e tecido ósseo.”

Harness

“Approaches utilizing exogenous cell sources typically **harness** stem cells or progenitor cells and are currently being tested in hundreds of cell therapy clinical trials.”

“The field is rapidly evolving toward achieving greater control over the cell composition, phenotype, and function in vivo by **harnessing** bioengineering approaches.”

A definição obtida a partir do site Infopédia.pt, aponta que a correspondência em português para “harness” é “arnês”. Contudo, pode perceber-se que este termo não se enquadra dentro do contexto da frase. Decidi então fazer uma pesquisa em dicionários da língua de partida, para tentar perceber o significado da palavra. Entre as definições, está efetivamente, a referência ao arnês, mas na categoria de nome. Ou seja, esta palavra pode ser utilizada como nome e verbo. Enquanto verbo, a palavra ganha outro significado como se pode comprovar pela entrada do dicionário Merriam-Webster “to put into action or service <huge dams harness the power of water to produce electricity>” e alguns dos sinónimos que acompanham a definição: “apply, employ, exercise, exploit, harness, operate, utilize”. Depreende-se, então, que se trata de utilizar algo, de explorar, ou aproveitar.

“O campo está a evoluir rapidamente no sentido de se conseguir um maior controlo sobre a composição das células, o fenótipo, e a função in vivo, **aproveitando** as abordagens da bioengenharia.”

No geral, os problemas de tradução encontrados ao longo do texto foram do mesmo cariz dos apresentados acima, tendo sido as soluções encontradas para os ultrapassar em tudo semelhantes a estas.

7. Glossário

O levantamento e gestão da terminologia de um texto “is an essential component task of the translation process” (Gouadec, 2007).

No caso do texto a traduzir, também houve, naturalmente, este levantamento e gestão da terminologia, que resultou na criação de um glossário. O referido glossário surgiu devido a várias razões como, por exemplo, a grande especificidade da área onde se enquadrava o texto a traduzir, a existência de uma grande densidade terminológica e a falta de conhecimento da área tratada.

Este glossário conferiu uma maior consistência a nível terminológico ao texto de chegada, porque uma vez pesquisado e encontrado o termo certo correspondente a uma determinada expressão ou conceito, este passou a ser utilizado de uma maneira regular ao longo do texto.

A elaboração deste glossário foi importante também porque permitiu uma maior rapidez e facilidade de acesso a conceitos e definições, informação no fundo, que de outro modo teria de ser constantemente pesquisada e verificada. É claro que esta pesquisa teve obviamente de ser feita, mas uma vez compilada num só local, o processo de tradução tornou-se muito mais fluido.

Um glossário obriga a um contacto com textos e artigos sobre o mesmo tema e que contêm uma linguagem semelhante, quer na fase de pesquisa do termo, quer na fase de procura da confirmação desse mesmo tema. Isto permite ao tradutor ganhar um maior conhecimento acerca do tema sobre o qual está a traduzir e familiarizar-se com a sua terminologia.

O glossário resultante desta pesquisa apresenta-se em forma de lista, com a apresentação do termo, a sua respetiva tradução e definição, apresentado em ordem alfabética, por considerar que deste modo, a pesquisa se efetuará com maior facilidade.

Os critérios de seleção dos termos ou conceitos nele presentes centraram-se em primeiro lugar e, como é natural, na natureza do termo, ou seja, teriam de estar relacionados com o tema geral das terapias com células estaminais. O outro critério prendeu-se com a frequência de aparecimento dos mesmos ao longo do texto.

Tendo-se revelado uma útil ferramenta ao longo da tradução aqui apresentada, no futuro o glossário poderá voltar a ser útil em traduções dentro do mesmo domínio. Deste

modo, evitar-se-á a elaboração de uma nova pesquisa terminológica, com a conseqüente perda de tempo e tudo o que isso acarreta no processo de tradução, existindo, contudo, a possibilidade de ser enriquecido com novas entradas se assim se achar adequado.

Glossário

Adipose tissue

Tecido adiposo

Tipo de tecido conjuntivo, onde predominam células adiposas (adipócitos) e cuja função principal é a de reserva energética. As células adiposas não se dividem.

Allogeneic

Alogénico

Dois ou mais indivíduos (ou linhas celulares) dizem-se alogénicos um em relação ao outro, quando os genes, de cada organismo, num ou mais loci não têm uma sequência idêntica.

Angiogenesis

Angiogénese

Desenvolvimento de novos vasos sanguíneos num tecido vivo. Este processo depende da proliferação de células endoteliais, que são as células de revestimento dos vasos sanguíneos.

Angiopoietin

Angiopoietina

Fatores de crescimento que promovem a angiogénese.

Apoptosis

Apoptose

Morte biológica programada das células cuja duração de vida normal varia de acordo com o respetivo tipo celular.

Arthroplasty

Artroplastia

Operação que se destina a refazer as superfícies articulares numa articulação anquilosada (privada de movimento).

Autogenous

Autógeno

Que se produz ou se desenvolve sem intervenção estranha. Que se forma no organismo às suas próprias expensas.

Autograft**Autoenxerto**

Tecido ou órgão transplantado de uma parte, para outra, do mesmo organismo.

Autologous**Autólogo**

Qualquer tecido orgânico retirado de um indivíduo e utilizado/transplantado no mesmo indivíduo.

Bone marrow**Medula óssea**

Tecido de consistência mole que preenche a parte central dos ossos longos e as diferentes cavidades e aréolas dos ossos esponjosos.

Buffy coat**Camada leuco- plaquetária**

Um componente sanguíneo preparado por centrifugação de uma unidade de sangue total e que contém uma fração considerável dos leucócitos e das plaquetas.

Cancellous bone**Oso esponjoso**

Um dos dois tipos de osso. Comparado com osso cortical, tem uma área de superfície maior, mas é menos densa, mais macia, mais fraca e menos rígida. Osso esponjoso é altamente vascular e contém, frequentemente, medula óssea vermelha onde a hematopoiese, a produção de células sanguíneas, ocorre.

Cell therapy**Terapia celular**

Tratamento através do qual se induzem células estaminais a diferenciar-se num tipo celular específico necessário para reparar células ou tecidos destruídos ou danificados.

Centrifugation**Centrifugação**

Separação, com o auxílio da força centrífuga produzida por uma rotação rápida, de elementos de densidades diferentes.

Chemoattractant**Químioatraente**

Agente químico que induz a circulação de células quimiotáticas na direção da sua concentração mais elevada.

Chondrocytes**Condrocitos**

Célula cartilaginosa adulta, proveniente do condroblasto, com forma ovoide, presa nos seios da substância fundamental (condroplasto) da cartilagem.

Chondrogenesis**Condrogénese**

Formação e desenvolvimento de cartilagem.

Clot**Coágulo**

Massa semissólida de qualquer líquido orgânico. (sangue)

Collagen**Colagénio**

Constituinte orgânico do tecido conjuntivo e do tecido ósseo e das cartilagens. Transforma-se em gelatina por ação da fervura ou do calor.

Connective tissue**Tecido conjuntivo**

Tecido de ligação que rodeia, envolve e reúne órgãos e seus elementos.

Cortical bone**Ossso cortical**

Parte exterior do osso, composto por lâminas ósseas paralelas e extremamente próximas entre si, constituindo uma substância dura e compacta que confere resistência ao osso.

Cyst**Quisto**

Tumor benigno formado num órgão por uma cavidade delimitada por uma parede e cheio de uma substância líquida, mole ou, raramente, sólida.

Cytokines**Citocinas**

Designação de diversas substâncias produzidas ou libertadas por células de diferentes tipos quando devidamente estimuladas e que vão atuar em células-alvo portadoras de recetores específicos.

Debridement**Desbridamento**

Abertura de uma ferida ou de um foco ou cavidade infetados.

Degranulation**Desgranulação**

Lise das granulações dos leucócitos granulados, durante a fagocitose bacteriana.

Ectopic**Ectópico**

Que está fora do lugar.

Endogenous**Endógeno**

Que se forma ou se produz no interior do corpo.

Endothelium**Endotélio**

Tecido extremamente fino, formado por uma camada de células endoteliais, que reveste o interior do coração e dos vasos sanguíneos e linfáticos.

Epidermal growth factor**Fator de crescimento epidérmico**

Hormona de polipéptido que estimula a proliferação celular, especialmente das células epiteliais.

Ex vivo**Ex vivo**

Fora do organismo vivo.

Exogenous**Exógeno**

Que tem origem no exterior.

Fibrin**Fibrina**

Substância proteica não existente normalmente no sangue circulante. Resulta da ação da trombina no fibrinogênio e é responsável pela formação de coágulos sanguíneos. A fibrina origina um emaranhado de fibras que captam trombócito.

Fibroblast**Fibroblasto**

Célula do tecido conjuntivo muito alongada, geralmente aplicada contra feixes colagénios segrega proteínas e colagénio molecular.

Fibroblast growth factor**Fator de crescimento fibroblástico**

Estimula a proliferação de células endoteliais, especialmente e que promovem a angiogénese.

Granulocyte colony-stimulating factor**Fator estimulador de colónias de granulócitos**

Produzido por macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, atua para promover a maturação de células precursoras para granulócitos.

Growth factors**Fatores de crescimento**

Uma substância (como a vitamina B12) que promove o crescimento, em especial o crescimento celular.

Hematopoiesis**Hematopoiese**

Formação dos elementos figurados do sangue.

Hematopoietic stem cell**Célula estaminal hematopoiética**

As células estaminais hematopoiéticas são células estaminais formadoras de sangue, o que significa que podem criar e reparar o sangue e sistema imunitário.

Heparin**Heparina**

Substância anticoagulante, com ação potente e rápida, que inibe a formação e a atividade da tromboplastina e da trombina.

Host cell**Célula hospedeira**

Uma célula viva invadida por ou suscetível de ser invadida por um agente infeccioso (como uma bactéria ou um vírus)

Hyaline cartilage**Cartilagem hialina**

Tipo de tecido cartilágneo cuja substância fundamental, de aparência amorfa, é muito resistente e elástica. Constitui o anel da traqueia e dos brônquios, assim como as partes cartilagueas do nariz e das costelas, e recobre as superfícies ósseas ao nível das articulações (joelho, cotovelo, punho, etc.).

Hyaluronic acid**Ácido hialurônico**

Mucopolissacarídeo que atua como agente de ligação, lubrificação e proteção.

Hydroxyapatite**Hidroxiapatita**

Componente inorgânico constituinte da matriz óssea e dos dentes, que confere rigidez a estas estruturas.

In vitro**In vitro**

Num tubo de laboratório, em ambiente artificial.

In vivo**In vivo**

Dentro do organismo vivo, num ambiente natural.

Intervertebral disc**Disco intervertebral**

Disco fibrocartilágneo intercalado entre as superfícies articulares de dois corpos vertebrais. É constituído por um núcleo central designado como núcleo pulposo, contornado por um anel de fibras conjuntivas.

Intraoperative**Intraoperatório**

Que ocorre durante o procedimento cirúrgico; referente ao período durante o procedimento cirúrgico.

Ischemia**Isquemia**

Paragem ou insuficiência do fornecimento de sangue a um tecido ou a um órgão. Pode ser devida a vasoconstrição, a obstrução ou compressão arteriais.

Matrix**Matriz**

Substância intercelular de um tecido ou do tecido a partir do qual se desenvolve uma estrutura.

Mesenchymal stem cell**Célula estaminal mesenquimal**

Células estaminais multipotenciais que se podem diferenciar numa variedade de tipos de células incluindo osteoblastos (células do osso), condrócitos (células de cartilagem) e adipócitos (células de gordura).

Ossification**Ossificação**

Formação normal do tecido ósseo, a partir do tecido conjuntivo, quer diretamente à custa de um esboço fibroso, quer por intermédio de um esboço cartilágneo.

Osteochondral**Osteocondral**

Relativo a ou composto por osso e cartilagem.

Osteogenesis**Osteogénese**

Formação e desenvolvimento do tecido ósseo.

Osteolysis**Osteólise**

Absorção do tecido ósseo que pode provocar a destruição mais ou menos extensa dos ossos.

Perfusion**Perfusão**

Introdução lenta e contínua durante algumas horas ou dias de diversos líquidos (sangue, plasma, soluções salinas, soluções medicamentosas) na circulação sanguínea.

Phenotype**Fenótipo**

Conjunto dos caracteres observáveis, aparentes, de um indivíduo, devidos essencialmente aos fatores hereditários (genótipo) e em certa medida à influência exercida pelas condições do meio ambiente.

Phosphatase**Fosfatase**

Enzima que ativa a libertação do ácido fosfórico combinado com uma substância orgânica sob a forma de éster. As fosfatases existem na maioria dos tecidos do organismo e no sangue (fosfatemia) sob a forma de fosfatases ácidas (ativas em meio ácido), das quais a mais importante é a fosfatase prostática, e de fosfatases alcalinas (ativas em meio alcalino) provenientes do fígado, do intestino, do rim e dos ossos.

Platelet-derived growth fator**Fator de crescimento derivado de plaquetas**

Fator de crescimento mitogénico encontrado sobretudo em plaquetas. Desempenha um importante papel na cicatrização de feridas

Platelet-rich plasma**Plasma rico em plaquetas**

Tipo de sangue que contém elevados níveis de plaquetas e fatores de crescimento. Pode ser usado como um componente auxiliar na aceleração da cicatrização de tecidos na regeneração óssea.

Progenitor cells**Células progenitoras**

Células que se podem diferenciar num número limitado de tipos de células, mas que não se podem autorrenovar ou produzir mais células estaminais. Por exemplo, as células progenitoras do sangue contidas na nossa medula óssea só podem produzir glóbulos vermelhos e brancos.

Proteoglycans**Proteoglicanos**

Proteína que contém uma ou mais cadeias de glicosilaminoglicanos ligados à cadeia proteica por complexos covalentes

Regenerative medicine**Medicina regenerativa**

A Medicina Regenerativa tem como objetivo principal o reparo e a substituição terapêutica de tecidos lesados e degenerados por complexos celulares ou moleculares com estruturas e funções equivalentes.

Spinal fusion**Artrodese da coluna**

Imobilização da coluna através de qualquer forma de fusão. A fusão é uma forma de tratamento, entre outras, das doenças degenerativas dos discos intervertebrais, ou das fraturas vertebrais.

Stem Cell**Célula estaminal**

Célula pluripotente com capacidade de se autorrenovar, de se dividir indefinidamente e que pode diferenciar-se em vários tipos de células.

Transforming growth fator**Fator de Crescimento Transformador**

Segregado por várias células (monócitos, células T, ou plaquetas), possui diversos efeitos na divisão e atividade celular (indutor de angiogénese, estimulador da proliferação de fibroblastos, ou inibidor da proliferação de células T).

Ventricular ejection fraction**Fração de ejeção do ventrículo**

Proporção entre o volume de sangue que o coração esvazia durante a sístole e o volume de sangue no coração no fim da diástole (expressado numa percentagem normalmente entre 50 e 80%).

Xenograft**Xenoenxerto**

Um enxerto de tecido retirado de um dador de uma determinada espécie e enxertado num outro de uma espécie diferente.

8. Conclusão

O projeto que agora se conclui foi elaborado no âmbito do Mestrado em Tradução Especializada e serviu como um meio de aplicação de todas as técnicas e ferramentas adquiridas ao longo dos cinco anos de curso. Apresentou-se como um enorme desafio, na medida em que o tema abordado pelo artigo se tratava de um tópico muito específico e especializado, que tem conhecido grandes avanços nos últimos tempos, e por isso ganhou uma importância crescente.

O principal objetivo deste projeto era a reflexão acerca de tudo aquilo que envolve o processo de tradução, desde a escolha do tema e artigo a traduzir, até à elaboração de um glossário. Também foi importante a exposição das principais dificuldades e do que foi feito para as ultrapassar.

Deste trabalho resulta ainda um glossário, que se revelou bastante útil durante o processo de tradução e que, uma vez compilado e terminado, poderá servir para futuras traduções, evitando novas pesquisas terminológicas, ou pelo menos tão profundas quanto aquela que teve de ser feita para esta tradução. Um outro resultado desta pesquisa foi um aprofundar de conhecimentos por parte do tradutor em relação ao tema tratado.

Este relatório representa, então, o culminar de um processo de tradução que contribuiu para o enriquecimento do aluno não só a nível das competências que um tradutor tem de possuir para desempenhar o seu trabalho, mas também a nível do conhecimento da área abordada.

9. Bibliografia

Recursos online

IATE

<http://iate.europa.eu/iatediff/>

Infopédia

<http://www.infopedia.pt/>

Google

<https://www.google.pt/>

Linguee

www.linguee.pt

Glossário Médicos de Portugal

<http://medicosdeportugal.saude.sapo.pt/glossario>

Merriam-Webster

<http://www.merriam-webster.com/>

Dictionary

<http://dictionary.reference.com/>

Priberam

<http://www.priberam.pt/dlpo/>

Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal

<http://www.rcaap.pt/>

Repositório da Universidade de Lisboa

<http://repositorio.ul.pt/>

Repositório da Universidade do Minho

<http://repositorium.sdum.uminho.pt/>

Repositório da Universidade do Porto

<http://repositorio-aberto.up.pt/>

Repositório do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

<http://rihuc.huc.min-saude.pt/>

Bibliografia para a construção do Corpus

Benevides, Patrícia Alexandra Azevedo Blanco (2003), *Efeito da mobilização com G-CSF nos linfócitos e células NK dos enxertos hematopoiéticos*, Porto, Universidade do Porto (http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/9541/6/5546_TM_01_C.pdf)

Cury, Vanessa F.; Guimarães, Marcus M. (2011), *Fator de crescimento derivado de plaquetas na implantodontia. Novas perspetivas de tratamento para reconstrução óssea*. Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial (<http://www.elsevier.pt/pt/revistas/revista-portuguesa-estomatologia-medicina-dentaria-e-cirurgia-maxilofacial330/artigo/fator-crescimento-derivado-plaquetas-na-implantodontia-novas-perspetivas90099450>)

Fernandes, Hélder; Sousa, Alexandra; Campos, José; Patrício, José; Oliveira, Patrícia; Vieira, Tiago; Oliveira, Ana; Faria, Teresa; Perez, Berta; Martins, Elisabete; Pereira, Jorge (2011) *Avaliação da Viabilidade Miocárdica*, Ata Médica Portuguesa, Revista Científica da Ordem dos Médicos (<http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/1568>)

Gutierrez, Manuel; Lopes, Maria Ascensão; Hussain, Nandyala Sooraj; Cabral, Abel Trigo; Almeida, Luís; Santos, José Domingos (2006) *Substitutos Ósseos Conceitos Gerais e Estado Actual*, Porto, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (<http://www.scielo.oces.mctes.pt/pdf/am/v19n4/v19n4a04.pdf>)

Horta, Cláudia; Vilaverde, Joana; Mendes, Paula; Goçaves, Isabel; Serra, Luís; Sá Pinto, Pedro; Almeida, Rui; Carvalho, Rui; Dores, Jorge; Serra, Maria Beatriz (2003), *AVALIAÇÃO DA TAXA DE AMPUTAÇÕES Consulta Multidisciplinar do Pé Diabético*, Ata Médica Portuguesa, Revista Científica da Ordem dos Médicos (<http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/1224/876>)

João Pedro Lopes; António Fiarresga; Pedro Silva Cunha; Joana Feliciano; Judas, Fernando; Palma, Paulo; Falacho, Rui Isidro; Figueiredo, Helena (2012) *Estrutura e Dinâmica do Tecido Ósseo*, Coimbra, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (<http://rihuc.huc.min-saude.pt/handle/10400.4/1346>)

Lindvall, Olle; Kokaia, Zaal; Martinez-Serrano, Alberto (2004) *Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders—how to make it work*, Nature Medicine 10, S42–S50 (<http://www.nature.com/nm/journal/v10/n7s/abs/nm1064.html>)

Pinto, Ana Rita da Costa (2010), *Potential of human bone marrow derived stem cells combined with chitosan based biodegradable scaffolds for bone tissue engineering*, Universidade do Minho (<http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/12361?mode=full>)

Rodrigues, Gonçalo Martins da Costa Pereira (2011), *Estudo da regulação da angiogénese tumoral pelo H2 O2 in vivo*, Lisboa, Universidade de Lisboa (<http://repositorio.ul.pt/handle/10451/6313>)

Rui Cruz Ferreira (2012), *Terapia celular cardíaca com células mesenquimatosas*, Lisboa, Serviço de Cardiologia, Hospital de Santa Marta, Centro Hospitalar Lisboa Central (<http://www.elsevier.pt/pt/revistas/revista-portuguesa-cardiologia334/artigo/terapia-celular-cardiaca-com-celulas-mesenquimatosas90184771>)

Schmitt, Fernando (2006) *Regeneração e Cicatrização*, Porto, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (http://users.med.up.pt/cc04-10/biopatteoricas/Aula6_RegeneracaoCicatrizacao.pdf)

Sousa, João Pedro Borges Catela dos Reis (2012), *Efeito das BMPs na regeneração óssea: mecanismo de ação e aplicação em Medicina Dentária*, Porto, Universidade do Porto (<http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/63823>)

Artigos Consultados

RIBEIRO, Graça Barbosa. “O novo anúncio da Crioestaminal promove a culpa ou uma causa? Público 18 de maio de 2012

(<http://www.publico.pt/sociedade/noticia/anuncio-da-crioestaminal-e-chantagem-emocional-diz-oliveira-da-silva-1546614>)

DIÁRIO DA SAÚDE, Redação. “Brasileiros desenvolvem osso artificial em pó” Diário da Saúde 29 de junho de 2012

(<http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=osso-artificial-po&id=7911>)

Bibliografia sobre tradução:

BERKENKOTTER, Carol; HUCKIN, Thomas N. (1995). *Genre Knowledge in Disciplinary Communication: Cognition, Culture, Power*; Hillsdale, Lawrence Erlbaum Associates

BOWKER, Lynne (2001). “Towards a Methodology for a Corpus-Based Approach to Translation Evaluation”, *Meta: Translators' Journal*, vol. 46, nº 2, 2001, p. 345-364.

GOUADEC, Daniel (2007). *Translation as a Profession*, Amsterdam, Benjamins.

TROSBORG, Anna (1997) *Text Typology: Register, Genre and Text Type*, Benjamins

VENUTI, Lawrence (1995). *The Translator's Invisibility: A History of Translation*. London, Routledge

Bibliografía consultada:

BIBER, Douglas; CONRAD, Susan; REPPEN, Randi (1998). *Corpus Linguistics: Investigating Language Structure and Use (Excerpt)*, Cambridge, Cambridge University Press

EMERY, Peter G. (1991). "Text Classification and Text Analysis in Advances Translation Teaching", *Meta: Translators' Journal*, vol. 36, n° 4, 1991, p. 567-577

HURTADO ALBIR, Amparo; MELIS, Nicole Martínez (2001). "Assessment In Translation Studies: Research Needs", *Meta: Translators' Journal*, vol. 46, n° 2, 2001, p. 272-287

NORD, Christiane (1997). *Translating as a Purposeful Activity*, St. Jerome, Manchester

ROBINSON, Douglas (1997). *Becoming a Translator - An Introduction to the Theory and Practice of Translation*, New York, Routledge

10. Anexos

10.1 Tradução

Terapia intraoperatória com células estaminais

Mónica Beato Coelho,^{1,2} Joaquim M.S. Cabral² e Jeffrey M. Karp¹

¹Center for Regenerative Therapeutics and Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Harvard Stem Cell Institute, and Harvard-MIT Division of Health Sciences and Technology, Cambridge, Massachusetts 02139; [email: jkarp@rics.bwh.harvard.edu](mailto:jkarp@rics.bwh.harvard.edu)

²Departamento de Bioengenharia e Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, 1049-001 Lisboa, Portugal

Annu. Rev. Biomed. Eng. 2012. 14:325–49

A Annual Review of Biomedical Engineering está online em bioeng.annualreviews.org

DOI deste artigo:
10.1146/annurev-bioeng071811-150041

Copyright © 2012 por Annual Reviews. Todos os direitos reservados

1523-9829/12/0815-0325\$20.00

Palavras-chave

célula estaminal mesenquimal, pesquisa clínica, autólogo, isolamento celular

Resumo

As células estaminais representam uma importante promessa na regeneração de tecidos defeituosos e nas terapias modificadoras da doença. Apesar do recente surgimento de várias abordagens promissoras com células estaminais em ensaios clínicos, as terapias intraoperatórias com células estaminais oferecem uma esperança mais imediata, integrando uma fonte celular autóloga com uma intervenção cirúrgica bem estabelecida, num único procedimento. No presente estudo, os principais desenvolvimentos nas abordagens intraoperatórias com células estaminais, desde modelos in vivo a estudos clínicos, são revistos, e os potenciais mecanismos regenerativos, bem como as funções de diferentes populações celulares no processo regenerativo, são discutidos. Apesar das terapias intraoperatórias com células estaminais se terem mostrado seguras e eficientes para vários fins, existem ainda desafios críticos a ser abordados antes de estas passarem a fazer parte do arsenal cirúrgico padrão.

