

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

**Células-tronco mesenquimais em modelo de pele humana
reconstruída *in vitro*: aplicabilidade na engenharia tecidual**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia

**São Paulo
2022**

JENIFFER FARIAS DOS SANTOS

**Células-tronco mesenquimais em modelo de pele humana
reconstruída *in vitro*: aplicabilidade na engenharia tecidual**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador(a): Profa. Dra. Viviane Abreu
Nunes

**São Paulo
2022**

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente:

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Dedicatória

*Ao meu pai, Matias Santos, que sempre
acreditou em meu potencial e incentivou minha
vida acadêmica.*

*Ao meu marido, Eliomar Fiuza, por todo
companheirismo, paciência e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me guiado, me dado forças para enfrentar todos os desafios, e por sempre estar ao meu lado.

À Prof^a Dr^a Viviane Abreu Nunes por tudo e por tanto. A pessoa que me ensinou a manusear as pipetas, e a filosofar sobre as células e sobre a vida. Aprendi tanto com ela, que essa tese seria apenas um pequeno capítulo da nossa história. Vivi é minha fonte de inspiração, sinônimo de dedicação, inteligência, competência, alegria e cumplicidade. Em meus momentos de angústia, sempre esteve ao meu lado, acreditando em meu potencial. Quero te agradecer por todas palavras de incentivo, e por me ensinar com tanto carinho e zelo. Por me acolher, e por acreditar nesse projeto. Que outros alunos possam ter a mesma sorte que eu tive ao ter uma orientação como a sua. Serei eternamente grata por tudo, e um dia espero te deixar tão orgulhosa, como o orgulho que sinto em tê-la como minha orientadora.

Ao Prof. Felipe Chambergo por ter me apresentado a vida científica e por me acolher como filha. Obrigada por toda dedicação, ensinamentos, inúmeras assinaturas em ofícios, e por todo incentivo. Ao meu padrinho científico, todo meu agradecimento e carinho.

Aos meus pais, Eunice Farias e Matias Santos, por serem meu porto seguro e fortaleza. Por me incentivarem e não medirem esforços para ver meu sonho se realizar. Obrigada por tudo. Amo vocês!

Ao meu marido, Eliomar Fiuza, que acompanhou minha trajetória científica desde meu ingresso à USP. Obrigada por sempre me ouvir e se interessar pelo mundo da biologia celular e molecular. Poder conversar contigo sobre todos os assuntos possíveis foi, e é, um dos maiores motivos para eu me apaixonar por você todos os dias. Obrigada pelo carinho e amor, e por ser meu ombro amigo. Obrigada por sonhar meus sonhos, que agora são nossos. Te amo para sempre.

À Profª Drª Silvy Stuchi Maria-Engler, por todo conhecimento e acolhimento durante minha tese. Obrigada por ensinar o modelo de pele 3D da Universidade de São Paulo, e por disponibilizar seu tempo para discussões tão enriquecedoras à minha vida acadêmica. Sem a senhora, seria quase impossível a realização deste trabalho.

Agradeço também à Silvia Romano, por me ensinar o passo-a-passo da pele 3D, e por evidenciar que os mínimos detalhes fazem toda a diferença. Ao grupo do Laboratório de Citopatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, em especial às meninas Larissa Carvalho, Cláudia Larissa, Julia Bagatin, meu muito obrigada.

À Profª Drª Maria de Fátima Raposo e ao Prof. Paulo Ribeiro, por me acolherem no doutorado sanduíche, pelos aprendizados, carinho, e por fazerem de Portugal meu segundo lar.

Ao Prof. Jorge Carvalho Silva por me ensinar sobre *electrospinning*, resazurina, MEV e FITR, por me inspirar como professor e por ser minha referência em engenharia tecidual.

Ao Prof. Luismar Marques Porto, por aceitar minha proposta de doutorado sanduíche empresarial, e por fazer discussões tão pertinentes com nossos resultados, sempre com muito zelo e boa energia.

À Drª. Fernanda Vieira Berti, pela orientação, dedicação, acolhimento e aprendizado. Obrigada por me apresentar cantinhos tão lindos em Florianópolis, e por me fazer ficar apaixonada pela natureza e pela vida. Nossos momentos de convívio valeram por muitos anos e sinto que, ainda, tenho muito a aprender e conviver contigo.

Ao professor Alexandre Bruni-Cardoso e seus alunos, em especial ao Antônio, por toda a ajuda com as imunofluorescências. Obrigada a técnica Célia por todo apoio.

Aos meus queridos amigos e amigas do laboratório, em especial a Brisa, Bruna, Vandy, Sammy Pacco, Myrian, Gustavo, Willian, Victória, Nathália Ruder e Rafael, por tornarem meus dias no trabalho tão felizes e cheios de café.

Aos meus amigos portugueses, Filipa Pires, Ana, Pipa, Inês, Gonçalo, Diana Querido, Bruno Guerreiro, Daniela Fernandes, Lúgia, Roberto, e a minha amiga brasileira que conheci em Portugal, Mariana Rossi, por tanto carinho e momentos inesquecíveis.

À Janaina de Andrea Dernowsek, por me ensinar não somente sobre biomanufatura aditiva, mas também em como acreditar e batalhar por um sonho.

Aos meus amigos Quantis, Daniela Tiepo, Laura Rebouças, Williane Siqueira e Diego Rodney, por me ensinarem o que é um trabalho em equipe de excelência. Pelas risadas e momentos de alegria.

À Carla Mergel, por sempre lembrar do nosso laboratório nas doações do Butantan, e pelas nossas conversas tão confortantes.

Agradeço à Denisse Camarena, por me ensinar a fazer os cortes histológicos.

Agradeço à Helena Malerba, por me ensinar a utilizar o criostato.

Agradeço ao técnico Walter Turato, pelo apoio nos PCR *Arrays*.

A todos os funcionários da EACH-USP, em especial ao Clarino Vieira, por cuidar do nosso laboratório.

Ao meu irmão Diego e cunhada Tatiane, por sempre estarem ao meu lado. Aos meus sobrinhos, Leonardo e Isabella, por serem minha fonte de felicidade.

À minha melhor amiga e irmã Sarah Ingrid Farias por me oferecer a melhor companhia e ombro amigo que eu poderia ter.

À minha amiga Érika por sua lealdade e carinho.

À minha família Farias e Santos por todo amor, e aos meus avós por sempre orarem à Deus por mim.

Aos meus sogros pelo cuidado e carinho.

Aos meus amigos que chegaram e se foram. Por me fazerem entender que a vida é feita de ciclos, mas que as lembranças boas sempre devem permanecer.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro.

À Universidade de São Paulo e Universidade Nova de Lisboa pela oportunidade de realização do doutorado e pela infraestrutura.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação interunidades em Biotecnologia da USP, Fábria e Eliane, e à secretária da Faculdade de Ciência e Tecnologia da UNL, Ana Cruz, pela ajuda e instruções.

Às pessoas que aqui não estão citadas, mas que me apoiaram e ajudaram na realização deste trabalho, mesmo que indiretamente, meus sinceros agradecimentos.

Nenhuma conquista tem significado pleno, se não for partilhada com as pessoas que nos ajudaram durante o caminho (Chiara Lubich)

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, que financiou a bolsa de doutorado regular N.41050/2019-5; e de doutorado sanduíche empresarial N.302030/2020-4.

O doutorado sanduíche foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Processo N. 88887.152230/2017-00.

O projeto de pesquisa teve financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo N. 2019/11963-0.

“Lembre-se de Deus em tudo o que fizer e Ele lhe mostrará o caminho certo”

(Pv 3:6)

“Bem-aventurado o homem que encontra sabedoria e adquire conhecimento”

(Pv. 3:13)

RESUMO

SANTOS, J. F. **Células-tronco mesenquimais em modelo de pele humana reconstruída in vitro**: aplicabilidade na engenharia tecidual. 2022. 146f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A epiderme, camada mais superficial da pele, é composta por queratinócitos, que proliferam na camada basal e, à medida que são impelidos para as camadas mais superficiais, se diferenciam e expressam proteínas estrato-específicas. Em caso de traumas na pele, a homeostase epidérmica é afetada, sendo necessárias abordagens clínicas para seu restabelecimento. A engenharia tecidual é uma importante estratégia para a regeneração da pele, sendo o uso de células-tronco mesenquimais (CTM) do cordão umbilical, interessante na terapia celular. Esse projeto avaliou o potencial de transdiferenciação das CTM do cordão umbilical em queratinócitos em modelos tridimensionais (3D) de pele *in vitro*, utilizando os equivalentes dérmicos: i) colágeno tipo I e fibroblastos dérmicos, ii) matriz descelularizada, iii) *scaffold* comercial, iv) tela absorvível comercial. Foi investigada a expressão das proteínas epidermais CQ5, CQ10, involucrina e filagrina, por imunofluorescência e PCR em tempo real, além da atividade das KLK na hidrólise de substratos fluorogênicos. Também foram investigados, por PCR *Array*, genes envolvidos na cicatrização, expressos em modelos de pele 3D com CTM, além de sua modulação no caso de ferida na pele. Os resultados, apesar de não indicarem uma epiderme tipicamente estratificada, mostraram expressão dos marcadores CQ5, CQ10, involucrina e filagrina, bem como o aumento da atividade de KLK nos equivalentes epidérmicos constituídos de CTM, em todos substitutos dérmicos usados, indicando comprometimento das CTM induzidas com a transdiferenciação epidermal. A análise dos genes colágeno I, III, XIV, além de IGF-1 e TGF- β 3, expressos por CTM em modelos de pele 3D sugere seu envolvimento na fase de remodelamento do processo cicatricial. Os modelos propostos, tanto para investigar a transdiferenciação epidermal das CTM, como seu envolvimento no processo de cicatrização, indicam sua aplicabilidade para uso na pesquisa com vistas ao seu aprimoramento e exploração em estratégias de medicina regenerativa.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais (CTM), modelo de pele 3D, substitutos dérmicos, biomateriais, cicatrização.

