

Células Estaminais

O que são?
Onde estão?
Para que servem?

João Ramalho-Santos
Inês Araújo
Luís Pereira de Almeida
Lino Ferreira
Cláudia Cavadas

CO-FINANCIAMENTO:



AGÊNCIA NACIONAL
PARA A CULTURA
CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA



Células Estaminais

O que são?
Onde estão?
Para que servem?

João Ramalho-Santos
Inês Araújo
Luís Pereira de Almeida
Lino Ferreira
Cláudia Cavadas

Edição
Imprensa Universidade de Coimbra
Rua da Ilha, 1
3000-214 Coimbra

Email: imprensauc@ci.uc.pt
URL: http://www.uc.pt/imprensa_uc
Vendas online: <http://livrariadaimprensa.uc.pt>

Título
Células Estaminais: O Que São? Onde Estão? Para Que Servem?

Autores
João Ramalho-Santos
Inês Araújo
Luís Pereira de Almeida
Lino Ferreira
Cláudia Cavadas

Ilustração
Fernando Correia

Produção e revisão de texto
Teresa Girão

Pré-Impressão
Imprensa da Universidade de Coimbra

ISBN
978-989-26-0592-0

Impressão
Norprint

Depósito Legal

1ª Edição

Tiragem: 20.000 exemplares

Obra Publicada com o apoio de



AGÊNCIA NACIONAL
PARA A CULTURA
CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

No conjunto de crónicas apresentadas neste livro, investigadores portugueses abordam um tema que tem revelado grandes avanços científicos e tecnológicos no âmbito da biomedicina: as células estaminais. Estas crónicas ilustradas foram publicadas mensalmente no jornal Diário de Coimbra entre Dezembro de 2011 e Maio de 2012 e resultaram de um projeto de divulgação científica designado “Quero Mais e Melhores Células! Células Estaminais: O que são? Onde estão? Para que servem?”, uma iniciativa do Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra (CNC), no âmbito do Programa COMPETE – Média Ciência.

Este livro pretende contribuir para uma população mais informada que emitirá opiniões e tomará decisões mais conscientes sobre a aplicação das células estaminais. Além disso, pretende-se que o leitor tenha consciência que a investigação científica em células estaminais está a evoluir rapidamente e que, por vezes, esses estudos estão até a desenrolar-se muito perto das suas casas, em laboratórios portugueses.

João Ramalho-Santos

Inês Araújo

Luís Pereira de Almeida

Lino Ferreira

Cláudia Cavadas

1 CÉLULAS ESTAMINAIS: 7 MITOS E VERDADES

João Ramalho-Santos

*Investigador do CNC - Centro de Neurociências e Biologia Celular;
e Professor Associado do Departamento de Ciências da Vida,
Universidade de Coimbra*

1 – As células estaminais têm duas propriedades: auto-renovação e capacidade de diferenciação. Por outras palavras, são capazes de formar quer novas células estaminais, quer outros tipos de células.

2 – A importância destas células é dupla. Permitem estudar os mecanismos que levam uma célula a transformar-se noutra com uma função específica, e sugerem a esperança de poder produzir células para substituir outras que tenham sido destruídas por diferentes patologias como a doença de Parkinson, lesões na espinal medula, diabetes ou doenças cardiovasculares. É uma área de investigação muito promissora, havendo no entanto um longo caminho a percorrer até terapias concretas, sendo necessário ter atenção a publicidade enganosa que promove intervenções sem qualquer base científica.

3 – Um pormenor importante a reter é que as células estaminais não são todas idênticas. Há várias com diferentes propriedades e características. Algumas podem dar origem a todos os tipos de células

que existem no organismo, outras apenas a alguns. As primeiras designam-se pluripotentes, as segundas multipotentes.

4 – As células estaminais pluripotentes não existem no organismo adulto. Podem ser obtidas a partir de embriões (células estaminais embrionárias) ou da transformação de células de um organismo adulto modificadas em laboratório (células pluripotentes induzidas, ou iPS). Embora não haja terapias comprovadas com células pluripotentes, as células iPS teriam a vantagem de poder ser geradas a partir de células de um paciente concreto, evitando recurso a doadores ou embriões.

