

Células estaminais na regeneração da pele: aplicações terapêuticas e cosméticas

Stem cells for skin regeneration: therapeutic and cosmetic applications

Barata R.¹, Silva A.C.^{1,2}

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

RESUMO

Tendo em conta a capacidade das células estaminais para se autorrenovarem e diferenciarem em vários tipos de células do organismo, a sua utilização terapêutica torna-se interessante, por exemplo, ao nível da regeneração da pele. Nesse sentido, as células estaminais têm sido testadas para o tratamento/cicatrização de feridas originadas pela exposição ao calor e à radiação, bem como em úlceras diabéticas. A eficácia da utilização destas células tem sido demonstrada por vários investigadores, tendo-se verificado que promovem a reepitelização e a neovascularização, e reduzem a formação de cicatrizes, sem provocar respostas inflamatórias ou imunológicas. Também na área da cosmética tem sido observado o potencial das células estaminais, em particular, as células de origem vegetal, para retardar o processo natural de envelhecimento da pele, através da proteção das células estaminais autólogas e estimulação da sua proliferação. No entanto, é necessário realizar mais estudos clínicos e procurar novos ingredientes ativos, de forma a poder concluir, com maior rigor, a eficácia destas aplicações.

Palavras-chave: Células estaminais mesenquimais, regeneração da pele, cicatrização de feridas, anti envelhecimento.

ABSTRACT

Concerning the stem cells ability for self-renewal and differentiation in the different types of body cells, their therapeutic application is promising, for example, for skin regeneration. In this sense, the use of stem cells has been tested for wound healing caused by exposure to heat and radiation, and for diabetic ulcers. Several researchers have demonstrated the efficacy of these cells, which increase the re-epithelialization and neovascularization and reduce the scar tissue without originating inflammatory and immune responses. Furthermore, the potential of stem cells, in particular, plant cells, has been shown for cosmetics, due to their ability for delaying the skin natural aging process, protecting autologous stem cells and stimulating their proliferation. However, more clinical studies and the discovery of more active ingredients are needed to conclude on the effectiveness of these applications.

Keywords: Mesenchymal stem cells, skin regeneration, wound healing, anti-aging.

¹ FP-ENAS (Unidade de Investigação UFP em Energia, Ambiente e Saúde), CEBIMED (Centro de Estudos em Biomedicina), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Portugal.

² UCIBIO/REQUIMTE, MedTec-Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Departamento de Ciências do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal.

Autoras para correspondência: Ana Catarina Silva (acsilva@ufp.edu.pt); Rita Barata (29733@ufp.edu.pt)

Submetido/Submitted: 8 junho 2019 | Aceite/Accepted: 10 julho 2019

INTRODUÇÃO

As células estaminais são células indiferenciadas capazes de se autorrenovar e de se diferenciar nos diferentes tipos de células especializadas do organismo, desempenhando funções essenciais na manutenção dos tecidos e órgãos, através da reparação, regeneração e substituição celular¹. Tendo em conta as características das células estaminais, a sua utilização tem vindo a ganhar relevância, sobretudo ao nível terapêutico. Neste contexto, uma das aplicações mais promissoras é na reparação e regeneração da pele, em feridas de diferentes etiologias².

Recentemente, o uso cutâneo de células estaminais tem sido sugerido na área da cosmética, exercendo um efeito anti envelhecimento. O envelhecimento cutâneo é um processo complexo onde ocorre danificação e eventual morte das células. Ao utilizar cosméticos contendo células estaminais este processo pode ser atrasado, devido ao efeito regenerador e reparador que estas células têm nos tecidos danificados por exposição a toxinas e adversidades do meio ambiente³.

Este trabalho de revisão bibliográfica começa por descrever, sucintamente, a estrutura básica da pele e o seu processo de cicatrização. Segue-se a análise das células estaminais, dando relevância às células estaminais mesenquimais (*mesenchymal stem cells*, MSCs), suas características e vantagens de utilização terapêutica, através da apresentação de exemplos de alguns estudos pré-clínicos. Com vista a avaliar o potencial destas células, foi analisada a sua utilização em dois tipos de feridas cutâneas (queimaduras térmicas e úl-

ceras diabéticas), tendo em conta a sua elevada incidência na população e a dificuldade de tratamento. Por último, foram analisados os efeitos da utilização de células estaminais na pele para fins cosméticos.

O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DA PELE

A pele humana

A pele é composta pelas camadas da epiderme e da derme, sendo a hipoderme uma camada subcutânea adjacente formada por tecido adiposo, que tem essencialmente funções de suporte. A espessura das diferentes camadas varia consideravelmente consoante o local do corpo humano^{4,5}. A epiderme é a camada superficial da pele, sendo revestida pelo estrato córneo, que constitui uma camada de células mortas que está em permanente renovação. Esta camada é formada por estratos, não é vascularizada, sendo nutrida por difusão a partir dos capilares da derme. Os queratinócitos representam a maior parte das células presentes, sendo responsáveis pela resistência da pele à abrasão e à perda de água por evaporação. Existem também melanócitos, que dão cor à pele; células de Langerhans do sistema imunitário; células de Merkel associadas a terminações nervosas, que permitem detetar o tato e pressão superficial⁵.

As células da epiderme são produzidas nas camadas mais profundas e vão empurrando as células mais antigas até à superfície, através de um processo designado por queratinização. A queratinização é um processo contínuo que origina diferentes camadas ou estratos celulares (desde a mais profunda até à mais superficial): camada basal,

camada espinhosa, camada granulosa, camada translúcida e camada córnea. O número de células em cada camada e o número de camadas variam consoante a localização no corpo. As zonas de pele espessa, como as palmas das mãos, ponta dos dedos e planta dos pés, possuem todas as camadas, sendo que a camada córnea contém um número de células maior; a pele fina, que cobre o resto do corpo é mais flexível, contém menor número de células em cada camada e normalmente não é constituída pela camada translúcida. Neste processo de renovação, as células mudam a sua composição morfológica e química, uma vez que se vão achatando à medida que sobem até à superfície e vão incorporando a queratina. Quando as células chegam à superfície morrem, formando uma barreira designada por camada ou estrato córneo, que protege as células adjacentes até serem eliminadas por descamação⁵. Uma vez que a camada córnea tem a função de proteger o organismo do meio exterior, também pode dificultar a penetração de formulações dermatológicas e cosméticas, impedindo a ação dos fármacos e dos ingredientes ativos⁶.

A derme é constituída por tecido conjuntivo, sendo responsável por grande parte da resistência estrutural da pele. Nesta camada estão presentes fibroblastos, macrófagos, terminações nervosas, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas, folículos pilosos, e fibras de colagénio e elastina⁵. O colagénio confere resistência à pele, enquanto a elastina proporciona flexibilidade⁷. A camada da derme é mais espessa do que a epiderme, estando estas interligadas e trocando nutrientes através das papilas

dérmicas que a derme projeta para a epiderme, denominadas de junções dermoepidérmicas⁷.

Abaixo da derme encontra-se a hipoderme, que não é uma verdadeira camada da pele. É formada por uma camada de tecido conjuntivo laxo que estabelece a ligação entre a pele e o músculo ou osso adjacente, exercendo essencialmente funções de suporte. É maioritariamente constituída por células adiposas, fibroblastos, macrófagos, fibras de colagénio e elastina. A hipoderme armazena cerca de metade da gordura total do organismo humano, variando a quantidade de gordura com a idade, o sexo e a alimentação⁵.

Com a idade a epiderme torna-se mais fina e a quantidade de colagénio diminui, as infeções e lesões da pele tornam-se mais frequentes, e a reparação tecidular torna-se mais lenta. Também as fibras de elastina da derme e a gordura da hipoderme começam a diminuir, originando a flacidez e secura da pele⁵. O envelhecimento da pele é influenciado tanto por fatores internos como por fatores externos. A radiação UV é o fator externo que mais danos provoca na pele, levando à formação de radicais livres que degradam os lípidos do cimento intercelular, provocam lacunas na barreira lipídica e mudanças na estrutura do colagénio e da elastina. Os fatores internos que causam alterações na pele são, principalmente, a diminuição da exfoliação fisiológica da epiderme, inibição da regeneração e crescimento tecidular, e inibição de processos de diferenciação. A diminuição do potencial regenerativo da pele resulta, entre outros fatores, da menor atividade das células estaminais⁸.

O processo de cicatrização

A pele é a principal barreira de proteção do organismo contra as condições adversas do meio ambiente. Assim sendo, quando ocorre uma lesão ou ferida cutânea é fundamental que esta recupere rapidamente a integridade para restabelecer todas as suas funções. Existem poucos tratamentos eficazes para acelerar a cicatrização da pele e reduzir a formação de cicatrizes, pelo que é necessário compreender o processo de cicatrização para poder desenvolver novas terapias e avaliar a sua eficácia⁹.

Quando a pele sofre uma lesão são desencadeadas as cascatas de coagulação intrínseca e extrínseca. As plaquetas agregam-se e desencadeiam um processo de vasoconstrição, que reduz a perda de sangue, formando-se um coágulo que ajuda a preencher a falta de tecido e serve de matriz provisória para a migração de diferentes tipos celulares (leucócitos, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e fatores de crescimento)^{10,11}. Passados 5 a 10 minutos de vasoconstrição, os vasos dilatam e as plaquetas e os leucócitos invadem a matriz provisória da ferida¹⁰.

A cicatrização das feridas cutâneas é um processo biológico regulado pela interação de células, fatores de crescimento e citocinas, que compreende as fases de hemostasia (primeiras horas da lesão), inflamação (1-3 dias após a lesão), proliferação (4-21 dias após a lesão) e remodelação (21 dias-1 ano após a lesão)¹⁰. Na fase de hemostasia, tanto as plaquetas como os leucócitos libertam citocinas e fatores de crescimento que¹⁰: (i) ativam o processo inflamatório - interleucina 1 alfa (IL-1 α), interleucina

1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); (ii) estimulam a síntese de colagénio - fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e fator de crescimento de transformação beta (TGF- β); (iii) ativam a transformação dos fibroblastos para miofibroblastos - TGF- β ; (iv) iniciam a angiogénese - FGF-2, fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A), fator indutível de hipóxia 1 alfa (HIF-1 α) e TGF- β ; (v) dão suporte ao processo de reepitelização - fator de crescimento epidérmico (EGF), FGF-2, IGF-1 e TGF- α .

A fase inflamatória ocorre em simultâneo com a fase de hemostasia, e envolve principalmente a ativação do sistema imune inato⁹. A desgranulação das plaquetas e os subprodutos da degradação bacteriana atraem os neutrófilos até ao local da lesão, onde permanecem entre 2 a 5 dias desde que a ferida não infete¹⁰. Os neutrófilos são importantes para eliminar as bactérias e os restos celulares, ao mesmo tempo que atraem outras células essenciais à fase inflamatória. Estes têm a capacidade de libertar mediadores (como o TNF- α , IL-1 β e IL-6) que amplificam a resposta inflamatória e estimulam o VEGF e a IL-8 para haver uma reparação adequada¹². Aproximadamente 3 dias após a lesão, os monócitos migram até ao local da inflamação e diferenciam-se em macrófagos⁹. Estes têm como função defender o hospedeiro ao fazer a apresentação antigénica e fagocitose, resolver a inflamação, remover células apoptóticas, suportar a proliferação celular e a restauração tecidual após a lesão¹⁰.