ABSTRACT

SANTOS, J. F. **Mesenchymal stem cells in an in vitro reconstructed human skin model**: applicability in tissue engineering. 2022. 146f. Thesis (Doctorate in Biotechnology) – Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2022.

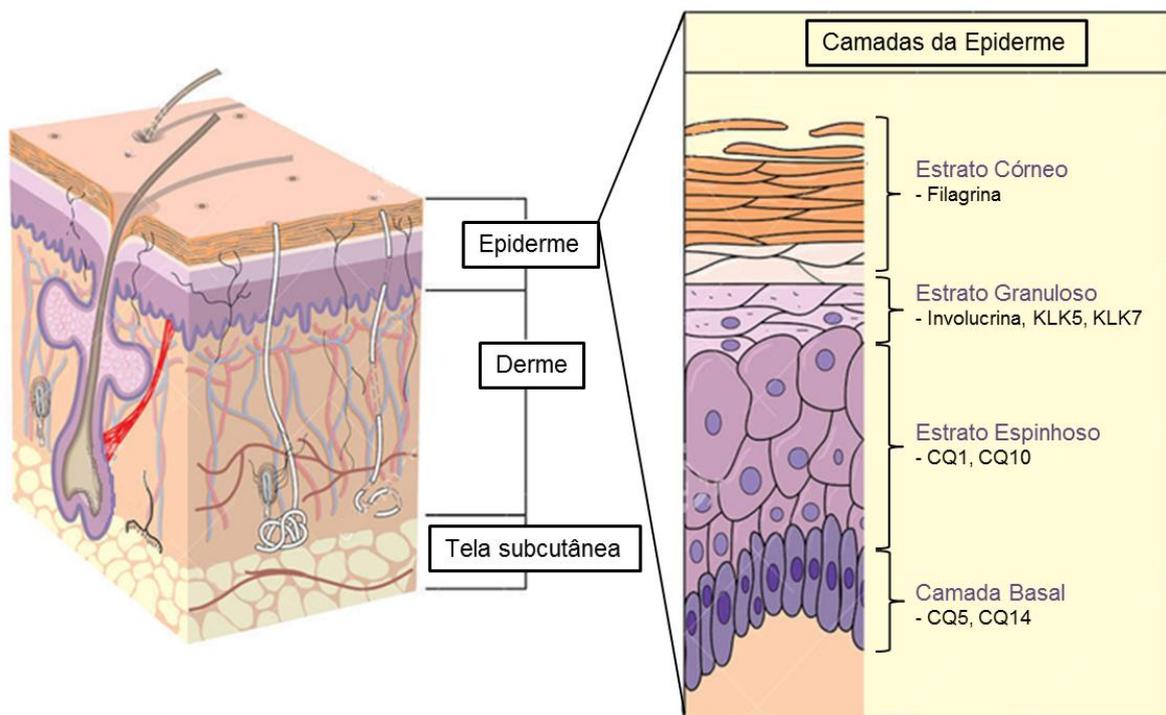
The epidermis, the most superficial layer of the skin, is composed of keratinocytes, which proliferate in the basal layer and, as they are pushed to the more superficial layers, differentiate and express stratum-specific proteins. In case of skin trauma, epidermal homeostasis is affected, requiring clinical approaches to restore it. Tissue engineering is an important strategy for skin regeneration, and the use of mesenchymal stem cells (MSC) from the umbilical cord is interesting in cell therapy. This project evaluated the transdifferentiation potential of umbilical cord MSCs into keratinocytes in three-dimensional (3D) skin models in vitro, using the dermal equivalents: i) type I collagen and dermal fibroblasts, ii) decellularized matrix, iii) commercial scaffold, iv) commercial absorbable mesh. The expression of epidermal proteins cytokeratin 5, 14 and 10, involucrin and filaggrin was investigated by immunofluorescence and/or real-time PCR, in addition to the activity of KLK in the hydrolysis of fluorogenic substrates. Genes involved in healing, expressed in 3D skin models with MSC, were also investigated by array PCR, in addition to their modulation in the skin wounds cases. The results, despite not indicating a typically stratified epidermis, showed expression of epidermal markers CK5, CK14, CK10, involucrin and filaggrin, as well as increased KLK activity in the epidermal equivalents made up of MSC, in all dermal substitutes used, indicating impairment of induced MSC with epidermal transdifferentiation. The analysis of collagen I, III, XIV genes, in addition to IGF-1 and TGF- β 3, expressed by MSC in 3D skin models, suggests their involvement in the remodeling phase of the healing process. The proposed models, both to investigate the epidermal transdifferentiation of MSC, and their involvement in the healing process, indicate their applicability for use in research with a view to their improvement and exploration in regenerative medicine strategies.

Keywords: mesenchymal stem cells (MSC), 3D skin model, dermal substitutes, biomaterials, wound healing.

1. INTRODUÇÃO

A pele é o manto de revestimento do organismo, indispensável à vida, e forma uma interface de autorrenovação e auto-reparação entre o organismo e o ambiente, protegendo-o contra danos mecânicos, químicos, osmóticos e térmicos, além de fornecer uma barreira eficaz contra a invasão microbiana (DAȔBROWSKA; MIELCAREK; NOWAK, 2018). Ela é constituída essencialmente, por três camadas: epiderme, derme e tela subcutânea (**Figura 1**).

Figura 1 - Camadas da pele. A pele é constituída, essencialmente, por três camadas: 1) Epiderme – camada externa que está em contato direto com o ambiente; 2) Derme – camada interna; 3) Tela subcutânea – camada que está sob a derme.



Fonte: Adaptado de <http://www.mayoclinic.org/basic-skin-layers/img-20006377>.

A epiderme é a camada externa que está em contato direto com o meio ambiente. Ela é formada por um arranjo ordenado de células denominadas queratinócitos, que se dispõem em estratos ou camadas, as quais, de dentro para fora, recebem os nomes de germinativa ou basal, espinhosa, granulosa e córnea (TEZUKA; TAKAHASHI; KATSUNUMA, 1992).

Na camada basal, os queratinócitos proliferam continuamente enquanto não iniciam o processo de diferenciação. Ao iniciarem o processo de diferenciação terminal, essas células passam por mudanças morfológicas e bioquímicas à medida que são impelidas, sucessivamente, para as camadas mais superficiais pela produção de novas células (ECKERT; CRISH; ROBINSON, 1997).