5 – Existem células estaminais em vários locais do organismo adulto, sobretudo em locais que necessitam de uma renovação contínua, sendo as mais conhecidas as da medula óssea (produtoras de células sanguíneas), da pele ou do aparelho digestivo. Mas há também células estaminais no tecido adiposo (gordura), e em alguns locais dos sistemas muscular e nervoso, incluindo regiões do cérebro. Por outro lado, existem igualmente células estaminais em tecidos fetais como o cordão umbilical e o fluido amniótico. Estas células estaminais são todas multipotentes.

6 – Os tratamentos propostos à base de células estaminais também não são equivalentes. Em termos de aplicações clínicas concretas, as células estaminais produtoras de sangue adultas e do cordão umbilical são utilizadas em terapias com o objetivo de repor o sistema sanguíneo, por exemplo após tratamento oncológico. Os transplantes de medula óssea são na verdade transplantes de células estaminais. A sua utilização para tratar outros quadros clínicos que não impliquem a formação de sangue tem vindo a ser testada, mas estas aplicações são ainda experimentais. O mesmo é válido para a utilização de outros tipos de células estaminais. Dada a quantidade de informação disponível, nem toda fidedigna, é crucial contactar entidades credíveis antes de tomar decisões.

7 – Como em todas as áreas científicas continuarão a fazer-se novas descobertas, levando à revisão contínua de conceitos.



2 MENTE SÃ EM CORPO SÃO: CÉLULAS ESTAMINAIS NO CÉREBRO

Inês Araújo

*Professora do IBB-CBME (Inst. de Biotecnologia e Bioengenharia,
Centro de Biomedicina Molecular e Estrutural e Programa de Medicina Regenerativa,
Dep.de Ciências Biomédicas e Medicina, Univ. Algarve);
e colaboradora do CNC – Centro de Neurociências e Biologia Celular,
Universidade de Coimbra.*

Todos sabemos que o exercício físico faz bem em todas as idades. O entusiasmo com que nos dirigimos ao ginásio ou ao Parque Verde para uma caminhada de final de tarde é que não é igual para todos. E de acordo com a nossa maior ou menor vontade pessoal em fazer “jogging” ou ir jogar uma partida de ténis, sentimos diferente empatia pelas notícias que nos chegam da investigação sobre o exercício físico: que faz bem, que faz mal, que só faz bem se for feito voluntariamente, que aumenta o stress oxidativo, que aumenta a esperança de vida, etc.

A investigação mais recente em modelos animais mostra que o exercício voluntário (o equivalente a correr numa rodinha, para um rato de laboratório) estimula a formação de novas células neuronais numa zona do cérebro que está ligada à aprendizagem e à formação de memória, o **hipocampo**. Mais, a exposição a um ambiente estimulante não só aumenta a formação de novas células no hipocampo, como faz com que estas se liguem aos neurónios que já fazem parte desta estrutura, adicionando novos elementos aos circuitos neuronais. Para um rato de laboratório, um ambiente estimulante pode ser uma gaiola cheia de túneis e escorregas ou bonecos (quem já teve um hamster em miúdo lembra-se com certeza de gastar a mesada em novos apetrechos adquiridos na loja de animais). Para nós, um estímulo equivalente pode ser um Sudoku ou as palavras cruzadas do jornal, uma ida ao museu ou qualquer outra atividade do nosso agrado.

Mas de onde vêm estes novos neurónios que se vão formando no nosso hipocampo? Há vários sistemas no nosso organismo nos quais se formam novas células continuamente, como a pele, medula óssea, sistema olfativo, intestino, entre outros. A estrutura altamente organizada e complexa do cérebro não deixa adivinhar que no sistema nervoso adulto também ocorra formação de novos neurónios – **neurogénese** – durante toda a vida do organismo. Contudo, novos neurónios são continuamente produzidos em algumas regiões do cérebro, incluindo o hipocampo. No hipocampo, existe uma população de células indiferenciadas com duas características fundamentais: são capazes de se dividir dando origem a mais células do mesmo tipo, e podem diferenciar-se em neurónios e outras células do sistema nervoso. Estas células designam-se por **células estaminais neurais**.