À medida que a inflamação diminui, é importante que aconteça a reepitelização da ferida, restaurando a rede vascular e formando tecido granulomatoso. Deste modo, ocorre a migração e proliferação dos queratinócitos, bem como das células estaminais dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas próximas do local da lesão^{9,13}. A migração termina quando as células entram em contacto, se formam novas estruturas de adesão e os queratinócitos secretam proteínas para ajudar a reconstruir a camada basal¹⁴. Outro passo essencial é restaurar a rede de vasos sanguíneos, dada a importância dos nutrientes e do oxigénio para que a cicatrização ocorra com sucesso⁹. Na última fase de proliferação, a matriz provisória anteriormente formada é substituída por tecido granulomatoso, constituído por uma grande quantidade de fibroblastos, granulócitos, macrófagos, capilares e feixes desorganizados de colagénio¹⁵. As células predominantes nesta fase são os fibroblastos, responsáveis pela produção de várias substâncias (colagénio, fibronectina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e ácido hialurónico) que formam uma estrutura organizada onde se dá a adesão, crescimento e diferenciação das células^{10,16,17}.

A fase de remodelação é iniciada no final do desenvolvimento do tecido granulomatoso⁹. A tensão mecânica associada à ação das citocinas leva a que os fibroblastos se diferenciem em miofibroblastos, que contraem a ferida e ajudam a reduzir a formação da cicatriz¹⁸⁻²⁰. Quando a cicatrização estiver completa, os miofibroblastos entram em apoptose²¹ e o colagénio III, que foi rapidamente formado na última

fase de proliferação, é substituído por colagénio I, que tem maior resistência à tração mas demora mais tempo a depositar⁹. A forma como se dá a reorganização química das fibras de colagénio afeta a força de tração que, por conseguinte, também influencia a formação da cicatriz²². Durante esta fase, também as MSCs produzem fatores de crescimento, como o TGF- β 3, para limitar a formação excessiva de cicatriz²³. Os vasos anteriormente formados e o fluxo sanguíneo começam a diminuir e forma-se um ambiente avascular e acelular, típico de uma ferida madura^{9,24}. Quando se trata de uma lesão grave torna-se impossível recuperar alguns componentes da pele, como os folículos pilosos ou as glândulas sudoríparas, e a pele curada pode apenas atingir aproximadamente 80% do valor original da força de tração⁹.

CÉLULAS ESTAMINAIS

As células estaminais são células não especializadas capazes de se renovarem, e de se diferenciarem em células de múltiplas linhagens (Figura 1)^{25,26}. Estão presentes em todas as fases do desenvolvimento de um ser vivo, desde o embrião ao ser adulto, e são essenciais à manutenção dos tecidos do organismo¹. Existem três tipos de células estaminais: totipotentes, pluripotentes/embrionárias e multipotentes/adultas. As primeiras são totalmente indiferenciadas, sendo capazes de se diferenciar em todos os tipos de células, podendo originar um organismo completo. As segundas estão presentes nos embriões, na fase de blastocisto, e conseguem diferenciar-se nas células das diferentes camadas embrionárias (mesoderme,

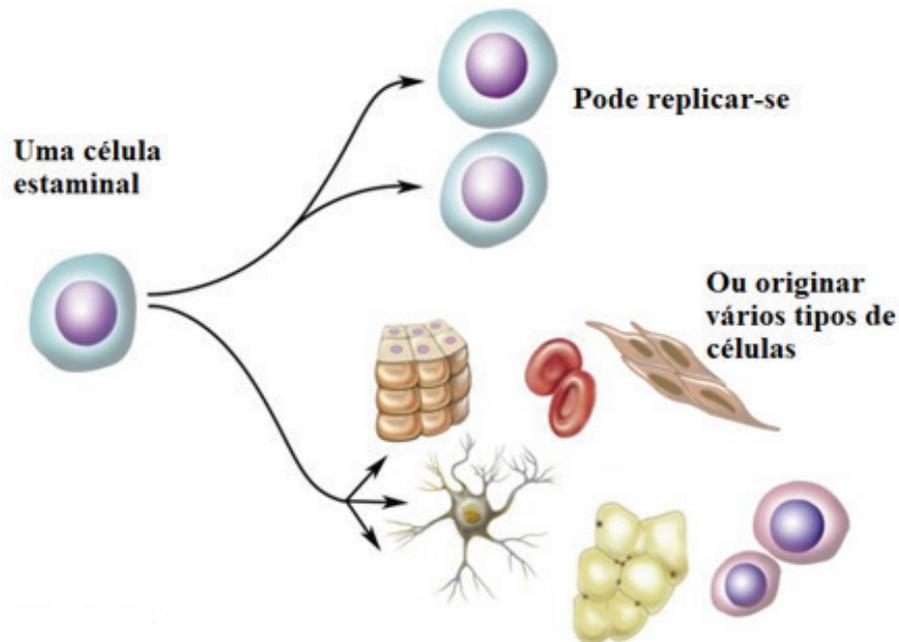


Figura 1. Células estaminais (adaptado de²⁷).

endoderme e ectoderme). As terceiras são mais limitadas no que diz respeito à capacidade de diferenciação, e originam células apenas de uma das três camadas referidas anteriormente¹.

As células estaminais da epiderme foram identificadas em três locais distintos^{28,29}: no bulbo dos folículos pilosos (regeneram os folículos pilosos e participam na regeneração da epiderme, em caso de lesão); na base das glândulas sebáceas (após serem transplantadas são capazes de se diferenciar em todos os tipos de células presentes na epiderme); na camada basal da epiderme (participam na reparação tecidual e dão origem à epiderme da pele adulta).

CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMAIS

Entre as células estaminais destaca-se uma pequena população de células progenitoras multipotentes não hematopoiéticas, as MSCs, que podem ser

isoladas a partir de tecidos adultos ou de tecidos fetais^{30,31}. Apesar destas células terem origem mesodérmica e originarem, por exemplo, osteócitos, adipócitos e condrócitos, em cultura própria são capazes de se diferenciar em células de linhagem ectodérmica (por exemplo, neurónios, células da epiderme e dos anexos cutâneos) e endodérmica (por exemplo, hepatócitos)²⁶. As MSCs foram definidas por terem uma aparência morfológica semelhante à dos fibroblastos³².

Inicialmente as MSCs foram obtidas a partir da medula óssea, embora ao longo dos anos tenham sido isoladas de vários tecidos, tais como o fígado, pulmões, cérebro, tecido adiposo, sangue periférico, córnea, timo, polpa dentária, tendões, baço, trompa de Falópio, placenta, líquido amniótico e sangue do cordão umbilical^{26,33}. O cordão umbilical é uma fonte abundante de MSCs com maior potencial de diferenciação e am-

plificação do que as provenientes da medula óssea ou do sangue periférico autólogo (ou seja, do próprio paciente), sendo facilmente recolhidas³⁴.

Vários estudos têm sido efetuados com o objetivo de estabelecer uma definição para as MSCs. Deste modo, a Sociedade Internacional de Terapia com Células Estaminais estabeleceu um conjunto de critérios aos quais as células devem obedecer para serem consideradas MSCs^{35,36}: (i) aderir à placa de cultura; (ii) expressar marcadores de superfície específicos (ser positivas para CD105, CD73 e CD90, e negativas para a) CD45, CD34, CD14, b) CD11b, CD79a ou c) CD19 e HLA-DR); (iii) quando colocadas em condições específicas, ter capacidade de se diferenciar em vários tipos de células da linhagem mesenquimatosa, incluindo condroblastos, osteoblastos e adipócitos.

Tendo em conta o potencial das MSCs, têm-se realizado vários estudos de modo a entender o seu comportamento, características e funcionalidades, com a finalidade de serem utilizadas na terapêutica da regeneração da pele ou em cosméticos.

Características e funcionalidades

As MSCs possuem múltiplas características que as tornam interessantes na área da medicina regenerativa, para reparar tecidos danificados. Muitos estudos têm demonstrado o potencial regenerativo destas células em feridas cutâneas²², em particular, nas feridas dos diabéticos³⁷. Badillo *et al.* (2007) trataram feridas induzidas em ratos com diabetes utilizando, separadamente, MSCs, células com o marcador de

superfície CD45+ e um veículo de controlo. As MSCs foram isoladas a partir de ratos transgênicos que expressavam uma proteína marcadora de fluorescência, enquanto as células CD45+ são representativas das células não mesenquimais e foram usadas como controlo das células hematopoiéticas (células predominantes da medula óssea), e o veículo foi uma solução salina tamponada com fosfato. A cicatrização foi avaliada através da medição da abertura epitelial, volume de tecido granulomatoso e produção de fatores de crescimento, assim como pela capacidade destas células causarem contração *in vitro*. Passados 7 dias do ferimento, foi possível observar que as feridas tratadas com MSCs estavam fechadas, havia contração do tecido, aumento dos vasos sanguíneos, formação de tecido granulomatoso, reepitelização e aumento do número de células na base da ferida. Verificou-se também que as MSCs têm maior capacidade contrátil do que os fibroblastos responsáveis por mediar a contração normal da ferida. Pelo contrário, as células CD45+ não foram tão eficazes para fechar a ferida e o veículo não foi capaz de curar a ferida, observando-se apenas uma ligeira formação de tecido e contração da ferida, menor quantidade de tecido granulomatoso e de células no local. Para determinar o potencial de diferenciação das MSCs recorreu-se à microscopia de fluorescência para avaliar a presença da proteína (representativa das MSCs) associada ao marcador CD31 das células endoteliais, e à α -actina do músculo liso. Nas feridas tratadas com MSCs houve maior evidência do marcador CD31 e maior número de

vasos sanguíneos, comparativamente às feridas tratadas com veículo, mas não foi verificada a diferenciação das MSCs em células endoteliais. Ainda neste estudo, concluiu-se que apenas as MSCs são capazes de se diferenciar em miofibroblastos, dado o resultado de dupla coloração para a proteína fluorescente e para a α -actina do músculo liso. Devido ao elevado número de células presentes nas feridas tratadas com MSCs, procedeu-se à análise da presença de fatores de crescimento importantes para a migração celular. Verificou-se que na presença de MSCs o fator de crescimento celular derivado do estroma 1 alfa (SDF-1 α) está muito aumentado, em comparação com outros tratamentos, sendo este um dos fatores mais importantes na migração de células estaminais e progenitoras para os tecidos. Também foi verificada a deficiência do SDF-1 α nas feridas diabéticas, podendo esta ser uma das causas que leva às complicações da doença. Outros fatores de crescimento essenciais à cicatrização foram analisados, verificando-se que as MSCs produziram maior quantidade de EGF, TGF β -1 e VEGF do que o veículo e as células CD45+. Neste estudo pôde verificar-se que as MSCs são capazes de cicatrizar feridas diabéticas em ratos, essencialmente através do aumento da reepitelização, produção de tecido granulomatoso, aumento da neovascularização, aumento da contração da ferida, produção de fatores de crescimento e recrutamento de células³⁷. Em outro estudo, Stoff *et al.* (2009) efetuaram o transplante de MSCs humanas para feridas cutâneas de coelhos e avaliaram a evolução da cicatrização da pele ao longo de 80 dias, analisando a