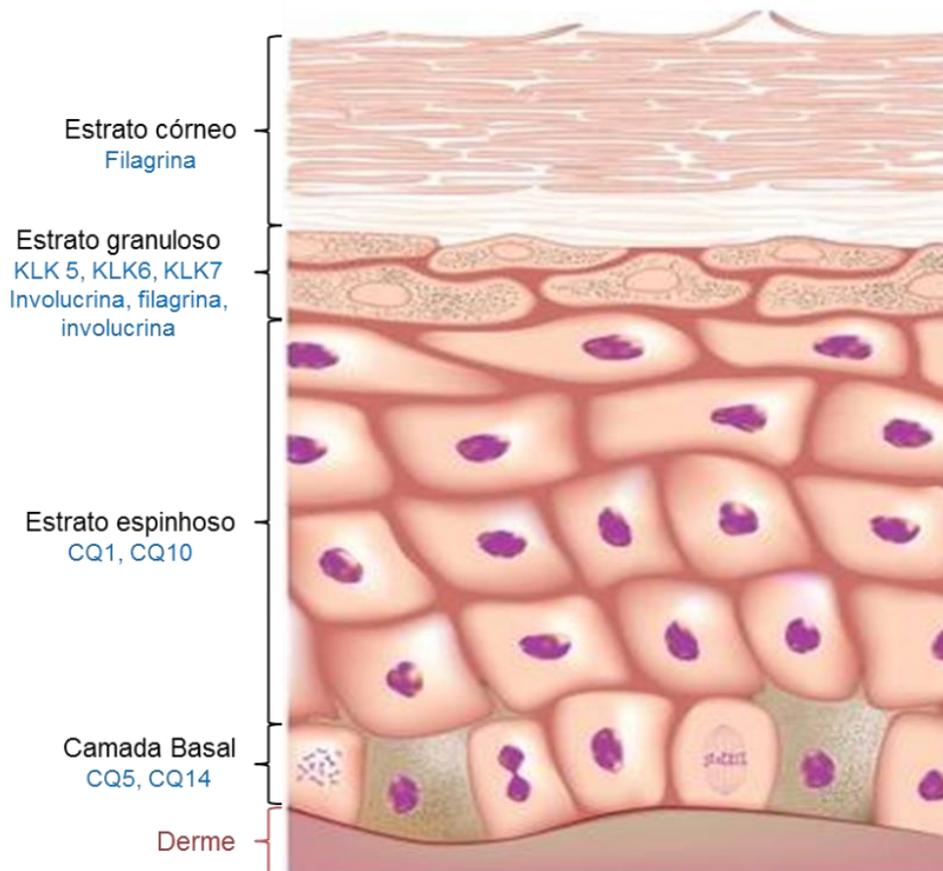
Ao deixarem a camada basal, as células passam a se conectar por estruturas de adesão chamadas de desmossomos, que conferem resistência mecânica à pele e dão um aspecto espinhoso à região, formando a camada espinhosa. Acima dessa camada está a camada granulosa, na qual os queratinócitos possuem formato retangular com citoplasma contendo grânulos de querato-hialina, precursores da queratina que irão compor a camada córnea. Estima-se que a epiderme humana se renove de 15 a 30 dias (KOSTER; ROOP, 2007).

Durante a diferenciação terminal, os queratinócitos expressam diferentes tipos de proteínas, dentre elas, a involucrina, a filagrina e as citoqueratinas (CQ) (RAWLINGS et al., 1994). As CQ apresentam distribuição específica para cada estrato da epiderme, o que permite serem utilizadas como marcadores de diferenciação (POLAKOWSKA; HERTING, GOLDSMITH, 1991; HUANG et al., 2016). Enquanto as CQ5 e CQ14 são expressas na camada basal, as CQ1 e CQ10 aparecem na camada espinhosa (**Figura 2**), o que indica o início do processo de diferenciação (POLAKOWSKA, HERTING, GOLDSMITH et al., 1991; CANDI et al., 2002; MASRI et al., 2022). As maiores mudanças ocorrem durante a transição das células da camada granulosa para a córnea.

A camada córnea é composta por células totalmente diferenciadas, os corneócitos, em que a ação combinada de diferentes enzimas resulta na perda do núcleo e de outras organelas, restando apenas uma rede complexa de proteínas e lipídeos. Embora os eventos moleculares envolvidos na perda do núcleo e nas alterações morfológicas observadas nos queratinócitos ainda não sejam completamente compreendidos, sabe-se que há uma intensa atividade proteolítica nesse processo (SANTOS et al., 2019).

A involucrina é a mais comum, se não obrigatória, proteína do envelope cornificado. Ela possui vários resíduos de glutamina (Q) que participam na formação de ligações isopeptídicas covalentes (RICE; GREEN, 1979). Sua expressão se dá no início do estrato espinhoso e se mantém até o granuloso.

Figura 2 - Estrutura da epiderme. A epiderme é constituída por quatro estratos: basal, espinhoso, granuloso e córneo. No estrato basal, são expressas as CQ5 e CQ14, enquanto que no estrato espinhoso, encontram-se as CQ1 e CQ10. No estrato granuloso, as células apresentam grânulos queratoialinos que contém filagrina, involucrina e loricrina, além da expressão das caliceínas KLK5, KLK6 e KLK7. O estrato córneo representa a primeira linha de barreira da pele, sendo constituído por células anucleadas chamadas de corneócitos. Nesse estrato, verifica-se a presença de filagrina.



Fonte: Adaptado de https://www.123rf.com/photo_17432855_epidermis-of-the-skin.html

Além da involucrina, a filagrina também é muito importante no processo de diferenciação terminal das células, pois está diretamente envolvida na integridade da barreira cutânea. Monômeros de filagrina participam na organização das lamelas que formarão a camada córnea, de modo que fiquem paralelamente compactadas e auxiliem na manutenção da homeostase da pele (CARDILI et al., 2013).

Além dessas proteínas, nas camadas mais superficiais da epiderme, há uma família de enzimas que compreende as caliceínas teciduais (KLK), as quais estão envolvidas na descamação da pele. As caliceínas mais ativas na pele são a KLK7

ou SCCE (do Inglês, Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme) e a KLK5 ou SCTE (do Inglês, Stratum Corneum Tryptic Enzyme) (BRATTSAND et al., 2005; KOMATSU et al., 2005; KOMATSU et al., 2007), e são responsáveis por clivar as proteínas que compõem os corneodesmosomos (SIMON et al., 2001; CAUBET et al., 2004; NAUROY; NYSTRÖM, 2019).

A expressão de KLK5 e KLK7 está restrita à camada granulosa da epiderme saudável. Essas enzimas são encontradas nos grânulos lamelares que liberam os seus conteúdos para o espaço extracelular, na interface entre os estratos granuloso e córneo. Sua expressão está associada ao processo de cornificação (ISHIDA-YAMAMOTO et al., 2004; NAUROY; NYSTRÖM., 2019).

No processo de diferenciação epidérmica, todas essas proteínas são expressas de maneira orquestrada até que ocorra a descamação das camadas mais superficiais da epiderme. Além disso, é essencial que o processo de proliferação dos queratinócitos esteja em equilíbrio com a descamação da camada córnea (HUANG et al., 2016). Contudo, em determinadas condições patológicas ou traumas da pele, como é o caso de queimaduras, a dinâmica entre os processos de proliferação e diferenciação epidérmica é afetada, podendo ocorrer perda da funcionalidade da pele. Ainda, em casos de traumas graves, nos quais as regiões mais profundas da derme são atingidas, um distúrbio no processo de cicatrização pode requerer um tempo maior para o fechamento da ferida, ou levar a cicatrizes excessivas resultando em uma pele com características diferentes da saudável (PHILIPS et al., 2016; SORG et al., 2017).

A cicatrização de feridas envolve quatro fases distintas, mas que se sobrepõem entre si, sendo elas: hemostática, inflamatória, proliferativa e remodelação tecidual. De maneira geral, na fase hemostática, as células sanguíneas impedem a perda de sangue no local da lesão, e liberam uma variedade de fatores que atraem neutrófilos para o local, iniciando a fase inflamatória. Os neutrófilos, além de outras células do sistema imune, migram para o local da lesão, protegendo-a contra a invasão de patógenos, além de auxiliar no recrutamento de células cutâneas que promoverão o reparo tecidual. Nessa fase, chamada proliferativa, ocorre produção de matriz extracelular (MEC), que contribuirá para o fechamento da ferida. Por fim, o colágeno produzido na MEC amadurece, na chamada fase de remodelamento, e o local da ferida começa a assemelhar-se à pele saudável. Todas as fases requerem a coordenação funcional entre diferentes tipos de células, sejam

elas epidérmicas, dérmicas, endoteliais e imunes, para garantir o sucesso no processo de restauração tecidual (BALBINO et al., 2005; HAN; CEILLEY, 2017).

Uma das feridas de pele mais frequente no mundo são as queimaduras. Estima-se que 180.000 mortes a cada ano sejam causadas por queimaduras e, quando não fatais, elas são uma das principais causas de morbidade que incluem hospitalização prolongada (OMS, 2018). Em 2004, quase 11 milhões de pessoas no mundo sofreram queimaduras a ponto de necessitarem de atenção médica (OMS, 2018). Entre os anos de 2008 a 2014, houve 129.858 casos de internações no Sistema Único de Saúde por queimaduras (CITRON et al., 2018). As manifestações físicas, psicológicas e psicossociais decorrentes da gravidade da queimadura podem comprometer a qualidade de vida dos pacientes no curto e longo prazo, sendo um importante problema de saúde pública (WASIAK et al., 2014; ECHEVARRÍA-GUANILO et al., 2016).

Atualmente, a engenharia de tecidos tem sido importante aliada no tratamento de queimaduras graves, tanto para incorporar substitutos de pele, como para propor adjuvantes que acelerem a reconstituição epidérmica (NOURIAN DEHKORDI et al., 2019). Em muitos casos, são usados enxertos de pele, especialmente quando as vítimas sofrem de graves lesões que causam danos permanentes à pele. Enxertos da própria vítima ou aloenxertos também são utilizados para acelerar o processo de cicatrização. No entanto, os mecanismos de cicatrização das feridas após o transplante do aloenxerto não estão bem caracterizados (BOYCE et al., 2002; CALOMENO et al., 2015), além de não serem, necessariamente, eficientes. Ainda, o uso de autoenxertos pode não ser viável em casos de pacientes muito debilitados e com extensas áreas comprometidas, limitando seu uso clínico (CHUA et al., 2016).