Qual a função das células estaminais neurais no cérebro adulto? No cérebro em desenvolvimento, as células estaminais neurais contribuem para a formação das várias estruturas cerebrais. No cérebro adulto, as células estaminais neurais são importantes para os fenómenos de adaptação a novas situações, no contexto de formação



de novas memórias e aprendizagem – um fenómeno conhecido como **plasticidade**. A neurogénese é influenciada por variados fatores, uns negativos, como a idade, alguns fármacos, radiação, ou doenças neurodegenerativas, e outros positivos, como a atividade física. Por isso, mexa-se, faz-lhe bem!

3 UMA NOVA ALQUIMIA: DE CÉLULAS DA PELE, EM CÉLULAS ESTAMINAIS E NEURÓNIOS

REPROGRAMAÇÃO DE CÉLULAS DIFERENCIADAS EM CÉLULAS ESTAMINAIS PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSCS)

Luís Pereira de Almeida

*Investigador do CNC - Centro de Neurociências e Biologia Celular;
e Professor Auxiliar da Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra*

Nos últimos anos têm sido feitas descobertas extraordinárias no domínio das ciências da vida, e em particular da biotecnologia, que ainda há pouco eram consideradas ficção científica. A reprogramação de células diferenciadas naquilo que se chama células estaminais pluripotentes induzidas é sem dúvida uma dessas descobertas.

Mas de que é que estamos a falar?

Quando um óvulo é fecundado por um espermatozoide forma-se um embrião cujas células se vão diferenciando de células estaminais que inicialmente se conseguem auto-renovar e dar origem a

qualquer tipo de células mas que progressivamente se especializam (diferenciam), até darem origem a células da pele, do sangue, do coração, do cérebro. Até há poucos anos, pensava-se que este processo de diferenciação ocorria de forma unidirecional e irreversível, ou seja, uma célula da pele não podia ser transformada numa célula estaminal e muito menos num neurónio.

No entanto, em 2006 o investigador Shinya Yamanaka e colaboradores, no Japão, derrubaram este paradigma ao gerarem, a partir de fibroblastos da pele, células estaminais com capacidade de renovação ilimitada e de especialização em qualquer tipo de células. Estas células foram produzidas por introdução nos fibroblastos de apenas quatro moléculas, designadas Klf4, Oct4, Sox2 e c-Myc, e foram designadas de **células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs)**. Esta descoberta notável que mais parecia alquimia revolucionou as ciências da vida.

Porque é que isto é importante?

A partir de células retiradas por biópsia da pele ou doutro tecido dum indivíduo adulto, podem agora produzir-se células estaminais pluripotentes induzidas, células com capacidade de renovação ilimitada e diferenciáveis, em teoria, em qualquer tipo de célula. Espera-se que as células estaminais induzidas forneçam novos modelos de doença que permitam testar novas terapias, dado que podem agora ser retiradas células da pele de doentes, reprogramadas em células estaminais induzidas e novamente diferenciadas, por exemplo em neurónios que vão permitir estudar patologias como a doença de Alzheimer, de Parkinson, Machado-Joseph entre muitas outras.

Por outro lado, o transplante de órgãos tem limitações associadas à falta de órgãos para transplante e à necessidade de imunossupressão durante toda a vida dos doentes. Espera-se que as iPSC possam vir a ser utilizadas para transplante e terapia celular, ultrapassando o problema da rejeição mediante utilização de células do próprio doente. Em doenças genéticas, após correção do defeito genético por reparação génica, será possível produzir células saudáveis para transplantação.

Já se faz nos laboratórios nacionais?

As iPSCs são objeto de estudo em diversos laboratórios nacionais incluindo o Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, onde há presentemente grupos que trabalham com iPSC: para estudar as alterações mitocondriais das iPSC, utilizar células iPSC para terapia de doenças cardiovasculares, ou, como no nosso grupo de investigação, gerar iPSC a partir de fibroblastos da pele para investigação e terapia da doença de Machado-Joseph.