resistência das feridas de incisão à força de tração e as características histológicas. Cada coelho sofreu 10 incisões na pele, até ao limite inferior da derme, sendo 5 tratadas com MSCs humanas e as restantes não receberam qualquer tratamento. No vigésimo primeiro dia do estudo, foi possível observar a migração das MSCs desde a superfície de aplicação até ao limite da incisão. No final do ensaio, as feridas tratadas com MSCs revelaram maior recuperação na resistência à tração (52%) do que as não tratadas (31%), sendo este um bom indicador da taxa de cicatrização. Este fator associado à formação de cicatrizes menos evidentes nas feridas tratadas com MSCs, observadas ao nível macroscópico e histológico, sugere que o tratamento com MSCs pode melhorar a regeneração de feridas. Tendo em conta que as MSCs humanas não causaram nenhuma resposta inflamatória nos coelhos, estes resultados sugerem que MSCs xenogénicas (provenientes de indivíduos de espécies diferentes) podem ser usadas na regeneração de feridas cutâneas²². Algumas das características mais importantes que permitem às MSCs ter um elevado potencial regenerativo, são³⁸⁻⁴⁹: capacidade de autorrenovação, multipotencialidade, secreção de mediadores que promovem a renovação de tecidos, substituição de tecidos, ação anti apoptótica, anti stress oxidativa, pro angiogénica, imunossupressora, imunomoduladora, redução da fibrose e redução da formação de cicatrizes hipertróficas. Além disso, as MSCs são facilmente acessíveis e cultiváveis *in vitro*, têm elevada estabilidade genómica e levantam poucas questões éticas, contrariamente ao uso de células

estaminais embrionárias²⁶. Por outro lado, as MSCs têm a capacidade de produzir macrófagos anti-inflamatórios que ajudam na reparação tecidual, e possuem a particularidade de escapar à rejeição imunológica, reduzindo a resposta imune do organismo ao secretar citocinas e imuno receptores (TGF- β , IL-10, indoleamina 2,3-dioxigenase, prostaglandina E2 ou por interação célula-célula), e inibir as células do sistema imune inato (células dendríticas, células *natural killer*, monócitos e neutrófilos) e do sistema imune adaptativo (células B, células T-helper 1 e células T citotóxicas)^{30,50-53}. Comparativamente aos transplantes alogénicos (transplantes entre indivíduos diferentes, mas da mesma espécie) é importante ter em consideração que as MSCs são privilegiadas pelo sistema imunológico, uma vez que não possuem antigénios de superfície celular responsáveis por gerar uma resposta imune²³.

Numa situação de dano tecidual, em que a angiogénese esteja diminuída, as MSCs também têm a capacidade de libertar fatores que estimulam a migração, proliferação e diferenciação das células progenitoras endógenas que apoiam a angiogénese e ajudam na regeneração dos tecidos. Estas células endógenas são libertadas pela medula óssea e tecidos ou órgãos não originários da medula óssea, como o baço, o tecido adiposo e a parede vascular, e a sua principal função é migrar para as áreas lesadas e promover a formação de vasos sanguíneos⁵⁴. Foi também demonstrado que as MSCs são capazes de induzir a angiogénese em membros isquémicos⁵⁵.

Utilização terapêutica

Para o sucesso da utilização das MSCs em medicina regenerativa é necessário seguir procedimentos no que diz respeito ao seu isolamento, caracterização e expansão⁵⁶. A medula óssea é considerada a melhor fonte de MSCs, sendo as células estaminais da medula óssea usadas como padrão para a comparação da funcionalidade de MSCs de outras fontes²⁶. No entanto, ao contrário da medula óssea, as MSCs de outros tecidos podem ser facilmente obtidas por métodos não invasivos e a sua proliferação *in vitro* pode ser mantida durante várias passagens de meio de cultura⁵⁷. Graças ao seu elevado potencial terapêutico, têm sido feitas várias análises envolvendo a administração sistémica e local de MSCs, através de transplantes autólogos e alogénicos, de modo a perceber qual o método mais eficaz²². Apesar da situação ideal envolver a utilização de células autólogas, vários estudos têm comprovado tanto a eficácia como a segurança da utilização de células alogénicas e xenogénicas²². Relativamente à via de administração, sabe-se que a via mais utilizada para fazer transplantes de MSCs é a intravenosa, no entanto o procedimento mais viável é a injeção no local alvo da terapêutica, garantindo assim a presença de um maior número de células funcionais no sítio da lesão²⁶. Além disso, outras formas de administração têm sido utilizadas, envolvendo a utilização de estruturas de suporte formadas por biomateriais (*scaffolds*) associadas a células estaminais para injeção intradérmica ou sistémica⁵⁸. No estudo feito por Falanga *et al.* (2007) foi demonstrada a eficácia

da aplicação de MSCs no local da ferida, a partir de um sistema de fibrina em *spray*. A viabilidade e a capacidade de migração das células foi comprovada, tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, sugerindo a sua permanência no local da ferida⁵⁹.

Uma das limitações associadas à utilização das MSCs é a perda da sua potência durante a subcultura *in vitro*, principalmente nas passagens de meio de cultura mais altas. Tem-se observado que a senescência das MSCs humanas da medula óssea nas culturas a longo prazo se deve ao declínio no potencial de diferenciação, encurtamento do comprimento dos telómeros e alterações morfológicas⁶⁰. Sabe-se que o cultivo prolongado destas células aumenta a probabilidade de transformação maligna e diminuição da sua multipotência⁶¹.

Várias análises foram feitas de modo a perceber os procedimentos a seguir para contornar as limitações acima descritas. Por exemplo, observou-se que dois dos compostos vitais (soro e os fatores de crescimento) mais usados para manter a cultura das MSCs são responsáveis pela transformação maligna das células nas passagens mais elevadas⁶². Também se sabe que, em condições mínimas de cultura, o meio necessita de 10% de soro fetal bovino, mas tais condições levam as MSCs a reter algumas proteínas provenientes desse soro que podem provocar respostas imunológicas *in vivo*⁶³. Experimentou-se utilizar um meio de cultura sem soro e observou-se a diminuição gradual do potencial de diferenciação e da atividade das telomerasas. No entanto, as células mantiveram-se resistentes à transformação espontânea, podendo ser

mantidas em passagens mais altas sem alterações cromossómicas⁶². Apesar da realização de diversos estudos é difícil obter dados comparativos devido à variação nos métodos de cultivo utilizados para as MSCs²⁶.

A idade das células também influencia bastante a sua atividade. Duscher *et al.* (2014) compararam MSCs de origem adiposa provenientes de ratos novos e velhos e, apesar da sua frequência e viabilidade serem semelhantes, a sinalização e capacidade angiogénica foi significativamente reduzida nos ratos velhos, resultando na baixa cicatrização de feridas⁶⁴. Em outro estudo, Bustos *et al.* (2014) também observaram que as MSCs mais velhas possuem menor capacidade migratória e anti-inflamatória⁶⁵.

Capacidade de homing

Homing é o termo utilizado para referir as células que têm a capacidade de migrar e de se implantarem no local da lesão. Embora este processo esteja bem identificado na atividade dos leucócitos aquando da inflamação, o mesmo não se verifica no que diz respeito às células estaminais, em caso de isquemia ou dano tecidual²⁶. Sabe-se apenas que as MSCs expressam recetores e moléculas de adesão que auxiliam na sua migração até ao tecido danificado, onde exercem a sua função: o recetor de quimiocinas tipo 4 (CXCR4) e a sua proteína de ligação, o SDF-1 α ²⁶.

Existe, no entanto, a possibilidade das células estaminais se hospedarem em locais não alvo, o que é particularmente grave quando estas se alojam nos pulmões. Assim, é necessário compreender o mecanismo de *homing* e

monitorizar a eficácia terapêutica destas células, para que sejam seguras para o hospedeiro. Nesse sentido, têm sido efetuados testes *in vivo* com métodos não invasivos, como a tomografia computadorizada por emissão de fóton único, bioluminescência ou tomografia por emissão de pósitrons²⁶.

São vários os fatores que podem influenciar o mecanismo de *homing*, incluindo a idade das células, a fonte da qual foram retiradas, as condições de cultivo, o número de passagens celulares e a via de administração. Sabe-se que um número maior de passagens diminui a capacidade de *homing*, e que células recém-isoladas são mais eficientes que as células cultivadas. Foi também demonstrado que a disponibilidade de oxigênio, citocinas e fatores de crescimento nos meios de cultura são importantes neste processo, assim como a presença de metaloproteases que estão envolvidas na migração das MSCs. Sabe-se também que a presença de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e TGF-1 β , regulam positivamente o nível de metaloproteases, potenciando a migração das MSCs²⁶.

UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS NA REGENERAÇÃO DE QUEIMADURAS TÉRMICAS E POR RADIAÇÃO

As queimaduras severas causadas pelo calor ou pela radiação representam um grande problema de saúde, uma vez que são difíceis de tratar. As queimaduras térmicas são classificadas com base na sua profundidade, e as que ocupam mais de 20% da superfície corporal provocam efeitos sistêmicos graves, habitualmente designados por *burn shock*⁶⁶. Estas lesões da pele originam a perda total da

sua barreira protetora externa, atraso na cicatrização, aumento da inflamação e hipermetabolismo que potencia o *stress* oxidativo⁶⁷. Uma inadequada cicatrização deste tipo de feridas, associada ao crescimento bacteriano, pode levar a um estado grave de seps⁶⁸.

No caso de uma queimadura por radiação, a extensão do dano depende da dose e do tipo de radiação, da radiosensibilidade individual, da extensão de pele exposta, da profundidade de penetração da radiação e da existência de outros fatores (como por exemplo, tabagismo e obesidade associada à diabetes), que promovem a isquemia dos vasos sanguíneos da derme^{32,69}. A exposição à radiação ionizante origina um conjunto de sintomas (como por exemplo, o eritema seguido de perda de cabelo, descamação seca, descamação húmida e ulceração), sendo designada por síndrome da radiação aguda, e afetando principalmente as células com elevada taxa de proliferação, como é o caso das células cutâneas^{70,71}. A radiação danifica a camada basal da pele que contém queratinócitos e as células estaminais do folículo piloso, o que leva à produção de radicais livres e alterações na estrutura do ADN (ácido desoxirribonucleico), aumentando os níveis de inflamação e de *stress* oxidativo^{72,73}. Alguns tratamentos têm evidenciado a importância da relação complexa entre a pele e os restantes tecidos na síndrome de radiação aguda⁷⁴. O nível do dano da função de barreira da pele, do potencial regenerativo e da integridade dos capilares é crucial, assim como as modificações na rede de comunicação entre queratinócitos, fibroblastos, e células imunocompetentes locais ou circulantes, como células de Langer-

hans, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos⁷⁴.

Sabe-se que os dois tipos de queimaduras da pele referidos diferem na resposta inflamatória, podendo a radiação originar inflamações recorrentes, que levam ao eritema e necrose⁷⁵. A necrose acontece quando a radiação atinge também as estruturas subcutâneas mais profundas, como os músculos, os vasos sanguíneos ou os ossos, podendo também ocorrer descamação resultante da morte dos queratinócitos⁷⁶. Nos dois casos, o procedimento mais comum é a remoção do tecido danificado e realização de um autotransplante, embora nas queimaduras por radiação os enxertos levem frequentemente a lesões não curativas, devido ao estado de inflamação constante, tanto ao nível local como sistémico^{77,78}. A cicatrização ineficaz das feridas após cirurgia, assim como a falta de fármacos disponíveis para o tratamento de queimaduras graves, levou à necessidade de efetuar pesquisas para obter melhores opções terapêuticas³⁶, sendo que as mais promissoras envolvem MSCs isoladas ou em associação com outros tratamentos⁷⁹.