Adicionalmente à estratégia de transplante de pele obtidas de outros indivíduos ou do próprio paciente, queratinócitos primários têm sido utilizados em modelos *in vitro* visando seu uso na engenharia tecidual nos casos de queimaduras (COOLEN et al., 2007; ILJAS et al., 2021). Eles podem ser isolados de diversas fontes, porém, sua limitada capacidade proliferativa e de expansão *in vitro*, além de baixo rendimento no processo de isolamento no caso de células precursoras epidérmicas, aponta para a necessidade do uso de outras fontes celulares.

Nesse contexto, emergem as células-tronco, cujo potencial de autorrenovação e a capacidade de originar linhagens celulares com diferentes

funções têm impulsionado pesquisas sobre as aplicações terapêuticas dessas células (NUNES et al., 2009; NUNES et al., 2007; NUNES; ZATZ, 2006; SANTOS et al., 2019; ZATZ; NUNES; ZATZ, 2005).

Uma importante fonte de células-tronco é representada pelo cordão umbilical humano (WANG et al., 2004; SANTOS et al., 2019), formado por componentes hematopoiéticos e mesenquimais (CTM). A coleta dessas células envolve um procedimento simples, seguro e indolor, dependendo apenas do consentimento materno, o que constitui uma vantagem frente a outras fontes de células-tronco adultas. Especificamente, as células-tronco do cordão são imunologicamente mais imaturas do que de outras fontes, ocasionando, por exemplo, menor frequência de doença do enxerto contra hospedeiro, principal complicação pós-transplante de medula entre não-aparentados idênticos ou parcialmente idênticos (GLUCKMAN; ROCHA, 2004; MARTIN-PIEDRA et al., 2019).

Estudos envolvendo a exploração das potencialidades de CTM do cordão umbilical mostraram que essas células são capazes de se diferenciar em tipos celulares derivados dos três folhetos embrionários, ou seja, endoderma, mesoderma e ectoderma (NUNES et al., 2007; SANTOS et al., 2019; STEFAŃSKA et al., 2020).

O transplante de células-tronco para o tratamento de doenças tem-se mostrado bem sucedido, pois, além de sua propriedade pouco imunogênica (LIN; HOGAN, 2011), as sinalizações e secreções parácrinas das CTM proporcionam um microambiente que estimula a regulação da inflamação, reparação e regeneração de lesões (KIM et al., 2016). Na pele, os efeitos parácrinos das CTM também têm sido associados à melhora na migração e proliferação de fibroblastos, macrófagos, queratinócitos e células endoteliais, além de promover a angiogênese em feridas (RUSTAD et al., 2012).

Em relação à transdiferenciação das CTM em células da pele, em 2013, Bishai et al. (2013) Demonstraram que as CTM desse tecido, quando comparadas às outras fontes disponíveis, além de apresentarem maior potencial para a transdiferenciação, de maneira geral, podem se transdiferenciar em células epidérmicas, corroborando os dados obtidos por Martin-Piedra et al. (2019), tanto *in vitro* quando *in vivo*.

Em 2015, Chen et al. Evidenciaram a transdiferenciação *in vitro* das CTM do cordão umbilical em queratinócitos, ao utilizarem biomateriais de colágeno e quitosano como suportes dérmicos. No modelo proposto, apesar de ser verificada a expressão de CQ19 e de involucrina, não fica claro, histologicamente, se ocorre estratificação da

epiderme a partir de CTM. Ainda assim, *in vivo*, esse arcabouço melhorou a regeneração de feridas, fornecendo resultados promissores para a medicina regenerativa.

Schneider et al. (2010) utilizaram CTM da geleia de Wharton do cordão umbilical tratadas com ácido ou 5-azacitidina, sobre equivalentes dérmicos constituídos por colágeno I/III e fibroblastos, como um possível modelo tridimensional (3D) de pele. Os autores observaram que, apesar de ser observada expressão de pan-citoqueratina, a transdiferenciação não foi acompanhada por mudanças morfológicas características de queratinócitos nem pela expressão de outros marcadores epidermais.

Nosso grupo já demonstrou que as CTM do cordão umbilical podem se diferenciar em queratinócitos, após cultivo bidimensional em meio contendo fator de crescimento epidermal (EGF), em um processo temporalmente similar ao que ocorre na pele humana. Durante o processo de diferenciação, verificou-se a expressão das CQ5, 10 e 14, e da involucrina, proteínas marcadoras da diferenciação epidermal, bem como a atividade enzimática das calicreínas teciduais, existentes nas camadas mais diferenciadas da epiderme (SANTOS et al., 2019).

Também já foi demonstrado que CTM derivadas da medula óssea se diferenciam em queratinócitos, tanto *in vitro* como *in vivo*, o que foi avaliado por meio da presença de diversas proteínas expressas em queratinócitos. Essas células, além da capacidade de se transdiferenciar, recrutaram outros queratinócitos por meio da sinalização de diferentes quimiocinas, auxiliando na reparação de feridas na pele (SASAKI, et al., 2008; LI et al., 2015).

Nessa mesma linha, também foi mostrado que CTM do tecido adiposo, quando co-cultivadas com queratinócitos humanos ou com meio condicionado obtido de queratinócitos, passaram a expressar marcadores de queratinócitos como involucrina, CQ5 e 10 (CHAVEZ-MUNOZ et al., 2013). Este estudo demonstrou, pela primeira vez, que as células-tronco obtidas de lipoaspirato de cirurgias possuem a capacidade de se transdiferenciar em células do tipo queratinócito (KLC – do inglês, “keratinocyte-like cells”), podendo formar uma epiderme estratificada. Outro estudo evidenciou que, após serem injetadas no tecido subcutâneo de camundongos, CTM derivadas do tecido adiposo migraram para a pele, e se diferenciaram em KLC, sugerindo que o microambiente é fundamental para o comportamento que as células adotam (LIN et al., 2013; PAGANELLI et al., 2019).

Apesar de muitos avanços no uso das CTM, mais especificamente das provenientes do cordão umbilical, para o estabelecimento de modelos 3D de epiderme, os resultados ainda são controversos ou insuficientes para reproduzirem um modelo epidérmico funcional (SCHNEIDER ET AL., 2010; CHEN et al., 2015) que garanta a função de barreira, apresente características fenotípicas de uma epiderme humana, na qual as proteínas marcadoras da diferenciação sejam expressas em uma relação temporal similar à que ocorre *in vivo*.

Para entender melhor como o microambiente pode afetar o processo de diferenciação das células epidérmicas, vários métodos têm sido utilizados, sendo um deles o modelo animal. Apesar disso, em 11 de novembro de 2015, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA – publicou no Diário Oficial da União nº 215, seção 3, resolução que obriga fabricantes de cosméticos e laboratórios farmacêuticos a empregarem métodos alternativos à utilização de animais na pesquisa. Portanto, o uso de animais na pesquisa tende a ser substituído, gradualmente, por modelos *in vitro*.

Modelos 3D *in vitro*, ao contrário, têm ganhado grande destaque na bioengenharia tecidual, pois mimetizam as características arquitetônicas, o comportamento e fenótipo celular como um tecido (LAI, CHENG; KISAALITA, 2012).

O modelo 3D de pele mais antigo, e ainda utilizado, é representado por queratinócitos co-cultivados com um equivalente dérmico constituído por colágeno e fibroblastos, em uma interface ar-líquido (IAL), a qual permite a estratificação dos queratinócitos em um processo similar ao que acontece na pele humana (PRUNIERAS; REGNIER; WOODLEY, 1983; CARLSON et al., 2008). A cultura dos queratinócitos nessa interface faz com que as células estejam expostas ao oxigênio, diferenciando-se completamente. Prunieras, Regnier e Woodley (1983) sugerem que essa exposição aumente a morfogênese epidérmica e a síntese de grânulos queratohialinos.

Recentemente, a MEC que dá o suporte à diferenciação dos queratinócitos também vem sendo mimetizada por polímeros biodegradáveis chamados *scaffolds*. Estudos demonstraram que *scaffolds* são capazes de criar um microambiente favorável à regeneração, promover a remodelação do tecido, além de atuar como um modelo que induz a reparação funcional da pele, osso, coração, pulmão, dentre outros órgãos (YI et al., 2016).

Como substitutos dérmicos, o desenvolvimento de *scaffolds* para uso clínico devem levar em consideração algumas características, como: ser aderentes, ter porosidade entre 60 e 90% para permitir passagem de nutrientes e metabólitos, apresentar diâmetro mínimo de 20 µm em seus poros para permitir a invasão de fibroblastos, exibir baixa toxicidade, permitir a evaporação de água de forma semelhante à pele, ser flexíveis, fáceis de armazenar e usar, além de ter baixo custo (GOMES, 2013).