4 CÉLULAS ESTAMINAIS E DOENÇAS CARDÍACAS

Lino Ferreira

*Investigador do CNC – Centro de Neurociências
e Biologia Celular da Universidade de Coimbra,
e do Biocant – Centro de Inovação em Biotecnologia, Cantanhede*

Pacientes que sobrevivem a um enfarte do coração possuem uma deterioração progressiva do músculo cardíaco provocada por fenómenos de isquemia (isto é, falta de oxigénio e glicose). Nos últimos anos têm sido testadas várias plataformas para a indução da vascularização no músculo cardíaco isquémico entre as quais se destacam: fatores de mobilização de células estaminais, terapia génica, e terapia celular englobando o transplante de células estaminais ou progenitoras. Infelizmente, ainda não existe nenhum produto comercial com capacidade de regenerar o músculo cardíaco após enfarte. No caso da terapia celular, a grande maioria dos ensaios clí-

nicos diz respeito ao transplante de células estaminais/progenitoras da medula óssea (cerca de 22 ensaios clínicos; três dos quais em fase III), e uma pequena parte de células endoteliais progenitoras isoladas do sangue periférico, células estaminais do mesênquima, células estaminais do tecido adiposo e células estaminais cardíacas. As células estaminais da medula óssea têm sido utilizadas na maioria dos ensaios clínicos realizados até à data. Um grande número de estudos pré-clínicos e clínicos mostram que o transplante de células da medula óssea no coração melhora o funcionamento cardíaco, principalmente a sua fração de ejeção ventricular (capacidade do coração bombear sangue), embora seja uma melhoria muito pequena (até 5% da fração de ejeção).

O mecanismo regenerativo das células estaminais transplantadas no coração após enfarte do miocárdio ainda não está completamente identificado e continua a ser alvo de intensa investigação. É provável que o efeito regenerativo seja dependente do tipo de células estaminais utilizadas, do método de transplante, da altura pós-enfarte em que as células foram transplantadas, entre outras variáveis. Resultados recentes mostram que as células estaminais transplantadas no coração têm a capacidade de contribuir para a neovascularização do tecido cardíaco, de promover a sobrevivência das células cardíacas e de estimular a proliferação de células estaminais/células precursoras cardíacas.

Um dos desafios desta área continua ser a identificação da melhor célula estaminal/precursora para regeneração cardíaca. A melhor candidata deverá corresponder aos seguintes critérios: ser fácil de isolar, ser em número suficiente para eficácia terapêutica, ser não-imunogénica, e ter a capacidade de se diferenciar em células cardíacas. Um outro desafio importante nesta área diz respeito à identificação dos pacientes que poderão beneficiar mais deste tipo de terapia celular e identificar a melhor janela temporal para o transplante celular. Finalmente, com o objetivo de potenciar o efeito terapêutico destas terapias, será necessário o desenvolvimento de novas plataformas para reter as células no coração após transplante e monitorizar a sua atividade por métodos de imagem não invasiva.



5 CÉLULAS ESTAMINAIS HEMATOPOIÉTICAS DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL

Lino Ferreira

*Investigador do CNC – Centro de Neurociências
e Biologia Celular da Universidade de Coimbra,
e do Biocant – Centro de Inovação em Biotecnologia, Cantanhede*

Células do sangue são células com múltiplas funções entre as quais transportar oxigénio, proteger imunologicamente todas as células do corpo humano, diferenciar-se em células dos vasos sanguíneos, etc. A natureza e a importância destas tarefas faz com que as células do sangue estejam constantemente a ser renovadas. As células que dão origem às células do sangue são chamadas **células estaminais hematopoiéticas** e estão localizadas essencialmente na medula óssea. Uma em cada 100.000 células da medula óssea são células estaminais hematopoiéticas capazes de dar origem a células do sangue ao longo do tempo.

As células estaminais hematopoiéticas são as células estaminais mais bem caracterizadas de todas as células estaminais que se co-

nhece no corpo humano. A primeira demonstração experimental da sua existência foi feita por dois investigadores Canadianos no início dos anos sessenta chamados Till e McCulloch. Eles foram os primeiros a identificar as duas características fundamentais de todas as células estaminais: (i) capacidade de se auto-renovarem num estado indiferenciado e dar origem a células filhas idênticas à célula mãe, e (ii) capacidade de se diferenciarem em mais de um tipo de células.