Estudos pré-clínicos em queimaduras térmicas

Mansilla *et al.* (2006) recolheram amostras sanguíneas de 15 pacientes queimados e de 15 dadores saudáveis, e avaliaram a presença de MSCs. Os resultados demonstraram que foi possível identificar as células nos dois tipos de amostras. No entanto, verificou-se que estas se encontravam significativamente em maior quantidade nos doentes queimados⁸⁰. Em outro estudo, procedeu-se à injeção intramuscular de MSCs em

ratos que tinham acabado de sofrer queimaduras. Passadas 24h, foram removidos os rins, pulmões e o fígado dos animais para a pesquisa histológica de células inflamatórias e de células mortas. Comparando com o grupo controlo (não tratado), observou-se um número reduzido de células inflamatórias e de células mortas nos ratos tratados com MSCs⁸¹. Os resultados destes dois estudos evidenciam a capacidade das MSCs para realizar o *homing*³⁶.

Foi realizada uma experiência que avaliou, comparativamente, o resultado do tratamento de queimaduras em ratos, utilizando MSCs provenientes da medula óssea e fibroblastos embrionários. Verificou-se que ambas as células foram capazes de regenerar a pele, ao formar novos vasos sanguíneos e tecido granulomatoso. No entanto, com o tratamento com MSCs foram obtidos resultados mais rápidos⁸². Öksüz *et al.* (2013) também trataram ratos com MSCs após sofrerem queimaduras e observou que estes tiveram menor número de células apoptóticas e maior percentagem de tecido vital, comparativamente ao grupo controlo⁸³.

O papel imunossupressor das MSCs nas queimaduras tem sido analisado ao longo dos anos, sendo bem compreendido atualmente. Zhang *et al.* (2015) observaram que ratos tratados com MSCs têm níveis circulatórios reduzidos de glóbulos brancos, proteína C reativa, TNF- α , IL6 e IL10⁸⁴. Caliar-Oliveira *et al.* (2016) experimentaram injetar intradermicamente MSCs em ratos e observaram a redução de células CD4+ e CD8+ no baço e o aumento de citocinas anti-inflamatórias (TGF- β e IL10) em circulação. Esta modulação da resposta

imunitária mostrou estar diretamente relacionada com a taxa de sobrevivência dos ratos⁸⁵. Liu *et al.* (2014) também observaram a diminuição de células inflamatórias e citocinas pro-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) e aumento de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 no local da lesão, após proceder à injeção intravenosa de MSCs provenientes do cordão umbilical⁸⁶.

Estudos pré-clínicos em queimaduras por radiação

Graças ao potencial regenerativo das MSCs estas tornam-se interessantes para tratar as lesões derivadas da exposição à radiação ionizante, que afetam essencialmente doentes que se submeteram a tratamentos de radioterapia ou sofreram uma exposição acidental a esta radiação³⁶. Tem sido observado que cerca de 95% dos pacientes que recebem radioterapia têm reações cutâneas de intensidade variável, visto que este procedimento afeta não só o tumor, mas também os tecidos saudáveis que o rodeiam³². Neste sentido, foram efetuadas várias experiências em ratos onde se observou igual capacidade de *homing* destas lesões. Por exemplo, François *et al.* (2007) avaliaram o efeito curativo das MSCs em ratos que sofriam da síndrome de radiação cutânea. Neste estudo, após a aplicação da radiação na perna dos animais, foi efetuada a injeção intravenosa de MSCs da medula óssea e os resultados foram comparados com ratos controlo, não submetidos a tratamento. No momento da administração, a viabilidade celular das amostras recolhidas foi superior a 98%. Os animais testados foram mortos três, quatro, seis e oito semanas após a exposição à ra-

dição, e foram recolhidas amostras de pele para analisar a presença das MSCs nos tecidos e para avaliar a severidade das lesões, bem como a sua cicatrização. Através da análise macroscópica observou-se que as MSCs retardaram a evolução das lesões, verificando-se que após quatro semanas da irradiação existia apenas descamação húmida das lesões. Pelo contrário, as lesões dos animais controlo apresentaram a progressão de eritema para descamação seca e húmida, e ulceração. Após oito semanas, as lesões dos animais controlo apresentavam apenas cicatrização parcial, enquanto as tratadas com MSCs estavam totalmente curadas, tendo-se observado uma aceleração da cicatrização da quinta à oitava semana. Estes resultados foram confirmados por exames histológicos, após seis semanas da irradiação, onde foi possível observar ulceração com tecido fibroso e inflamação, tanto na derme como na hipoderme dos ratos sem tratamento. Passadas as oito semanas do estudo, a pele dos animais mostrou estar parcialmente curada. Na sexta semana, os ratos tratados com MSCs apresentaram áreas com reepitelização e algum tecido dérmico fibroso e inflamado. A cicatrização foi praticamente completa na oitava semana com tecido dérmico moderadamente fibroso, sugerindo que as MSCs aumentam efetivamente a reepitelização dos tecidos. Verificou-se que as MSCs foram capazes de efetuar o *homing* até ao local exposto à radiação, onde permaneceram até às oito semanas após o transplante, embora fossem diminuindo ao longo do tempo. Os resultados deste estudo evidenciam o sucesso da utilização de MSCs humanas na fase inicial do tratamento da síndrome

da radiação aguda, através de injeção intravenosa. É também sugerido que as MSCs diminuem a gravidade das lesões, reduzindo drasticamente a evolução para necrose e acelerando a cicatrização da pele³². Em outro estudo, Jin *et al.* (2016) associaram MSCs a fatores de crescimento derivados de plaquetas e testaram a sua eficácia no tratamento de úlceras causadas por radiação, tendo observado que a cicatrização foi mais rápida, e com uma deposição de colagénio mais organizada, em comparação aos resultados da utilização dos componentes em separado⁸⁷. Curiosamente, Horton *et al.* (2013) observou que o tratamento de ratos com MSCs levou a uma menor deposição de colagénio, comparado com o grupo controlo, evitando a ocorrência de fibrose⁸⁸. Verificou-se que a presença de MSCs levou à redução da expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 β , aumento da IL-10 e dos fatores de crescimento derivados de plaquetas, assim como diminuiu a infiltração de macrófagos pró-inflamatórios (CD80+) na pele lesionada e aumento dos anti-inflamatórios (CD163+)⁸⁸.

De forma a facilitar a transferência dos resultados para os humanos, Agay *et al.* (2010) desenvolveram um modelo *in vivo* com porcos para avaliar a capacidade de cicatrização das MSCs⁷⁴. Neste estudo, os porcos foram expostos à radiação e, de seguida, foram injetados intradermicamente com MSCs. Verificou-se a acumulação de linfócitos na zona da ferida e um melhoramento da circulação local, contrariamente ao que foi verificado nos porcos sem tratamento⁷⁴. Noutro estudo, utilizando o mesmo modelo animal, Riccobono *et al.* (2012) demonstraram que as MSCs autólogas derivadas do te-

cido adiposo também são capazes de tratar a lesão, impedir a necrose e reduzir a dor⁷¹.

Estudos clínicos em queimaduras por radiação

Devido à capacidade que as MSCs têm para reduzir a inflamação e ajudar na regeneração cutânea, vários estudos clínicos têm sido elaborados para compreender a sua eficácia na aceleração da cicatrização de queimaduras.

Caso clínico 1

Um indivíduo do sexo masculino com 27 anos de idade esteve exposto a uma elevada dose de radiação que rapidamente lhe provocou lesões cutâneas. A dose de radiação absorvida no centro da lesão originou ulceração, epidermólise e perda de adesão da epiderme à camada basal. No entanto, não houve sinal de rabiólise. No tratamento, primeiro procedeu-se à excisão da lesão, para impedir que a inflamação alastrasse para os tecidos saudáveis. Após verificar a ausência de inflamação e infeção, fez-se um transplante autólogo de pele, tendo-se verificado a ocorrência de lise imediata do enxerto e formação de úlcera com infeção. Deste modo, foi necessário efetuar um novo procedimento, começando por repetir a excisão do tecido, onde se pôde observar o deterioramento do tecido muscular e dos vasos sanguíneos. De seguida, efetuou-se um segundo transplante de pele e experimentou-se a terapia celular com MSCs da medula óssea, efetuando duas administrações num período de 9 dias. As MSCs foram injetadas no local da ferida, sobre o transplante de pele e à volta da lesão, tanto ao nível cutâ-

neo como muscular. Por fim, cobriu-se a lesão com pele artificial. Deste tratamento não resultou qualquer reação adversa relacionada com a utilização de MSCs autólogas. No dia seguinte à primeira administração celular, já não havia dor nem evolução clínica da queimadura, o tamanho da ferida começou a diminuir progressivamente e, passado 1 mês, a ferida estava praticamente curada. Durante os 11 meses de seguimento do paciente, não se verificou nenhuma reincidência da queimadura de radiação. Ao fim de 75 dias a cicatrização estava completa, sendo a estética o único problema e, passado 1 ano, o resultado persistiu inalterado⁷⁸.

Caso clínico 2

Um indivíduo do sexo masculino com 66 anos, fumador e com tensão arterial alta, foi submetido a radioterapia (dose aplicada 50-60 Gy) quando tinha 36 anos, para tratar um angioma na perna direita. Foi verificado que, a cada 10 anos após o tratamento de radioterapia, apareciam úlceras no mesmo local, com remissão após tratamento. No entanto, com o passar do tempo, estas começaram a aparecer mais frequentemente, provocando necrose do tecido⁸⁹. O referido paciente foi ao hospital com duas úlceras necróticas que rapidamente se transformaram em uma única ferida, envolvendo tecido muscular. Foi realizada uma escarectomia para remover o tecido necrótico e promover a vascularização e o paciente foi incluído no protocolo de tratamento para lesões induzidas por radiação (aplicação tópica de colagenase ou sulfadiazina de prata com lidocaína e vitamina A, associada à administração sistémica de pentoxifilina e vitaminas C e E como

antioxidantes). Quando a ferida atingiu condições adequadas, começaram a fazer-se repetidas renovações de pele com películas poliméricas, de modo a promover o ambiente ideal de cura, evitando a desidratação e infeções. Mais tarde, procedeu-se ao tratamento hiperbárico com oxigénio para promover a oxigenação dos tecidos danificados e a angiogénese. Para utilizar como adjuvante do tratamento foram recolhidas MSCs a partir do osso ilíaco de um cadáver. As células foram tratadas em laboratório e administradas na ferida em três momentos diferentes. Após cada aplicação, revestiu-se a ferida com uma película polimérica transparente, que era renovada consoante a necessidade, e que permitiu manter a hidratação e monitorizar o estado de cicatrização. Para avaliar a eficácia do tratamento, foram tiradas fotos periodicamente e efetuaram-se análises histológicas e aos biomarcadores de resposta inflamatória. Após cada administração, observou-se a diminuição do nível de proteína C reativa e, 3 meses após a segunda administração, atingiram-se valores controlo da integrina- $\beta 1$ dos linfócitos, remetendo para o efeito anti-inflamatório induzido pelas MSCs. Passados 2 anos, observou-se que o tamanho da úlcera diminuiu, houve recuperação local e remissão dos sintomas, melhorando significativamente a qualidade de vida do paciente. Tais fatos permitiram concluir que as MSCs ajudam na cicatrização dos tecidos, melhoram a circulação local e diminuem as inflamações características deste tipo de queimaduras, tendo sido esta uma das primeiras vezes em que se conseguiu tratar com sucesso um caso crónico, sem resposta positiva aos tratamentos

convencionais, utilizando MSCs provenientes de um cadáver⁸⁹.