Alguns estudos têm proposto o uso de CTM cultivadas em *scaffolds* para tratamento de doenças dermatológicas (TAM et al., 2014; STEFFENS et al., 2015; XIE et al., 2016). Tam et al. (2014), ao cultivar CTM do cordão umbilical sobre *nanoscaffolds* (*scaffolds* produzidos com fibras de 50-500 nm de diâmetro) de policaprolactona com aloe vera, mostraram que as células passaram a expressar proteínas específicas de queratinócitos, além de outras que auxiliam na cicatrização de feridas, quando submetidas à transdiferenciação. Em relação à associação do *nanoscaffold* com CTM de cordão umbilical *in vivo*, os mesmos autores mostraram os efeitos benéficos na cicatrização da pele, sugerindo seu uso em feridas de pacientes diabéticos (TAM et al., 2014).

Trabalho recente também mostrou que CTM de polpa de dente, co-cultivadas com queratinócitos humanos, aderiram sobre *scaffolds* de ácido poli-DL-láctico (PDLLA), o qual representa um biomaterial eficiente na medicina regenerativa (STEFFENS et al., 2015). Porém, as CTM de polpa de dente são de difícil isolamento e obtenção quando comparadas às do cordão umbilical.

Apesar desses resultados promissores, os tratamentos com os *scaffolds* hoje disponíveis são insuficientes para promover a recuperação dos pacientes, especialmente em casos de grandes queimaduras e feridas crônicas (MIDDELKOOP et al., 2004; STEFFENS et al., 2015).

Algumas empresas têm se dedicado à produção de *scaffolds* poliméricos que possam ser utilizados na engenharia tecidual. Uma delas é a empresa Biocelltis Biotecnologia S/A, que atua no desenvolvimento de biomateriais e produtos a um estágio em que eles possam ser licenciados para parceiros comerciais de áreas terapêuticas específicas. A empresa possui expertise na produção de biomateriais, arcabouços teciduais, neuro-engenharia e uma infinidade de plataformas de engenharia de tecidos que vão desde a produção de matrizes 3D para cultura de células tronco, embrionárias, e endoteliais, à matrizes de regeneração dérmica para

terapia celular, produzida de forma personalizada para cada paciente, fazendo uso da própria célula do paciente. Um de seus produtos mais conhecidos são as matrizes 3D CellFate®, biomateriais compostos por nanofibras poliméricas naturais de 50 a 100 nm de diâmetro, biocompatíveis, estéreis, prontas para uso, ideais para cultivar células humanas e animais em laboratório (BIOCELLTIS).

Outra empresa especializada na produção de insumos para cultura 3D é a TissueLabs. Ela desenvolve e comercializa insumos, equipamentos e serviços na área de fabricação de órgãos e tecidos em laboratório. Em seu portfólio são comercializados hidrogéis chamados MatriXpec™ que oferecem microambientes específicos do tecido que se quer estudar. No caso da pele, o MatriXpec™ disponível é originário de matriz descelularizada de pele porcina, e contém componentes que mimetizam a MEC da pele fisiológica (TISSUELABS).

Atualmente, na área clínica e cirúrgica, já são utilizadas telas poliméricas como equivalentes dérmicos e/ou curativos para o tratamento de feridas e queimaduras de pele (SHAHROKHI; ARNO; JESCHKE, 2014; CORRÊA, 2018). Elas podem ser constituídas por materiais biológicos, como o Integra® ou Matriderm®, ou sintéticos como Dermagraft® e Transcyte®. Esses materiais são formulados para mimetizar as propriedades essenciais da MEC, sendo que seu sucesso na medicina regenerativa depende das suas características fundamentais, químicas e físicas, entre as quais se destacam: arquitetura tridimensional, forma e resistência mecânica compatível à derme, estrutura porosa que permita boa ancoragem, proliferação e migração celular, composição química que minimize a resposta inflamatória e imunológica, além da taxa de degradação controlada que permita a substituição gradual e ordenada do suporte pelo tecido biológico funcional (GOMES et al., 2013;).

De maneira geral, as matrizes são confeccionadas para terem diâmetros de poros entre 20 a 125 µm, que permitam a infiltração de fibroblastos e células endoteliais na ferida. No processo de regeneração da pele, essa matriz é, gradualmente, reabsorvida na medida em que a derme é regenerada e vascularizada (CORRÊA, 2018).

Adicionalmente, essas telas podem ser cultivadas com células como os queratinócitos e fibroblastos autólogos, alógenos ou neonatais (FERREIRA et al., 2011; VAN ZUIJLEN et al., 2015). O uso combinado dos fibroblastos e queratinócitos

nesses substitutos dérmicos cria um modelo vivo de pele, na qual a presença e a produção de citocinas e fatores de crescimento por essas células (ZAULYANOV; KIRSNER, 2007) melhoram a regeneração dérmica e epidérmica, reduzindo a contração da ferida, acelerando a cicatrização e diminuindo a fibrose no local (COULOMB; LEBRETON; DUBERTRET, 1989; LAMME et al., 2000; PHAM et al., 2007; BALLESTEROS-CILLERO et al., 2019). Porém, a obtenção de células autólogas pode ser inviável no caso de pacientes muito debilitados, enquanto células alógenas são, geralmente, rejeitadas, não sendo utilizadas em casos de substituição permanente da pele (HULTMAN et al., 1996).

Nesse sentido, o cultivo de CTM sobre as telas poliméricas tende a ser promissor devido ao seu potencial de diferenciação epidérmica similar ao processo fisiológico em humanos (SANTOS et al., 2019), além das suas características de baixa imunogenicidade, propriedades imunomodulatórias e proliferativas. Assim, considera-se que o uso dessas células possa melhorar a regeneração da pele, diminuindo a resposta inflamatória e a possibilidade de rejeição no caso de transplantes.

Embora os estudos realizados contribuam para perspectivas do uso das CTM na medicina regenerativa na área dermatológica (HENG et al., 2005; KAMOLZ et al., 2006; TOAI ET AL., 2011), os mecanismos moleculares e as vias de sinalização que regulam a diferenciação das CTM em queratinócitos *in vivo* ainda não estão esclarecidos. Além disso, o comportamento das CTM em modelos de pele 3D *in vitro* ainda é um campo com literatura escassa, apesar de sua importância na engenharia tecidual.

Assim, de modo geral, este projeto é dividido em três vertentes: a primeira aborda a utilização das CTM como equivalente epidérmico sobre suportes dérmicos já estabelecidos e/ou comercializados na pesquisa; a segunda trata-se de investigar os genes que são modulados no processo cicatricial quando essas células são utilizadas como equivalentes epidérmicos ou como tratamento direto e indireto (meio condicionado) em cultura organotípicas de peles feridas; e a última, avalia a confecção e viabilidade de utilização de *scaffold* polimérico obtido pelo processo de eletrofiação (**Figura 3**).

Figura 3 - Organograma geral das vertentes investigadas nesse projeto.

1) CTM como equivalente epidérmico, utilizando os seguintes suportes dérmicos:

- Colágeno com fibroblastos;
- Matriz Descelularizada MatriXpec®;
- Scaffold CellFate®;
- Tela absorvível comercial Integra®;

2) CTM no processo cicatricial:

- Investigação dos genes cicatriciais modulados quando as CTM são utilizadas como equivalente epidérmico, seja em peles com ou feridas;

3) Produção de *scaffold* polimérico que futuramente possa ser utilizado com CTM na medicina regenerativa

- *Scaffold* de policaprolactona e gelatina de peixe confeccionados pela técnica de eletrofiação;

Fonte: do próprio autor.

Além da terapia clínica, o desenvolvimento de modelos *in vitro* eficientes para diferenciação de células-tronco em queratinócitos, utilizando tanto suportes dérmicos já estabelecidos na pesquisa (colágeno com fibroblastos e matriz descelularizada) como modelos promissores na engenharia tecidual (*scaffolds* e telas absorvíveis) poderá fornecer ferramentas úteis tanto para o estudo da biologia da pele, teste de drogas e cosméticos, como resultar em estratégias terapêuticas, fundamentadas na engenharia de tecidos, para pacientes com queimaduras (ARNO et al., 2011; JEREMIAS et al., 2014; MOHD HILMI; HALIM, 2015).

6. CONCLUSÃO

As células usadas nesse projeto foram caracterizadas como CTM por meio da aderência ao plástico, imunofenotipagem e diferenciação em tipos celulares da linhagem mesenquimal.

O uso do suporte confeccionado com colágeno tipo I e fibroblastos dérmicos foi utilizado como prova de conceito do processo de transdiferenciação. Tanto o cultivo por 1 ou 10 dias em meio de diferenciação, e posterior exposição à IAL, resultou em uma distribuição celular similar a um tecido conjuntivo frouxo. Contudo, foi detectada a expressão de CQ10 por imunofluorescência e, das proteínas CQ14, involucrina e filagrina por PCR em tempo real, sugerindo comprometimento com a diferenciação epidérmica.

Quando as CTM foram induzidas à diferenciação sobre a matriz descelularizada, também se verificou aumento da expressão das proteínas CQ5, CQ10 e involucrina no final do período de exposição à IAL, além de atividade de KLK.