Índice

INTRODUÇÃO	326
TERAPIA INTRAOPERATÓRIA COM CÉLULAS ESTAMINAIS.....	328
Osteogênese.....	328
Osteocondrogênese.....	333
Angiogênese.....	334
Aplicações Cardíacas.....	335
MECANISMOS REGENERATIVOS	336
FONTES CELULARES.....	336
POTENCIAIS FUNÇÕES DE PRODUTOS CELULARES PROCESSADOS E TRANSPLANTADOS INTRAOPERATÓRIAMENTE.....	338
MÉTODOS UTILIZADOS PARA ISOLAR OU CONCENTRAR PRODUTOS CELULARES INTRAOPERATÓRIAMENTE.....	339
DESAFIOS E PRÓXIMAS ETAPAS.....	341
RESUMO.....	343

INTRODUÇÃO

A medicina regenerativa promete devolver estrutura e função aos tecidos e órgãos danificados. As abordagens que utilizam fontes celulares exógenas, aproveitam normalmente as células estaminais ou as células progenitoras e estão a ser testadas em centenas de ensaios clínicos de terapia celular. Estes ensaios incluem células derivadas de fontes autólogas e alogénicas. Em particular, as terapias celulares intraoperatórias, que integram terapias celulares autólogas com intervenções cirúrgicas num único procedimento, oferecem uma enorme esperança para um futuro próximo, e algumas abordagens alcançaram já o sucesso clínico. O processo de terapia celular intraoperatório inclui normalmente a colheita e processamento de tecido para a obtenção do produto celular desejado, a intervenção cirúrgica dependendo da aplicação clínica, e a aplicação das células (ver **Figura 1**). A terapia celular intraoperatória beneficia da acessibilidade e segurança que advém do uso das células do próprio paciente, o que faz com que não seja despoletada uma resposta imunitária; assim como dos muitos tipos de células relevantes que podem ser colhidas através de técnicas minimamente invasivas. Esta terapia também contorna muitas das limitações da terapia celular exógena, evitando a manipulação *in vitro* das células e uma expansão celular cara,

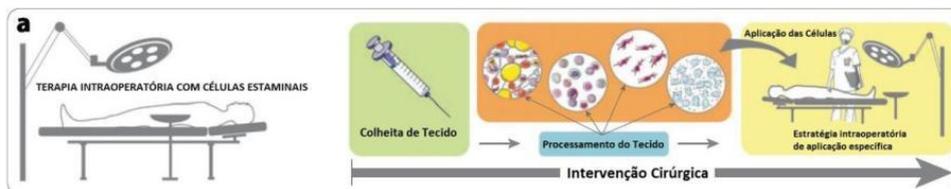
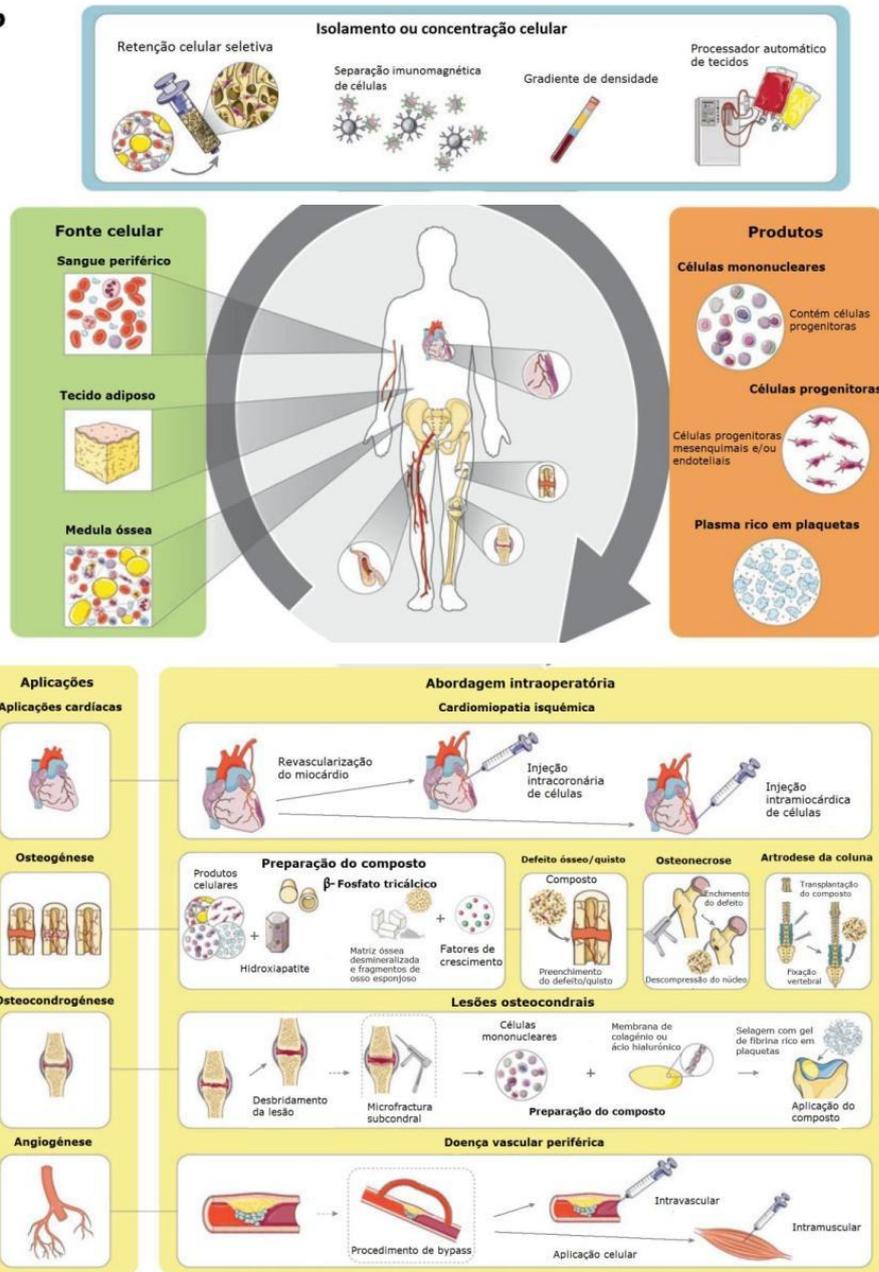


Figura 1

Terapia intraoperatória com células estaminais. (a) O processo de terapia celular intraoperatória inclui normalmente a colheita e processamento de tecido para a obtenção do produto celular desejado, e uma estratégia de aplicação de células intraoperatória que depende da aplicação clínica. (b) O processo de terapia celular intraoperatória inicia-se com a colheita de tecido autólogo. Os tecidos, entre os quais sangue periférico, tecido adiposo e medula óssea, podem ser utilizados como fontes de células estaminais (caixa verde). O tecido pode então ser processado utilizando diversos métodos (caixa azul) para a obtenção do produto celular desejado (caixa laranja). A terapia de células estaminais pode ser aplicada como um tratamento complementar em conjunto com a cirurgia ou um tratamento intervencivo (caixas amarelas). A figura foi elaborada utilizando Servier Medical Art (<http://www.servier.com/servier-medical-art>).

b



a necessidade de instalações de boas práticas de fabrico, a necessidade de contratar pessoal com treino em cultura de células, potenciais contaminações, e um segundo procedimento (num outro momento) para a colheita das células. Pode ser benéfico evitar a cultura de células de modo a limitar alterações no fenótipo, que podem ocorrer quando as células são removidas do seu microambiente nativo durante um longo período de tempo. Além disso, as estratégias executadas inteiramente dentro da sala de operações (sem expansão de cultura) podem reduzir o período de espera da cirurgia. É importante ressaltar que, a U.S. Food and Drug Administration, a Agência Europeia de Medicamentos e outras autoridades reguladoras, consideram, de modo geral, os produtos de células adultas como sendo produtos biológicos que podem ser divididos em duas categorias: produtos biológicos minimamente manipulados (e.g., produtos sanguíneos autólogos, incluindo plasma rico em plaquetas ou concentrado de plaquetas e produtos sanguíneos alogénicos, tais como medula óssea ou sangue do cordão umbilical), e produtos biológicos manipulados, tais como células estaminais mesenquimais (CEM) com expansão de cultura. Algumas abordagens celulares intraoperatórias encaixam na categoria de produtos biológicos minimamente manipulados, nos quais não existe a necessidade de fazer ensaios clínicos, acelerando assim a potencial passagem para a clínica. O foco principal desta revisão é apresentar uma visão global das abordagens de terapias celulares autólogas, nas quais os produtos celulares são colhidos, minimamente manipulados, e aplicados no paciente no mesmo dia.

TERAPIA INTRAOPERATÓRIA COM CÉLULAS ESTAMINAIS

Até à data, as abordagens intraoperatórias com células estaminais convencionais têm sido bastante simplistas, usando tipicamente a medula óssea integral, sem uma estratégia de concentração celular ou métodos específicos de aplicação das células ou de controlo da sua função in vivo. O campo está a evoluir rapidamente no sentido de se conseguir um maior controlo sobre a composição das células, o fenótipo, e a função in vivo, aproveitando as abordagens da bioengenharia. Estas abordagens incluem a concentração e seleção de células estaminais ou populações progenitoras, juntamente com a incorporação de biomateriais incluindo suportes ou matrizes com as propriedades químicas e físicas apropriadas, para promover a rápida fixação de tipos de células específicos ou para determinar o destino das mesmas in vivo. A **Tabela 1** resume os estudos publicados acerca das terapias intraoperatórias com células estaminais, incluindo as que descrevem modelos pré-clínicos, relato de casos, e ensaios clínicos para o tratamento de uma ampla gama de condições agudas e crónicas. Nas secções seguintes, descrevemos as abordagens intraoperatórias que foram desenvolvidas para várias aplicações clínicas, com ênfase nos procedimentos técnicos e resultados clínicos.

Osteogénese

Os materiais de enxerto ósseo natural têm evoluído ao longo dos dois últimos séculos, incluindo agora, enxertos autólogos ou alogénicos de osso cortical, osso corticoesponjoso, osso esponjoso, e matriz óssea desmineralizada (1). O primeiro autoenxerto ósseo intraoperatório foi realizado na Alemanha em 1820, contudo, este procedimento não se tornou uma prática clínica corrente até F.H. Albee ter resumido a sua experiência com 3000 procedimentos de enxerto ósseo autólogos em 1915 (2). O osso esponjoso autólogo que inclui fragmentos ósseos, uma população heterogénea de células e vários fatores de crescimento, tem-se tomado o padrão ouro da regeneração óssea e processos reconstrutivos que produzem os resultados clínicos mais bem-sucedidos e previsíveis. Este sucesso tem sido atribuído, em parte, à presença de células no interior do enxerto (3). A história e o progresso com autoenxertos ósseos tem sido extensivamente revista noutros artigos (3). Aqui focamo-nos no uso de células estromais da medula óssea aspiradas e aplicadas intraoperatóriamente.

As primeiras terapias celulares intraoperatórias a promover a regeneração osteogénica, utilizaram medula óssea que foi aspirada via agulha, e posteriormente injetada percutaneamente na falha óssea (4-8). Comparativamente a efetuar um autoenxerto ósseo colhido a partir da crista íliaca, a injeção de medula óssea

autóloga é menos invasiva e resulta em menos complicações para dador e recetor (6, 9). Foram também aplicadas injeções percutâneas com medula óssea integral misturada com osso em pó desmineralizado nos quistos ósseos para travar, com sucesso, a fase de expansão e promover a ossificação do quisto (10, 11). Apesar de medula óssea autóloga ter sido utilizada para aumentar a cicatrização de feridas osteogénicas durante décadas, o mecanismo exato mediador desta resposta não é claro, dado que a medula óssea isolada é extremamente heterogénea (i.e., é composta de múltiplos tipos de células) e contém uma série de citocinas, componentes matriz extracelulares, e frequentemente, fragmentos de osso.

Uma possível correlação entre a eficácia da medula óssea e a concentração celular (12) levou a uma investigação acerca dos métodos utilizados para selecionar as células antes do transplante. Por exemplo, as subpopulações obtidas através de separação por graduação de densidade de medula óssea mostraram uma osteogénese aumentada (13). Para além disso, no final da década de 1980, Connolly et al. (14) propôs um método para aumentar o potencial osteogénico de uma preparação injetável a partir da concentração de células de medula óssea nucleadas por centrifugação. A medula óssea concentrada aumentou significativamente a osteogénese, resultando numa regeneração melhorada como comprovado radiograficamente. Um importante estudo clínico de Hemigou et al. (15) avaliou a correlação entre o número de células progenitoras derivadas de medula óssea (determinada por unidades de fibroblastos formadoras de colónias) e a extensão da cicatrização óssea numa não-união da diáfise tibial. Os investigadores observaram um limite para o número total de células progenitoras presentes na medula óssea concentrada (equivalente a uma concentração celular de 1000 células progenitoras por centímetro cúbico) necessários ao sucesso do tratamento (união da fratura da diáfise tibial). Como alternativa à centrifugação, para a concentração de células para aplicações osteogénicas, o trabalho do laboratório de George Muschler (16) em Cleveland, demonstrou a viabilidade da tecnologia de retenção celular seletiva (RCS) (ver **Figura 2**) para o isolamento e concentração rápidos (3–4x) de células progenitoras do tecido conjuntivo, dentro da sala de operações, a partir de medula óssea aspirada recentemente e de corpos vertebrais. Através deste processo, a performance do enxerto ósseo foi melhorada. A RCS é tecnicamente simples e rápida: O substrato poroso, biocompatível e implantável, cujas propriedades de superfície favorecem a fixação rápida de células progenitoras do tecido conjuntivo, é carregado para uma seringa, e a medula óssea é passada através de amostras de matriz a um baixo ritmo de modo a obter um enxerto composto enriquecido em células progenitoras. Muschler et al. (17) examinou o osso esponjoso como matriz e o impacto de um coágulo de medula óssea (aspiração de medula óssea colhida sem heparina) em modelos animais para artrodese da coluna. O resultado clínico foi avaliado com uma pontuação de união (grau de união, de 0% a fusão 100% completa da articulação facetária e a totalidade da lâmina), tomografia computadorizada quantitativa (para determinar o volume ósseo, a densidade óssea, e a área da secção transversal da massa de fusão), e testes mecânicos (foram geradas curvas de deslocamento de carga para calcular a rigidez, carga máxima, falha de deslocamento, e falha total de energia). Os resultados mostram que a combinação do enxerto ósseo enriquecido com células e o coágulo de medula óssea permitem atingir uma melhoria significativa nos resultados clínicos, que aqueles com estas duas técnicas utilizadas separadamente (enxerto ósseo enriquecido ou enxerto ósseo mais coágulo de medula óssea). Os autores apresentam várias hipóteses para o efeito positivo do coágulo de medula óssea na eficiência do enxerto: O coágulo de fibrina pode proporcionar estabilidade mecânica e funcionar como um suporte para as células transplantadas e endógenas; a desgranulação das plaquetas proporciona um suplemento de citocinas osteogénicas, nomeadamente, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento transformador β (TGF- β); e a atividade fibrinolítica do coágulo de medula óssea, podem servir como uma fonte de fatores angiogénicos.

Muschler et al. (18) também explorou o osso cortical desmineralizado como matriz alternativa à RCS, usando o mesmo modelo animal para a artrodese da coluna e os mesmos métodos para avaliar os resultados. O aumento da aplicação de células com osso cortical em pó desmineralizado e a matriz de osso esponjoso foi extensivamente explorado para aplicações osteogénicas intraoperatórias, dado o seu histórico de sucesso na promoção de crescimento de novo osso. Idealmente, os materiais deveriam ser osteocondutores (i.e.,

Tabela 1 Exemplos de aplicações clínicas de terapias celulares intraoperatórias

Aplicação	Exemplo	Procedimento cirúrgico geral	Resultado	Biomateriais	População Celular	Referências
Angiogênese	Doença vascular periférica	Aspiração de medula óssea/ colheita de sangue periférico Isolamento/concentração celular Aplicação de células intramuscular/intravascular	Perfusão sanguínea aumentada Salvamento de membro Cicatrização de feridas Melhorias na dor em repouso, ausência de dor a caminhar		CM CM e plaquetas	42, 45-56
Angiogênese/ miogênese	Cardiomiopatia isquêmica	Aspiração de medula óssea Isolamento/concentração celular Revascularização do miocárdio Injeção intramiocárdica/ intracoronária de células	Perfusão local melhorada Contratilidade melhorada nas áreas de enfarte Aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo		CD133 + células CM	59-66
Osteocondrogênese	Lesões osteocondrais	Aspiração de medula óssea/ colheita de sangue periférico Isolamento/concentração celular Preparação da lesão (desbridamento da lesão e/ou microfratura subcondral) Preparação de composto celular Aplicação do composto Selagem com gel de fibrina rico em plaquetas	Regeneração osteocondral em vários graus de remodelagem apesar da formação não completa de cartilagem hialina	Colagênio em pó Membrana de ácido hialurônico	CM CM e plaquetas	32-34, 39

Osteogênese	Cicatrização do defeito ósseo	Aspiração de medula óssea Concentração celular Preparação de enxerto	Regeneração óssea	Matriz óssea desmineralizada Fragmentos de osso esponjoso Hidroxiapatite β-TCP Colagénio em pó PMO	Células da MO CM, GV, e plaquetas CM e plaquetas	4-9, 14, 15, 22, 30, 113
	Regeneração do osso alveolar para fendas alveolares	Aspiração de medula óssea Concentração celular Preparação de composto Enchimento da fenda alveolar	Reconstrução da fenda labial		Células da MO e plaquetas	19, 21
	Tratamento de quisto ósseo	Aspiração de medula óssea Preparação de composto (mistura do gel da matriz óssea desmineralizada e aspirado de medula óssea) Preenchimento de quisto ósseo	Impedimento da expansão do quisto Ossificação do quisto	Células da MO	10, 11	
	Osteonecrose	Aspiração de medula óssea Concentração celular Descompressão do núcleo Preparação de composto Enchimento de defeito com material enxertado	Redução da dor Atraso na progressão da doença Regressão da lesão necrótica	Células da MO CM	23, 25-29	
	Artrodese da coluna	Aspiração de medula óssea Concentração celular Preparação de composto Fixação vertebral Transplantação do composto	Artrodese da coluna bem-sucedida	Células da MO	17, 18, 20, 114	

Abreviaturas: β-TCP, beta-fosfato tricálcico; MO, medula óssea; PMO, proteína morfogenética óssea; CM, célula mononuclear; GV, glóbulo vermelho.

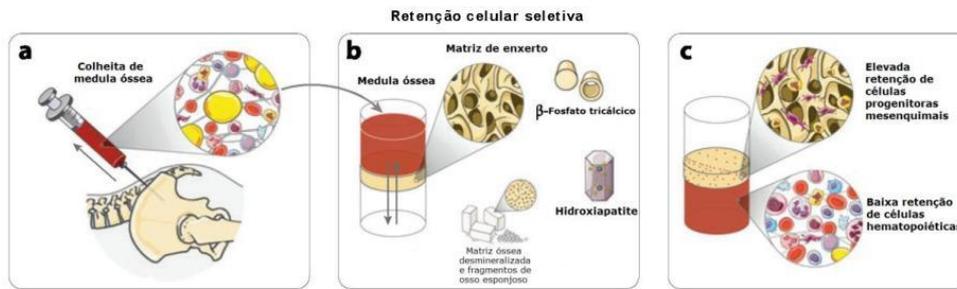


Figura 2

Retenção celular seletiva. Após a colheita, (a) a medula óssea é passada através (b) de uma matriz de enxerto implantável. Este processo possibilita a exposição da matriz a um volume elevado de medula óssea num curto período de tempo. O processo é repetido até ser atingida a saturação do enxerto. Vários materiais porosos podem ser usados como matriz de enxerto, e.g., matriz óssea desmineralizada, fragmentos de osso esponjoso, hidroxiapatite, e β -fosfato tricálcico. Uma fração maior de células progenitoras mesenquimais é retida no enxerto, enquanto que a retenção de células hematopoiéticas é significativamente menor (c). Após o enriquecimento, o enxerto está pronto a ser implantado, apesar de alguns procedimentos pós-processamento como adição de medula óssea integral ou plasma rico em plaquetas poderem ser efetuados de maneira a melhorar as propriedades de manuseamento do enxerto e aumentar o seu potencial terapêutico. A figura foi elaborada utilizando Servier Medical Art (<http://www.servier.com/servier-medical-art>).

deveriam apresentar propriedades químicas e físicas de superfície que promovam a adesão e migração de células osteogênicas e osteoindutores (i.e., deveriam estimular a diferenciação osteogênica). O β -Fosfato Tricálcico (β -TCP), outro material que tem sido extensivamente estudado como um suporte para a engenharia de tecido de osso, foi também avaliado como matriz para as definições de terapia intraoperatória com células estaminais—nomeadamente, para regeneração do osso alveolar, fenda alveolar e também para artrodese da coluna (19–21). Ensaios *in vitro* mostraram que as CEM podem aderir à estrutura porosa do β -TCP em até 2 h de combinação e podem sustentar a proliferação celular, fazendo delas bons candidatos a aplicações intraoperatórias (20). A eficácia da RCS foi também testada usando uma mistura de osso desmineralizado e fragmentos esponjosos coagulados com plasma rico em plaquetas num modelo canino com defeito segmentar de tamanho crítico no fêmur (22). Às 16 semanas, uma resposta a 100% foi obtida, o que equivale aos resultados do método de autoenxerto padrão para a reparação de defeitos de tamanho crítico. Um relatório clínico preliminar descreve os resultados a curto prazo (2 anos) da abordagem intraoperatória para o tratamento de três pacientes com osteonecrose secundária extensiva dos côndilos femorais (23). Este tratamento, que combinou a descompressão e desbridamento da lesão necrótica e o sistema comercial RCS, facilitou a recuperação da função do joelho. O sistema RCS foi introduzido em 2003 com o nome Collect[®] pela DePuy Biologics (uma companhia Johnson & Johnson), em combinação com substitutos de enxerto ósseo, como uma terapia minimamente invasiva para a artrodese da coluna, que eliminou a necessidade da colheita de enxerto ósseo. De modo geral, o sistema RCS mostra resultados que são clinicamente comparáveis aos dos autoenxertos ósseos, sem a morbidade observada no local do enxerto. Entre os desafios colocados por esta tecnologia estão: uma falta de controlo sobre as células transplantadas (este desafio aplica-se à maioria das terapias celulares exógenas) e a dificuldade em obter as quantidades de células que podem ser alcançadas através da expansão de cultura *in vitro* (24).