FERIDAS DE DIABÉTICOS

A ulceração do pé diabético é o principal motivo de hospitalização dos doentes diabéticos, visto que é frequente as úlceras infetarem e progredirem para um estado que requer a amputação do membro. Uma das principais razões que compromete a cicatrização das úlceras diabéticas é o facto da circulação sanguínea estar diminuída nestas feridas⁴⁸. Além disso, as alterações na produção de fatores de crescimento e de tecido granulomatoso, oscilações na resposta a mediadores inflamatórios e a contração das feridas, também são responsáveis pelo atraso da cicatrização das úlceras diabéticas^{37,54}. Apesar dos avanços científicos feitos nesta área, é necessário desenvolver terapias mais eficazes. Nesse sentido, a administração de MSCs representa um tratamento promissor para este tipo de feridas, tendo em conta a segurança e eficácia comprovadas em ensaios pré-clínicos e clínicos, e dada a sua capacidade de aumentar a angiogénese que, por sua vez, melhora a cicatrização da pele^{48,90}.

Estudos pré-clínicos

Tal como acontece nas queimaduras, as MSCs são benéficas na cicatrização das feridas diabéticas, devido à capacidade de secreção de citocinas que promovem a migração celular, a remodelação da matriz extracelular e a angiogénese, bem como a sua diferenciação em queratinócitos e em células endoteliais^{48,90}. Para o efeito, as MSCs podem ser administradas através de um transplante alogénico, visto que estas células pos-

suem propriedades imunossupressoras e imunomoduladoras. Vários estudos pré-clínicos demonstraram que as MSCs são capazes de fechar a ferida, formar novo tecido granulomatoso, aumentar o número de local células e promover a formação de vasos sanguíneos⁴⁸. Por exemplo, O'Loughlin *et al.* (2013) avaliaram o efeito de dose-resposta resultante da aplicação de MSCs associadas a estruturas de suporte (*scaffolds*) em úlceras diabéticas de um modelo animal. Neste estudo foi aplicada topicamente uma matriz de colagénio associada a MSCs alogénicas não diabéticas derivadas da medula óssea, em coelhos diabéticos, aos quais foram infligidas feridas nas orelhas. Cada ferida foi tratada aleatoriamente de uma das seguintes formas: 1) sem tratamento; 2) matriz de colagénio; 3) matriz de colagénio com 50000 MSCs; 4) matriz de colagénio com 100000 MSCs ou 5) matriz de colagénio com 1000000 MSCs. Passados 7 dias, as análises histológicas demonstraram que a reepitelização aumentava consoante o aumento da dose de MSCs utilizada. Também se observou que as matrizes de colagénio associadas às células reestruturaram a pele de um modo mais organizado, comparativamente à sua utilização isolada ou à ausência de tratamento. Observou-se também que o transplante da matriz de colagénio com 1000000 de MSCs aumentou significativamente o fecho da ferida, enquanto os restantes tratamentos obtiveram resultados semelhantes às feridas sem tratamento. Por último, recorreu-se à avaliação da eficácia do tratamento através da angiogénese e da resposta inflamatória, onde se verificou que o comprimento dos vasos sanguíneos era significativamente

maior e a vasculatura estava aumentada nas feridas tratadas com a matriz de colagénio associada à dose de 1000000 de MSCs. Contrariamente, nos restantes tratamentos obtiveram-se resultados semelhantes aos das feridas sem tratamento. Todos os tratamentos demonstraram uma redução significativa na distância de difusão radial em relação às feridas não tratadas, representando uma distância menor para a migração dos nutrientes entre os capilares e o tecido, o que aumenta a regeneração tecidual. Em relação ao diâmetro dos vasos, não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos de tratamento. Através da quantificação de neutrófilos e linfócitos foi possível observar que nenhum tratamento provocou inflamação, quando comparados com as feridas sem tratamento, o que indica que a matriz de colagénio de bovino e as MSCs alogénicas não afetam negativamente a cicatrização da pele. Neste estudo verificou-se que a aplicação tópica de uma determinada dose de MSCs associada a uma matriz de colagénio, aumenta a cicatrização das feridas diabéticas, fechando feridas e aumentando a neovascularização. O modelo pré-clínico utilizado é considerado relevante, uma vez que está descrito que a cicatrização dos coelhos é semelhante à dos humanos, envolvendo reepitelização e formação de tecido granulomatoso⁴⁸.

Estudos clínicos

Caso clínico 1

Foi realizado um estudo clínico com o objetivo de avaliar o tratamento de uma úlcera crónica de um indivíduo diabético, utilizando uma matriz de colagénio associada a fibroblastos autólogos em

combinação com a administração de MSCs autólogas da medula óssea. O indivíduo do sexo masculino tinha 77 anos e possuía uma ferida crónica aberta há 25 anos. O tratamento iniciou-se com a recolha de uma amostra de MSCs da medula óssea e administração de uma pequena quantidade diretamente nos bordos da ferida. De seguida, adicionou-se a matriz de colagénio e fibroblastos e cobriu-se a ferida com gaze e com uma película adesiva, para a preparação permanecer em contacto com o local afetado. Esta aplicação foi repetida em dois momentos diferentes, tendo-se verificado que após 4 semanas do tratamento, a ferida mostrou estar cicatrizada, apresentando um tamanho inferior, e um aumento da vascularização e da espessura da derme⁵⁵.

Caso clínico 2

Lu *et al.* (2011) avaliaram a eficácia e segurança do tratamento de doentes diabéticos com isquemia crítica do membro inferior e úlceras dos pés utilizando MSCs da medula óssea autólogas (grupo A), células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea (grupo B) e uma solução salina (grupo controlo). Neste estudo foram analisados 37 doentes, que foram aleatoriamente submetidos à injeção intramuscular de um dos tratamentos. Passadas 2 horas do transplante das células, verificou-se que três membros do grupo A e dois do grupo B tiveram dor ligeira, mas não houve qualquer situação de infeção, rejeição ou outras complicações decorrentes do tratamento. Verificou-se também que as MSCs produziram uma quantidade significativamente maior de fatores de crescimento, como VEGF, fator

de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) e angiopoetina-1, sob condições de normóxia e hipóxia, do que as células mononucleares. Passadas 24 semanas do transplante, a dor dos membros tratados, em repouso, diminuiu significativamente tanto no grupo A como no grupo B, e o tempo de caminhada sem dor também aumentou significativamente em ambos, comparando com o grupo controlo. O índice de pressão tornozelo-braquial e a medição transcutânea de oxigénio aumentaram em ambos os tratamentos até às 4 semanas após o transplante, e os resultados persistiram até às 24 semanas de observação. No entanto, estes resultados foram significativamente maiores quando utilizadas MSCs. Após as 24 semanas, também foi possível observar um aumento significativo dos vasos sanguíneos, assim como da circulação sanguínea no grupo tratado com MSCs, em comparação com o grupo tratado com células mononucleares, enquanto no grupo controlo não houve alteração. Em detalhe, observou-se que 6 semanas após o transplante o número de úlceras curadas no grupo A foi significativamente maior do que no grupo B, sendo a taxa de cicatrização de 100% atingida na 8ª semana, no grupo A, e na 12ª semana, no grupo B. No grupo controlo, 6 pacientes sofreram amputação do membro inferior, enquanto nos grupos de tratamento não ocorreram amputações. Este ensaio permitiu demonstrar a segurança de ambos os tratamentos, uma vez que não houve complicações relacionadas com a administração de células, tendo o tratamento com MSCs originado melhores resultados clínicos. No entanto, para avaliar melhor estes resultados, é necessário

fazer o estudo em um número maior de pacientes e por um período de tempo mais longo⁹¹.

Caso clínico 3

Qin et al. (2016) realizaram um estudo que envolveu 53 pacientes com sintomas severos de ulceração do pé diabético associado a diferentes graus de doença arterial dos membros inferiores, que foram distribuídos aleatoriamente por um grupo controlo (25 pacientes - 38 membros) e um grupo experimental (28 pacientes - 34 membros). Os pacientes de ambos os grupos receberam o tratamento convencional de angioplastia, e o grupo experimental foi adicionalmente tratado com MSCs derivadas do cordão umbilical humano. O tratamento foi feito através da administração intravenosa das MSCs e injeção local nos bordos da úlcera, sendo o volume de suspensão de MSCs ajustado consoante o tamanho da úlcera. Os pacientes foram seguidos até 1 a 3 meses após o tratamento, tendo-se verificado que a angioplastia realizada nos dois grupos teve uma taxa de sucesso de 81%. Após o tratamento, as taxas de recuperação de estenose e oclusão foram de 87% e 68%, respetivamente. Os pacientes de ambos os grupos tiveram melhorias significativas 2 meses depois do tratamento. No entanto, o grupo experimental obteve resultados mais favoráveis ao nível da temperatura da pele, índice de pressão tornozelo-braquial, tensão transcutânea de oxigénio e distância de claudicação. No final do tratamento, também foi possível constatar que houve um aumento do número de vasos sanguíneos, sendo este significativamente maior no grupo experimental. Entre os 19 pacientes em

estado mais grave, 15 foram curados em 3 meses, 2 tiveram uma área de úlcera menor, 1 tratamento falhou devido a uma complicação da doença, e 1 sofreu uma amputação 6 semanas após o transplante. Ainda assim, a extensão dessa amputação foi significativamente menor devido ao tratamento. Durante o período experimental não se verificaram reações adversas ou complicações graves associadas ao tratamento, indicando que o transplante de MSCs após angioplastia é seguro e eficaz para pacientes com úlceras diabéticas severas, visto que os seus resultados foram significativamente melhores que os do controlo³⁴.

APLICAÇÃO EM COSMÉTICOS

Tendo em conta as características das células estaminais, em particular a capacidade regenerativa, a sua aplicação é promissora na área da cosmética. Nos últimos anos, tem-se dado especial atenção à utilização de células estaminais nos processos de anti envelhecimento da pele, devido ao seu potencial para estimular a proliferação das células estaminais da epiderme. Várias pesquisas têm sido realizadas no sentido de entender como se pode retardar o processo natural de envelhecimento da pele. Deste modo, os cosméticos modernos têm como objetivo melhorar a aparência da pele, enquanto estimulam e regeneram os seus processos fisiológicos, protegendo-a contra as agressões do meio ambiente^{8,92}.

Atualmente, por razões éticas, a lei europeia proíbe a utilização de substâncias de origem humana e animal obtidas contra o bem-estar destes, pelo que a indústria cosmética se tem interessado pelos recursos vegetais. Sabe-se que as

células estaminais vegetais têm a capacidade de proteger as células estaminais humanas, estimular a regeneração da pele e prevenir o seu processo de envelhecimento⁸.

Células estaminais vegetais

Tal como as células estaminais animais, as células estaminais vegetais, provenientes de plantas, são igualmente capazes de estimular a regeneração de tecidos em situações de stress. Além disso, as células estaminais de plantas possuem características únicas que lhes permite regenerar tecido lesado e originar uma nova planta⁹³. As plantas possuem uma proteína designada por *WUSCHEL* que é capaz de transformar células somáticas em células estaminais, o que explica a capacidade de gerar uma nova planta⁹⁴. Há ainda evidências de que as auxinas, hormonas presentes nas plantas, conseguem regular o comprimento dos telómeros essenciais à estabilidade do genoma a longo prazo, enquanto o ácido abscísico, outra hormona das plantas, tem um efeito antagónico⁹⁵.