O cultivo das CTM sobre o *scaffold* CellFate® não resultou na expressão de CQ10, embora tenha sido identificado aumento da atividade das KLK.

A tela absorvível Integra® permitiu a adesão celular e a diferenciação das CTM cultivadas sobre esse suporte também resultou em alta atividade de KLK.

Tais resultados indicam comprometimento das CTM com o processo de diferenciação epidérmica.

O *scaffold* produzido a partir da eletrofiação dos polímeros PCL e gelatina de peixe foi biocompatível, permitiu a proliferação de fibroblastos, sendo um candidato à engenharia tecidual para cicatrização de feridas.

A análise dos genes expressos por CTM e queratinócitos em modelo de cicatrização de pele 3D, estabelecido nesse projeto, aponta a utilização das CTM na medicina regenerativa, além de indicar proteínas interessantes para serem estudadas no processo cicatricial com as CTM. O perfil de expressão sugere que as CTM estejam relacionadas à fase de remodelamento tecidual do processo cicatricial.

REFERÊNCIAS

- ADELI-SARDOU, M. et al. Controlled release of lawsone from polycaprolactone/gelatin electrospun nano fibers for skin tissue regeneration. **Int J Biol Macromol.**, v. 124, p. 478-491, 2019.
- ALMEIDA D. C. et al. Epigenetic Classification of Human Mesenchymal Stromal Cells. **Stem Cell Reports**, v. 6, n. 2, p. 168-175, fev. 2016.
- ANGELO, P. F. et al. Substrate specificity of human kallikrein 6: salt and glycosaminoglycan activation effects. **J Biol Chem.**, v. 281, n. 6, p. 3116-3126, 2006.
- ARNO, A. et al. Stem Cell Therapy: A New Treatment for Burns? **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 4, n. 10, p. 1355-1380, 2011. Review.
- BALBINO, C. A. et al. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** [online]. v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BALLESTEROS-CILLERO, R. et al. Biomimetic In Vitro Model of Cell Infiltration into Skin Scaffolds for Pre-Screening and Testing of Biomaterial-Based Therapies. **Cells**, v. 8, n. 8, p. E917, 2019.
- BELLAS, E. et al. In vitro 3D full-thickness skin-equivalent tissue model using silk and collagen biomaterials. **Macromol Biosci.**, v. 12, n. 12, p. 1627-1636, 2012.
- BIOCELLTIS. **Linha CellFate®**. Disponível em: <<https://www.biocelltis.com/cellfate>>. Acesso em: 24 jan 2022.
- BISHAI, I. E. M. et al. Mesenchymal stem cell separation from Wharton's jelly and its differentiation into keratinocytes. **Comp Clin Pathol**, v. 22, p. 547, 2013.
- BOELSMA, E.; VERHOEVEN, M. C.; PONEC, M. Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT). **J Invest Dermatol**, v. 112, n. 4, p. 489-498, abr. 1999.
- BOYCE, S. T. et al. Cultured skin substitutes reduce donor skin harvesting for closure of excised, full-thickness burns. **Ann Surg**, v. 235, n. 2, p. 269-279, 2002.
- BRATTSAND, M. et al. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. **J Invest Dermatol**, v. 124, n. 1, p. 198-203, 2005.
- BRITO, T. S. Tratamento de queimados graves com transplante de pele homóloga: revisão sistemática. Monografia (conclusão do curso de medicina da Faculdade de Medicina da Bahia). Brasil, Bahia.p. 47, 2016.
- BROHEM, C. A. et al. Artificial Skin in Perspective: Concepts and Applications. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 24 n. 1, p. 35-50, 2011.
- BYDLOWSKI, S. P. et al. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 31 p. 25-35, 2009. Supplement 1.

CALOMENO, L. H. et al. **Relato do primeiro ano de experiência do banco de pele do hospital Universitário Evangélico de Curitiba**. Resumo Expandido. Associação Médica Brasileira, Arquivos Catarinenses de Medicina. 44. ISSN:1806-4280. 2015. Suplemento 1.

CANDI, E. et al. Expression of transglutaminase 5 in normal and pathologic human epidermis. **J Invest Dermatol**, v. 119, n. 3, p. 670-677, 2002.

CARDILI, R. N. et al. Dermatite atópica e filagrina: restaurando barreiras para o controle da doença. **Braz J Allergy Immunol**, v. 1, n. 5, p. 239-242, 2013.

CARLSON, M. W. et al. (2008). Three-dimensional tissue models of normal and diseased skin. **Curr Protoc Cell Biol**; Chapter 19:Unit 19.9.

CARMONA, A. K.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 81, n. 3, p. 381-392, 2009.

CATARINO, C. M. et al. Skin corrosion test: a comparison between reconstructed human epidermis and full thickness skin models. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 125, p. 51-57, Apr 2018.

CAUBET, C. J. et al. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family. SCTE / KLK5 / hK5 and SCCE / KLK7 / hK7. **J Invest Dermatol**, v. 122, n. 5, p. 1235-1244, 2004.

CHANG, Y.; LI, H.; GUO, Z. Mesenchymal stem cell-like properties in fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*, v. 34, n. 3, p. 703-714, Aug 2018. doi:10.1159/000363035.

CHAVEZ-MUNOZ, C. et al. Transdifferentiation of adipose-derived stem cells into keratinocyte-like cells: engineering a stratified epidermis. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e80587, 2013.

CHEN, D. et al. Transdifferentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into epidermal-like cells by the mimicking skin microenvironment. **Int J Low Extrem Wounds**, v. 14 n. 2, p. 136-145, 2015.

CHIOU, B. et al. Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties. **European Polymer Journal**, v. 44, p. 3748-3753, 2008.

CHUA, A. W. et al. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. **Burns Trauma**, v. 19, n. 4, p. 3, 2016.

CITRON, I. et al. Assessing burn care in Brazil: an epidemiologic, cross-sectional, nationwide study. **Surgery**, v. 163, n. 5, p. 1165-1172, 2018.

COOLEN, N. A. et al. Culture of Keratinocytes for Transplantation without the Need of Feeder Layer Cells. **Cell Transplant**, v. 16, n. 6, p. 649-661, 2007.

CORRÊA, F. B. **Estudo prospectivo, randomizado e controlado comparando a contração tardia do enxerto de pele parcial entre três matrizes dérmicas no tratamento das sequelas de queimaduras**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. p. 127, 2018.

COULOMB, B.; LEBRETON, C.; DUBERTRET, L. Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. **J Invest Dermatol**, v. 92, n. 1, p.122-125, 1989.

CUNHA, T. F. **Aplicação do poli(ε-caprolactona) com estrutura estrelada para obtenção de microesferas biorreabsorvíveis**. São Paulo. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo, Brasil.

DAŹBROWSKA, M.; MIELCAREK, A.; NOWAK, I. (2018). Evaluation of sex-related changes in skin topography and structure using innovative skin testing equipment. **Skin Res Technol**, v. 24, n. 4, p. 614-620, Nov 2018.

DE MAYO, T. et al. The role of bone marrow mesenchymal stromal cell derivatives in skin wound healing in diabetic mice. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0177533, Jun 2017.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DRISKELL, R. R. et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. **Nature**, v. 504, n. 7479, p. 277-281, 2013.

DUAN, H. et al. Engineering of epidermis skin grafts using electrospun nanofibrous gelatin/ polycaprolactone membranes. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 2077-2084, June 2013. doi: 10.2147/IJN.S42384.

ECHEVARRÍA-GUANILO, M. E. et al. Avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde no primeiro ano após a queimadura. **Escola Anna Nery**, v. 20, n. 1, p. 155-166, 2016.

ECKERT, R. L.; CRISH, J. F.; ROBINSON, N. A. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. **Physiol Rev**, v. 77, n. 2, p. 397-424, 1997.

EGLES, C.; GARLICK, J. A.; SHAMIS, Y. Three-dimensional human tissue models of wounded skin. **Methods Mol Biol.**, v. 585, p. 345-359, 2010. doi:10.1007/978-1-60761-380-0_24

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol**, v. 109, p. 235-242, 2000.

EVES, P. et al. Characterization of an in vitro model of human melanoma invasion based on reconstructed human skin. **Br J Dermatol**, v. 142, p. 210-222, 2000.

FERREIRA, M. C. et al. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. **Rev Bras Cir Plást**, v. 26, n. 4, p. 696-702, 2011.

FISCHER, J.; MEYER-HOFFERT, U. Regulation of kallikrein-related peptidases in the skin - from physiology to diseases to therapeutic options. **Thromb Haemost**, v. 110, n. 3, p. 442-449, 2013.

GAUTAM, S. et al. "Surface Modification of Nanofibrous Polycaprolactone/Gelatin Composite Scaffold by Collagen Type I Grafting for Skin Tissue Engineering." **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications** v. 34, p. 402-409, 2014.