Para além do sistema Collect são usados vários processadores de células sanguíneas automatizados, para concentração intraoperatória de sangue ou medula óssea, para tratar, por exemplo, osteonecrose da cabeça femoral (25–28). Estes estudos seguem protocolos cirúrgicos semelhantes aos do sistema RCS, descritos em pormenor no artigo de Hermigou et al. (29). Em resumo, a medula óssea é colhida com o paciente sob anestesia geral e a medula óssea aspirada é concentrada e injetada na cabeça femoral após a descompressão do núcleo. O tratamento cirúrgico foi considerado seguro e eficaz para quadris sintomáticos com osteonecrose mas sem colapso (o sucesso clínico cai

de 90% para menos de 50% quando o procedimento é efetuado após o colapso da articulação). Depois de um tratamento bem-sucedido, os pacientes apresentaram diminuição da dor e outros sintomas relacionados com as articulações, progressão retardada da doença, e regressão da lesão necrótica.

É importante notar que os implantes osteocondutores e osteoindutores, que contêm agentes terapêuticos sem uma fonte celular exógena, podem promover com êxito a formação de osso novo para o tratamento de fraturas e para procedimentos de artrodese da coluna. Por exemplo, o produto OP-1TM, recentemente adquirido à Stryker pela Olympus Biotech Corporation, é um material de enxerto ósseo osteocondutor e osteoindutor, que inclui a proteína morfogénica óssea recombinante-7 (rhBMP-7) e colagénio de origem bovina tipo I, utilizado já em cerca de 40.000 pacientes. O produto foi aprovado pela US Food and Drug Administration, em 2001, para a revisão da artrodese da coluna, lombar pósterio-lateral, e para o tratamento de uma não-união óssea longa; está também aprovada na Austrália, Canadá, Suíça, e na União Europeia. O produto é preparado na sala de operações, combinando colagénio e BMP-7 em pó com salina estéril, e acredita-se ativar e recrutar células progenitoras e estaminais aquando da implantação. Um mecanismo similar tem sido proposto para proteína morfogénica óssea-2 (BMP-2), que é fornecida através de uma esponja de colagénio no enxerto ósseo Infuse® (Medtronic), que foi aprovado pela primeira vez em 2002 para uso na cirurgia de artrodese lombar anterior, em pacientes com esqueleto adulto. Curiosamente, alguns estudos têm examinado melhorias nessas estratégias através da adição intraoperatória de medula óssea integral autóloga. Por exemplo, através do uso de um modelo femoral canino defeituoso (30), foi examinada a aplicação de um material osteoindutor (OP-1) com medula óssea. Apesar da adição de medula óssea ter promovido uma maior formação de osso no centro do defeito, não foram, no geral, observadas diferenças funcionais entre o grupo com implante OP-1 e adição de aspirado de medula óssea, e o grupo de controlo com o implante OP-1 e adição de sangue coagulado. Talvez os resultados tivessem sido diferentes, tivessem sido utilizadas populações de células seletivas no lugar de medula óssea integral. A medula óssea integral, sem concentração prévia pode promover a hipóxia e privação de nutrientes no defeito, uma vez que a medula óssea é metabolicamente exigente devido ao seu alto teor celular. Por isso, pode ser interessante analisar a adição de células progenitoras concentradas ao OP-1 ou ao enxerto ósseo Infuse. Para além disso, a terapia fator de crescimento, como por exemplo a BMP-2 recombinante, está sob grande escrutínio, dada a recente análise que mostra que os riscos de efeitos adversos, incluindo o risco de formação óssea ectópica, osteólise, dor, nova malignidade, deslocamento do implante, subsidência, infeção, eventos urogenitais, e ejaculação retrógrada, são 10– 50 vezes maiores que as estimativas originais (31). Estes riscos podem alterar as futuras estratégias de regeneração óssea para aquelas que não requerem a adição de fatores de crescimento recombinantes.

Osteocondrogénese

As grandes lesões osteocondrais não se reparam espontaneamente; portanto, são necessárias intervenções para devolver estrutura e função às cartilagens. Foram desenvolvidas abordagens intraoperatórias para reparação osteocondral, para evitar a necessidade de duas cirurgias (associadas com estratégias de expansão celular) e para enfrentar desafios colocados pela expansão dos condrócitos, que limitaram o potencial regenerativo. Num exemplo, as células mononucleares derivadas de medula óssea, colhidas e separadas intraoperatóriamente foram misturadas com gel de fibrina autólogo e aplicadas por injeção para estimular a regeneração condral dentro de um modelo de coelho com um defeito de espessura total de cartilagem (32). O tratamento com células mononucleares autólogas derivadas de medula óssea promoveu uma maior reparação da cartilagem, comparativamente ao tratamento com células mononucleares derivadas de sangue periférico autólogo misturadas com gel de fibrina autólogo, ou com apenas gel de fibrina. Curiosamente, apesar de vários estudos terem mostrado que o gel de fibrina tem potencial como suporte para cartilagem, os resultados obtidos exclusivamente com o gel de fibrina foram inferiores aos da reparação obtida sem tratamento. É fundamental ter em conta que a composição da fibrina pode afetar drasticamente a invasão celular, por células endógenas, e a formação óssea.

Recentemente, Giannini et al. (33) desenvolveu uma técnica de reparação artroscópica de apenas um passo, utilizando células derivadas da medula óssea para reparar lesões osteocondrais talares, e validou a aplicação deste procedimento para as lesões osteocondrais do joelho (34). O procedimento cirúrgico começa com a aspiração de medula óssea, com o paciente sob anestesia geral ou espinal. Após a colheita de medula óssea, a camada leuco-plaquetária é concentrada utilizando o sistema SmartPreP BMAC™ da Harvest Technologies. Em paralelo, os cirurgiões começam a artroplastia, que inclui o desbridamento da lesão, a preparação de compostos (misturando a camada leuco-plaquetária com colagénio em pó, ou combinando-a com uma membrana de ácido hialurónico) e a sua aplicação, assim como a estabilização dos compostos utilizando um gel de fibrina autólogo rico em plaquetas. Os pacientes apresentaram melhorias na função das articulações, com uma integração satisfatória do enxerto e graus variáveis de remodelagem dos tecidos, como indicado pela presença de proteoglicanos e colagénio tipo II, marcadores de cartilagem hialina. No entanto, no fim do período de acompanhamento (24 meses após a cirurgia), a avaliação histológica não revelou cartilagem hialina completa. O curto período de acompanhamento, o pequeno número de pacientes (48 para o tornozelo e 20 para o joelho), e o número limitado de amostras de biópsia, limitam as conclusões que podem ser tiradas destes estudos. Contudo, estes estudos representam um passo na direção da regeneração osteocondral, utilizando abordagens celulares intraoperatórias.

Um outro procedimento cirúrgico de apenas uma fase para o tratamento de lesões osteocondrais, proposto por Benthien & Behrens (35–37), é denominado de Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC®), revisto por Steinwachs et al. (38). Este combina microfraturas subcondrais com a fixação de uma membrana de colagénio tipo I/III com cola de fibrina ou sutura. Para aumentar o número de células estaminais no defeito osteocondral, a técnica AMIC padrão (que se apoia no recrutamento de CEM estimuladas através microfratura) foi combinada com a aplicação intraoperatória de concentrado de medula óssea (39). O procedimento cirúrgico combinado engloba a colheita de medula óssea, concentração de medula óssea, utilizando o kit de concentração da Biomet MarrowStim™, desbridamento da lesão, uma microfratura, preparação de uma membrana de colagénio, colocação do concentrado de medula óssea, e estabilização da membrana com cola de fibrina. Apesar da adição de medula óssea não ter sido conclusivamente comprovada como vantajosa, foi observado um maior número de CEM na medula óssea da crista ilíaca, comparativamente aos números no sangue induzidos pelo procedimento da microfratura. A reparação de cartilagem de lesões osteocondrais pode estar relacionada com a sobrevivência de um pequeno número de células progenitoras que foram aplicadas no defeito, promovendo o processo de regeneração numa fase inicial. Esta hipótese é apoiada pela prova da sobrevivência de CEM derivadas de medula óssea, até 24 semanas depois da transplantação para o defeito osteocondral (40). Apesar das técnicas de estimulação de medula óssea, como a microfratura, poderem aumentar o nível local de citocinas que promovem a reparação da cartilagem, e podem induzir a migração das células progenitoras para a lesão, as células progenitoras derivadas de uma microfratura são insuficientes para induzir a formação de cartilagem hialina por si só. Por isso, a aplicação de células intraoperatóriamente isoladas pode ser importante para o aumento do número de células relevantes no defeito e aumentar as hipóteses de sobrevivência.

Angiogénese

A Doença Vascular Periférica (DVP) resulta normalmente numa redução ou bloqueio do fluxo sanguíneo nas extremidades inferiores, o que pode levar à isquemia crítica de membros, que está associada a dor em repouso e necrose dos tecidos (úlceras ou gangrena). Para alguns pacientes, a revascularização é necessária para restabelecer a perfusão tecidual. Contudo, uma intervenção direta para restabelecer o fluxo sanguíneo (e.g., através de cirurgia de bypass), nem sempre é uma opção, uma vez que os bloqueios se localizam em pequenas artérias distais. Por essa razão, os tratamentos que promovem a angiogénese tornaram-se a principal terapia para estes pacientes. Uma extensiva revisão sobre a angiogénese terapêutica para DPV, através da utilização de transplantação de células da medula óssea autólogas, pode ser encontrada no artigo escrito por Matoba & Matsubara (41). A aplicação terapêutica das células de medula óssea mononucleares, colhidas e separadas intraoperatóriamente, para o tratamento de

pacientes com isquemia crítica de membros, foi relatada pela primeira vez em 2002 (42). Este estudo piloto foi motivado por provas que indicam que as células de medula óssea mononucleares poderiam suportar a formação de vasos sanguíneos colaterais em modelos animais (43, 44). Os pacientes com isquemia bilateral da perna receberam uma injeção intramuscular de células de medula óssea mononucleares, isoladas e separadas intraoperatóriamente (colhidas da crista íliaca), numa perna, e células de sangue periférico mononucleares na outra perna, como controlo. O índice tomazelo-braço (a proporção entre a pressão sanguínea no tomazelo e a pressão sanguínea no braço), dor em repouso, pressão do oxigénio transcutâneo, e ausência de dor em períodos de movimento, foram significativamente melhorados nas pernas injetadas com células mononucleares de medula óssea. Estes resultados foram validados por estudos adicionais e incluíram também medidas de avaliação adicionais, de entre as quais, o aumento da perfusão do fluxo sanguíneo através da cintilografia de perfusão, determinação da melhoria da disfunção endotelial, avaliação de cicatrização de ferida, e exame de acompanhamento de melhoria em sintomas e função clínica (45–54). Além disso, a implantação de células mononucleares intraoperatórias derivadas de medula óssea nos membros isquémicos, contribuiu significativamente para a redução dos números de grandes amputações (42, 45, 47–53). Um outro relatório descreve um estudo similar, que utiliza o fator estimulador de colónias de granulócitos, administrado em cada um dos cinco dias anteriores à operação, para a mobilização de células mononucleares do sangue periférico (55). A injeção intramuscular distal da camada leuco-plaquetária de medula óssea, foi também proposta como tratamento celular intraoperatório complementar, a ser executada em combinação com a cirurgia de bypass e/ou tratamento intervencional (56). Apesar de muitas terapias baseadas em células que promovem a angiogénese envolverem uma infusão de células mononucleares não fracionadas, que contêm células progenitoras e estaminais com a capacidade de se diferenciarem em múltiplas linhagens, a diferenciação endotelial parece ser favorecida (43,44).

Ainda que a injeção intramuscular seja a principal via de aplicação de células para a terapia DVP, algumas das estratégias de aplicação de células combinam a injeção intramuscular e a injeção intra-arterial. Esta combinação permite às células estaminais atingir as artérias selecionadas, aumentando assim a concentração de células estaminais nas regiões musculares isquémicas, que são ainda perfundidas (48, 56).

Um sistema totalmente automatizado (o Tissue Genesis Cell Isolation System™) para isolar células estaminais de tecido adiposo autólogo, colhidas por lipoaspiração, está a ser explorado em testes a decorrer numa fase inicial, para o tratamento de DVP (57). Depois do tecido ser processado na sala de operações, as células estaminais obtidas são implantadas na superfície interior dos enxertos protéticos padrão, para promover a endotelialização do enxerto, e evitar a formação de coágulos. Os primeiros pacientes tratados com este método, recuperaram a sensibilidade na perna e nos dedos e começaram a caminhar sem dor debilitante (58).

Aplicações Cardíacas

É fundamental considerar a terapia intraoperatória com células estaminais para o tratamento da isquemia do miocárdio, com base no potencial que as células transplantadas têm de inibir a apoptose e a formação de cicatrizes, de promover a remodelagem de tecido conjuntivo e a produção de matriz extracelular, de desencadear a instalação de células estaminais endógenas, de modular a inflamação, e de promover a angiogénese com a esperança de regenerar tecido miocárdico saudável. A administração intraoperatória de células da medula óssea, via injeção intramiocárdica ou intracoronária, tem sido aplicada no seguimento de uma cirurgia de bypass coronário (CABG), por exemplo, para aumentar a angiogénese e a reparação do miocárdio. Esta técnica pode ser complementada com a aplicação de cola de fibrina autóloga imediatamente após a injeção celular, para evitar a perda de células devido a regurgitação (59). Apesar da maioria dos ensaios clínicos que combinam a CABG e a transplantação autóloga de células estaminais terem utilizado células mononucleares derivadas de medula óssea integral (59–63), outros estudos utilizaram células CD133+ separadas através de sistemas imunomagnéticos de separação celular (64–66). Foi também proposto um método intraoperatório para isolar células CD34+ derivadas de medula óssea para terapia cardíaca: Este, envolve a rápida redução dos eritrócitos, através da utilização de hidroxietilamido e centrifugação de baixa velocidade, seguida de

separação imunomagnética de células CD34⁺ (67). Em geral, o isolamento e aplicação intraoperatória de células promoveram a revascularização, resultando numa maior perfusão miocárdica e contractilidade das áreas de enfarte, levando a melhorias na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (59, 65). Apesar da injeção de CEM derivadas de medula óssea nas áreas de peri-enfarte poder aumentar a contractilidade, e apesar da injeção de células na zona central do enfarte do miocárdio poder promover a angiogênese, a diferenciação miogénica, e a remodelagem isquémica inversa (68), a administração de células derivadas de medula óssea diretamente no miocárdio com cicatriz não viável, não aparenta melhorar a contractilidade (62, 68). Por isso, quando considerando a estratégia de aplicação de células para a regeneração de tecido cardíaco danificado, pode ser importante ter em conta vários locais de injeção, incluindo as áreas peri-enfarte viáveis e a área central do enfarte do miocárdio (68).

MECANISMOS REGENERATIVOS

Entender os mecanismos mediadores dos efeitos terapêuticos das terapias intraoperatórias com células estaminais é uma tarefa gigantesca, e a informação atual é insuficiente para chegar a conclusões significativas. Este facto não surpreende, dado que a maioria dos estudos acerca de células estaminais intraoperatórias se focam na avaliação da segurança e viabilidade, portanto, na sua maioria, negligenciam a investigação dos mecanismos responsáveis pelos resultados observados. Entre os potenciais mecanismos estão: (a) as células progenitoras ou estaminais dentro do transplante repõem as células progenitoras no hospedeiro; (b) as células no transplante diferenciam-se e produzem tecido novo; (c) as células sobreviventes (ou a morrer) transplantadas segregam fatores tróficos, angiogénicos, ou imunomodulatórios que fornecem sinais às células locais endógenas via sinalização parácrina ou para células distantes através de mecanismos endócrinos (o que pode resultar na mobilização e instalação de células hospedeiras distantes). Também é possível que as células transplantadas se possam fundir com as células hospedeiras (num processo conhecido como fusão celular). A elucidação dos mecanismos mediadores das melhorias funcionais é complicado pela composição heterogénea de muitas das populações celulares infundidas intraoperatóriamente (e.g., medula óssea), onde certos tipos de células podem desempenhar um papel preponderante ou múltiplos de células podem trabalhar em conjunto sinergicamente. Especificamente, dado que muitas abordagens de terapia celular intraoperatória empregam populações celulares heterogéneas, que podem incluir células progenitoras ou estaminais, é possível que os resultados positivos não sejam mediados pelas células progenitoras ou estaminais. Além disso, dado que as células são isoladas e processadas dentro da sala de operações, há uma provável diversidade considerável na forma como as células são obtidas, processadas, e infundidas (apesar dos esforços feitos para normalizar os procedimentos com kits e dispositivos bem desenhados), e esta diversidade pode afetar o modo de ação e os resultados. Para além disso, não se deve esquecer que as terapias celulares intraoperatórias envolvem forçosamente o isolamento de uma fonte celular autóloga; assim, podem existir diferenças significativas no número relativo de células e fenótipos que podem ser resultado da idade, sexo, raça, índice de massa corporal, ascendência/genética, dieta, e meio. O mecanismo provavelmente também depende da aplicação específica (e.g., osteogénese vs. angiogénese vs. redução de formação de cicatriz) e método de aplicação (e.g., injeção local, infusão sistémica, ou aplicação em combinação com um biomaterial). Assim, muitas questões permanecem sem resposta, e as novas técnicas vão provavelmente ser necessárias para elucidar a biologia in vivo no que diz respeito à forma como as células transplantadas articulam as respostas terapêuticas (69). Também é provável que as estratégias para o controlo do destino e função das células após a transplantação [e.g., através da engenharia de células exógenas dentro da sala de operações (70)], venham a proporcionar um eixo para maximizar o efeito terapêutico, aproveitando mecanismos específicos. Estas estratégias deverão ajudar a limitar a variabilidade da resposta.

FONTES CELULARES

As células estaminais e progenitoras adultas podem ser colhidas intraoperatóriamente de vários tecidos, incluindo medula óssea, tecido adiposo, e sangue periférico. A medula óssea é a fonte mais comum, muito

provavelmente porque é de fácil e rápido acesso, e porque existem várias ferramentas para colher medula (a partir de transplante de medula óssea). A medula óssea contém células hematopoiéticas e mesenquimais, para além de outros tipos de células que podem desempenhar um papel na regeneração de tecidos. Contudo, uma das limitações das abordagens das terapias intraoperatórias com células estaminais é a quantidade limitada de material fonte colhido e a baixa produção de protocolos de isolamento celular, que normalmente produzem células estaminais a uma frequência por célula mononucleada de 1 em 10.000 para 1 até 100.000 (71–74). Para contornar estes desafios e para evitar o procedimento altamente invasivo que é a colheita de medula óssea, que causa dor no local da aspiração, devem ser tidas em consideração fontes alternativas das quais isolar células estaminais autólogas. Por exemplo, o pó de osso, normalmente eliminado por ser considerado um resíduo na artrodese da coluna, provou ser uma fonte de células estaminais (75). O tecido adiposo é uma promissora fonte alternativa de células que possuem potencial de diferenciação em multilinhagens, e pode ser colhido através de um método menos invasivo e em maiores quantidades que a medula óssea, com morbidade mínima após a colheita (76).

Vários estudos estabeleceram uma análise comparativa entre células estaminais derivadas de diferentes fontes (76–79). O estudo desenvolvido por Peng et al. (76) incluiu análises imunofenotípicas de células estaminais isoladas de medula óssea de rato e tecido adiposo, e revelou uma maior percentagem de células CD44+, CD73+ e CD90+ no tecido adiposo. Para além disso, é sugerida uma maior capacidade de proliferação em células isoladas do tecido adiposo, por uma maior e mais constante taxa de crescimento ao longo de 10 gerações, um menor tempo de duplicação da população, a maior proporção de populações celulares na fase S, e uma maior atividade de telomerase. Estes resultados são apoiados por outros estudos publicados que se centram na avaliação de diferentes fontes de células estaminais adultas (77, 79). O tecido adiposo pode ser considerado como uma boa alternativa à medula óssea para aplicações intraoperatórias em termos de abundância de células estaminais, frequência, e potencial de expansão. Apesar de alguns pacientes poderem possuir tecido adiposo limitado para o cenário autólogo, devido à elevada frequência de CEM derivadas de tecido adiposo (a sua ocorrência é 100 a 300 vezes maior na medula óssea, e o número de células estaminais que podem ser isoladas por volume de lipoaspiração, é aproximadamente 10 vezes maior que a partir da medula óssea), pequenos reservatórios de tecido adiposo podem ser suficientes para o isolamento de células estaminais (77, 80–82). O número de células estaminais necessárias também depende da aplicação clínica. Por exemplo, células estaminais derivadas de tecido adiposo recentemente isoladas da almofada de gordura infrapatelar, são adequadas para um procedimento de uma só etapa para regenerar pequenos defeitos focais da cartilagem; contudo, para defeitos osteocondrais maiores, é recomendado o uso de tecido adiposo subcutâneo (83). Aquando da colheita de tecido adiposo para terapia intraoperatória com células estaminais, deve ter-se em conta que o local de colheita de tecido e o procedimento cirúrgico, têm um efeito sobre a produção de células estaminais. Por exemplo, a colheita de tecido adiposo do abdómen através de ressecção ou lipoaspiração tumescente produz mais células estaminais comparativamente com a lipoaspiração assistida por ultrassom e o tecido adiposo colhido da região da anca/coxa (81, 84). Na revisão feita por Hoogendoorn et al. (85) acerca do estado dos tratamentos baseados em células para a regeneração do disco intervertebral, os autores propõem um conceito para um procedimento de uma só etapa através da utilização de células estaminais derivadas de tecido adiposo, para o tratamento regenerativo de discos intervertebrais ligeiramente degenerados e para artrodese da coluna de uma degeneração severa do disco intervertebral. O tecido adiposo deve ser colhido através de técnicas minimamente invasivas e deve ser processado por meio de digestão enzimática e enriquecimento por centrifugação para obter células estaminais num só procedimento cirúrgico, que dure menos de 2 h. Para artrodese da coluna, os autores sugerem o desencadeamento *ex vivo* de osteogénese a curto prazo, através da exposição por 15 min a BMP-2 (86), misturando as células estaminais com um suporte poroso de fosfato de cálcio, e implantando uma caixa bioabsorvível preenchida pelo suporte inoculado com células estaminais acionadas. Este procedimento de uma só etapa para artrodese da coluna é descrito em detalhe noutro documento (87). Para o tratamento regenerativo do disco intervertebral ligeiramente degenerado, as células estaminais derivadas de tecido adiposo, após isolamento celular, podem ser transplantadas por injeção para o disco intervertebral após o apropriado desencadeamento celular *ex vivo*, e introdução de célula portadora. Relatos de casos e ensaios clínicos da 1ª à 2ª fases com utilização de

células estaminais derivadas de tecido adiposo autólogo, numa variedade de campos, são revistos e discutidos por Gimble et al. (88).