Os extratos derivados de células estaminais vegetais constituem uma fonte de vários ingredientes ativos seguros para uso humano, visto que não originam respostas imunitárias. Estes extratos contêm várias substâncias que ajudam a reverter os processos de anti envelhecimento, como polifenóis, ácidos fenólicos, triterpenos, flavonóides, carotenóides, ácidos gordos, açúcares e péptidos. De acordo com alguns estudos, um dos compostos com propriedades anti envelhecimento mais marcadas é a cinetina, uma citocina responsável pelo crescimento das plantas, e que exerce uma atividade antioxidante nas células

humanas. A cinetina está presente em várias células estaminais vegetais, encontrando-se em elevada concentração nos limões e nas framboesas⁸.

Dependendo do tipo de planta utilizada, as células estaminais vegetais exercem vários efeitos favoráveis para a pele, sendo capazes de prolongar a vida dos fibroblastos e estimular a sua atividade; aumentar a flexibilidade da epiderme; regular a divisão celular; reconstruir a epiderme danificada; ativar a reparação do ADN celular, protegendo as células do stress oxidativo; proteger contra as radiações UV. Deve ter-se em atenção que as células estaminais vegetais são extremamente sensíveis a fatores externos, como a luz e a temperatura, pelo que são utilizadas nos cosméticos sob a forma de extratos em pó ou solúveis em óleo ou em água^{8,96}. São utilizadas técnicas de cultura específicas que combatem os problemas das culturas selvagens, como o crescimento lento, colheitas sazonais, variação das concentrações de substâncias ativas entre plantas e colheitas, e presença de metabolitos tóxicos. Estas técnicas permitem a produção de elevadas quantidades de ingredientes ativos cosméticos, difíceis de conseguir a partir das culturas naturais das plantas^{92,96,97}. Algumas espécies vegetais raras possuem compostos cosméticos interessantes, mas não podem ser usadas por se encontrarem em vias de extinção. Algumas indústrias cosméticas têm procurado contornar este problema, como é o caso da Mibelle Biochemistry, que desenvolveu uma tecnologia sustentável (PhytoCellTecTM) para obter grandes quantidades de ingredientes ativos a partir de uma pequena quantidade de material vegetal. Esta tecnologia permite o cresci-

mento de células estaminais, isoladas a partir de um tecido vegetal previamente selecionado, em condições ideais, dentro de um biorreator. Os investigadores da Mibelle Biochemistry descobriram que as células estaminais vegetais contêm fatores epigenéticos que lhes conferem capacidades de multipotência e de autorrenovação semelhantes aos das humanas. Por esse motivo, quando aplicadas corretamente, estas células têm um impacto positivo na vitalidade e funcionamento das células estaminais da pele⁹⁸.

Estudos clínicos

Nos últimos anos, o efeito anti envelhecimento dos extratos de células estaminais provenientes de diferentes espécies vegetais tem sido sugerido, existindo já alguns produtos comercializados. Por exemplo, a PhytoCellTecTM *Malus domestica*, uma preparação lipossómica patenteada que contém células estaminais derivadas da *Uttwiler Spätlauber*, uma variedade rara de maçã suíça, demonstrou promover o anti envelhecimento⁹⁹. Estas maçãs são conhecidas pelo seu elevado potencial de longevidade e excelente capacidade de armazenamento, o que sugere que possuem células estaminais de alta qualidade. Para avaliar as possíveis vantagens desta espécie vegetal, foram feitas culturas celulares com o objetivo de utilizar o extrato obtido em estudos de anti envelhecimento. Em primeiro lugar, foi avaliada a viabilidade das células estaminais do cordão umbilical expostas a 0,01% e 0,1% de extrato vegetal, observando-se um crescimento celular de 20% e 80%, respetivamente. Estes resultados demonstraram que as células estaminais vegetais estimulam a proliferação das

células estaminais humanas. De seguida, duas culturas de células (uma com extrato e outra sem extrato) foram expostas à radiação UV, tendo-se observado a morte de 50% das células sem extrato e a perda de 7% de viabilidade das células cultivadas com extrato. Estes resultados evidenciam que o extrato vegetal promove a proteção e manutenção das células estaminais humanas¹⁰⁰. Em outro estudo, os mesmos investigadores avaliaram os efeitos do extrato vegetal de células estaminais de *Uttwiler Spätlauber*, em uma cultura de fibroblastos em senescência (processo natural que leva a que as células percam a capacidade de se dividir, sendo bastante prejudicial se ocorrer nas células estaminais, visto serem indispensáveis à regeneração dos tecidos). Deste modo, adicionou-se água oxigenada a duas culturas distintas para induzir este processo, sendo uma delas posteriormente incubada com 2% de extrato (teste), durante 144 horas, e a outra não (controlo). Analisou-se a expressão genética de ambas as culturas, observando-se uma diminuição de genes importantes para a proliferação celular na cultura-controlo, enquanto na cultura-teste foi possível observar uma neutralização deste efeito. Observou-se, ainda, que o extrato estimulou a expressão da hemeoxigenase 1, uma enzima com atividade antioxidante. De seguida, fez-se um estudo em cabelos na fase de crescimento anagénica com o objetivo de avaliar a evolução do seu comprimento fora do couro cabeludo. Verificou-se que, quando colocados em meio de cultura próprio, os cabelos cresceram até ao dia 14 e começaram a regredir a partir daí. Contudo, quando tratados com 0,2% de extrato, estes foram ca-

pazes de adiar ligeiramente os processos de senescência e necrose, crescendo até ao dia 18. Por fim, de modo a avaliar a eficácia da utilização de células estaminais de *Uttwiler Spätlauber* na pele, realizou-se um estudo clínico com 20 voluntários. Durante 4 semanas, foi aplicado um creme com 2% de PhytoCellTec™, duas vezes por dia, na região periocular. A profundidade das rugas foi analisada após 2 e 4 semanas de aplicação do creme, tendo-se verificado uma diminuição significativa de 8% e 15%, respetivamente¹⁰¹.

A planta da espécie *Syringa vulgaris*, por ser rica em verbascosídeos, possui vários benefícios quando utilizada na pele, podendo ser usada no tratamento da inflamação comum, e na pele acneica, envelhecida e danificada pela radiação UV⁸. Também o extrato de células estaminais do tomate, obtido a partir da *Lycopersicon esculentum*, pode ser aplicado em produtos cosméticos para promover uma pele saudável. Graças à sua elevada capacidade antioxidante, este extrato é capaz de proteger as células da pele contra o stress oxidativo e danos induzidos por metais pesados¹⁰². Também foi confirmado que as células estaminais de *Coffea bengalensis* e *Nicotiana sylvestris* estimulam os fibroblastos a produzir colagénio, promovendo assim a regeneração da pele^{8,103}.

O Citrustem™ é um ingrediente ativo natural, obtido a partir de células estaminais da laranja, que exerce um efeito anti envelhecimento. Foi realizado um estudo em 20 mulheres, com a idade compreendida entre os 41 e os 55 anos, que aplicaram na face uma formulação com 3% deste ingrediente, duas vezes por dia, durante 56 dias. Comparando

com o grupo-controlo, que não aplicou a formulação, o grupo-teste obteve um aumento de 17,5% da elasticidade da pele, observando-se também uma reorganização da estrutura da derme e, ainda, uma pele mais suave^{8,104}.

Na pele facial oleosa ou envelhecida, os poros tendem a dilatar, o que aumenta a quantidade de sebo à superfície da pele. A Refine Ginger™ é um produto à base de células estaminais das folhas do gengibre (*Zingiber officinale*), que demonstrou evitar este efeito, tornando a textura da pele mais suave e uniforme, e menos brilhante. Este ingrediente ativo apresenta atividade adstringente, permitindo reduzir o número de poros, o que aumenta a firmeza da pele, reduz a produção de sebo, promove o fornecimento de água à epiderme e reduz a produção de radicais livres. Foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*, utilizando uma concentração de 0,5% de Refine Ginger™. Os testes *in vitro* mostraram o potencial para exercer: um efeito hidratante, devido ao aumento de 18% da síntese de glicosaminoglicanos; um aumento da firmeza, devido ao incremento de 20% da taxa de elastina, de 18% de proteoglicanos perimembranares, 21% dos proteoglicanos transmembranares e 21% dos proteoglicanos matriciais; um efeito matificante, resultante da redução de 17% da atividade da enzima 5-alfa redutase; um efeito antioxidante, confirmado pela redução até 23% da produção de radicais livres. Os estudos clínicos foram realizados em 20 mulheres, com idades compreendidas entre os 18 e os 50 anos, após a aplicação diária de uma emulsão contendo o Refine Ginger™. Ao fim de 6 horas, verificou-se uma redução de 15% do brilho facial.

Passados 28 dias, observou-se que 80% das mulheres reduziram o tamanho dos poros e 85% obtiveram uma pele com uma textura mais suave e uniforme. No final do tratamento, houve uma melhoria geral do estado da pele em cerca de 50%, observando-se uma textura mais suave, menos poros e poros mais fechados. Verificou-se, ainda uma redução de 19% da secreção de sebo^{8,105}.

CONCLUSÃO

Apesar dos avanços efetuados na medicina regenerativa, o tratamento de feridas cutâneas graves, essencialmente provenientes da exposição à radiação ou de indivíduos diabéticos, continua a ser difícil. Em particular, no tratamento de queimaduras causadas por radiação, o tratamento cirúrgico clássico (excisão do tecido seguida de transplante autólogo) falha, devido à disseminação imprevisível do processo necrótico.

A utilização de células estaminais mesenquimais na regeneração da pele tem-se revelado promissora, devido à capacidade de redução da inflamação e do risco de sepse, e de promoção da renovação tecidular. O número crescente de ensaios clínicos com células estaminais, revela que estas constituem uma estratégia terapêutica eficaz, sendo necessário entender em que condições são mais eficientes. Nesse sentido, torna-se fundamental executar ensaios clínicos que sigam protocolos, doses de tratamento, tipos de células estaminais e vias de administração comparáveis, permitindo tirar conclusões acerca dos resultados obtidos por diferentes investigadores. Outro aspeto importante consiste na realização de estudos em um número maior de pacientes e com perío-

dos de seguimento pós-tratamento mais prolongados, de forma a poder concluir, com maior rigor, a eficácia clínica destes tratamentos.

A utilização de células estaminais, em particular, as células de origem vegetal, para fins cosméticos constitui uma estratégia inovadora e promissora. Tem sido descrito que estas células são capazes de promover a hidratação da pele e aumentar a sua elasticidade, ajudando a prevenir o envelhecimento cutâneo. Quando aplicadas na pele, estas têm a capacidade proteger e estimular a proliferação das células estaminais autólogas, ajudando a reverter os processos naturais de envelhecimento. No entanto, é necessário realizar mais estudos clínicos e procurar novos ingredientes ativos, para concluir acerca da eficácia da utilização das células estaminais em cosméticos.

Agradecimentos

Trabalho financiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito dos projetos UID/Multi/04378/2019 e UID/Multi/04546/2019.