GLUCKMAN, E.; ROCHA, V. Cord blood transplant: strategy of alternative donor search. **Springer Semin Immunopathol**, v. 26, n. 1-2, p. 143-154, July 2004. Review.

GOMES, S. R. R. **Desenvolvimento de matrizes biomiméticas como substitutos de pele destinados ao tratamento de queimaduras**. Dissertação de doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Portugal. p. 239, 2013.

GOMES, S. R. R. et al. Evaluation of nanofibrous scaffolds obtained from blends of chitosan, gelatin and polycaprolactone for skin tissue engineering. **Int J Biol Macromol**, v. 102, p. 1174-1185, 2017.

GOMES, S. R. R. et al. In vitro evaluation of crosslinked electrospun fish gelatin scaffolds. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, n. 3, p. 1219-1227, 2013.

GUO, C. J. et al. Kallikrein 7 Promotes Atopic Dermatitis-Associated Itch Independently of Skin Inflammation. **J Invest Dermatol**, v. 140, n. 6, p. 1244-1252, 2020. doi:10.1016/j.jid.2019.10.022

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Adv Ther**, v. 34, n. 3, p. 599-610, 2017.

Harsha L.; Brundha, M. Role of collagen in wound healing. Drug Invent. **Today**, v. 13, n. 1, p. 55-57, 2020.

HATTORI, H. et al. Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 76, n. 1, p. 230-239, 2006.

HENG, B. C. et al. Directing stem cells into the keratinocyte lineage in vitro. **ExpDermatol**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2005.

HODGKINSON, T.; BAYAT, A. A. In vitro and ex vivo analysis of hyaluronan supplementation of Integra® dermal template on human dermal fibroblasts and keratinocytes. **J Appl Biomater Funct Mater**, v. 14, n. 1, p. 9-18, 2016. doi: 10.5301/jabfm.5000259.

HUANG, K. F. et al. Baicalein increases keratin 1 and 10 expression in HaCaT keratinocytes via TRPV4 receptor activation. **Exp Dermatol**, v. 25, n. 8, p. 623-629, 2016.

HULTMAN, C. S. et al. Allogeneic fibroblasts used to grow cultured epidermal autografts persist in vivo and sensitize the graft recipient for accelerated second-set rejection. **J Trauma**, v. 41, n. 1, p. 51-58, 1996. Discussion p. 8-60.

ILJAS, J. D. et al. A human skin equivalent burn model to study the effect of a nanocrystalline silver dressing on wound healing. **Burns**, v. 47, n. 2, p. 417-429, Mar 2021. doi: 10.1016/j.burns.2020.07.007.

ISHIDA-YAMAMOTO, A. et al. Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. **J Invest Dermatol**, v. 122, n. 5, p. 1137-1144, 2004.

JADALANNAGARI, S. et al. Potential mechanisms underlying ectodermal differentiation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 478, n. 2, p. 831-837, 2016.

JEREMIAS, T. S. et al. Dermal substitutes support the growth of human skin-derived mesenchymal stromal cells: potential tool for skin regeneration. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e89542, Feb 2014. doi:10.1371/journal.pone.0089542

JIANG, R. et al. Kallikrein-5 promotes cleavage of desmoglein-1 and loss of cell-cell cohesion in oral squamous cell carcinoma. **J BiolChem**, v. 286, n. 11, p. 9127-9135, 2011.

JIN, H. J. et al. Down-regulation of CD105 is associated with multi-lineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 381, n. 4, p. 676-681, 2009.

KAMALVAND, M. et al. Design of a decellularized fish skin as a biological scaffold for skin tissue regeneration. **Tissue Cell**, v. 71, p. 101509, Aug 2021.

KAMOLZ, L. P. et al. Cultured human epithelium: human umbilical cord blood stem cells differentiate into keratinocytes under in vitro conditions. **Burns**, v. 32, n. 1, p. 16-19, 2006.

KAO, C. Application of Concentrated Growth Factors Membrane for Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell Differentiation towards Keratinocytes. **Separations**, v. 8, n. 61, p. 1-14, 2021.

KARAHUSEYINOGLU, S. et al. Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 3, p. 682-691, 2008.

KERN, S. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v. 24, n. 5, p. 1294-1301, 2006.

KIM, K. et al. (2016). Mesenchymal Stromal Cells: Properties and Role in Management of Cutaneous Diseases. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. .doi: 10.1111/jdv.13934. [Epub ahead of print].

KOMATSU, N. et al. Aberrant human tissue kallikrein levels in the stratum corneum and serum of patients with psoriasis: dependence on phenotype, severity and therapy. **Br J Dermatol**, v. 156, n. 5, p. 875-883, 2007.

KOMATSU, N. et al. Quantification of human tissue kallikreins in the stratum corneum: dependence on age and gender. **J Invest Dermatol**, v. 25, n. 6, p. 1182-1189, 2005.

KOSTER, M. I.; ROOP, D. R. Mechanisms regulating epithelial stratification. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 23, p. 93-113, 2007.

KRAUSE, D. S. et al. CD34: structure, biology, and clinical utility. **Blood**, v. 87, n. 1, p. 1-13, 1996.

Kulus, M. et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Human and Animal Perinatal Tissues-Origins, Characteristics, Signaling Pathways, and Clinical Trials. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 3278, 2021. doi.org/10.3390/cells10123278

Kumar N, et al. Decellularization of Skin Tissue. **Adv Exp Med Biol**, v. 1345, p. 165-191, 2021.

Kuwahara M. et al.. E-cadherin expression in wound healing of mouse skin. **J Cutan Pathol**, v. 28, n. 4, p. 191-199, Apr 2001.

LAI, Y.; CHENG, K.; KISAALITA, W. Three dimensional neuronal cell cultures more accurately model voltage gated calcium channel functionality in freshly dissected nerve tissue. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45074, 2012.

LAMME, E. N. et al. Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. **J Pathol**, v. 190, n. 5, p. 595-603, 2000.

LAW, J. X. et al. Electrospun Collagen Nanofibers and Their Applications in Skin Tissue Engineering. **Tissue Eng Regen Med**, v. 14, n. 6, p. 699-718, Aug 2017. doi:10.1007/s13770-017-0075-9

LI, B. et al. Calcium silicate accelerates cutaneous wound healing with enhanced re-epithelialization through EGF/EGFR/ERK-mediated promotion of epidermal stem cell functions. **Burns Trauma**. 2021 Sep 30;9:tkab029.

LI, Z. et al. Rho kinase inhibitor Y-27632 promotes the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into keratinocyte-like cells in xeno-free conditioned medium. **Stem Cell Res Ther**, v. 6, p. 17, Mar 2015. doi: 10.1186/s13287-015-0008-2.

LIN, Y.; HOGAN, W. J. Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment and Prevention of Graft-versus-Host Disease. **Adv Hematol**, v. 2011, p. 427863, 2011.

LIN, Y. H. et al. The effects of microenvironment on wound healing by keratinocytes derived from mesenchymal stem cells. **Ann Plast Surg**, v. 71, p. 67-74, 2013. Supplement 1.

LOURA, L. M.; PRIETO, M. FRET in Membrane biophysics: an overview. **Front Physiol**, v. 15, n. 2, p. 82, 2011.

LV, F. J. et al. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 32, n. 6, p. 1408-1419, Jun 2014.

MARTIN-PIEDRA, M. A. et al. Effective use of mesenchymal stem cells in human skin substitutes generated by tissue engineering. **Eur Cell Mater**, v. 37, p. 233-249, Mar 2019.

MARTIN-RENDON, E. et al. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. **Vox Sang**, v. 95, n. 2, p. 137-148, Aug 2008.

MASRI, S. et al. Cellular Interaction of Human Skin Cells towards Natural Bioink via 3D-Bioprinting Technologies for Chronic Wound: A Comprehensive Review. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 23, p. 476, 2022. doi.org/10.3390/ijms23010476

MIDDELKOOP, E. et al. Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. **Biomaterials**, v. 25, n. 9, p. 1559-1567, 2004.

MIYAKI, L. A. M. et al. Study of internalization and viability of multimodal nanoparticles for labeling of human umbilical cord mesenchymal stem cells. **Einstein**, v. 10, n. 2, p. 189-196, 2012.

MOHD HILMI, A. B.; HALIM, A. S. Vital roles of stem cells and biomaterials in skin tissue engineering. **World J. Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 428-436, 2015.

MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A.; DEL CARLO, R. J. Mesenchymal stem cell. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 238-245, 2010.

MORAES, D. What the relationship between CD90 e CD44 in Mesenchymal Stem Cells?. **Cytotherapy**, v. 20, p. 5, 2018. doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.02.124

MÜLLER, A. M. et al. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. **Exp Mol Pathol**, v. 72, n. 3, p. 221-229, 2002.

MULLER, W. A. et al. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. **J. Exp. Med**, v. 178, n. 2, p. 449-460, 1993.

NAGAMURA-INOUE, T.; HE, H. (2017). Umbilical cord-derived Mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. **World J Stem Cells**. 2014 Apr 26; v. 6, n. 2, p.195-202, Apr 2014.