POTENCIAIS FUNÇÕES DE PRODUTOS CELULARES PROCESSADOS E TRANSPLANTADOS INTRAOPERATORIAMENTE

Dado que muitas abordagens de terapia celular intraoperatória tiram partido das populações celulares heterogêneas contidas na medula óssea, permanece a controvérsia acerca das subpopulações responsáveis pelos diferentes mecanismos de regeneração e acerca do papel das células transplantadas versus células endógenas. A maioria das terapias celulares intraoperatórias usadas para promover a angiogênese para os pacientes com DVP, utilizam a infusão de células mononucleares não fracionadas, e alguns autores sugerem que o efeito sinérgico de diferentes populações celulares na promoção da angiogênese na DVP parece envolver células CD34+ derivadas de medula óssea, que expressam recetores para o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e angiopoietina-2. Estes autores também sugerem que a fração de CD34- é responsável pela secreção dos fatores angiogénicos (bFGF e VEGF) e angiopoietina-2, que estimulam as células CD34+ a formar artérias colaterais e promovem a maturação e manutenção das artérias recém formadas (42, 45). A camada leuco-plaquetária contém elevados números de células CD34+ e CD133+, um subconjunto significativo do qual também coexpressa o recetor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR-2), e células CD34+CD133+VEGFR-2+ foram definidas por Peichev et al. (89), como células progenitoras endoteliais funcionais. Contudo, Case et al. (90) defende que a fração de CD34+ de células mononucleares (derivadas de sangue periférico mobilizado com fator estimulador de colónias de granulócitos e sangue do cordão umbilical) que também coexpressa CD133 e VEGFR é positivo para CD45 (>99%). Os autores também afirmam que esta fração de células (CD34+CD45+), é uma subpopulação hematopoética primitiva distinta, contrariamente à população de células progenitoras endoteliais, e por isso mesmo não pode formar novos vasos sanguíneos. Contudo, a fração de células CD34+CD45- foi enriquecida com células endoteliais formadoras de colónias. Esta descoberta ilustra a importância de definir com precisão o potencial biológico das diferentes subpopulações de células estaminais para conceber terapias com células estaminais mais eficientes.

A promoção de angiogênese, por injeção de células derivadas de medula óssea em áreas de isquemia do miocárdio, parece desempenhar um papel fundamental no melhoramento do desempenho cardíaco regional. A injeção de células mononucleares derivadas de medula óssea contribui para a melhoria da perfusão miocárdica, devido a um aumento da densidade dos microvasos do miocárdio. O melhoramento da perfusão do miocárdio parece estar positivamente correlacionado com o número de células CD34+ transplantadas (60). A maioria dos estudos não consegue demonstrar evidências diretas do destino das células após transplantação. Por exemplo, não há indícios que os efeitos terapêuticos possam ser atribuídos à diferenciação das células transplantadas em cardiomiócitos. Num estudo realizado por Ang et al. (62), as células mononucleares derivadas de medula óssea, foram injetadas num miocárdio com cicatriz para prevenir os efeitos de melhoramento de função num miocárdio viável após revascularização. Por isso, a avaliação funcional focou-se apenas na revascularização de um miocárdio não viável com cicatriz crónica. Deste modo, qualquer alteração na função não poderia ser atribuída às diferenças na perfusão. A injeção de células derivadas de medula óssea não melhorou a função de contractilidade, o que sugere que as células derivadas de medula óssea não contribuem para a regeneração miocárdica. No entanto, estes resultados não deveriam ser extrapolados para outros contextos clínicos, como enfarte agudo do miocárdio ou miocárdio isquémico mas viável. A ausência de regeneração do miocárdio pode dever-se ao fracasso do enxerto de células em tecido não viável com cicatriz crónica.

Várias terapias celulares osteogénicas intraoperatórias envolvem também a aplicação de células de medula óssea não fracionadas ou células mononucleares derivadas de medula óssea. Por contraste, a RCS é baseada no princípio de que os progenitores de tecido conjuntivo são retidos no composto do enxerto com

significativamente maior frequência que outras células derivadas de medula óssea. Os progenitores de tecido conjuntivo são definidos por unidades formadoras de colônias, que expressam fosfatase alcalina (73, 74, 91). Para além da expressão de fosfatase alcalina, os progenitores de tecido conjuntivo podem ser identificados através de outros marcadores tais como STRO-1(92) e molécula de adesão de células leucocitárias activa (93). Apesar dos progenitores de tecido conjuntivo serem uma escolha óbvia para aplicações osteogénicas, outros tipos celulares selecionados e citocinas desempenham um papel fundamental no estabelecimento de condições ótimas para a regeneração óssea. Por isso, as terapias celulares intraoperatórias para aplicações osteocondrogénicas também incluem a aplicação de citocinas relevantes para a regeneração do tecido, que pode ser alcançada através de produtos de plaquetas autólogos. A aplicação de produtos de plaquetas, tais como plasma rico em plaquetas ou gel de fibrina rico em plaquetas, contribui para a estimulação de células progenitoras, e estes produtos de plaquetas atuam como quimioatratantes devido à libertação de fatores de crescimento pelos grânulos α , incluindo PDGF, TGF- β 1, TGF- β 2, EGF derivado de plaquetas, VEGF, fator de crescimento semelhante à insulina 1, e fator plaquetário 4 (94–97). Além disso, o plasma rico em plaquetas, em combinação com trombina, também aumenta as propriedades de manuseamento dos enxertos finais para aplicações osteogénicas devido ao seu efeito coagulante (22).

MÉTODOS UTILIZADOS PARA ISOLAR OU CONCENTRAR PRODUTOS CELULARES INTRAOPERATÓRIAMENTE

As terapias celulares intraoperatórias, atuais e propostas, incluem a aplicação de células mononucleares derivadas de medula óssea, de células progenitoras mesenquimais e endoteliais derivadas da medula óssea ou do tecido adiposo, da população celular da medula óssea integral, e do plasma rico em plaquetas. Estas populações/produtos celulares podem ser obtidos intraoperatóriamente através de vários métodos, resumidos na **Tabela 2**: gradiente de densidade, processador automático de células, seleção de células de base imunológica, e RCS.

O método mais tradicional para se obterem células mononucleares é o do gradiente de densidade. Para otimizar o isolamento celular, são utilizadas estratégias complementares, tais como a lise dos glóbulos vermelhos e sedimentação de dextrano (98), mas o nível de produção extremamente baixo continua a ser uma limitação, e impede o desenvolvimento de abordagens intraoperatórias. Para além disso, durante os processos de separação por gradiente de densidade, as células são expostas a potenciais agentes tóxicos e requerem a utilização de um centrifugador. O plasma rico em plaquetas autólogo pode também ser processado a partir do sangue periférico ou a partir da medula óssea, utilizando as técnicas de gradiente de densidade, que representam um método seguro e rentável de obter fatores de crescimento (21). As propriedades de manuseamento do plasma rico em plaquetas podem ser melhoradas se este for transformado num gel de plaquetas, através da incorporação de concentrado de plaquetas numa rede de fibrina polimerizada. Vários produtos disponíveis no mercado servem este propósito, como é o caso do Platelex® e Vivostat PRF® (99, 100).

Os processadores de células automatizados, executam a lavagem e digestão do tecido, concentração da camada leuco-plaquetária, com ou sem o agente de sedimentação como hidroxietilamido, redução de volume através da diminuição do plasma, e processamento de plasma rico em plaquetas, e têm sido utilizados em ambientes intraoperatórios para o processamento de células da medula óssea, sangue periférico, e tecido adiposo. Os processadores de células automatizados proporcionam o benefício de uma rentabilidade e eficiência operacional superior, reduzido risco de contaminação, e padronização dos protocolos de processamento de células.

A seleção celular de base imunológica, através da seleção magneticamente ativada, é utilizada para isolar subpopulações de células específicas, com base nos seus antígenos de superfície, tais como células CD34+ ou CD133+ para aplicações angiogénicas (64, 66, 67,101). A seleção celular de base imunológica está limitada a subpopulações de células homogêneas que têm um painel de marcadores bem definido. Contudo, a utilização de populações de células estaminais altamente homogêneas em abordagens intraoperatórias pode impedir uma regeneração eficiente. A prova experimental apoia a ideia de um balanço delicado e complexo entre diferentes mecanismos putativos. Apesar das populações de células estaminais altamente homogêneas permitirem o desenvolvimento de uma

Tabela 2. Métodos para isolar/concentrar populações celulares utilizados em ambientes intraoperatórios e produtos comerciais relacionados

Método	Breve descrição	Produto, empresa	Referência(s): Método	Referência(s): Intraoperatório
Retenção celular seletiva	Utilização de produtos de enxerto ósseo para reter seletivamente células progenitoras da medula óssea integral ou outros produtos do sangue, aumentando a concentração celular que será aplicada. Os produtos de enxerto ósseo são carregados para uma seringa, e a medula óssea é passada várias vezes pelas das amostras de matriz através de um fluxo lento.	Cellect®, DePuy	115	17, 18, 20, 22, 23
Seleção celular de base imunológica	Seleção celular de base imunológica, através da seleção celular magneticamente ativada, é utilizada para isolar células específicas com base nos seus antígenos de superfície (64, 66, 67, 101), incluindo a seleção positiva de uma população celular alvo ou seleção negativa através da remoção das populações celulares indesejadas.	CliniMACS®, Miltenyi Biotec Isolex®, Baxter	–	64, 66, 101, 67
Gradiente de densidade	A separação celular pode ser alcançada em função das diferenças de densidade e tamanho das diferentes populações celulares. Isto pode ser alcançado através de centrifugação simples, protocolos de centrifugação otimizada, e centrifugação com um meio de densidade. A população celular recuperada, depende do meio de densidade, protocolo de centrifugação, e fração colhida. Alguns aparelhos foram desenvolvidos para melhorar o manuseamento da medula óssea e outros produtos do sangue, tais como plasma rico em plaquetas, através de protocolos de isolamento celular para gradiente de densidade, de modo a evitar a contaminação e fornecer resultados mais consistentes.	Meio de densidade: Ficoll-Paque™ e Percoll™, GE Healthcare LymphoPrep™, Axis-Shield, Dispositivos: GenesisCS, EmCyte Corporation MarrowStim™ Concentration Kit, Biomet SmartPREP, Harvest Technologies	98 – – – – 116 –	14, 19, 21, 50, 52, 54, 61, 62 – – – – 48 39 33, 34, 52, 56
Processador automatizado de sangue	Os produtos celulares são separados do sangue e seus derivados, utilizando unidades fechadas e completamente automatizadas, com base no princípio de gradiente de densidade.	CS-3000 Plus Blood Cell Separator, Baxter Sepax®, Biosafe COBE®, CardianBCT AS blood cell separator, Fresenius	117–119 117–120 – –	42 56 15, 20, 26–29, 55, 63, 113 50, 51

técnica de terapia mais controlada e definida, descartar outros componentes celulares pode perturbar o equilíbrio entre os importantes processos de regeneração que envolvem diferentes tipos de células e sinalização trófica relacionada. O isolamento de células progenitoras mesenquimais pelo método de base imunológica, é limitado pelo facto de que o perfil antigénico exibido por estas células não ser único. Assim, as células progenitoras mesenquimais não podem ser associadas a um tipo de fenótipo celular em particular, e não há consenso em relação a que anticorpos usar para os isolar. As estratégias focadas em métodos para atingir o isolamento de populações celulares relevantes numa só etapa, são cruciais para o sucesso das terapias intraoperatórias com células estaminais.

No campo da ortopedia, foram elaborados protocolos baseados na tecnologia RCS, em substratos apropriados que promovam a fixação rápida das células progenitoras de tecido conjuntivo. Substratos como enxerto de osso esponjoso, hidroxiapatite porosa, e microesferas de fibrina, são usados para concentrar e reter seletivamente células progenitoras mesenquimais da medula óssea integral (17, 18, 20, 22, 102). Contudo, em alguns casos, o espaço de tempo do isolamento não está em sintonia com os requerimentos intraoperatórios, e os materiais usados até à data não são os ideais, uma vez que são significativamente limitados no que diz respeito às suas propriedades mecânicas, disponibilidade, e risco de transmissão de doenças. Por isso, existe uma grande oportunidade de otimizar e expandir a utilidade e o âmbito destas abordagens RCS intraoperatórias.

DESAFIOS E PRÓXIMAS ETAPAS

Para tirar partido dos desenvolvimentos alcançados no campo das terapias baseadas em células, alguns tópicos deveriam ser analisados cuidadosamente, e os avanços e progressos relativos a estes assuntos aumentariam significativamente o impacto das terapias celulares intraoperatórias. O número limitado de células disponível para aplicação, sem prévia expansão celular, pode limitar o potencial das terapias celulares intraoperatórias. Portanto, o desenvolvimento de estratégias para aumentar o rendimento do isolamento celular durante o espaço de tempo intraoperatório, é altamente recomendado. Um método denominado SELEX (evolução sistemática de ligandos por enriquecimento exponencial) mostrou resultados de isolamento promissores quando usado para alcançar células estaminais mesenquimais da medula óssea integral (103). Este método usa aptâmeros, como ADN de cadeia simples ou moléculas RNA, com grande afinidade e especificidade para as proteínas de membrana das células alvo. Os aptâmeros funcionam como sondas moleculares para assinaturas moleculares de células que não apresentam um painel de marcadores de superfície altamente específicos (104). Apesar dos relatórios mais recentes de terapias celulares intraoperatórias não explorarem o tecido adiposo como uma fonte de células progenitoras, alguns autores propõem métodos para a geração intraoperatória de terapias celulares autólogas baseadas em células lipoaspiradas. O isolamento celular do tecido adiposo pode ser otimizado através da seleção apropriada do tratamento enzimático, das etapas de lavagem e centrifugação, e a disponibilidade de dispositivos de grau clínico para o isolamento celular a partir de tecido adiposo (por exemplo, Celution® da Cytori Therapeutics e Tissue Genesis Cell Isolation System™ da Tissue Genesis) (105, 106). Contudo, os métodos que requerem a manipulação extensiva das células na sala de operações, como o uso de enzimas, podem levar a processos de aprovação regulatórios prolongados. Para além disso, estão a ser feitos esforços para desenvolver estruturas celulares adiposas, através da utilização de materiais diferentes que promovam a rápida fixação das células da fração vascular estromal do tecido adiposo, que são conhecidas por incluir células progenitoras e multipotentes. Suportes poliméricos biodegradáveis, poli(L-lactida-co-caprolactona) macroporoso, e colagénio poroso natural tipo I/III foram propostos para um procedimento cirúrgico de uma etapa para aplicações na engenharia de cartilagem e tecido ósseo. Estas técnicas promoveram a fixação celular após 5-10 min, e uma grande porção das unidades de fibroblastos formadoras de colónias dentro da fração estromal vascular aderiu preferencialmente aos suportes poliméricos (107). As células da fração vascular estromal também podem ser incorporadas num hidrogel de fibrina, através do método proposto por Bensaïd et al. (108). Os hidrogeles permitem a propagação imediata das células e podem

ser usados como revestimento para materiais substitutos de osso na engenharia intraoperatória de enxertos osteogênicos (109).

Estratégias para incorporar estímulos químicos e físicos para direcionar o destino das células *in vivo*, são fundamentais para o sucesso das terapias celulares intraoperatórias. Estímulos adicionais podem ser cruciais para a promoção da proliferação e sobrevivência celular ajudando assim a alcançar um número suficiente de células para um resultado positivo. Tal estratégia pode ser concebida como uma estimulação de duas etapas, primeiro para promover a expansão celular, de modo a alcançar uma concentração celular ótima, e em seguida direcionar a função celular para os mecanismos regenerativos desejados.

O uso de populações celulares não fracionadas nas terapias celulares intraoperatórias leva a produtos celulares mal definidos devido à sua heterogeneidade e falta de compreensão do seu destino e função *in vivo*. Esta heterogeneidade também impede a generalização dos resultados de diferentes grupos devido a diferenças nos pacientes, condições de processamento, fonte celular, e outros parâmetros clínicos que têm um grande impacto no fenótipo celular. A caracterização mais completa das diferentes populações celulares e suas propriedades, representa uma condição necessária para o futuro desenvolvimento de terapias celulares intraoperatórias eficientes. O controle preciso de células endógenas e implantadas *in vivo* é crucial para a definição das populações celulares e dos seus mecanismos terapêuticos, de modo a elaborar estratégias eficientes em termos de isolamento celular, escolha das populações celulares adequadas, aplicação celular, momento do tratamento, e controle do destino das células *in vivo*. Apesar da heterogeneidade das células representar um desafio no que toca a melhor elucidar os mecanismos regenerativos, é também um elemento chave dos diversos efeitos terapêuticos das células.

A variabilidade de paciente para paciente em termos do número de células progenitoras também representa um desafio para a técnica intraoperatória *in si* (15). Atualmente, o número de células progenitoras é determinado através de ensaios *in vitro*, que requerem cultura celular, como ensaios de unidades formadoras de colônias de fibroblastos; e, portanto, o número de células progenitoras aplicadas intraoperatóriamente é definido retrospectivamente. Existe a necessidade de se avaliar intraoperatóriamente o número de células estaminais e progenitoras que foram recolhidas e que serão aplicadas, o que aumenta o nível de complexidade desta abordagem. Se considerarmos a variabilidade do paciente em termos do número de células com diferentes fenótipos, o conceito de seleção celular torna-se apelativo porque permite a padronização do número apropriado de células, apresentando um fenótipo bem definido, a ser aplicado. Contudo, esta padronização requer a elucidação de assinaturas específicas de subpopulações celulares relevantes.

As estratégias de aplicação celular têm um grande impacto nos resultados das terapias celulares. Os métodos de aplicação deveriam promover a sobrevivência celular e a função celular direta para maximizar os resultados positivos. Um relatório recente propõe o desenvolvimento de uma abordagem de terapia celular intraoperatória para o revestimento do enxerto vascular autólogo, que promoveria a recelularização de homotransplantes ou xenoenxertos descelularizados, para minimizar complicações após o implante (101). A estratégia centra-se na aplicação de células CD133⁺ derivadas de medula óssea integrada em fibrina autóloga, administrada via spray, utilizando o sistema Vivostat[®] disponível no mercado. Este conceito tira partido das propriedades promissoras da fibrina como uma matriz extracelular para a angiogênese: A fibrina é capaz de sustentar o processo de auto-organização das células mononucleares derivadas de medula óssea, e produzir estruturas vasculares em matrizes avasculares de fibrina 3D (110), e as estruturas tubulares de fibrina conseguem resistir à deformação circunferencial devido à deposição de colagénio das células intersticiais alojadas sobre as construções, levando a um aumento da resistência à tração (111). No entanto, devido à deformação da matriz de fibrina transplantada, causada pelo processo fibrinolítico antes da conclusão do enxerto, a estabilização química da fibrina ou outras alternativas, devem ser desenvolvidas para melhorar a estabilidade do revestimento durante o período de enxerto.

As limitações na conceção de vários estudos clínicos intraoperatórios prejudicam seriamente a interpretação das informações clínicas, comprometendo a capacidade de tirar conclusões válidas. Entre as limitações mais frequentes destes estudos, estão o número reduzido de pacientes, falta de controlos (devido a questões práticas e éticas),

critérios de inclusão de paciente (os pacientes que aceitam participar em estudos para novas terapias, normalmente passaram já por vários tratamentos sem sucesso, e por isso representam o pior cenário possível aquando do começo da terapia celular intraoperatória), e a ausência de acompanhamento a longo prazo. Os ensaios clínicos aleatórios, duplo-cegos, controlados, são especificamente requeridos para a validação das abordagens intraoperatórias mais promissoras. Apesar destes desafios, existem grandes oportunidades de traduzir estas investigações básicas e estudos clínicos preliminares, em tratamentos clínicos amplamente disponíveis e assim, impulsionar ainda mais o progresso já feito neste campo.

SÍNTESE:

Nos últimos anos, a terapia celular intraoperatória emergiu como uma importante e empolgante abordagem que tem o potencial de curar várias condições médicas. As abordagens intraoperatórias, que utilizam múltiplos tipos de células, já se mostraram seguras e eficientes para várias indicações. Para além disso, muitas abordagens estão a ser desenvolvidas para aumentar o impacto terapêutico, otimizar os resultados pretendidos, e ultrapassar limitações atuais— nomeadamente, a baixa produtividade dos métodos de isolamento celular e falta de controlo do destino e função das células após implantação. O desenvolvimento destas abordagens depende da identificação de subpopulações relevantes e da compreensão dos mecanismos regeneradores através de diferentes perspetivas, desde a biologia mais básica, até à patologia geral. A terapia celular reúne um conjunto de disciplinas: biologia, química, ciência de biomateriais, medicina, e engenharia, entre outros. Por isso, deveria ser feito um esforço para desenvolver estudos colaborativos, que tirassem proveito dos desenvolvimentos mais promissores em cada campo. Por exemplo, a revisão por Discher et al. (112) sublinha a importância das abordagens integrativas para melhor controlar a função estaminal, tais como o uso de combinações de citocinas, sistemas de materiais incluindo componentes de matriz extracelulares, e interações biomecânicas, bem como uma abordagem de sistemas de biologia para melhor prever o comportamento das células estaminais in vivo. Embora haja uma oportunidade importante de melhorar e expandir a utilidade das terapias celulares intraoperatórias existentes, o esclarecimento dos mecanismos regenerativos principais que articulam uma resposta terapêutica favorável e a condução de estudos clínicos mais controlados, deveria permanecer uma prioridade.

Declaração Informativa

J.M.K. é um coproprietário da Megacell Therapeutics, uma companhia que tem a opção de licenciar IP gerado por J.M.K. J.M.K. pode beneficiar financeiramente se o IP for licenciado e posteriormente validado. Os interesses de J.M.K. foram analisados e sujeitos a um plano de gestão supervisionado pelo Hospital Brigham and Women's and Partners HealthCare de acordo com as suas políticas de conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Vikram Juneja e Vijay Kumar pelo feedback útil e aperfeiçoamentos a esta revisão. M.B.C. agradece o apoio da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal (SFRH/BD/33723/2009), através do programa MIT-Portugal focado na área dos sistemas de bioengenharia. Este trabalho foi financiado por Institutos Nacionais de Saúde, através do apoio HL095722 e HL097172 para J.M.K.