REFERÊNCIAS

1. Walsh, G., *Pharmaceutical biotechnology: concepts and applications*. 2007.
2. Cerqueira, M. T.; Pirraco, R. P.; Marques, A. P., Stem Cells in Skin Wound Healing: Are We There Yet? *Advances in Wound Care* 2016, 5 (4), 164-75.
3. Swiss Medica [homepage na internet]. Anti Aging Treatment; [consultado em 2018 dezembro 10] Disponível em: <http://www.startstemcells.com>.
4. Kolarsick, P. A. J.; Kolarsick, M. A.; Goodwin, C., Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* 2011, 3 (4), 203-213.
5. Seeley, R. R.; Stephens, T. D.; Tate, P., *Anatomia e Fisiologia*. 8 ed.; 2008; p 156-161, 163-164, 173-174.
6. Schäfer-Korting, M.; Mehnert, W.; Korting, H.-C., Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced drug delivery reviews* 2007, 59 (6), 427-443.
7. Mercurio, D. G. Caracterização da pele fotoenvelhecida, desenvolvimento e eficácia clínica de formulações dermocosméticas por técnicas de biofísica e análise de imagem. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
8. Małgorzata, M.; Elzbieta, S., Anti-Aging Properties of Plant Stem Cell Extracts. *Cosmetics* 2018, 5 (4), 55.
9. Landén, N. X.; Li, D.; Stähle, M., Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2016, 73 (20), 3861-3885.
10. Reinke, J. M.; Sorg, H., Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research* 2012, 49 (1), 35-43.
11. Woo, M. D. P. D. Young C.; Park, M. D. P. D. Soo S.; Subieta, B. S. Alberto R.; Brennan, M. D. P. D. Timothy J., Changes in Tissue pH and Temperature after Incision Indicate Acidosis May Contribute to Postoperative Pain. *Anesthesiology* 2004, 101 (2), 468-475.
12. Eming, S. A.; Krieg, T.; Davidson, J. M., Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 2007, 127 (3), 514-525.
13. Lau, K.; Paus, R.; Tiede, S.; Day, P.; Bayat, A., Exploring the role of stem

- cells in cutaneous wound healing. *Experimental Dermatology* 2009, 18 (11), 921-933.
14. Jacinto, A.; Martinez-Arias, A.; Martin, P., Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nature cell biology* 2001, 3, E117.
15. Schultz, G. S.; Wysocki, A., Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 2009, 17 (2), 153-162.
16. Eckes, B.; Nischt, R.; Krieg, T., Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis & Tissue Repair* 2010, 3 (1), 4.
17. Barker, T. H., The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine. *Biomaterials* 2011, 32 (18), 4211-4214.
18. Hinz, B., Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *Journal of Investigative Dermatology* 2007, 127 (3), 526-537.
19. Profyris, C.; Tziotziou, C.; Do Vale, I., Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics: Part I. The molecular basis of scar formation. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2012, 66 (1), 1-10.
20. Tziotziou, C.; Profyris, C.; Sterling, J., Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics: Part II. Strategies to reduce scar formation after dermatologic procedures. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2012, 66 (1), 13-24.
21. Xue, M.; Jackson, C. J., Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care* 2013, 4 (3), 119-136.
22. Stoff, A.; Rivera, A. A.; Sanjib Banerjee, N.; Moore, S. T.; Michael Numnum, T.; Espinosa-de-los-Monteros, A.; Richter, D. F.; Siegal, G. P.; Chow, L. T.; Feldman, D.; Vasconez, L. O.; Michael Mathis, J.; Stoff-Khalili, M. A.; Curiel, D. T., Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation. *Experimental Dermatology* 2009, 18 (4), 362-369.
23. Frykberg, R. G.; Banks, J., Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care* 2015, 4 (9), 560-582.
24. Greenhalgh, D. G., The role of apoptosis in wound healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1998, 30 (9), 1019-1030.
25. Wei, X.; Yang, X.; Han, Z.-p.; Qu, F.-f.; Shao, L.; Shi, Y.-f., Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica* 2013, 34, 747.
26. Ullah, I.; Subbarao, Raghavendra B.; Rho, Gyu J., Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience reports* 2015, 35 (2), e 00191.
27. The National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine [homepage na internet]. Understanding Stem Cells: An Overview of the Science and Issues; [consultado em 2018 dezembro 10] Disponível em: http://dels.nas.edu/resources/static-assets/materials-based-on-reports/booklets/Understanding_Stem_Cells.pdf.
28. Eming, S. A.; Martin, P.; Tomic-Canic, M., Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine* 2014, 6

(265), 265sr6.

29. Strong, A. L.; Neumeister, M. W.; Levi, B., Stem Cells and Tissue Engineering. *Clinics in Plastic Surgery* 2017, 44 (3), 635-650.

30. Karimineko, S.; Movassaghpour, A.; Rahimzadeh, A.; Talebi, M.; Shamsasenjan, K.; Akbarzadeh, A., Implications of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 2016, 44 (3), 749-757.

31. Ben-Ami, E.; Berrih-Aknin, S.; Miller, A., Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 2011, 10 (7), 410-415.

32. François, S.; Mouiseddine, M.; Mathieu, N.; Semont, A.; Monti, P.; Dudoignon, N.; et al. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Annals of hematology* 2007, 86 (1), 1-8.

33. Lotfinegad, P.; Shamsasenjan, k.; Movassaghpour, A.; Majidi, J.; Baradaran, B., Immunomodulatory Nature and Site Specific Affinity of Mesenchymal Stem Cells: a Hope in Cell Therapy. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2014, 4 (1), 5-13.

34. Qin, H. L.; Zhu, X. H.; Zhang, B.; Zhou, L.; Wang, W. Y., Clinical Evaluation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation After Angioplasty for Diabetic Foot. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2016, 124 (08), 497-503.

35. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F. C.; Krause, D. S.; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal

stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, 8 (4), 315-317.

36. Rodgers, K.; Jadhav, S. S., The application of mesenchymal stem cells to treat thermal and radiation burns. *Advanced drug delivery reviews* 2018, 123, 75-81.

37. Badillo, A. T.; Redden, R. A.; Zhang, L.; Doolin, E. J.; Liechty, K. W., Treatment of diabetic wounds with fetal murine mesenchymal stromal cells enhances wound closure. *Cell and tissue research* 2007, 329 (2), 301-311.

38. Caplan, A. I.; Dennis, J. E., Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry* 2006, 98 (5), 1076-1084.

39. Du, Z.; Wei, C.; Cheng, K.; Han, B.; Yan, J.; Zhang, M.; et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation. *Journal of Surgical Research* 2013, 183 (2), 907-915.

40. Selek, O.; Buluc, L.; Muezzinoglu, B.; Ergun, R. E.; Ayhan, S.; Karaoz, E., Mesenchymal stem cell application improves tendon healing via anti-apoptotic effect (Animal study). *Acta orthopaedica et traumatologica turcica* 2014, 48 (2), 187-95.

41. Torrente, D.; Avila, M. F.; Cabezas, R.; Morales, L.; Gonzalez, J.; Samudio, I.; Barreto, G. E., Paracrine factors of human mesenchymal stem cells increase wound closure and reduce reactive oxygen species production in a traumatic brain injury in vitro model. *Human & experimental toxicology* 2014, 33 (7), 673-84.

42. Sukpat, S.; Isarasena, N.; Wong-

- phoom, J.; Patumraj, S., Vasculoprotective Effects of Combined Endothelial Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells in Diabetic Wound Care: Their Potential Role in Decreasing Wound-Oxidative Stress. *BioMed research international* 2013, 2013, 8.
43. Wu, Y.; Chen, L.; Scott, P. G.; Tredget, E. E., Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. *Stem cells* 2007, 25 (10), 2648-2659.
44. Shi, Y.; Hu, G.; Su, J.; Li, W.; Chen, Q.; Shou, P.; et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Research* 2010, 20, 510.
45. Oh, J. Y.; Kim, M. K.; Shin, M. S.; Lee, H. J.; Ko, J. H.; Wee, W. R.; Lee, J. H., The Anti-Inflammatory and Anti-Angiogenic Role of Mesenchymal Stem Cells in Corneal Wound Healing Following Chemical Injury. *Stem cells* 2008, 26 (4), 1047-1055.
46. Qi, Y.; Jiang, D.; Sindrilaru, A.; Stegemann, A.; Schatz, S.; Treiber, N.; et al. TSG-6 Released from Intradermally Injected Mesenchymal Stem Cells Accelerates Wound Healing and Reduces Tissue Fibrosis in Murine Full-Thickness Skin Wounds. *Journal of Investigative Dermatology* 2014, 134 (2), 526-537.
47. Liu, S.; Jiang, L.; Li, H.; Shi, H.; Luo, H.; Zhang, Y.; et al.. Mesenchymal Stem Cells Prevent Hypertrophic Scar Formation via Inflammatory Regulation when Undergoing Apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology* 2014, 134 (10), 2648-2657.
48. O'Loughlin, A.; Kulkarni, M.; Creane, M.; Vaughan, E.; Mooney, E.; Shaw, G.; et al. Topical Administration of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Seeded in a Collagen Scaffold Augments Wound Healing and Increases Angiogenesis in the Diabetic Rabbit Ulcer. *Diabetes* 2013, 62 (7), 2588-2594.
49. Ramanauskaite, G.; Vaitkuvienė, A.; Kaseta, V.; Vitlipaite, A.; Liubaviciute, A.; Biziuleviciene, G., Bone marrow-derived lineage-negative cells accelerate skin regeneration in vivo. *Turkish Journal of Biology* 2018, 42 (3), 205-205-212.
50. Kim, J.; Hematti, P., Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology* 2009, 37 (12), 1445-1453.
51. Dazzi, F.; Marelli-Berg, F. M., Mesenchymal stem cells for graft-versus-host disease: Close encounters with T cells. *European Journal of Immunology* 2008, 38 (6), 1479-1482.
52. Siegel, G.; Schäfer, R.; Dazzi, F., The Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation* 2009, 87 (9S), S45-S49.
53. Spaggiari, G. M.; Abdelrazik, H.; Becchetti, F.; Moretta, L., MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E₂. *Blood* 2009, 113 (26), 6576.
54. Gu, C.; Huang, S.; Gao, D.; Wu, Y.; Li, J.; Ma, K.; et al. Angiogenic Effect of Mesenchymal Stem Cells as a Therapeutic Target for Enhancing Diabetic Wound Healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* 2014, 13 (2), 88-93.
55. Vojtassák, J.; Danisovic, L. u.; Kubes, M.; Bakos, D.; Jarábek, L. u.; Ulicná,