Neste momento, as células estaminais hematopoiéticas são as células estaminais com mais utilização clínica. Certos pacientes com doenças do sangue e do sistema imunitário podem ser tratados eficientemente pelo transplante de células estaminais hematopoiéticas isoladas da medula óssea de pacientes saudáveis e imunologicamente compatíveis. Este tipo de procedimento tem mais de 50 anos de história clínica.

O sangue do cordão umbilical pode ser utilizado como fonte alternativa de células estaminais hematopoiéticas. Após o sucesso no primeiro transplante de células estaminais hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical numa criança com anemia de Fanconi (doença autossómica recessiva caracterizada por diversas anormalidades congénitas) realizado pela equipa da Doutora Gluckman em 1989, a coleção e utilização clínica do sangue do cordão umbilical para o tratamento de doenças do sangue tem aumentado até aos nossos dias. Contudo, essas células têm sido utilizadas sobretudo para o tratamento de doenças de sangue em crianças. A isso se deve o seu pequeno número. Neste momento estão a ser estudadas várias plataformas para a sua expansão em laboratório. As células estaminais hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical estão também a ser avaliadas em estudos, sobretudo pré-clínicos, para medicina regenerativa, nomeadamente para o tratamento de doenças isquémicas. Por exemplo, células progenitoras vasculares isoladas a partir do sangue do cordão umbilical podem diferenciar-se em células dos vasos sanguíneos, e quando transplantadas em modelos animais de isquemia do coração ou membros inferiores aumenta quantitativamente a neovascularização e fluxo sanguíneo.



6 CÉLULAS ESTAMINAIS NA DESCOBERTA DE NOVOS MEDICAMENTOS

Cláudia Cavadas

*Investigadora do CNC - Centro de Neurociências e Biologia Celular;
e Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia,
Universidade de Coimbra*

Quando falamos em células estaminais, muitas ideias, mais ou menos corretas, podem surgir. A sua futura utilização em terapia regenerativa na cura de doenças até agora incuráveis, como a diabetes, ou a Doença de Alzheimer, é certamente uma das que entusiasma mais investigadores e a população em geral. Mas as células estaminais têm ainda um interesse menos conhecido que consiste na sua utilização na descoberta de novos medicamentos.

Para que uma nova molécula passe à categoria de fármaco eficaz e seguro, existe um longo percurso, de pelo menos 10 anos, altamente dispendioso, em que só uma pequena percentagem das moléculas que parece promissora em laboratório chega ao mercado. Este fracasso resulta num cada vez menor investimento em moléculas novas e,

em especial, no desinteresse no desenvolvimento de novos fármacos para patologias com baixa incidência como é o caso das doenças raras.

Antes de passarem aos testes clínicos, as novas moléculas têm que passar diversos testes laboratoriais (ensaios pré-clínicos) para demonstrar a sua eficácia e a sua não toxicidade, quer recorrendo a células animais ou linhas celulares mantidas em condições apropriadas, quer recorrendo, numa fase posterior, a experimentação animal. Assim, os resultados destes ensaios pré-clínicos reúnem um conjunto de informação sobre os efeitos farmacológicos desses compostos com utilidade para determinada doença, o possível mecanismo de ação, e ainda a sua segurança. Só depois de passar critérios muito apertados, um futuro fármaco poderá passar então a ensaios clínicos. No entanto, os resultados nestes modelos nem sempre são observados no homem, isto é, compostos que mostraram resultados promissores num modelo animal de determinada patologia podem não ser eficazes no homem. Assim, milhares de moléculas promissoras não passam esta fase.

É fundamental que sejam desenvolvidos ensaios pré-clínicos que encurtarem o tempo de descoberta e que os resultados obtidos prevejam com maior aproximação possível o que vai ocorrer nos doentes. Neste campo, as células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC) são ferramentas fundamentais para a descoberta de novos fármacos. E como? As iPSC são obtidas por reprogramação a partir de células de um indivíduo adulto (exemplo: células da pele ou do sangue de um doente) e no laboratório são diferenciadas nas células em que se pretende testar os novos compostos, por exemplo, neurónios ou células do coração. Assim, é possível ter disponíveis células humanas que apresentem as características da doença que se pretende tratar e que constituem um modelo excepcional para testar novos fármacos. Estas experiências com células diferenciadas a partir das células estaminais poderão não substituir outros modelos celulares, já bem validados, nem a experimentação animal, mas juntamente com estas metodologias vão contribuir para que se encontrem novos fármacos de uma forma mais rápida e eficaz.