Literatura Citada

1. Joneschild E, Urbaniak JR. 2005. Biology of the vascularized fibular graft. In *Bone Generation and Repair: Biology and Clinical Applications*, ed. JR Lieberman, GE Friedlaender, pp. 93–112. New York: Humana
2. de Boer HH. 1988. The history of bone grafts. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 226:292–98
3. Fujishiro T, Kobayashi H, Bauer TW. 2008. Autograft bone. In *Musculoskeletal Tissue Regeneration*, ed. WS Pietrzak, pp. 65–79. New York: Humana
4. Paley D, Young MC, Wiley AM, Fornasier VL, Jackson RW. 1986. Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. An experimental study in rabbits. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 208:300–12
5. Healey JH, Zimmerman PA, McDonnell JM, Lane JM. 1990. Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 256:280–85
6. Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R. 1991. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 266:259–70
7. Garg NK, Gaur S, Sharma S. 1993. Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. *Acta Orthop. Scand.* 64:671–72
8. Siwach RC, Sangwan SS, Singh R, Goel A. 2001. Role of percutaneous bone marrow grafting in delayed unions, non-unions and poor regenerates. *Indian J. Med. Sci.* 55:326–36
9. Connolly JF. 1995. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 313:8–18
10. Rougraff BT, Kling TJ. 2002. Treatment of ative unicameral bone cysts with percutaneous injection of demineralized bone matrix and autogenous bone marrow. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 84:921–29
11. Docquier P-L, Delloye C. 2005. Treatment of aneurysmal bone cysts by introduction of demineralized bone and autogenous bone marrow. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 87:2253–58
12. Friedenstein AJ. 1976. Precursor cells of mechanocytes. *Int. Rev. Cytol.* 47:327–59
13. Budenz RW, Bernard GW. 1980. Osteogenesis and leukopoiesis within diffusion-chamber implants of isolated bone marrow subpopulations. *Am. J. Anat.* 159:455–74
14. Connolly J, Guse R, Lippiello L, Dehne R. 1989. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 71:684–91
15. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. 2005. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 87:1430–37
16. McLain RF, Fleming JE, Boehm CA, Muschler GF. 2005. Aspiration of osteoprogenitor cells for augmenting spinal fusion: comparison of progenitor cell concentrations from the vertebral body and iliac crest. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 87A:2655–61
17. Muschler GF, Nitto H, Matsukura Y, Boehm C, Valdevit A, et al. 2003. Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 407:102–18
18. Muschler GF, Matsukura Y, Nitto H, Boehm CA, Valdevit AD, et al. 2005. Selective retention of bone marrow-derived cells to enhance spinal fusion. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 432:242–51
19. Oyama T, Nishimoto S, Takeda M. 2005. Alveolar bone regeneration utilizing β -TCP and platelet-rich plasma (PRP) derived from bone marrow aspirate. *Ann. Plast. Surg.* 54:222–23
20. Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J. 2008. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials* 29:3973–82
21. Nishimoto S, Oyama T, Matsuda K. 2007. Simultaneous concentration of platelets and marrow cells: a simple and useful technique to obtain source cells and growth factors for regenerative medicine. *Wound Repair Regen.* 15:156–62
22. Brodke D, Pedrozo HA, Kapur TA, Attawia M, Kraus KH, et al. 2006. Bone grafts prepared with selective cell retention technology heal canine segmental defects as effectively as autograft. *J. Orthop. Res.* 24:857–66
23. Lee K, Goodman SB. 2009. Cell therapy for secondary osteonecrosis of the femoral condyles using the Collect DBM System: a preliminary report. *J. Arthroplasty* 24:43–48
24. Kraus KH, Kirker-Head C. 2006. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.* 35:232–42
25. Hernigou P, Beaujean F. 2002. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 405:14–23

26. Gangji V, Hauzeur J-P, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M. 2004. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells: a pilot study. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 86:1153–60
27. Gangji V, Hauzeur J-P. 2005. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 87:106–12
28. Hernigou P, Poignard A, Zilber S, Rouard H. 2009. Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Indian J. Orthop.* 43:40–45
29. Hernigou P, Manicom O, Poignard A, Nogier A, Filippini P, De Abreu L. 2004. Core decompression with marrow stem cells. *Oper. Tech. Orthop.* 14:68–74
30. Takigami H, Kumagai K, Latson L, Togawa D, Bauer T, et al. 2007. Bone formation following OP-1 implantation is improved by addition of autogenous bone marrow cells in a canine femur defect model. *J. Orthop. Res.* 25:1333–42
31. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. 2011. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J.* 11:471–91
32. Chang F, Ishii T, Yanai T, Mishima H, Akaogi H, et al. 2008. Repair of large full-thickness articular cartilage defects by transplantation of autologous uncultured bone-marrow-derived mononuclear cells. *J. Orthop. Res.* 26:18–26
33. Giannini S, Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B. 2009. One-step bone marrow-derived cell transplantation in talar osteochondral lesions. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 467:3307–20
34. Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B, Cenacchi A, Giannini S. 2010. Osteochondral lesions of the knee: a new one-step repair technique with bone-marrow-derived cells. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 92:2–11
35. Benthien JP, Behrens P. 2010. Autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): combining microfracturing and a collagen I/III matrix for articular cartilage resurfacing. *Cartilage* 1:65–68
36. Benthien JP, Behrens P. 2010. Autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): a one-step procedure for retropatellar articular resurfacing. *Ata Orthop. Belg.* 76:260–63
37. Benthien J, Behrens P. 2011. The treatment of chondral and osteochondral defects of the knee with autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): method description and recent developments. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 19(8):1316–19
38. Steinwachs MR, Guggi T, Kreuz PC. 2008. Marrow stimulation techniques. *Injury* 39:26–31
39. de Girolamo L, Bertolini G, Cervellini M, Sozzi G, Volpi P. 2010. Treatment of chondral defects of the knee with one step matrix-assisted technique enhanced by autologous concentrated bone marrow: in vitro characterisation of mesenchymal stem cells from iliac crest and subchondral bone. *Injury* 41:1172–77
40. Oshima Y, Watanabe N, Matsuda K-i, Takai S, Kawata M, Kubo T. 2005. Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation. *J. Histochem. Cytochem.* 53:207–16
41. Matoba S, Matsubara H. 2009. Therapeutic angiogenesis for peripheral artery diseases by autologous bone marrow cell transplantation. *Curr. Pharm. Des.* 15:2769–77
42. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, et al. 2002. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360:427–35
43. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K-i, et al. 2001. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103:897–903
44. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, et al. 2001. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 104:1046–52
45. Miyamoto M, Yasutake M, Takano H, Takagi H, Takagi G, et al. 2004. Therapeutic angiogenesis by autologous bone marrow cell implantation for refractory chronic peripheral arterial disease using assessment of neovascularization by ^{99m}Tc-tetrofosmin (TF) perfusion scintigraphy. *Cell Transplant.* 13:429–37
46. Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, et al. 2004. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 109:1215–18

47. Kohlman-Trigoboff D, Lawson JH, Murphy MP. 2006. Stem cell use in a patient with an ischemic foot ulcer: a case study. *J. Vasc. Nurs.* 24:56–61
48. Franz RW, Parks A, Shah KJ, Hankins T, Hartman JF, Wright ML. 2009. Use of autologous bone marrow mononuclear cell implantation therapy as a limb salvage procedure in patients with severe peripheral arterial disease. *J. Vasc. Surg.* 50:1378–90
49. Napoli C, Farzati B, Sica V, Iannuzzi E, Coppola G, et al. 2008. Beneficial effects of autologous bone marrow cell infusion and antioxidants/L-arginine in patients with chronic critical limb ischemia. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 15:709–18
50. Hernández P, Cortina L, Artaza H, Pol N, Lam RM, et al. 2007. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: a comparison of using blood cell separator and Ficoll density gradient centrifugation. *Atherosclerosis* 194:e52–56
51. Koshikawa M, Shimodaira S, Yoshioka T, Kasai H, Watanabe N, et al. 2006. Therapeutic angiogenesis by bone marrow implantation for critical hand ischemia in patients with peripheral arterial disease: a pilot study. *Curr. Med. Res. Opin.* 22:793–98
52. Amann B, Luedemann C, Ratei R, Schmidt-Lucke JA. 2009. Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease. *Cell Transplant.* 18:371–80
53. Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, et al. 2008. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am. Heart J.* 156:1010–18
54. Kamata Y, Takahashi Y, Iwamoto M, Matsui K, Murakami Y, et al. 2007. Local implantation of autologous mononuclear cells from bone marrow and peripheral blood for treatment of ischaemic digits in patients with connective tissue diseases. *Rheumatology* 46:882–84
55. Huang P, Li S, Han M, Xiao Z, Yang R, Han ZC. 2005. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care* 28:2155–60
56. Kolvenbach R, Kreissig C, Cagiannos C, Afifi R, Schmaltz E. 2010. Intraoperative adjunctive stem cell treatment in patients with critical limb ischemia using a novel point-of-care device. *Ann. Vasc. Surg.* 24:367–72
57. US Natl. Inst. Health. 2011. Feasibility study of the TGI adipose-derived stromal cell (ASC)-coated ePTFE vascular graft (TGI-PVG-IDE). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01305863>
58. Univ. Louisville. 2011. UofL vascular surgeons perform first prosthetic bypass graft procedure using patient's own stem cells with 'point-of-care' technology. <http://louisville.edu/medschool/news-archive/uofl-vascular-surgeons-perform-first-prosthetic-bypass-graft-procedure-using-patient2019sown-stem-cells-with2018point-of-care2019-technology>
59. Mocini D, Staibano M, Mele L, Giannantoni P, Menichella G, et al. 2006. Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Am. Heart J.* 151:192–97
60. Yaoita H, Takase S, Maruyama Y, Sato Y, Satokawa H, et al. 2005. Scintigraphic assessment of the effects of bone marrow-derived mononuclear cell transplantation combined with off-pump coronary artery bypass surgery in patients with ischemic heart disease. *J. Nucl. Med.* 46:1610–17
61. Zhao Q, Sun Y, Xia L, Chen A, Wang Z. 2008. Randomized study of mononuclear bone marrow cell transplantation in patients with coronary surgery. *Ann. Thorac. Surg.* 86:1833–40
62. Ang K-L, Chin D, Leyva F, Foley P, Kubal C, et al. 2008. Randomized, controlled trial of intramuscular or intracoronary injection of autologous bone marrow cells into scarred myocardium during CABG versus CABG alone. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 5:663–70
63. Li T-S, Hamano K, Hirata K, Kobayashi T, Nishida M. 2003. The safety and feasibility of the local implantation of autologous bone marrow cells for ischemic heart disease. *J. Card. Surg.* 18:S69–75
64. Ghodsizad A, Klein H-M, Borowski A, Stoldt V, Feifel N, et al. 2004. Intraoperative isolation and processing of BM-derived stem cells. *Cytotherapy* 6:523–26
65. Stamm C, Kleine HD, Westphal B, Petzsch M, Kittner C, et al. 2004. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 52:152–58

66. Klein HM, Assmann A, Lichtenberg A, Heke M. 2010. Intraoperative CD133+ cell transplantation during coronary artery bypass grafting in ischemic cardiomyopathy. *MMCTS* 2010:3947
67. Donnenberg AD, Donnenberg VS, Griffin DL, Moore LR, Tekinturhan F, Kormos RL. 2011. Intraoperative preparation of autologous bone marrow-derived CD34-enriched cellular products for cardiac therapy. *Cytotherapy* 13(4):441–48
68. Jin P, Wang E, Wang Y-h, Huang W, Kuang W, et al. 2011. Central zone of myocardial infarction: a neglected target area for heart cell therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 16:636–47
69. Zhao W, Schafer S, Choi J, Yamanaka YJ, Lombardi ML, et al. 2011. Cell-surface sensors for real-time probing of cellular environments. *Nat. Nanotechnol.* 6:524–31
70. Sarkar D, Vemula PK, Zhao W, Gupta A, Karnik R, Karp JM. 2010. Engineered mesenchymal stem cells with self-assembled vesicles for systemic cell targeting. *Biomaterials* 31:5266–74
71. Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98:2396–402
72. Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. 2003. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp. Hematol.* 31:723–32
73. Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA. 2001. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J. Orthop. Res.* 19:117–25
74. Muschler GF, Boehm C, Easley K. 1997. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 79:1699–709
75. Ichiyonagi T, Anabuki K, Nishijima Y, Ono H. 2010. Isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow wastes of spinal fusion procedure (TLIF) for low back pain patients and preparation of bone dusts for transplantable autologous bone graft with a serum glue. *Biosci. Trends* 4:110–18
76. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, et al. 2008. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 17:761–74
77. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24:1294–301
78. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. 2007. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 327:449–62
79. Rebelato CK, Aguiar AM, Moretao MP, Senegaglia AC, Hansen P, et al. 2008. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp. Biol. Med.* 233:901–13
80. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, et al. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7:211–28
81. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, et al. 2006. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue harvesting procedure. *Cytotherapy* 8:166–77
82. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. 2006. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 24:150–54
83. Jurgens WJFM, van Dijk A, Zandieh Doulabi B, Niessen FB, Ritt MJPF, et al. 2009. Freshly isolated stromal cells from the infrapatellar fat pad are suitable for a one-step surgical procedure to regenerate cartilage tissue. *Cytotherapy* 11:1052–64
84. Jurgens WJFM, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandieh Doulabi B, Schouten TE, et al. 2008. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res.* 332:415–26
85. Hoogendoorn RJW, Lu ZF, Kroeze RJ, Bank RA, Wuisman PIJM, Helder MN. 2008. Adipose stem cells for intervertebral disc regeneration: current status and concepts for the future. *J. Cell. Mol. Med.* 12:2205–16
86. Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, Wuisman PIJM, Klein-Nulend J. 2006. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342:902–8

87. Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, Wuisman PIJM. 2007. Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. *Tissue Eng.* 13:1799–808
88. Gimble J, Guilak F, Bunnell B. 2010. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res. Ther.* 1:19
89. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, et al. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95:952–58
90. Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, et al. 2007. Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp. Hematol.* 35:1109–18
91. Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ, Muschler GF. 1997. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J. Orthop. Res.* 15:546–57
92. Simmons P, Torok-Storb B. 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78:55–62
93. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, et al. 1998. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J. Bone Miner. Res.* 13:655–63
94. Oprea WE, Karp JM, Hosseini MM, Davies JE. 2003. Effect of platelet releasate on bone cell migration and recruitment in vitro. *J. Craniofac. Surg.* 14:292–300
95. Langer HF, Gawaz M. 2008. Platelets in regenerative medicine. *Basic Res. Cardiol.* 103:299–307
96. Eppley BL, WoodellJE, HigginsJ. 2004. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 114:1502–8
97. Kark LR, Karp JM, Davies JE. 2006. Platelet releasate increases the proliferation and migration of bone marrow-derived cells cultured under osteogenic conditions. *Clin. Oral Implants Res.* 17:321–27
98. Peterbauer-Scherb A, van Griensven M, Meinel A, Gabriel C, Redl H, Wolbank S. 2010. Isolation of pig bone marrow mesenchymal stem cells suitable for one-step procedures in chondrogenic regeneration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 4:485–90
99. Leitner GC, Gruber R, Neumüller J, Wagner A, Kloimstein P, et al. 2006. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang.* 91:135–39
100. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Borzini P. 2008. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltext®. *Vox Sang.* 94:202–8
101. Kaminski A, Klopsch C, Mark P, Yerebakan C, Donndorf P, et al. 2010. Autologous valve replacement—CD133+ stem cell-plus-fibrin composite-based sprayed cell seeding for intraoperative heart valve tissue engineering. *Tissue Eng. Part C* 17:299–309
102. Zangi L, Rivkin R, Kassis I, Leviansky L, Marx G, Gorodetsky R. 2006. High-yield isolation, expansion, and differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells with fibrin microbeads. *Tissue Eng.* 12:2343–54
103. Guo K-T, Schäfer R, Paul A, Gerber A, Ziemer G, Wendel HP. 2006. A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers. *Stem Cells* 24:2220–31
104. Guo K-T, Ziemer G, Paul A, Wendel HP. 2008. CELL-SELEX: novel perspectives of aptamer-based therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 9:668–78
105. Lin K, Matsubara Y, Masuda Y, Togashi K, Ohno T, et al. 2008. Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution™ system. *Cytotherapy* 10:417–26
106. Hicok KC, Hedrick MH. 2011. Automated isolation and processing of adipose-derived stem and regenerative cells. *MethodsMol. Biol.* 702:87–105
107. Jurgens WJ, Kroeze RJ, Bank RA, Ritt MJPF, Helder MN. 2011. Rapid attachment of adipose stromal cells on resorbable polymeric scaffolds facilitates the one-step surgical procedure for cartilage and bone tissue engineering purposes. *J. Orthop. Res.* 29:853–60
108. Bensaïd W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. 2003. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 24:2497–502

109. Müller AM, Mehrkens A, Schäfer DJ, Jaquier C, Güven S, et al. 2010. Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular fraction of human adipose tissue. *Eur. Cells Mater.* 19:127–35
110. Rüger BM, Breuss J, Hollemann D, Yanagida G, Fischer MB, et al. 2008. Vascular morphogenesis by adult bone marrow progenitor cells in three-dimensional fibrin matrices. *Differentiation* 76:772–83
111. Syedain ZH, Weinberg JS, Tranquillo RT. 2008. Cyclic distension of fibrin-based tissue constructs: evidence of adaptation during growth of engineered connective tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:6537–42
112. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. 2009. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 324:1673–77
113. Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H. 2006. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions: surgical technique. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 88:322–27
114. Gupta MC, Theerajunyaporn T, Maitra S, Schmidt MB, Holy CE, et al. 2007. Efficacy of mesenchymal stem cell enriched grafts in an ovine posterolateral lumbar spine model. *Spine* 32:720–26
115. Jacobsen K, Szczepanowski K, Al-Zube LA, Kim J, Lin SS. 2008. The role of intraoperative bone marrow aspirate stem cell concentration as a bone grafting technique. *Tech. Foot Ankle Surg.* 7:84–89
116. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, von Hesler C, Andrassy J, et al. 2008. Concentration of bone marrow total nucleated cells by a point-of-care device provides a high yield and preserves their functional activity. *Cell Transplant.* 16:1059–69
117. Mehta J, Singhal S, Gordon L, Tallman M, Williams S, et al. 2002. COBE Spectra is superior to Fenwal CS-3000 Plus for collection of hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 29:563–67
118. Ford CD, Lehman C, Strupp A, Kelley L. 2002. Comparison of CD34+ cell collection efficiency on the COBE Spectra and Fenwal CS-3000 plus. *J. Clin. Apheresis* 17:17–20
119. Dzieczkowski JS, McGonigal M, Cook J, Sugrue M, Andersen J, Anderson KC. 1995. A comparison of peripheral blood stem cell apheresis using the Fenwal CS-3000 Plus and COBE Spectra. *Transfus. Sci.* 16:71–77
120. Aktas M, Radke T, Strauer B, Wernet P, Kogler G. 2008. Separation of adult bone marrow mononuclear cells using the automated closed separation system Sepax. *Cytotherapy* 10:203–11



Sumário

The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems Alexandre Albanese, Peter S. Tang, and Warren C.W. Chan	1
Mucosal Vaccine Design and Delivery Kim A. Woodrow, Kaila M. Bennett, and David D. Lo	17
Tendon Healing: Repair and Regeneration Pramod B. Voleti, Mark R. Buckley, and Louis J. Soslowsky	47
Rapid Prototyping for Biomedical Engineering: Current Capabilities and Challenges Andrés Diaz Lantada and Pilar Lafont Morgado	73
Continuum Mixture Models of Biological Growth and Remodeling: Past Successes and Future Opportunities G.A. Ateshian and J.D. Humphrey	97
Flexible and Stretchable Electronics for Biointegrated Devices Dae-Hyeong Kim, Roozbeh Ghaffari, Nanshu Lu, and John A. Rogers	113
Sculpting Organs: Mechanical Regulation of Tissue Development Celeste M. Nelson and Jason P. Gleghorn	129
Synthetic Biology: An Emerging Engineering Discipline Allen A. Cheng and Timothy K. Lu	155
Nonlinear Dynamics in Cardiology Trine Krogh-Madsen and David J. Christini	179
Microfluidic Models of Vascular Functions Keith H.K. Wong, Juliana M. Chan, Roger D. Kamm, and Joe Tien	205
Optical Nanoscopy: From Acquisition to Analysis Travis J. Gould, Samuel T. Hess, and Joerg Bewersdorf	231
Nonthermal Plasma Sterilization of Living and Nonliving Surfaces N. De Geyter and R. Morent	255

Robots for Use in Autism Research Brian Scassellati, Henny Admoni, and Maja Matarié.....	275
Regulation of Cell Behavior and Tissue Patterning by Bioelectrical Signals: Challenges and Opportunities for Biomedical Engineering Michael Levin and Claire G. Stevenson	295
Intraoperative Stem Cell Therapy Mónica Beato Coelho, Joaquim M.S. Cabral, and Jeffrey M. Karp	325
Optical Imaging Using Endogenous Contrast to Assess Metabolic State Irene Georgakoudi and Kyle P. Quinn	351
Quantitative Imaging Methods for the Development and Validation of Brain Biomechanics Models Philip V. Bayly, Erik H. Clayton, and Guy M. Genin	369
Advanced Technologies for Gastrointestinal Endoscopy Pietro Valdastrì, Massimiliano Simi, and Robert J. Webster III	397
Mechanical Regulation of Nuclear Structure and Function Rui P. Martins, John D. Finan, Farshid Guilak, and David A. Lee	431

Índices

Cumulative Index of Contributing Authors, Volumes 5–14	457
Cumulative Index of Chapter Titles, Volumes 5–14	461

Errata

Um registo online de correções aos artigos na Annual Review of Biomedical Engineering pode ser encontrado em <http://bioeng.annualreviews.org/>

10.2 Texto original

Intraoperative Stem Cell Therapy

Mónica Beato Coelho,^{1,2} Joaquim M.S. Cabral,² and Jeffrey M. Karp¹

¹Center for Regenerative Therapeutics and Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Harvard Stem Cell Institute, and Harvard-MIT Division of Health Sciences and Technology, Cambridge, Massachusetts 02139; email: jkarp@rics.bwh.harvard.edu

²Department of Bioengineering and Institute for Biotechnology and Bioengineering, Instituto Superior Técnico, Technical University of Lisbon, 1049-001 Lisbon, Portugal

Annu. Rev. Biomed. Eng. 2012. 14:325-49

The *Annual Review of Biomedical Engineering* is online at bioeng.annualreviews.org

This article's doi:
10.1146/annurev-bioeng-071811-150041

Copyright © 2012 by Annual Reviews.
All rights reserved

1523-9829/12/0815-0325\$20.00

Keywords

mesenchymal stem cell, clinical research, autologous, cell isolation

Abstract

Stem cells hold significant promise for regeneration of tissue defects and disease-modifying therapies. Although numerous promising stem cell approaches are advancing in clinical trials, intraoperative stem cell therapies offer more immediate hope by integrating an autologous cell source with a well-established surgical intervention in a single procedure. Herein, the major developments in intraoperative stem cell approaches, from in vivo models to clinical studies, are reviewed, and the potential regenerative mechanisms and the roles of different cell populations in the regeneration process are discussed. Although intraoperative stem cell therapies have been shown to be safe and effective for several indications, there are still critical challenges to be tackled prior to adoption into the standard surgical armamentarium.