- M.; Blasko, M., Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot. *Neuro Endocrinol Lett* 2006, 27 Suppl 2, 134-137.
56. Wu, X. B.; Tao, R., Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* 2012, 11 (4), 360-71.
57. Pendleton, C.; Li, Q.; Chesler, D. A.; Yuan, K.; Guerrero-Cazares, H.; Quinones-Hinojosa, A., Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue vs Bone Marrow: In Vitro Comparison of Their Tropism towards Gliomas. *PLoS one* 2013, 8 (3), e58198.
58. Ghieh, F.; Jurjus, R.; Ibrahim, A.; Geagea, A. G.; Daouk, H.; El Baba, B.; et al. The Use of Stem Cells in Burn Wound Healing: A Review. *BioMed research international* 2015, 2015, 9.
59. Falanga, V.; Iwamoto, S.; Chartier, M.; Yufit, T.; Butmarc, J.; Kouttab, N.; et al. Autologous Bone Marrow-Derived Cultured Mesenchymal Stem Cells Delivered in a Fibrin Spray Accelerate Healing in Murine and Human Cutaneous Wounds. *Tissue Engineering* 2007, 13 (6), 1299-1312.
60. Bonab, M. M.; Alimoghaddam, K.; Talebian, F.; Ghaffari, S. H.; Ghavamzadeh, A.; Nikbin, B., Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC cell biology* 2006, 7 (1), 14.
61. Røslund, G. V.; Svendsen, A.; Torsvik, A.; Sobala, E.; McCormack, E.; Immervoll, H.; et al. Long-term Cultures of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Frequently Undergo Spontaneous Malignant Transformation. *Cancer research* 2009, 69 (13), 5331.
62. Chen, G.; Yue, A.; Ruan, Z.; Yin, Y.; Wang, R.; Ren, Y.; Zhu, L., Monitoring the biology stability of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells during long-term culture in serum-free medium. *Cell and tissue banking* 2014, 15 (4), 513-521.
63. Sensebe, L., Clinical grade production of mesenchymal stem cells. *Bio-medical materials and engineering* 2008, 18 (1 Suppl), S3-10.
64. Duscher, D.; Rennert, R. C.; Januszyn, M.; Anghel, E.; Maan, Z. N.; Whittam, A. J.; et al. Aging disrupts cell subpopulation dynamics and diminishes the function of mesenchymal stem cells. *Scientific reports* 2014, 4, 7144.
65. Bustos, M. L.; Huleihel, L.; Kapetanaki, M. G.; Lino-Cardenas, C. L.; Mroz, L.; Ellis, B. M.; et al. Aging Mesenchymal Stem Cells Fail to Protect Because of Impaired Migration and Anti-inflammatory Response. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2014, 189 (7), 787-798.
66. Robins, E. V., Burn Shock. *Critical Care Nursing Clinics of North America* 1990, 2 (2), 299-307.
67. Rowan, M. P.; Cancio, L. C.; Elster, E. A.; Burmeister, D. M.; Rose, L. F.; Natesan, S.; et al. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Critical Care* 2015, 19 (1), 243.
68. Robson, M. C., Burn Sepsis. *Critical Care Clinics* 1988, 4 (2), 281-298.
69. Portas, M.; Coppola, A.; De Lellis, M. C.; Giongrande, J. C.; Drago, H.; Di Giorgio, M.; et al. In *Development of a specialized service for patients undergoing Cutaneous Radiation Syndrome* (3040), 9 Regional congress of IRPA on radiological and nuclear safety, Brazil, Brazil, 2013.
70. Griffin, R. J., *International Journal*

of Radiation Oncology • Biology • Physics 2006, 66 (2), 627.

71. Riccobono, D.; Agay, D.; Scherthan, H.; Forcheron, F.; Vivier, M.; Ballester, B.; *et al.* Application of Adipocyte-Derived Stem Cells in Treatment of Cutaneous Radiation Syndrome. *Health Physics* 2012, 103 (2), 120-126.

72. Ryan, J. L., Ionizing Radiation: The Good, the Bad, and the Ugly. *Journal of Investigative Dermatology* 2012, 132 (3, Part 2), 985-993.

73. Su, Y.; Meador, J. A.; Geard, C. R.; Balajee, A. S., Analysis of ionizing radiation-induced DNA damage and repair in three-dimensional human skin model system. *Experimental Dermatology* 2010, 19 (8), e16-e22.

74. Agay, D.; Scherthan, H.; Forcheron, F.; Grenier, N.; Hérodin, F.; Meineke, V.; Drouet, M., Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: Development of a new minipig model. *Experimental Hematology* 2010, 38 (10), 945-956.

75. Bray, F. N.; Simmons, B. J.; Wolfson, A. H.; Nouri, K., Acute and Chronic Cutaneous Reactions to Ionizing Radiation Therapy. *Dermatology and Therapy* 2016, 6 (2), 185-206.

76. Revel, T. d.; Gourmelon, P.; Vidal, D.; Renaudeau, C., *Menace terroriste approche médicale: Nucléaire Radiologique Biologique Chimique*. 2005.

77. Haubner, F.; Ohmann, E.; Pohl, F.; Strutz, J.; Gassner, H. G., Wound healing after radiation therapy: Review of the literature. *Radiation Oncology* 2012, 7 (1), 162.

78. Lataillade, J. J.; Doucet, C.; Bey, E.; Carsin, H.; Huet, C.; Clairand, I;

Bottollier-Depois, J. F.; *et al.* New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regenerative medicine* 2007, 2 (5), 785-794.

79. Eaton, E. B.; Varney, T. R., Mesenchymal stem cell therapy for acute radiation syndrome: innovative medical approaches in military medicine. *Military Medical Research* 2015, 2 (1), 2.

80. Mansilla, E.; Marín, G. H.; Drago, H.; Sturla, F.; Salas, E.; Gardiner, C.; *et al.* Bloodstream Cells Phenotypically Identical to Human Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells Circulate in Large Amounts Under the Influence of Acute Large Skin Damage: New Evidence for Their Use in Regenerative Medicine. *Transplantation proceedings* 2006, 38 (3), 967-969.

81. Yagi, H.; Soto-Gutierrez, A.; Kitagawa, Y.; Tilles, A. W.; Tompkins, R. G.; Yarmush, M. L., Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Attenuate Organ Injury Induced by LPS and Burn. *Cell Transplantation* 2010, 19 (6-7), 823-830.

82. Shumakov, V. I.; Onishchenko, N. A.; Rasulov, M. F.; Krasheninnikov, M. E.; Zaidenov, V. A., Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells More Effectively Stimulate Regeneration of Deep Burn Wounds than Embryonic Fibroblasts. *Bulletin of experimental biology and medicine* 2003, 136 (2), 192-195.

83. Oksuz, S.; Ulkur, E.; Oncul, O.; Kose, G. T.; Kucukodaci, Z.; Urhan, M., The effect of subcutaneous mesenchymal stem cell injection on stasis zone and apoptosis in an experimental burn model. *Plastic and reconstructive surgery*

2013, 131 (3), 463-71.

84. Zhang, J.; La, X.; Fan, L.; Li, P.; Yu, Y.; Huang, Y.; et al. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cell transplantation in rat burn models. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2015, 8 (5), 5129-5136.

85. Caliari-Oliveira, C.; Yaochite, J. N. U.; Ramalho, L. N. Z.; Palma, P. V. B.; Carlos, D.; De Queiróz Cunha, F.; et al. Xenogeneic Mesenchymal Stromal Cells Improve Wound Healing and Modulate the Immune Response in an Extensive Burn Model. *Cell Transplantation* 2016, 25 (2), 201-215.

86. Liu, L.; Yu, Y.; Hou, Y.; Chai, J.; Duan, H.; Chu, W.; et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Transplantation Promotes Cutaneous Wound Healing of Severe Burned Rats. *PLoS one* 2014, 9 (2), e88348.

87. Jin, I. G.; Kim, J. H.; Wu, H.-G.; Hwang, S. J., Effect of mesenchymal stem cells and platelet-derived growth factor on the healing of radiation induced ulcer in rats. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2016, 13 (1), 78-90.

88. Horton, J. A.; Hudak, K. E.; Chung, E. J.; White, A. O.; Scroggins, B. T.; Burke, J. F.; Citrin, D. E., Mesenchymal stem cells inhibit cutaneous radiation-induced fibrosis by suppressing chronic inflammation. *Stem cells* 2013, 31 (10), 2231-2241.

89. Portas, M.; Mansilla, E.; Drago, H.; Dubner, D.; Radl, A.; Coppola, A.; Di Giorgio, M., Use of Human Cadaveric Mesenchymal Stem Cells for Cell Therapy of a Chronic Radiation-Induced Skin Lesion: A Case Report. *Radiation Protection Dosimetry* 2016, 171 (1), 99-106.

90. Lopes, L.; Setia, O.; Aurshina, A.;

Liu, S.; Hu, H.; Isaji, T.; et al. Stem cell therapy for diabetic foot ulcers: a review of preclinical and clinical research. *Stem cell research & therapy* 2018, 9 (1), 188.

91. Lu, D.; Chen, B.; Liang, Z.; Deng, W.; Jiang, Y.; Li, S.; et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: A double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2011, 92 (1), 26-36.

92. Trehan, S.; Michniak-Kohn, B.; Beri, K., Plant stem cells in cosmetics: current trends and future directions. *Future Science OA* 2017, 3 (4), FSO226.

93. Su, Y. H.; Zhang, X. S., Chapter Two - The Hormonal Control of Regeneration in Plants. In *Current Topics in Developmental Biology*, Galliot, B., Ed. Academic Press: 2014; Vol. 108, pp 35-69.

94. Fehér, A., Somatic embryogenesis — Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 2015, 1849 (4), 385-402.

95. Watson, J. M.; Riha, K., Comparative biology of telomeres: Where plants stand. *FEBS Letters* 2010, 584 (17), 3752-3759.

96. Barbulova, A.; Apone, F.; Colucci, G., Plant Cell Cultures as Source of Cosmetic Active Ingredients. *Cosmetics* 2014, 1 (2), 94-104.

97. Georgiev, V.; Slavov, A.; Vasileva, I.; Pavlov, A., Plant cell culture as emerging technology for production of active cosmetic ingredients. *Engineering in Life Sciences* 2018, 18 (11), 779-798.

98. PhytoCellTec [homepage na inter-

net]. PhytoCellTec™ Malus Domestica [consultado em 2018 dezembro 10]; Disponível em: <https://www.phytocelltec.ch/en/what-is-phytocelltec>.

99. Mibelle Biochemistry [homepage na internet]. PhytoCellTec™ Malus Domestica - Plant stem cells for skin stem cell protection Biochemistry, [consultado em 2018 dezembro 10]; Disponível em: <https://mibellebiochemistry.com/phytocelltectm-malus-domestica>.

100. Schürch, C., Potential of plant cells in culture for cosmetic application. *Phytochemistry reviews* 2008, v. 7 (no. 3), pp. 599-605-2008 v.7 no.3.

101. Schmid, D.; Schürch, C.; Blum, P.; Belser, E.; Züllli, F., *Plant stem cell extract for longevity of skin and hair*. 2008; Vol. 134, p 29-35.

102. Tito, A.; Carola, A.; Bimonte, M.; Barbulova, A.; Arciello, S.; de Laurentiis, F.; et al. A tomato stem cell extract, containing antioxidant compounds and

metal chelating factors, protects skin cells from heavy metal-induced damages. *International journal of cosmetic science* 2011, 33 (6), 543-52.

103. Apone, F.; Tito, A.; Carola, A.; Arciello, S.; Tortora, A.; Filippini, L.; et al. A mixture of peptides and sugars derived from plant cell walls increases plant defense responses to stress and attenuates ageing-associated molecular changes in cultured skin cells. *Journal of biotechnology* 2010, 145 (4), 367-76.

104. Centerchem [homepage na internet]. Citrustem™, [consultado em 2018 outubro 10]; Disponível em: <https://www.centerchem.com/Products/citrustem/>.

105. Naolys - nature expanded, Refine Ginger - Restores skin texture [homepage na internet]. Refine Ginger Restores Skin Texture, [consultado em 2018 outubro 17]; Disponível em: http://www.naolys.com/product_refine_ginger_en.php.