João Ramalho-Santos é Professor do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, e Investigador no Centro de Neurociências e Biologia Celular, onde lidera o grupo de Biologia da Reprodução e Células Estaminais e coordena o Programa Doutoral em Biologia Experimental e Biomedicina. Realiza investigação no metabolismo e actividade mitocondrial de espermatozóides, oócitos e células estaminais pluripotentes, sendo co-autor de cerca de uma centena de publicações em revistas internacionais.



Inês Araújo é doutorada em Biologia Celular pela Universidade de Coimbra. Actualmente, integra o Programa em Medicina Regenerativa no Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina (Universidade do Algarve, Faro), onde a sua equipa investiga mecanismos de degeneração e reparação neuronal. É investigadora no CBME/IBB-Laboratório Associado, e colaboradora do Centro de Neurociências e Biologia Celular. Recebeu em 2005 a Medalha de Honra L'Öreal para as Mulheres na Ciência.



Luís Pereira de Almeida é Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e investigador do Centro de Neurociências e Biologia Celular. O seu grupo recorre a estratégias de base molecular para investigar e tratar doenças do cérebro com enfoque na doença de Machado-Joseph. Coordena diversos projetos de investigação e é co-autor de cerca de quatro dezenas de publicações em revistas internacionais.



Lino da Silva Ferreira é doutorado em Biotecnologia pela Universidade de Coimbra. Realizou trabalho de pós-doutoramento no Massachusetts Institute of Technology (MIT, EUA), nas áreas de células estaminais e biomateriais. Coordena atualmente uma equipa de 20 investigadores no CNC/Biocant que desenvolve projetos em células estaminais e biomateriais, nomeadamente para o tratamento de doenças cardiovasculares. Publicou até hoje mais de 50 artigos internacionais e é co-inventor de 16 patentes. Recebeu em 2008 o Prémio Crioestaminal e em 2012 o ERC Starting Grant.



Cláudia Cavadas é Diretora do Instituto de Investigação Interdisciplinar da Universidade de Coimbra e Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. É investigadora no Centro de Neurociências e Biologia Celular, onde lidera o grupo de Neuroendocrinologia e Neurogénese. Coordena diversos projetos de investigação e é co-autora de cerca de quatro dezenas de publicações em revistas internacionais.



Fernando J. S. Correia é Biólogo, Mestre em Ecologia Animal, especializado em Ilustração Científica (IC), desde 1988. Pioneiro em técnicas digitais em IC e sua utilização em Portugal (1998). Docente responsável pela re-introdução da disciplina IC no Ensino Superior (Métodos de Desenho Biológico, Univ. Évora, 1996), ensinou também no Instituto Piaget e Inst. Politécnico de Leiria. Actualmente é docente no Dep. de Biologia (Universidade de Aveiro), onde coordena o Curso de Formação em Ilustração Científica e dirige o Laboratório de Ilustração Científica. É responsável por mais de 75 cursos intensivos de IC (Portugal e estrangeiro). Foi co-fundador e primeiro Presidente do GNSI-Portugal Chapter. Assina mais de 85 publicações em autoria única, dos quais destaca o seu penúltimo livro “Mealhada – Naturezas sem igual” (em publicação; 396 pp.), e 30 em co-autoria, entre artigos e livros, nacionais e internacionais. Membro activo do GNSI, tem publicado frequentemente na Newsletter/Journal e foi um dos 4 portugueses convidado para participar no conceituado livro “*The Guild Handbook of Scientific Illustration*” (Elaine Hodges, 2ª ed.), entre outras obras da especialidade onde também colaborou. Participou em mais de 70 exposições (coletivas e individuais) a nível nacional e também internacional – EUA, Brasil, Argentina e Europa (Inglaterra, Espanha, França e Itália) – e foi galardoado com vários prémios/distinções (Portugal, EUA e Europa). www.efecorreia-artstudio.com