Contents

INTRODUCTION	326
INTRAOPERATIVE STEM CELL THERAPY	328
Osteogenesis	328
Osteochondrogenesis	333
Angiogenesis	334
Cardiac Applications	335
REGENERATIVE MECHANISMS	336
CELL SOURCES	336
POTENTIAL ROLES OF INTRAOPERATIVELY PROCESSED AND TRANSPLANTED CELL PRODUCTS	338
METHODS USED TO INTRAOPERATIVELY ISOLATE OR CONCENTRATE CELL PRODUCTS	339
CHALLENGES AND NEXT STEPS	341
SUMMARY	343

INTRODUCTION

Regenerative medicine promises to restore structure and function to damaged tissues and organs. Approaches utilizing exogenous cell sources typically harness stem cells or progenitor cells and are currently being tested in hundreds of cell therapy clinical trials. These trials include cells derived from both autologous and allogeneic sources. In particular, intraoperative cell therapies, which integrate autologous cell-based therapy with surgical interventions into a single procedure, offer enormous hope for the near future, and some approaches have already reached clinical fruition. The intraoperative cell therapy process typically includes tissue harvesting and processing to obtain the desired cell product, surgical intervention depending on the clinical application, and cell delivery (see **Figure 1**). Intraoperative cell therapy benefits from the accessibility and safety of using the patient's own cells, which do not trigger an immune response, and from the many relevant cell types that can be harvested using minimally invasive techniques. This therapy also circumvents many of the limitations of exogenous cell therapy by avoiding in vitro cell manipulation and costly

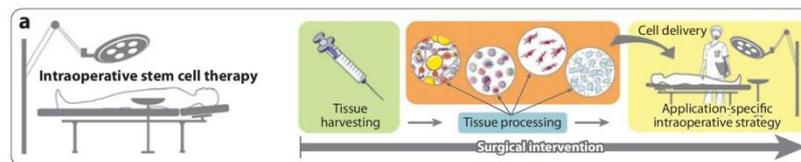
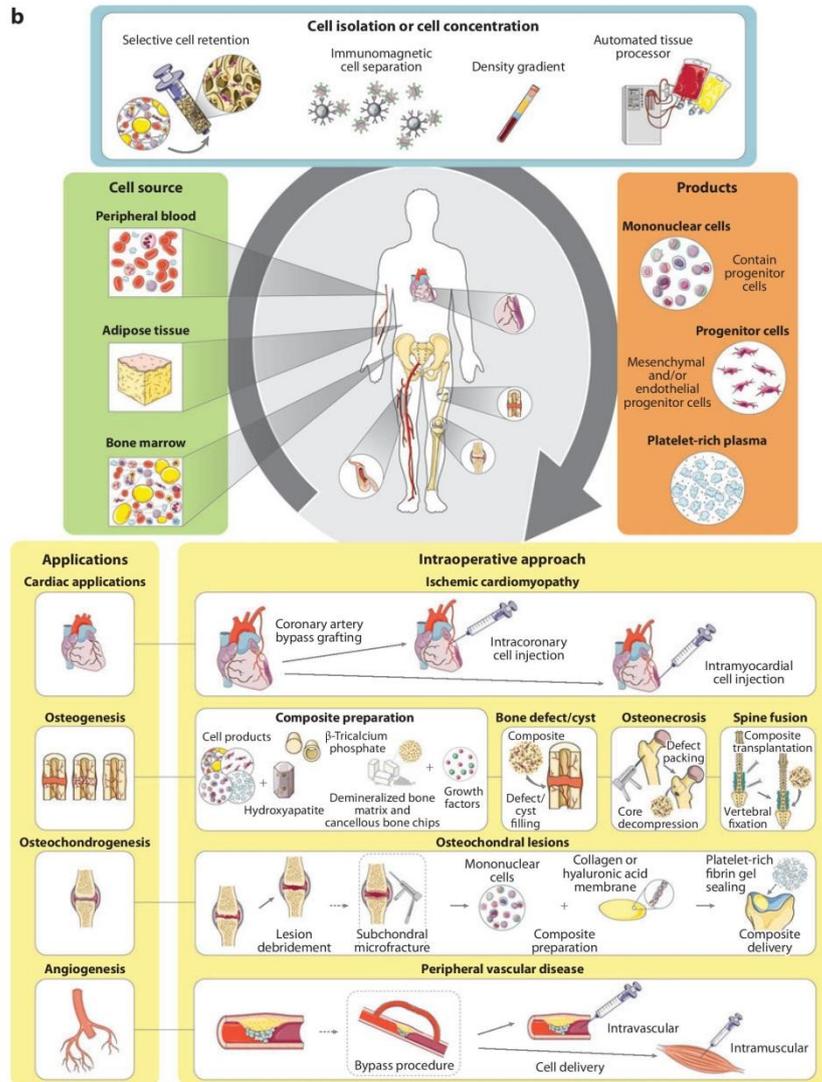


Figure 1

Intraoperative stem cell therapy. (a) The intraoperative cell therapy process typically includes tissue harvesting and processing to obtain the desired cell product, and an intraoperative cell delivery strategy that depends on the clinical application. (b) The intraoperative cell therapy process starts with autologous tissue harvesting. Tissues, including peripheral blood, adipose tissue, and bone marrow, can be used as sources of stem cells (*green box*). The tissue can then be processed using multiple methods (*blue box*) to obtain the desired cell product (*orange box*). The stem cell therapy can be applied as an adjunctive treatment in combination with surgery or an interventional treatment (*yellow boxes*). Figure was produced using Servier Medical Art (<http://www.servier.com/servier-medical-art>).



cell expansion, the need for Good Manufacturing Practice facilities, the need to hire personnel with cell culture training, the potential for contamination, and a second procedure (at a different time point) to harvest the cells. It may be beneficial to avoid cell culture to limit phenotype changes that can occur when cells are removed from their native microenvironment for an extended time frame. Additionally, strategies performed entirely within the operating room (without culture expansion) may reduce the wait time to surgery. Importantly, the US Food and Drug Administration, the European Medicines Agency, and other regulatory authorities generally consider adult cell products as biological products that can be divided into two categories: minimally manipulated biological products (e.g., autologous blood products, including platelet-rich plasma or platelet concentrate, and allogeneic blood products, such as bone marrow or umbilical cord blood), and manipulated biological products such as culture-expanded mesenchymal stem cells (MSCs). Certain intraoperative cell approaches fit under the minimally manipulated biological product category, in which extensive clinical trials are not required, thus accelerating potential translation to the clinic. The primary focus of this review is to present an overview of autologous cell therapy approaches in which cell products are harvested, minimally manipulated, and delivered to the patient on the same day.

INTRAOPERATIVE STEM CELL THERAPY

To date, conventional intraoperative stem cell approaches have been rather simplistic, typically utilizing whole bone marrow without a cell concentration strategy or specific methods to deliver the cells or to control their function *in vivo*. The field is rapidly evolving toward achieving greater control over the cell composition, phenotype, and function *in vivo* by harnessing bioengineering approaches. These approaches include the concentration and selection of stem cell or progenitor populations, along with the incorporation of biomaterials including scaffolds or matrices with appropriate chemical and physical properties to promote rapid attachment of specific cell types or to direct cell fate *in vivo*. **Table 1** summarizes published studies about intraoperative stem cell therapies, including those describing preclinical models, case reports, and clinical trials to treat a wide array of acute and chronic conditions. In the following sections, we describe intraoperative approaches that have been developed for several clinical applications, focusing on the technical procedures and clinical outcomes.

Osteogenesis

Natural bone grafting materials have evolved over the past two centuries to include autologous or allogeneic grafts of cortical bone, corticocancellous bone, cancellous bone, and demineralized bone matrix (1). The first intraoperative bone autograft was performed in Germany in 1820, yet this procedure did not become common clinical practice until F.H. Albee summarized his experience with 3,000 autologous bone grafting procedures in 1915 (2). Autologous cancellous bone that includes bone chips, a heterogeneous population of cells, and several growth factors has become the gold standard for osseous regeneration and reconstructive procedures that produce the most successful and predictable clinical results. This success has been attributed partially to the presence of cells within the graft (3). The history of and progress with bone autografts have been extensively reviewed elsewhere (3). Here we focus on the use of intraoperatively aspirated and delivered marrow stromal cells.

The first intraoperative cell therapies to promote osteogenic regeneration utilized bone marrow that was aspirated via a needle and then injected percutaneously into bone defects (4–8). Compared with performing a bone autograft harvested from the iliac crest, injecting autologous

marrow is less invasive and results in fewer complications at the donor and recipient sites (6, 9). Percutaneous injections of whole bone marrow mixed with demineralized bone powder were also delivered to bone cysts to successfully halt the expansion phase and promote cyst ossification (10, 11). Although autologous bone marrow has been used to augment osteogenic wound healing for decades, the exact mechanism mediating this response is not clear, given that isolated bone marrow is extremely heterogeneous (i.e., is composed of multiple cell types) and contains an array of cytokines, extracellular matrix components, and often small pieces of bone.

A possible correlation between effectiveness of bone marrow and cell concentration (12) prompted investigation into methods to sort cells prior to transplantation. For example, subpopulations obtained by density gradient separation of bone marrow showed increased osteogenesis (13). Furthermore, in the late 1980s, Connolly et al. (14) proposed a method to enhance the osteogenic potential of an injectable bone marrow preparation through concentration of bone marrow nucleated cells by centrifugation. The concentrated bone marrow significantly increased osteogenesis, resulting in enhanced regeneration as assessed radiographically. An important clinical study by Hernigou et al. (15) evaluated the correlation between the number of bone marrow-derived progenitor cells (determined by fibroblast colony-forming units) and the extent of bone healing in a tibial shaft nonunion. The investigators observed a threshold for the total number of progenitor cells present in concentrated bone marrow (equivalent to a cell concentration of 1,000 progenitor cells per cubic centimeter) required for the success of the treatment (union of the tibial shaft fracture). As an alternative to centrifugation to concentrate cells for osteogenic applications, work from George Muschler's (16) laboratory in Cleveland demonstrated the feasibility of selective cell retention (SCR) technology (see **Figure 2**) for rapid isolation and concentration (3–4×) of connective tissue progenitor cells within the operating room, from fresh bone marrow aspirates and vertebral bodies. Through the use of this process, bone graft performance was enhanced. SCR is technically simple and fast: The porous, biocompatible, and implantable substrate, which has surface properties that promote rapid attachment of connective tissue progenitor cells, is loaded into a syringe, and the bone marrow is passed through the matrix samples at a low flow rate to obtain composite graft enriched in progenitor cells. Muschler et al. (17) examined cancellous bone as the matrix and the impact of a bone marrow clot (bone marrow aspirate harvest without heparin) in animal models for spine fusion. The clinical outcome was assessed using the union score (degree of union, from 0% to 100% complete fusion of both facet joints and the entire lamina), quantitative computed tomography (to determine the bone volume, bone density, and cross-sectional area of the fusion mass), and mechanical testing (load displacement curves were generated to calculate stiffness, maximum load, displacement failure, and total energy failure). The results show that the combination of the enriched cellular bone graft and bone marrow clot permits one to achieve significantly improved clinical outcomes than those of either technique alone (enriched bone graft or bone graft plus bone marrow clot). The authors present several hypotheses for the positive effect of the bone marrow clot on the graft efficacy: The fibrin clot may provide mechanical stability and act as a scaffold for the transplanted and endogenous cells; the degranulation of platelets provides a supplement of osteogenic cytokines, namely, platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factors (FGFs), and transforming growth factor β (TGF- β); and the fibrinolytic activity of the bone marrow clot may serve as a source of angiogenic factors.

Muschler et al. (18) also explored demineralized cortical bone as an alternative matrix for SCR, using the same animal model for spinal fusion and the same methods to evaluate the outcome. Augmentation of cell delivery with demineralized cortical bone powder and cancellous bone matrix has been extensively explored for intraoperative osteogenic applications, given their successful track record for promoting new bone growth. Ideally, materials should be osteoconductive (i.e.,

Table 1 Examples of clinical applications of intraoperative cell therapies

Application	Example	General surgical procedure	Outcome	Biomaterials	Cell population	References
Angiogenesis	Peripheral vascular disease	Bone marrow aspiration/peripheral blood collection Cell isolation/concentration Intramuscular/intravascular cell delivery	Increased blood perfusion Limb salvage Wound healing Improvements in rest pain, pain-free walking time	–	MNCs MNCs and platelets	42, 45–56
Angiogenesis/myogenesis	Ischemic cardiomyopathy	Bone marrow aspiration Cell isolation/concentration Coronary artery bypass grafting Intramyocardial/intracoronary cell injection	Enhanced local perfusion Improved contractility on infarct areas Increase in left ventricular ejection fraction	–	CD133 ⁺ cells MNCs	59–66
Osteochondrogenesis	Osteochondral lesions	Bone marrow aspiration/peripheral blood collection Cell isolation/concentration Lesion preparation (lesion debridement and/or subchondral microfracture) Cellular composite preparation Composite delivery Platelet-rich fibrin gel sealing	Osteochondral regeneration in various degrees of remodeling although not complete hyaline cartilage formation	Collagen powder Hyaluronic acid membrane	MNCs MNCs and platelets	32–34, 39

Osteogenesis	Bone defect healing	Bone marrow aspiration Cell concentration Graft preparation Defect filling	Bone regeneration	Demineralized bone matrix Cancellous bone chips Hydroxyapatite β -TCP Collagen powder BMPs	BM cells MNCs, RBCs, and platelets MNCs and platelets	4-9, 14, 15, 22, 30, 113
	Alveolar bone regeneration for cleft alveolus	Bone marrow aspiration Cell concentration Composite preparation Packing into alveolar cleft	Cleft lip reconstruction		BM cells and platelets	19, 21
	Bone cyst treatment	Bone marrow aspiration Composite preparation (demineralized bone matrix gel and bone marrow aspirate mixing) Bone cyst filling	Cyst expansion halting Cyst ossification		BM cells	10, 11
	Osteonecrosis	Bone marrow aspiration Cell concentration Core decompression Composite preparation Defect packing with graft material	Pain reduction Delayed progression of the disease Necrotic lesion regression		BM cells MNCs	23, 25-29
	Spine fusion	Bone marrow aspiration Cell concentration Composite preparation Vertebral fixation Composite transplantation	Successful spinal fusion		BM cells	17, 18, 20, 114

Abbreviations: β -TCP, beta-tricalcium phosphate; BM, bone marrow; BMP, bone morphogenetic protein; MNC, mononuclear cell; RBC, red blood cell.

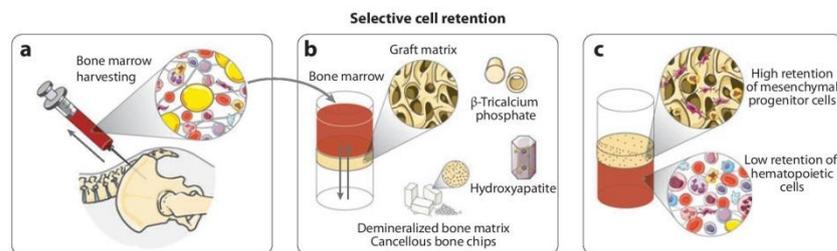


Figure 2

Selective cell retention. After harvesting, (a) the bone marrow is drawn through (b) an implantable graft matrix. This process facilitates matrix exposure to a high volume of bone marrow in a short time. The process is repeated until graft saturation is achieved. Several porous materials can be used as a graft matrix, e.g., demineralized bone matrix, cancellous bone chips, hydroxyapatite, and β -tricalcium phosphate. A higher fraction of mesenchymal progenitor cells are retained within the graft, whereas the retention of hematopoietic cells is significantly lower (c). After enrichment the graft is ready for implantation, although postprocessing procedures such as addition of whole bone marrow or platelet-rich plasma can be performed to improve graft handling properties and to improve the therapeutic potential of the graft. Figure was produced using Servier Medical Art (<http://www.servier.com/servier-medical-art>).

they should present chemical and physical surface properties that promote osteogenic cell attachment and migration) and osteoinductive (i.e., they should stimulate osteogenic differentiation). β -Tricalcium phosphate (β -TCP), another material that has been extensively studied as a scaffold for tissue engineering of bone, was also evaluated as a matrix for intraoperative stem cell therapy settings—namely, for alveolar bone regeneration for cleft alveolus and also for spine fusion (19–21). In vitro assays have shown that MSCs can adhere to the porous structure of β -TCP within 2 h of combination and can sustain cell proliferation, making them a good candidate for intraoperative applications (20). The efficacy of SCR was also tested using a mixture of demineralized bone and cancellous chips clotted with platelet-rich plasma in a canine critical-size segmental femoral defect model (22). At 16 weeks, 100% response was obtained, which is equivalent to the results of the standard autograft method to repair critical-size defects. A preliminary clinical report describes the short-term (2-year) results of the intraoperative approach to treat three patients with extensive secondary osteonecrosis of the femoral condyles (23). This treatment, which combined decompression and debridement of the necrotic lesion and the commercial SCR system, facilitated recovery of knee function. The SCR system was introduced in 2003 as Collect[®] by DePuy Biologics (a Johnson & Johnson company), in combination with bone graft substitutes, as a minimally invasive therapy for spinal fusion that removed the need for bone graft harvesting. In general, the SCR system shows results that are clinically comparable with those of bone autograft, without the morbidity observed at the graft site. Challenges posed by this technology include a lack of control over the transplanted cells (this challenge applies to most exogenous cell-based therapies) and difficulty obtaining the quantities of cells that can be achieved through in vitro culture expansion (24).

In addition to the Collect system, several automated blood cell processors are used for intraoperative concentration of blood or bone marrow to treat, for example, osteonecrosis of the femoral head (25–28). These studies follow surgical protocols similar to those of the SCR system, described in detail in the paper by Hernigou et al. (29). Briefly, the bone marrow is harvested with the patient under general anesthesia, and the aspirated bone marrow is concentrated and injected into the femoral head after core decompression. The surgical treatment was considered safe and effective for symptomatic hips with osteonecrosis but without collapse (the clinical success drops

from as high as 90% to lower than 50% when the procedure is performed after joint collapse). After successful treatment, the patients experienced reduction in pain and other joint symptoms, delayed progression of the disease, and necrotic lesion regression.

Importantly, osteoconductive and osteoinductive implants containing therapeutic agents without an exogenous cell source can successfully promote new bone formation for the treatment of fractures and for spinal fusion procedures. For example, the OP-1TM product, recently acquired from Stryker by Olympus Biotech Corporation, is an osteoconductive and osteoinductive bone graft material comprising recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7) and type I bovine collagen that has been used in approximately 40,000 patients. The product was approved by the US Food and Drug Administration in 2001 for revision of posterolateral lumbar spine fusion and for the treatment of long bone nonunion fractures; it is also approved in Australia, Canada, Switzerland, and the European Union. The product is prepared in the operating room by combining collagen and BMP-7 powders with sterile saline, and it is believed to activate and recruit stem and progenitor cells upon implantation. A similar mechanism has been proposed for bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), which is supplied via a collagen sponge in the Infuse[®] bone graft (Medtronic) that was first approved in 2002 for use in anterior lumbar fusion surgery on skeletally mature patients. Interestingly, some studies have examined improvement of these strategies through intraoperative addition of autologous whole bone marrow. For example, through the use of a canine femoral defect model (30), the delivery of an osteoinductive material (OP-1) with bone marrow was examined. Although the addition of bone marrow promoted increased bone formation in the center of the defect, no overall functional differences were observed between the OP-1 implant plus bone marrow aspirate group and the OP-1 implant plus clotted blood control group. Perhaps the results would have been different had selective populations of cells been used in place of whole bone marrow. Whole bone marrow without prior concentration may promote hypoxia and nutrient deprivation in the defect because bone marrow is metabolically demanding owing to its high cell content. Therefore, it may be of interest to examine supplementing OP-1 or the Infuse bone graft with concentrated progenitor cells. Furthermore, growth factor therapy such as recombinant BMP-2 is under great scrutiny, given the recent analysis showing that risks for adverse events, including risks for ectopic bone formation, osteolysis, pain, new malignancy, implant displacement, subsidence, infection, urogenital events, and retrograde ejaculation, are 10–50 times higher than the original estimates (31). These risks may shift future bone regenerative strategies to those that do not require the addition of recombinant growth factors.

Osteochondrogenesis

Large osteochondral lesions do not spontaneously repair; thus, interventions to restore cartilage structure and function are required. Intraoperative approaches were developed for osteochondral repair to avoid the need for two surgeries (associated with cell expansion strategies) and to address challenges posed by the expansion of chondrocytes, which have limited regenerative potential. In one example, bone marrow–derived mononuclear cells that were collected and separated intraoperatively were mixed with autologous fibrin gel and delivered by injection to stimulate chondral regeneration within a full-thickness rabbit articular cartilage defect model (32). Treatment using autologous bone marrow–derived mononuclear cells promoted superior cartilage repair when compared with treatment using autologous peripheral blood–derived mononuclear cells mixed with autologous fibrin gel, or fibrin gel alone. Interestingly, although several studies have shown that fibrin gel has potential as a scaffold for cartilage, the results obtained with the fibrin gel alone were inferior to those of the repair obtained with no treatment. It is critical to consider that fibrin composition can dramatically impact cell invasion by endogenous cells and bone formation.

Recently, Giannini et al. (33) developed a one-step intraoperative arthroscopic repair technique using bone marrow-derived cells to repair talar osteochondral lesions and validated the application of this procedure to osteochondral lesions of the knee (34). The surgical procedure begins with bone marrow aspiration with the patient under general or spinal anesthesia. After bone marrow collection, the buffy coat is concentrated using Harvest Technologies' SmartPREP BMAC™ system. In parallel, surgeons start the arthroplasty, which includes lesion debridement, composite preparation (mixing the buffy coat with collagen powder or combining it with a hyaluronic acid membrane) and delivery, and composite stabilization using autologous platelet-rich fibrin gel. Patients experienced improvement of joint function with satisfactory graft integration and varying degrees of tissue remodeling, as indicated by the presence of proteoglycans and type II collagen, hyaline cartilage markers. Nonetheless, by the end of the follow-up period (24 months postoperatively), the histologic evaluation did not show complete hyaline cartilage. The short follow-up period, the small number of patients (48 for the ankle and 20 for the knee), and the limited number of biopsy specimens limit the conclusions that can be drawn from these studies. However, these studies represent a step toward osteochondral regeneration using intraoperative cell approaches.

Another single-step surgical procedure for the treatment of osteochondral lesions, proposed by Benthien & Behrens (35–37), is termed Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC®), reviewed by Steinwachs et al. (38). It combines subchondral microfracture with the fixation of a type I/III collagen membrane with fibrin glue or sutures. To increase the number of stem cells in the osteochondral defect, the standard AMIC technique (which relies on recruitment of MSCs stimulated through microfracture) was combined with the intraoperative delivery of concentrated bone marrow (39). The combined surgical procedure encompasses bone marrow harvesting, bone marrow concentration using Biomet's MarrowStim™ concentration kit, lesion debridement, microfracturing, collagen membrane preparation, placement of the concentrated bone marrow, and stabilization of the membrane using fibrin glue. Although the addition of bone marrow has not been conclusively demonstrated to be advantageous, increased numbers of MSCs were observed in the iliac crest bone marrow compared with numbers in blood induced by the microfracture procedure. The cartilage repair of osteochondral lesions may be related to the survival of a small number of progenitor cells that are delivered into the defect, promoting the early-stage regeneration process. This hypothesis is supported by the evidence of bone marrow-derived MSC survival, up to 24 weeks after transplantation into an osteochondral defect (40). Although bone marrow stimulation techniques such as microfracturing may increase the local level of cytokines that promote cartilage repair and may induce progenitor cells to migrate into the lesion, the microfracture-derived progenitor cells are too few to induce hyaline cartilage formation by themselves. Therefore, the delivery of intraoperatively isolated cells may be important for increasing the number of relevant cells in the defect and increasing their chance of survival.

Angiogenesis

Peripheral vascular disease (PVD) often results in reduced or blocked blood flow in the lower extremities, which can lead to critical limb ischemia that is associated with rest pain and tissue necrosis (ulcerations and gangrene). For some patients, revascularization is required to restore tissue perfusion. However, direct intervention to restore blood flow (e.g., through bypass surgery) is not always an option because the blockages are localized in distal small arteries. Therefore, treatments that promote angiogenesis have become a therapeutic focus for these patients. A comprehensive review on therapeutic angiogenesis for PVD using autologous bone marrow cell transplantation can be found in the paper by Matoba & Matsubara (41). The therapeutic application of bone marrow mononuclear cells harvested and sorted intraoperatively for the treatment of

critical limb ischemia patients was first reported in 2002 (42). This pilot study was motivated by evidence that bone marrow mononuclear cells could support collateral vessel formation in animal models (43, 44). Patients with bilateral leg ischemia received intramuscular injection of intraoperatively isolated and sorted bone marrow mononuclear cells (harvested from the iliac crest) in one leg and peripheral blood mononuclear cells in the other leg, as a control. Ankle-brachial index (the ratio between the blood pressure at the ankle and the blood pressure in the arm), rest pain, transcutaneous oxygen pressure, and pain-free walking time were significantly improved in the legs injected with bone marrow mononuclear cells. Additional studies have validated these results and have included additional assessment measures including the perfusion blood flow increase through perfusion scintigraphy, determination of endothelial dysfunction improvement, evaluation of wound healing, and examination of follow-up improvement in symptoms and clinical function (45–54). Furthermore, implantation of intraoperative bone marrow–derived mononuclear cells into ischemic limbs significantly contributed to reduced numbers of major amputations (42, 45, 47–53). Another report describes a similar study using granulocyte colony-stimulating factor, administered each of the five days prior to the operation, to mobilize peripheral blood mononuclear cells (55). Distal intramuscular injection of bone marrow buffy coat was also proposed as an adjunctive intraoperative cell treatment to be performed in combination with bypass surgery and/or interventional treatment (56). Although several cell-based therapies to promote angiogenesis involve an infusion of unfractionated mononuclear cells that contains stem and progenitor cells with the capability to differentiate into multiple lineages, endothelial differentiation appears to be favored (43, 44).

Although intramuscular injection is the main cell delivery route for PVD therapy, some cell delivery strategies combine intramuscular injection and intraarterial injection. This combination allows stem cells to reach targeted vessels and thus increases the concentration of stem cells in ischemic muscle regions that are still perfused (48, 56).

A fully automated system (the Tissue Genesis Cell Isolation System™) to isolate stem cells from autologous adipose tissue harvested by liposuction is being explored in an ongoing phase I trial for treatment of PVD (57). After the tissue is processed in the operating room, the obtained stem cells are seeded onto the inner surface of standard prosthetic grafts to promote graft endothelialization and avoid clot formation. The first patients treated with this method regained sensation in the leg and toes and started to walk without debilitating pain (58).

Cardiac Applications

It is compelling to consider intraoperative stem cell therapy for the treatment of ischemic myocardium on the basis of the potential for transplanted cells to inhibit apoptosis and scar formation, to promote connective tissue remodeling and production of extracellular matrix, to trigger endogenous stem cell homing, to modulate inflammation, and to promote angiogenesis with the hope of regenerating healthy myocardial tissue. Intraoperative administration of bone marrow cells, via intramyocardial or intracoronary injection, has been applied following coronary artery bypass grafting (CABG), for example, to enhance angiogenesis and myocardial repair. This technique can be augmented with the application of autologous fibrin glue immediately after cell injection to avoid loss of cells due to regurgitation (59). Although the majority of the clinical trials combining CABG and autologous stem cell transplantation have employed whole bone marrow–derived mononuclear cells (59–63), other studies used CD133⁺ cells sorted intraoperatively through immunomagnetic cell separation systems (64–66). An intraoperative method to isolate bone marrow–derived CD34⁺ cells for cardiac therapy was also proposed: It involves rapid erythrocyte depletion using hydroxyethyl starch and low-speed centrifugation, followed by

immunomagnetic CD34⁺ cell sorting (67). In general, intraoperative isolation and application of cells have promoted revascularization, resulting in enhanced myocardial perfusion, and contractility of infarct areas, leading to improvement in left ventricular ejection fraction (59, 65). Although injection of bone marrow–derived MSCs into peri-infarct areas may improve contractility and although injection of cells into the central zone of the myocardial infarction can promote angiogenesis, myogenic differentiation, and reverse ischemic remodeling (68), administration of bone marrow–derived cells directly into nonviable scarred myocardium does not appear to improve contractile function (62, 68). Therefore, when considering the cell delivery strategy for the regeneration of damaged heart tissue, it may be important to consider multiple sites of injection, including viable, peri-infarct areas and the central zone of the myocardial infarction (68).

REGENERATIVE MECHANISMS

Discerning the mechanisms that mediate the therapeutic effects of intraoperative stem cell therapies is a daunting task, and current data are insufficient to draw substantial conclusions. This is not surprising, given that the majority of the intraoperative stem cell studies focus on the assessment of safety and feasibility and thus, for the most part, neglect the investigation into mechanisms responsible for the observed outcomes. Potential mechanisms include the following: (a) Stem or progenitor cells within the transplant replenish progenitor cells in the host; (b) cells in the transplant differentiate and produce de novo tissue; (c) surviving (or dying) transplanted cells secrete trophic, angiogenic, or immunomodulatory factors that provide signals to local endogenous cells via paracrine signaling or to distant cells through endocrine mechanisms (which may result in mobilization and homing of distant host cells). It is also possible that transplanted cells may fuse with host cells (in a process known as cell fusion). The elucidation of mechanisms mediating functional improvements is complicated by the heterogeneous composition of many of the intraoperatively infused cell populations (e.g., bone marrow), where certain cell types may serve a dominant role or multiple cell types may work together synergistically. Specifically, given that many intraoperative cell therapy approaches employ heterogeneous cell populations that may include stem or progenitor cells, it is possible that positive outcomes may not be mediated by the stem or progenitor cells. Also, given that cells are isolated and processed within the operating room, there is likely considerable diversity in how cells are obtained, processed, and infused (despite efforts to standardize procedures with well-designed kits and devices), and this diversity may impact mode of action and outcome. Furthermore, one must not forget that, by virtue, intraoperative cell therapies involve isolation of an autologous cell source; thus, there can be significant differences in relative cell numbers and phenotypes, which may be a function of age, sex, race, body mass index, ancestry/genetics, diet, and environment. The mechanism likely also depends on the specific application (e.g., osteogenesis versus angiogenesis versus reduction of scar formation) and delivery method (e.g., local injection, systemic infusion, or delivery in combination with a biomaterial). Thus, many questions remain unanswered, and new techniques will likely be required to elucidate *in vivo* biology related to how transplanted cells mediate therapeutic responses (69). It is also likely that strategies to control the fate and function of cells following transplantation [e.g., by engineering exogenous cells within the operating room (70)] will provide an axis to maximize the therapeutic effect by harnessing specific mechanisms. These strategies should help reduce variability of the response.

CELL SOURCES

Adult stem and progenitor cells can be intraoperatively harvested from several tissues including bone marrow, adipose tissue, and peripheral blood. Bone marrow is the most common source, most

likely because it can be easily accessed in a rapid manner and because several tools are available to harvest marrow (from bone marrow transplantation). Bone marrow contains hematopoietic cells and mesenchymal cells, in addition to other cells types that may play a role in promoting tissue regeneration. However, one of the main limitations of intraoperative stem cell therapy approaches is the limited quantity of harvested source material and the low yield of cell isolation protocols, which typically yield stem cells at a frequency per mononucleated cell of 1 in 10,000 to 1 in 100,000 (71–74). To circumvent these challenges and to avoid the highly invasive procedure of bone marrow harvesting that causes pain at the site of aspiration, alternative sources from which to isolate autologous stem cells should be considered. For example, bone dusts, usually discarded as waste during spinal fusion, were proven to be a source of stem cells (75). Adipose tissue is a promising alternative source of cells that have multilineage differentiation potential, and it can be collected through a less invasive method and in larger quantities than bone marrow, with minimal morbidity upon harvest (76).

Several studies have established a comparative analysis among stem cells derived from different sources (76–79). The study developed by Peng et al. (76) included immunophenotypic analysis of stem cells isolated from rat bone marrow and adipose tissue, and it revealed a greater percentage of CD44⁺, CD73⁺, and CD90⁺ cells in adipose tissue. Moreover, greater proliferation capacity in cells isolated from adipose tissue is suggested by a higher and constant growth rate throughout 10 generations, a lower population-doubling time, the highest proportion of cell population in S phase, and higher telomerase activity. These results are supported by other published studies that focus on the assessment of different adult stem cell sources (77, 79). Adipose tissue could be considered a good alternative to bone marrow for intraoperative applications on the basis of stem cell abundance, frequency, and expansion potential. Although some patients might have limited adipose tissue for autologous settings, owing to the high frequency of adipose tissue–derived MSCs (their occurrence is 100 to 300 times higher than in bone marrow, and the number of stem cells that can be isolated per unit volume of lipoaspirate is approximately 10-fold greater than that from bone marrow), small adipose tissue reservoirs might be sufficient for stem cell isolation (77, 80–82). The number of required stem cells also depends on the clinical applications. For example, freshly isolated adipose tissue–derived stem cells from the infrapatellar fat pad are suitable for a one-step surgical procedure to regenerate small focal cartilage defects; however, for larger osteochondral defects, subcutaneous adipose tissue would be advisable (83). When harvesting adipose tissue for intraoperative stem cell therapy, one must also consider that the tissue harvesting site and the surgical procedure have an effect on the yield of stem cells. For instance, adipose tissue harvest from the abdomen through resection or tumescent liposuction yields more stem cells compared with ultrasound-assisted liposuction and the adipose tissue harvested from the hip/thigh region (81, 84). In the review by Hoogendoorn et al. (85) about the status of cell-based treatments for intervertebral disc regeneration, the authors propose a concept for a one-step procedure using adipose tissue–derived stem cells for regenerative treatment of mildly degenerated intervertebral discs and for spinal fusion of severe intervertebral disc degeneration. The adipose tissue should be harvested by minimally invasive techniques and should be processed by enzymatic digestion and centrifugal enrichment to obtain stem cells within a single surgical procedure lasting less than 2 h. For spinal fusions, the authors suggest short-term *ex vivo* triggering of osteogenesis by 15 min exposure to BMP-2 (86), mixing stem cells with a porous calcium phosphate scaffold, and implanting a bioresorbable polymer cage filled with the scaffold seeded with triggered stem cells. This one-step procedure for spinal fusion is described in detail elsewhere (87). For the regenerative treatment of mildly degenerated intervertebral discs, adipose tissue–derived stem cells, after cell isolation, could be transplanted by injection into the intervertebral disc after appropriate *ex vivo* cell triggering and cell carrier seeding. Case reports and phase I to III clinical trials using autologous

adipose tissue-derived stem cells in a variety of fields are reviewed and discussed by Gimble et al. (88).

POTENTIAL ROLES OF INTRAOPERATIVELY PROCESSED AND TRANSPLANTED CELL PRODUCTS

Given that many intraoperative cell therapy approaches take advantage of the heterogeneous cell populations contained in the bone marrow, there remains controversy about the specific subpopulations responsible for the different regeneration mechanisms and about the role of transplanted cells versus endogenous cells. The majority of intraoperative cell therapies used to promote angiogenesis for PVD patients infuse unfractionated mononuclear cells, and some authors suggest that the synergetic effect of different cell populations on the promotion of angiogenesis in PVD seems to involve bone marrow-derived CD34⁺ cells that express receptors for basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin-2. These authors also suggest that the CD34⁺ fraction is responsible for secreting the angiogenic factors (bFGF and VEGF) and angiopoietin-2, which stimulates CD34⁺ to form collateral vessels and promotes the maturation and maintenance of the newly formed vessels (42, 45). The buffy coat contains high numbers of CD34⁺ and CD133⁺ cells, a significant subset of which also coexpress vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2), and CD34⁺CD133⁺VEGFR-2⁺ cells were defined by Peichev et al. (89) as functional endothelial progenitor cells. However, Case et al. (90) claim that the CD34⁺ fraction of mononuclear cells (derived from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood and umbilical cord blood) that also coexpresses CD133 and VEGFR is positive for CD45 (>99%). The authors also state that this cell fraction (CD34⁺CD45⁺) is a distinct and primitive hematopoietic subpopulation, as opposed to a population of endothelial progenitor cells, and therefore cannot form new blood vessels. However, the CD34⁺CD45⁻ cell fraction was enriched in endothelial colony-forming cells. This finding illustrates the importance of defining precise biological potential of different stem cell subpopulations to design more effective stem cell therapies.

The promotion of angiogenesis by the injection of bone marrow-derived cells into ischemic myocardial areas seems to play a critical role in the improvement of regional cardiac performance. The injection of bone marrow-derived mononuclear cells contributes to improved myocardial perfusion owing to an increase in the myocardial microvessel density. The myocardial perfusion improvement seems to be positively correlated with the number of CD34⁺ cells transplanted (60). The majority of studies fail to show direct evidence of cell fate after transplantation. For instance, there is no evidence that the therapeutic effects can be attributed to the differentiation of the transplanted cells into cardiomyocytes. In a study by Ang et al. (62), bone marrow-derived mononuclear cells were injected into scarred myocardium to prevent the effects of functional improvement in viable myocardium following revascularization. Therefore, the functional assessment was focused only on revascularizing chronically scarred, nonviable myocardium. This way, any difference in function could not be attributed to differences in perfusion. The injection of bone marrow-derived cells did not improve the contractile function, suggesting that the bone marrow-derived cells do not contribute to myocardial regeneration. Nonetheless, these results should not be extrapolated to other clinical settings, such as acute myocardial infarction or chronically ischemic but viable myocardium. The absence of myocardial regeneration may be due to the failure of cell engraftment in chronically scarred and nonviable tissue.

Several osteogenic intraoperative cell therapies also involve the application of unfractionated bone marrow cells or bone marrow-derived mononuclear cells. By contrast, SCR is based on the concept that connective tissue progenitors are retained in the graft composite with

significantly greater frequency than other bone marrow-derived cells. Connective tissue progenitors are defined by colony-forming units that express alkaline phosphatase (73, 74, 91). In addition to alkaline phosphatase expression, connective tissue progenitors can be identified through other markers such as STRO-1 (92) and activated leukocyte-cell adhesion molecule (93). Although connective tissue progenitors are an obvious choice for osteogenic applications, other selected cell types and cytokines play a key role in the establishment of optimal conditions for bone regeneration. Therefore, intraoperative cell therapies for osteochondrogenic applications also include the delivery of relevant cytokines for tissue regeneration, which can be achieved through autologous platelet products. The delivery of platelet products, such as platelet-rich plasma or platelet-rich fibrin gel, contributes to the stimulation of progenitor cells, and these platelet products act as a chemoattractant owing to the release of growth factors by the α granules, including PDGF, TGF- β 1, TGF- β 2, platelet-derived EGF, VEGF, insulin growth factor 1, and platelet factor 4 (94–97). Furthermore, platelet-rich plasma in combination with thrombin also increases the handling properties of the final grafts for osteogenic applications owing to its clotting effect (22).

METHODS USED TO INTRAOPERATIVELY ISOLATE OR CONCENTRATE CELL PRODUCTS

Current and proposed intraoperative cell therapies include the delivery of mononuclear cells derived from the bone marrow, mesenchymal and endothelial progenitor cells derived from the bone marrow or from the adipose tissue, the whole bone marrow cell population, and platelet-rich plasma. These cell populations/products can be obtained intraoperatively through several methods, summarized in **Table 2**: density gradient, automated cell processor, immune-based cell sorting, and SCR.

The most traditional method to obtain mononuclear cells from bone marrow is the density gradient. Complementary strategies, such as red blood cell lysis and dextran sedimentation (98), are used to optimize cell isolation, but the extremely low yield continues to be a limitation and hinders the development of intraoperative approaches. Furthermore, during density gradient media separation processes, cells are exposed to potential toxic agents and require the use of a centrifuge. Autologous platelet-rich plasma can also be processed from peripheral blood or from bone marrow using density gradient techniques, representing a safe and cost-effective method to obtain growth factors (21). The handling properties of platelet-rich plasma can be improved if it is processed into a platelet gel, through the embedding of concentrated platelets within a network of polymerized fibrin. Several commercially available products serve this purpose, such as Platelex[®] and Vivostat PRF[®] (99, 100).

Automated cell processors perform washing and tissue digestion, concentration of the buffy coat with or without a sedimentation agent such as hydroxyethyl starch, volume reduction by plasma depletion, and platelet-rich plasma processing, and they have been used in intraoperative settings to process cells from bone marrow, peripheral blood, and adipose tissue. Automated cell processors provide the benefit of superior operational reliability and efficiency, reduced contamination risk, and standardization of cell processing protocols.

Immune-based cell sorting, through magnetic activated cell sorting, is used to isolate specific cell subpopulations on the basis of their surface antigens, such as CD34⁺ or CD133⁺ cells for angiogenic applications (64, 66, 67, 101). Immune-based cell sorting is limited to homogeneous cell subpopulations that have a well-defined panel of markers. However, the use of highly homogeneous stem cell populations for intraoperative approaches may hinder an efficient regeneration. The experimental evidence supports the idea of a delicate and complex balance between different putative mechanisms. Although highly homogenous stem cell populations allow the design of a

Table 2 Methods to isolate/concentrate cell populations used in intraoperative settings and related commercial products

Method	Brief description	Product, company	Reference(s): Method	Reference(s): Intraoperative
Selective cell retention	Bone graft products are used to selectively retain progenitor cells from whole bone marrow or other blood products, increasing the cell concentration that will be delivered. The bone graft products are loaded into a syringe, and the bone marrow is passed through the matrix samples several times via a low flow rate.	Collect [®] , DePuy	115	17, 18, 20, 22 23
Immune-based cell sorting	Immune-based cell sorting, through magnetic activated cell sorting, is used to isolate specific cells on the basis of their surface antigens (64, 66, 67, 101), including positive selection of a target cell population or negative selection through removal of unwanted cell populations.	CliniMACS [®] , Miltenyi Biotec Isolux [®] , Baxter	–	64, 66, 101 67
Density gradient	Cell separation can be achieved on the basis of the density and size differences of different cell populations. This can be accomplished through simple centrifugation, optimized centrifugation protocols, and centrifugation using density media. The cell population recovered depends on the density medium, centrifugation protocol, and fraction collected. Some devices were developed to improve the handling of bone marrow and other blood products, such as platelet-rich plasma, through density gradient cell isolation protocols in order to avoid contamination and to provide more consistent results.	Density media: Ficoll-Paque [™] and Percoll [™] , GE Healthcare Lymphoprep [™] , Axis-Shield Devices: GenesisCS, EmCyme Corporation MarrowStim [™] Concentration Kit, Biomet SmartPreP, Harvest Technologies	98 – – – 116 –	14, 19, 21, 50, 52, 54, 61, 62 – – – 48 39 33, 34, 52, 56 42
Automated blood processor	Cellular products are separated from blood and related products using fully automated and closed units, on the basis of the density gradient principle.	CS-3000 Plus Blood Cell Separator, Baxter Sepax [®] , Biosafe COBE [®] , CaridianBCT AS blood cell separator, Fresenius	117–119 117–120 – –	56 15, 20, 26–29, 55, 63, 113 50, 51

more controlled and defined therapeutic technique, discarding other cellular components may disrupt the equilibrium between important regeneration processes involving different cell types and related trophic signaling. The isolation of mesenchymal progenitor cells by immune-based methods is restricted by the fact that the antigenic profile displayed by these cells is not unique. Thus, mesenchymal progenitor cells cannot be associated with a particular cell phenotype, and there is no consensus about what antibodies should be used to isolate them. Strategies focusing on methods to achieve one-step isolation of relevant cell populations are crucial to the success of intraoperative stem cell therapies.

In the field of orthopedics, protocols have been constructed on the basis of SCR on appropriate substrates that promote rapid attachment of connective tissue progenitors. Substrates such as cancellous bone graft, porous hydroxyapatite, and fibrin microbeads are used to selectively concentrate and retain mesenchymal progenitor cells from whole bone marrow (17, 18, 20, 22, 102). However, in some cases, the isolation time frame is not aligned with the intraoperative requirements, and the materials used to date are not ideal because they are significantly limited with respect to mechanical properties, availability, and risk of disease transmission. Therefore, there exists great opportunity to optimize and expand the utility and scope of these intraoperative SCR approaches.

CHALLENGES AND NEXT STEPS

To leverage the developments achieved in the field of cell-based therapies, a few topics should be considered carefully, and further improvement and progress with respect to these issues would greatly enhance the impact of intraoperative cell therapies. The limited number of cells available for delivery without previous cell expansion can limit the potential of intraoperative cell therapies. Therefore, the development of strategies to increase the cell isolation yield during the intraoperative time frame is highly recommended. A method termed systematic evolution of ligands by exponential enrichment has shown promising isolation results when used to target MSCs from whole bone marrow (103). This method uses aptamers, such as single-stranded DNA or RNA molecules, with high affinity and specificity for the membrane proteins of the target cells. The aptamers function as molecular probes for molecular signatures of cells that do not present a panel of highly specific surface markers (104). Although current reports of intraoperative cell therapy do not explore adipose tissue as a progenitor cell source, several authors propose methods for intraoperative generation of autologous cell therapies based on lipoaspirate cells. Cell isolation from adipose tissue can be optimized by appropriate selection of enzymatic treatment, washing and centrifugation steps, and the availability of clinical-grade devices for cell isolation from adipose tissue (for example, Celution[®] by Cytori Therapeutics and Tissue Genesis Cell Isolation System[™] by Tissue Genesis) (105, 106). However, methods that require extensive manipulation of cells in the operating room, such as the use of enzymes, may lead to prolonged regulatory approval processes. Furthermore, efforts are under way to develop adipose cell constructs using different materials to promote rapid attachment of adipose stromal vascular fraction cells that are known to include multipotent and progenitor cells. Biodegradable polymeric scaffolds, macroporous poly(L-lactide-copolactone), and porous natural type I/III collagen were proposed for a one-step surgical procedure for cartilage and bone tissue engineering applications. These techniques promoted cell attachment after 5–10 min, and a great portion of colony-forming unit fibroblasts within the stromal vascular fraction preferentially adhered to the polymeric scaffolds (107). Stromal vascular fraction cells can also be embedded in fibrin hydrogels through the method proposed by Bensaïd et al. (108). The hydrogels allow an instant seeding of the cells and can be

used as a coating for bone-substitute materials in the intraoperative engineering of osteogenic grafts (109).

Strategies to incorporate chemical and physical cues to direct cell fate *in vivo* are critical for the success of intraoperative cell therapies. Additional cues may be crucial for promoting cell proliferation and survival and thus to helping reach a sufficient number of cells for a positive outcome. Such a strategy could be designed as a two-step stimulation, first to promote cell expansion in order to reach an optimal cell concentration and then to direct cell function toward desired regeneration mechanisms.

The use of unfractionated cell populations in intraoperative cell therapies leads to poorly defined cell products owing to their heterogeneity and lack of understanding of their *in vivo* fate and function. This heterogeneity also hinders the generalization of findings from different groups because differences in patients, processing conditions, cell source, and other clinical parameters have a high impact on cell phenotype. A comprehensive characterization of the different cell populations and their properties represents a necessary condition for further development of efficient intraoperative cell therapies. Accurate *in vivo* cell tracking of endogenous and implanted cells is crucial for defining cell populations and their therapeutic mechanisms in order to design effective strategies in terms of cell isolation, choice of adequate cell populations, cell delivery, treatment timing, and control of cell fate *in vivo*. Although cell heterogeneity represents a challenge to further elucidating regenerative mechanisms, it is a key aspect of the cells' diverse therapeutic effects.

The variability from patient to patient in terms of number of progenitor cells also poses a challenge for the intraoperative technique itself (15). Currently, the number of progenitor cells is determined through *in vitro* assays requiring cell culture, such as colony-forming unit fibroblast assays; therefore, the number of progenitor cells delivered intraoperatively is determined retrospectively. There is a need to evaluate intraoperatively the number of stem and progenitor cells that were collected and that will be delivered, increasing the complexity level of this approach. If we consider the patient variability in terms of the number of cells with different phenotypes, the concept of cell sorting is appealing because it allows the standardization of the appropriate number of cells, presenting a well-defined phenotype, to be delivered. However, this standardization requires the elucidation of specific signatures of relevant cell subpopulations.

Cell delivery strategies have a great impact on the outcome of cell therapies. Delivery methods should promote cell survival and direct cell function to maximize the positive outcome. A recent report proposes the development of an intraoperative cell therapy approach for autologous vascular graft coating, which would promote the recellularization of decellularized homografts or xenografts to minimize postimplantation complications (101). The strategy focuses on the delivery of bone marrow-derived CD133⁺ cells embedded in autologous fibrin, via spray administration, using the commercially available system Vivostat[®]. This concept takes advantage of the promising properties of fibrin as an extracellular matrix for angiogenesis: Fibrin is able to support the self-organization process of bone marrow-derived mononuclear cells to produce vascular structures within avascular 3D fibrin matrices (110), and fibrin tubular structures can withstand circumferential strain due to collagen deposition of interstitial cells seeded on the constructs, leading to an increase of the tensile strength (111). Nonetheless, because transplanted fibrin matrix is degraded by fibrinolytic processes prior to complete cell engraftment, fibrin chemical stabilization or other alternatives must be developed to improve the stability of the coating during the engraftment period.

Limitations in the design of many intraoperative clinical studies seriously hinder the interpretation of the clinical data, compromising the ability to draw valid conclusions. Frequent study limitations include the small number of patients, lack of controls (due to practical and ethical issues),

patient inclusion criteria (the patients who agree to participate in studies for novel therapies usually have already undergone several unsuccessful treatments, so they represent the worst-case scenario when starting the intraoperative cell therapy), and absence of long-term follow-up. Randomized double-blind controlled trials are clearly required to validate the most promising intraoperative approaches. Despite these challenges, there are great opportunities to translate basic research and preliminary clinical studies into widely available clinical treatments and thus push even further the progress already made in this field.

SUMMARY

In recent years, intraoperative cell therapy has emerged as an important and exciting approach that can potentially treat many medical conditions. Intraoperative approaches, using multiple cell types, have already been shown to be safe and effective for multiple indications. Furthermore, many approaches are being developed to increase the therapeutic impact, optimize the desired outcome, and overcome current limitations—namely, low yield of cell isolation methods and lack of control of cell fate and function after implantation. The development of these approaches depends on the identification of relevant cell subpopulations and on the understanding of regenerative mechanisms through different perspectives ranging from basic biology to general pathology. Cell therapy brings together a multitude of disciplines: biology, chemistry, biomaterials science, medicine, and engineering, among others. Therefore, an effort should be made to develop collaborative studies that take advantage of the promising developments in each field. For example, the review by Discher et al. (112) highlights the importance of integrative approaches to better control stem function, such as the use of cytokine combinations, material systems including extracellular matrix components, and biomechanical interactions, as well as a systems biology approach to better predict stem cell behavior in vivo. Although there is significant opportunity to improve and expand the utility of existing intraoperative stem cell therapies, elucidating the main regenerative mechanisms that mediate favorable therapeutic response and conducting more controlled clinical studies should remain a priority.

DISCLOSURE STATEMENT

J.M.K. is a co-owner of Megacell Therapeutics, a company that has an option to license IP generated by J.M.K. J.M.K. may benefit financially if the IP is licensed and further validated. J.M.K.'s interests were reviewed and are subject to a management plan overseen by the Brigham and Women's Hospital and Partners HealthCare in accordance with their conflict-of-interest policies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Vikram Juneja and Vijay Kumar for helpful feedback and refinements to this review. M.B.C. acknowledges support from Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal (SFRH/BD/33723/2009), through the MIT-Portugal Program's Bioengineering Systems Focus Area. This work was supported by National Institutes of Health grants HL095722 and HL097172 to J.M.K.

LITERATURE CITED

1. Joneschild E, Urbaniak JR. 2005. Biology of the vascularized fibular graft. In *Bone Generation and Repair: Biology and Clinical Applications*, ed. JR Lieberman, GE Friedlaender, pp. 93–112. New York: Humana
2. de Boer HH. 1988. The history of bone grafts. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 226:292–98
3. Fujishiro T, Kobayashi H, Bauer TW. 2008. Autograft bone. In *Musculoskeletal Tissue Regeneration*, ed. WS Pietrzak, pp. 65–79. New York: Humana
4. Paley D, Young MC, Wiley AM, Fornasier VL, Jackson RW. 1986. Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. An experimental study in rabbits. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 208:300–12
5. Healey JH, Zimmerman PA, McDonnell JM, Lane JM. 1990. Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 256:280–85
6. Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R. 1991. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 266:259–70
7. Garg NK, Gaur S, Sharma S. 1993. Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. *Acta Orthop. Scand.* 64:671–72
8. Siwach RC, Sangwan SS, Singh R, Goel A. 2001. Role of percutaneous bone marrow grafting in delayed unions, non-unions and poor regenerates. *Indian J. Med. Sci.* 55:326–36
9. Connolly JF. 1995. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 313:8–18
10. Rougraff BT, Kling TJ. 2002. Treatment of active unicameral bone cysts with percutaneous injection of demineralized bone matrix and autogenous bone marrow. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 84:921–29
11. Docquier P-L, Delloye C. 2005. Treatment of aneurysmal bone cysts by introduction of demineralized bone and autogenous bone marrow. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 87:2253–58
12. Friedenstein AJ. 1976. Precursor cells of mechanocytes. *Int. Rev. Cytol.* 47:327–59
13. Budenz RW, Bernard GW. 1980. Osteogenesis and leukopoiesis within diffusion-chamber implants of isolated bone marrow subpopulations. *Am. J. Anat.* 159:455–74
14. Connolly J, Guse R, Lippiello L, Dehne R. 1989. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 71:684–91
15. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. 2005. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 87:1430–37
16. McLain RF, Fleming JE, Boehm CA, Muschler GF. 2005. Aspiration of osteoprogenitor cells for augmenting spinal fusion: comparison of progenitor cell concentrations from the vertebral body and iliac crest. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 87A:2655–61
17. Muschler GF, Nitto H, Matsukura Y, Boehm C, Valdevit A, et al. 2003. Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 407:102–18
18. Muschler GF, Matsukura Y, Nitto H, Boehm CA, Valdevit AD, et al. 2005. Selective retention of bone marrow-derived cells to enhance spinal fusion. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 432:242–51
19. Oyama T, Nishimoto S, Takeda M. 2005. Alveolar bone regeneration utilizing β -TCP and platelet-rich plasma (PRP) derived from bone marrow aspirate. *Ann. Plast. Surg.* 54:222–23
20. Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J. 2008. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials* 29:3973–82
21. Nishimoto S, Oyama T, Matsuda K. 2007. Simultaneous concentration of platelets and marrow cells: a simple and useful technique to obtain source cells and growth factors for regenerative medicine. *Wound Repair Regen.* 15:156–62
22. Brodke D, Pedrozo HA, Kapur TA, Attawia M, Kraus KH, et al. 2006. Bone grafts prepared with selective cell retention technology heal canine segmental defects as effectively as autograft. *J. Orthop. Res.* 24:857–66
23. Lee K, Goodman SB. 2009. Cell therapy for secondary osteonecrosis of the femoral condyles using the Collect DBM System: a preliminary report. *J. Arthroplasty* 24:43–48
24. Kraus KH, Kirker-Head C. 2006. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.* 35:232–42
25. Hernigou P, Beaujean F. 2002. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 405:14–23

26. Gangji V, Hauzeur J-P, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M. 2004. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells: a pilot study. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 86:1153-60
27. Gangji V, Hauzeur J-P. 2005. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 87:106-12
28. Hernigou P, Poignard A, Zilber S, Rouard H. 2009. Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Indian J. Orthop.* 43:40-45
29. Hernigou P, Manicom O, Poignard A, Nogier A, Filippini P, De Abreu L. 2004. Core decompression with marrow stem cells. *Oper. Tech. Orthop.* 14:68-74
30. Takigami H, Kumagai K, Latson L, Togawa D, Bauer T, et al. 2007. Bone formation following OP-1 implantation is improved by addition of autogenous bone marrow cells in a canine femur defect model. *J. Orthop. Res.* 25:1333-42
31. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. 2011. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J.* 11:471-91
32. Chang F, Ishii T, Yanai T, Mishima H, Akaogi H, et al. 2008. Repair of large full-thickness articular cartilage defects by transplantation of autologous uncultured bone-marrow-derived mononuclear cells. *J. Orthop. Res.* 26:18-26
33. Giannini S, Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B. 2009. One-step bone marrow-derived cell transplantation in talar osteochondral lesions. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 467:3307-20
34. Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B, Cenacchi A, Giannini S. 2010. Osteochondral lesions of the knee: a new one-step repair technique with bone-marrow-derived cells. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 92:2-11
35. Benthien JP, Behrens P. 2010. Autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): combining microfracturing and a collagen I/III matrix for articular cartilage resurfacing. *Cartilage* 1:65-68
36. Benthien JP, Behrens P. 2010. Autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): a one-step procedure for retropatellar articular resurfacing. *Acta Orthop. Belg.* 76:260-63
37. Benthien J, Behrens P. 2011. The treatment of chondral and osteochondral defects of the knee with autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): method description and recent developments. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 19(8):1316-19
38. Steinwachs MR, Gugli T, Kreuz PC. 2008. Marrow stimulation techniques. *Injury* 39:26-31
39. de Girolamo L, Bertolini G, Cervellini M, Sozzi G, Volpi P. 2010. Treatment of chondral defects of the knee with one step matrix-assisted technique enhanced by autologous concentrated bone marrow: in vitro characterisation of mesenchymal stem cells from iliac crest and subchondral bone. *Injury* 41:1172-77
40. Oshima Y, Watanabe N, Matsuda K-i, Takai S, Kawata M, Kubo T. 2005. Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation. *J. Histochem. Cytochem.* 53:207-16
41. Matoba S, Matsubara H. 2009. Therapeutic angiogenesis for peripheral artery diseases by autologous bone marrow cell transplantation. *Curr. Pharm. Des.* 15:2769-77
42. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, et al. 2002. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360:427-35
43. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K-i, et al. 2001. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103:897-903
44. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, et al. 2001. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 104:1046-52
45. Miyamoto M, Yasutake M, Takano H, Takagi H, Takagi G, et al. 2004. Therapeutic angiogenesis by autologous bone marrow cell implantation for refractory chronic peripheral arterial disease using assessment of neovascularization by ^{99m}Tc-tetrofosmin (TF) perfusion scintigraphy. *Cell Transplant.* 13:429-37
46. Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, et al. 2004. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 109:1215-18

47. Kohlman-Trigoboff D, Lawson JH, Murphy MP. 2006. Stem cell use in a patient with an ischemic foot ulcer: a case study. *J. Vasc. Nurs.* 24:56–61
48. Franz RW, Parks A, Shah KJ, Hankins T, Hartman JF, Wright ML. 2009. Use of autologous bone marrow mononuclear cell implantation therapy as a limb salvage procedure in patients with severe peripheral arterial disease. *J. Vasc. Surg.* 50:1378–90
49. Napoli C, Farzati B, Sica V, Iannuzzi E, Coppola G, et al. 2008. Beneficial effects of autologous bone marrow cell infusion and antioxidants/L-arginine in patients with chronic critical limb ischemia. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 15:709–18
50. Hernández P, Cortina L, Artaza H, Pol N, Lam RM, et al. 2007. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: a comparison of using blood cell separator and Ficoll density gradient centrifugation. *Atherosclerosis* 194:e52–56
51. Koshikawa M, Shimodaira S, Yoshioka T, Kasai H, Watanabe N, et al. 2006. Therapeutic angiogenesis by bone marrow implantation for critical hand ischemia in patients with peripheral arterial disease: a pilot study. *Curr. Med. Res. Opin.* 22:793–98
52. Amann B, Luedemann C, Rätei R, Schmidt-Lucke JA. 2009. Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease. *Cell Transplant.* 18:371–80
53. Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, et al. 2008. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am. Heart J.* 156:1010–18
54. Kamata Y, Takahashi Y, Iwamoto M, Matsui K, Murakami Y, et al. 2007. Local implantation of autologous mononuclear cells from bone marrow and peripheral blood for treatment of ischaemic digits in patients with connective tissue diseases. *Rheumatology* 46:882–84
55. Huang P, Li S, Han M, Xiao Z, Yang R, Han ZC. 2005. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care* 28:2155–60
56. Kolvenbach R, Kreissig C, Cagiannos C, Afifi R, Schmaltz E. 2010. Intraoperative adjunctive stem cell treatment in patients with critical limb ischemia using a novel point-of-care device. *Ann. Vasc. Surg.* 24:367–72
57. US Natl. Inst. Health. 2011. *Feasibility study of the TGI adipose-derived stromal cell (ASC)-coated ePTFE vascular graft (TGI-PVG-IDE)*. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01305863>
58. Univ. Louisville. 2011. *UofL vascular surgeons perform first prosthetic bypass graft procedure using patient's own stem cells with 'point-of-care' technology*. <http://louisville.edu/medschool/news-archive/uofl-vascular-surgeons-perform-first-prosthetic-bypass-graft-procedure-using-patient2019s-own-stem-cells-with-2018point-of-care2019-technology>
59. Mocini D, Staibano M, Mele L, Giannantoni P, Menichella G, et al. 2006. Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Am. Heart J.* 151:192–97
60. Yaoita H, Takase S, Maruyama Y, Sato Y, Satokawa H, et al. 2005. Scintigraphic assessment of the effects of bone marrow-derived mononuclear cell transplantation combined with off-pump coronary artery bypass surgery in patients with ischemic heart disease. *J. Nucl. Med.* 46:1610–17
61. Zhao Q, Sun Y, Xia L, Chen A, Wang Z. 2008. Randomized study of mononuclear bone marrow cell transplantation in patients with coronary surgery. *Ann. Thorac. Surg.* 86:1833–40
62. Ang K-L, Chin D, Leyva F, Foley P, Kubal C, et al. 2008. Randomized, controlled trial of intramuscular or intracoronary injection of autologous bone marrow cells into scarred myocardium during CABG versus CABG alone. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 5:663–70
63. Li T-S, Hamano K, Hirata K, Kobayashi T, Nishida M. 2003. The safety and feasibility of the local implantation of autologous bone marrow cells for ischemic heart disease. *J. Card. Surg.* 18:S69–75
64. Ghodsizad A, Klein H-M, Borowski A, Stoldt V, Feifel N, et al. 2004. Intraoperative isolation and processing of BM-derived stem cells. *Cytotherapy* 6:523–26
65. Stamm C, Kleine HD, Westphal B, Petzsch M, Kittner C, et al. 2004. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 52:152–58

66. Klein HM, Assmann A, Lichtenberg A, Heke M. 2010. Intraoperative CD133⁺ cell transplantation during coronary artery bypass grafting in ischemic cardiomyopathy. *MMCTS* 2010:3947
67. Donnenberg AD, Donnenberg VS, Griffin DL, Moore LR, Tekinturhan F, Kormos RL. 2011. Intraoperative preparation of autologous bone marrow-derived CD34-enriched cellular products for cardiac therapy. *Cytotherapy* 13(4):441-48
68. Jin P, Wang E, Wang Y-h, Huang W, Kuang W, et al. 2011. Central zone of myocardial infarction: a neglected target area for heart cell therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 16:636-47
69. Zhao W, Schafer S, Choi J, Yamanaka YJ, Lombardi ML, et al. 2011. Cell-surface sensors for real-time probing of cellular environments. *Nat. Nanotechnol.* 6:524-31
70. Sarkar D, Vemula PK, Zhao W, Gupta A, Karnik R, Karp JM. 2010. Engineered mesenchymal stem cells with self-assembled vesicles for systemic cell targeting. *Biomaterials* 31:5266-74
71. Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98:2396-402
72. Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. 2003. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp. Hematol.* 31:723-32
73. Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA. 2001. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J. Orthop. Res.* 19:117-25
74. Muschler GF, Boehm C, Easley K. 1997. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 79:1699-709
75. Ichihyanagi T, Anabuki K, Nishijima Y, Ono H. 2010. Isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow wastes of spinal fusion procedure (TLIF) for low back pain patients and preparation of bone dusts for transplantable autologous bone graft with a serum glue. *Biosci. Trends* 4:110-18
76. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, et al. 2008. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 17:761-74
77. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24:1294-301
78. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. 2007. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 327:449-62
79. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretao MP, Senegaglia AC, Hansen P, et al. 2008. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp. Biol. Med.* 233:901-13
80. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, et al. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7:211-28
81. Oedayrasingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, et al. 2006. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 8:166-77
82. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. 2006. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 24:150-54
83. Jurgens WJFM, van Dijk A, Zandieh Doulabi B, Niessen FB, Ritt MJPF, et al. 2009. Freshly isolated stromal cells from the infrapatellar fat pad are suitable for a one-step surgical procedure to regenerate cartilage tissue. *Cytotherapy* 11:1052-64
84. Jurgens WJFM, Oedayrasingh-Varma MJ, Helder MN, Zandieh Doulabi B, Schouten TE, et al. 2008. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res.* 332:415-26
85. Hoogendoorn RJW, Lu ZF, Kroeze RJ, Bank RA, Wuisman PIJM, Helder MN. 2008. Adipose stem cells for intervertebral disc regeneration: current status and concepts for the future. *J. Cell. Mol. Med.* 12:2205-16
86. Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, Wuisman PIJM, Klein-Nulend J. 2006. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342:902-8

87. Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, Wuisman PIJM. 2007. Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. *Tissue Eng.* 13:1799–808
88. Gimble J, Guilak F, Bunnell B. 2010. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res. Ther.* 1:19
89. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, et al. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95:952–58
90. Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, et al. 2007. Human CD34⁺AC133⁺VEGFR-2⁺ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp. Hematol.* 35:1109–18
91. Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ, Muschler GF. 1997. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J. Orthop. Res.* 15:546–57
92. Simmons P, Torok-Storb B. 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78:55–62
93. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, et al. 1998. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J. Bone Miner. Res.* 13:655–63
94. Oprea WE, Karp JM, Hosseini MM, Davies JE. 2003. Effect of platelet releasate on bone cell migration and recruitment in vitro. *J. Craniofac. Surg.* 14:292–300
95. Langer HF, Gawaz M. 2008. Platelets in regenerative medicine. *Basic Res. Cardiol.* 103:299–307
96. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. 2004. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 114:1502–8
97. Kark LR, Karp JM, Davies JE. 2006. Platelet releasate increases the proliferation and migration of bone marrow-derived cells cultured under osteogenic conditions. *Clin. Oral Implants Res.* 17:321–27
98. Peterbauer-Scherb A, van Griensven M, Meinel A, Gabriel C, Redl H, Wolbank S. 2010. Isolation of pig bone marrow mesenchymal stem cells suitable for one-step procedures in chondrogenic regeneration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 4:485–90
99. Leitner GC, Gruber R, Neumüller J, Wagner A, Kloimstein P, et al. 2006. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang.* 91:135–39
100. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Borzini P. 2008. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltek®. *Vox Sang.* 94:202–8
101. Kaminski A, Klopsch C, Mark P, Yerebakan C, Donndorf P, et al. 2010. Autologous valve replacement—CD133⁺ stem cell-plus-fibrin composite-based sprayed cell seeding for intraoperative heart valve tissue engineering. *Tissue Eng. Part C* 17:299–309
102. Zangi L, Rivkin R, Kassis I, Leviansky L, Marx G, Gorodetsky R. 2006. High-yield isolation, expansion, and differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells with fibrin microbeads. *Tissue Eng.* 12:2343–54
103. Guo K-T, Schäfer R, Paul A, Gerber A, Ziemer G, Wendel HP. 2006. A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers. *Stem Cells* 24:2220–31
104. Guo K-T, Ziemer G, Paul A, Wendel HP. 2008. CELL-SELEX: novel perspectives of aptamer-based therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 9:668–78
105. Lin K, Matsubara Y, Masuda Y, Togashi K, Ohno T, et al. 2008. Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution™ system. *Cytotherapy* 10:417–26
106. Hicok KC, Hedrick MH. 2011. Automated isolation and processing of adipose-derived stem and regenerative cells. *Methods Mol. Biol.* 702:87–105
107. Jurgens WJ, Kroeze RJ, Bank RA, Ritt MJPF, Helder MN. 2011. Rapid attachment of adipose stromal cells on resorbable polymeric scaffolds facilitates the one-step surgical procedure for cartilage and bone tissue engineering purposes. *J. Orthop. Res.* 29:853–60
108. Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. 2003. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 24:2497–502

109. Müller AM, Mehrkens A, Schäfer DJ, Jaquiere C, Güven S, et al. 2010. Towards an intraoperative engineering of osteogenic and vasculogenic grafts from the stromal vascular fraction of human adipose tissue. *Eur. Cells Mater.* 19:127–35
110. Rüger BM, Breuss J, Hollemann D, Yanagida G, Fischer MB, et al. 2008. Vascular morphogenesis by adult bone marrow progenitor cells in three-dimensional fibrin matrices. *Differentiation* 76:772–83
111. Syedain ZH, Weinberg JS, Tranquillo RT. 2008. Cyclic distension of fibrin-based tissue constructs: evidence of adaptation during growth of engineered connective tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:6537–42
112. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. 2009. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 324:1673–77
113. Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H. 2006. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions: surgical technique. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 88:322–27
114. Gupta MC, Theerajunyaporn T, Maitra S, Schmidt MB, Holy CE, et al. 2007. Efficacy of mesenchymal stem cell enriched grafts in an ovine posterolateral lumbar spine model. *Spine* 32:720–26
115. Jacobsen K, Szczepanowski K, Al-Zube LA, Kim J, Lin SS. 2008. The role of intraoperative bone marrow aspirate stem cell concentration as a bone grafting technique. *Tech. Foot Ankle Surg.* 7:84–89
116. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, von Hesler C, Andrassy J, et al. 2008. Concentration of bone marrow total nucleated cells by a point-of-care device provides a high yield and preserves their functional activity. *Cell Transplant.* 16:1059–69
117. Mehta J, Singhal S, Gordon L, Tallman M, Williams S, et al. 2002. COBE Spectra is superior to Fenwal CS-3000 Plus for collection of hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 29:563–67
118. Ford CD, Lehman C, Strupp A, Kelley L. 2002. Comparison of CD34⁺ cell collection efficiency on the COBE Spectra and Fenwal CS-3000 plus. *J. Clin. Apheresis* 17:17–20
119. Dzieczkowski JS, McGonigal M, Cook J, Sugrue M, Andersen J, Anderson KC. 1995. A comparison of peripheral blood stem cell apheresis using the Fenwal CS-3000 Plus and COBE Spectra. *Transfus. Sci.* 16:71–77
120. Aktas M, Radke T, Strauer B, Wernet P, Kogler G. 2008. Separation of adult bone marrow mononuclear cells using the automated closed separation system Sepax. *Cytotherapy* 10:203–11



Contents

The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems <i>Alexandre Albanese, Peter S. Tang, and Warren C.W. Chan</i>	1
Mucosal Vaccine Design and Delivery <i>Kim A. Woodrow, Kaila M. Bennett, and David D. Lo</i>	17
Tendon Healing: Repair and Regeneration <i>Pramod B. Voleti, Mark R. Buckley, and Louis J. Soslowsky</i>	47
Rapid Prototyping for Biomedical Engineering: Current Capabilities and Challenges <i>Andrés Díaz Lantada and Pilar Lafont Morgado</i>	73
Continuum Mixture Models of Biological Growth and Remodeling: Past Successes and Future Opportunities <i>G.A. Atesbian and J.D. Humphrey</i>	97
Flexible and Stretchable Electronics for Biointegrated Devices <i>Dae-Hyeong Kim, Roozbeh Ghaffari, Nanshu Lu, and John A. Rogers</i>	113
Sculpting Organs: Mechanical Regulation of Tissue Development <i>Celeste M. Nelson and Jason P. Gleghorn</i>	129
Synthetic Biology: An Emerging Engineering Discipline <i>Allen A. Cheng and Timothy K. Lu</i>	155
Nonlinear Dynamics in Cardiology <i>Trine Krogh-Madsen and David J. Christini</i>	179
Microfluidic Models of Vascular Functions <i>Keith H.K. Wong, Juliana M. Chan, Roger D. Kamm, and Joe Tien</i>	205
Optical Nanoscopy: From Acquisition to Analysis <i>Travis J. Gould, Samuel T. Hess, and Joerg Bewersdorff</i>	231
Nonthermal Plasma Sterilization of Living and Nonliving Surfaces <i>N. De Geyter and R. Morent</i>	255

Robots for Use in Autism Research <i>Brian Scassellati, Henny Admoni, and Maja Matarić</i>	275
Regulation of Cell Behavior and Tissue Patterning by Bioelectrical Signals: Challenges and Opportunities for Biomedical Engineering <i>Michael Levin and Claire G. Stevenson</i>	295
Intraoperative Stem Cell Therapy <i>Mónica Beato Coelho, Joaquim M.S. Cabral, and Jeffrey M. Karp</i>	325
Optical Imaging Using Endogenous Contrast to Assess Metabolic State <i>Irene Georgakoudi and Kyle P. Quinn</i>	351
Quantitative Imaging Methods for the Development and Validation of Brain Biomechanics Models <i>Philip V. Bayly, Erik H. Clayton, and Guy M. Genin</i>	369
Advanced Technologies for Gastrointestinal Endoscopy <i>Pietro Valdastri, Massimiliano Simi, and Robert J. Webster III</i>	397
Mechanical Regulation of Nuclear Structure and Function <i>Rui P. Martins, John D. Finan, Farshid Guilak, and David A. Lee</i>	431

Indexes

Cumulative Index of Contributing Authors, Volumes 5–14	457
Cumulative Index of Chapter Titles, Volumes 5–14	461

Errata

An online log of corrections to *Annual Review of Biomedical Engineering* articles may be found at <http://bioeng.annualreviews.org/>