NAUROY, P.; NYSTRÖM, A. Kallikreins: Essential epidermal messengers for regulation of the skin microenvironment during homeostasis, repair and disease. **Matrix Biol Plus**. 2019 Nov 21;6-7:100019. doi: 10.1016/j.mbplus.2019.100019.

NG, F. et al. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. **Blood**, v. 112, n. 2, p. 295-307, 2008.

NOURIAN DEHKORDI, A. et al. Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. **Stem Cell Res Ther**, v. 10, n. 1, p. 111, 2019.

NUNES, V. A. (2009). Exploring the potential of adult stem cells: why umbilical cord blood? In; **Stem Cells: Basic and applications**. Kaushik D DandSatish MT (Ed), Editora McGraw Hill, pp 603-613.

NUNES, V. A. et al. Stem cells from umbilical cord blood differentiate into myotubes and express dystrophin in vitro only after exposure to in vivo muscle environment. **Biol Cell**, v. 99, n. 4, p. 185-196, 2007.

NUNES, V. A.; ZATZ, M. Doenças Genéticas: Como tratá-las? In: Células-tronco: A Nova fronteira da Medicina. Eds. Marco Antonio Zago e Dimas Tadeu Covas, São Paulo, **Atheneu**, v.1, p. 197-221, 2006.

_____. Os avanços da Biotecnologia nas Tentativas Terapêuticas de Doenças Genéticas. In: Inovação, Biotecnologia e Saúde Pública. Instituto UNIEMP. Fórum Permanente das Relações Universidade-Empresa. Eds. Regina Scivolletto e Antonio Carlos Camargo, São Paulo, v. 1, p. 31-60, 2005.

ODA, K. et al. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. **Mol Syst Biol**. 2005;1:2005.0010.

OJEH, N. O.; FRAME, J. D.; NAVSARIA, H. A. In vitro characterization of an artificial dermal scaffold. **Tissue Eng**, v. 7, n. 4, p. 457-472, 2001.

OLIVEIRA, J. P. et al. Isomannide-based peptidomimetics as inhibitors for human tissue kallikreins 5 and 7. **ACS Med Chem Lett**, v. 5, n. 2, p. 128-132, 2013.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **The Wound Healing Society**. Chronic wound care guidelines. 2018.

ORYAN, A. et al. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. **Int J Biol Macromol**, v. 107, (Pt A), p. 678-688, 2018.

PAGANELLI, A. et al. In vitro Engineering of a Skin Substitute Based on Adipose-Derived Stem Cells. **Cells Tissues Organs**, v. 207, n. 1, p. 46-57, 2019.

PHAM, C. et al. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. **Burns**, v. 33, n. 8, p. 946-957, 2007.

PHAM, P. V.; VU, N. B. Off-the-shelf mesenchymal stem cells from human umbilical cord tissue can significantly improve symptoms in COVID-19 patients: An analysis of evidential relations. **World J Stem Cells**, v. 12, n. 8, p. 721-730, Aug 2020.

PHILLIPS, C. J. et al. Estimating the costs associated with the management of patients with chronic wounds using linked routine data. **Int Wound J**, v. 13, n. 6, p. 1193-1197, Dec 2016.

PIRES, F. et al. Polycaprolactone/Gelatin Nanofiber Membranes Containing EGCG-Loaded Liposomes and Their Potential Use for Skin Regeneration. **ACS Appl Bio Mater**, v. 2, n. 11, p. 4790-4800, Nov 2019.

POLAKOWSKA, R.; HERTING, E.; GOLDSMITH, L. A. Isolation of cDNA for human epidermal type I transglutaminase. **J Invest Dermatol**, v. 96, n. 2, p. 285-288, 1991.

POWELL, H. M.; SUPP, D. M.; BOYCE, S. T. Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes. **Biomaterials**, v. 29, p.834-843, 2008. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.10.036.

PRUNIERAS, M.; REGNIER, M.; WOODLEY, D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. **J Invest Dermatol**, v. 81, p.28-33, 1983.

QUERIDO, D. S. F. **Análise da infiltração celular numa matriz de nanofibras com poros expandidos**. Dissertação de mestrado (Engenharia biomédica). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Portugal. 115 p, 2019.

RAMALINGAM, R. et al. Poly- ϵ -Caprolactone/Gelatin Hybrid Electrospun Composite Nanofibrous Mats Containing Ultrasound Assisted Herbal Extract: Antimicrobial and Cell Proliferation Study. **Nanomaterials** (Basel), v. 9, n. 3, p. E462, 2019.

RANDALL, M. J. et al. Advances in the Biofabrication of 3D Skin in vitro: Healthy and Pathological Models. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 6, p. 154, 2018. doi: 10.3389/fbioe.2018.00154. eCollection 2018. Review.

RATAJCZAK, M. Z. Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. **Curr Opin Hematol**, v. 15, n. 4, p. 293-300, 2008.

RAWLINGS, A. V. et al. Stratum corneum moisturization at the molecular level. **J Invest Dermatol**, v. 103, n. 5, p. 731-741, 1994.

RICE, R. H.; GREEN, H. Presence inhuman epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. **Cell**, v. 18, n. 3, p. 681-694, 1979.

RODRIGUES M. et al. Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiol Rev**, v. 99, n. 1, p. 665-706, 2019. doi:10.1152/physrev.00067.2017

ROGER, M. et al. Bioengineering the microanatomy of human skin. **J. Anat.**, v. 234, p. 438-455, 2019.

RUSTAD, K. C. et al. Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. **Biomaterials**, v. 33, n. 1, p. 80-90, 2012.

SANTOS, J. F. et al. Mesenchymal stem cells differentiate into keratinocytes and express epidermal kallikreins: Towards an in vitro model of human epidermis. **J Cell Biochem**, v. 120, n. 8, p. 13141-13155, 2019.

SARUGASER, R. et al. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. **Stem Cells**, v. 23, n. 2, p. 220-229, Feb 2005.

SASAKI, M. et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **J Immunol**, v. 180, n. 4, p. 2581-2587, 2008.

SCHELLENBERG, A. et al. Matrix elasticity, replicative senescence and DNA methylation patterns of mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p. 6351-6358, Aug 2014.

SCHILLING, T. et al. Plasticity in adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 271, n. 1-2, p. 1-17, 2007.

SCHMIDT, B. A.; HORSLEY, V. Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. **Development**, v. 140, n. 7, p. 1517-1527, 2013. doi:10.1242/dev.087593.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SCHNEIDER, R. K. et al. Long-term survival and characterisation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on dermal equivalents. **Differentiation**, v. 79, n. 3, p. 182-193, 2010.

SCHNEIDER, R. K. et al. Three-dimensional epidermis-like growth of human mesenchymal stem cells on dermal equivalents: contribution to tissue organization by adaptation of myofibroblastic phenotype and function. **Differentiation**, v. 76, n. 2, p. 156-167, Feb 2008.

SCHOOP, V. M.; MIRANCEA, N.; FUSENIG, N. E. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. **J Invest Dermatol**, v. 112, n. 2, p. 343-353, Mar 1999. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00524.x.

SECCO, M. et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: Cord is richer than blood! **Stem Cell**, v. 26 p.146-150, 2007.

SHAHROKHI, S.; ARNO, A.; JESCHKE, M. G. The use of dermal substitutes in burn surgery: acute phase Wound Repair Regen, v. 22, n. 1, p. 14-22, 2014.

SIBOV, T. T. et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. **Cytotechnology**, v. 64, n. 5, p. 511-521, 2012.

SIMON, M. et al. Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation. **J Biol Chem**, v. 276, n. 23, p. 20292–20299, 2001.

SORG, H. et al. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **Eur Surg Res**, v. 58, n. 1-2, p. 81-94, 2017. doi:10.1159/000454919.

SOUNDARARAJAN, M.; KANNAN, S. Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin? **J Cell Physiol**, v. 233, n. 12, p. 9099-9109, Dec 2018.

STEFANŃSKA, K. et al. Human Wharton's Jelly-Cellular Specificity, Stemness Potency, Animal Models, and Current Application in Human Clinical Trials. **Journal of clinical medicine**, v. 9, n. 4, p. 1102, 2020. doi.org/10.3390/jcm9041102

STEFFENS, D. et al. Development of a biomaterial associated with mesenchymal stem cells and keratinocytes for use as a skin substitute. **Regen Med**, v. 10, n. 8, p. 975-987, 2015.

TAM, K. et al. A nanoscaffold impregnated with human wharton's jelly stem cells or its secretions improves healing of wounds. **J Cell Biochem**, v. 115, n. 4, p. 794-803, 2014.

TEIXEIRA, T. S. et al. Biological evaluation and docking studies of natural isocoumarins as inhibitors for human kallikrein 5 and 7. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 21, n. 20, p. 6112-6115, 2011.

TEZUKA, T.; TAKAHASHI, M.; KATSUNUMA, N. Cystatin alpha is one of the component proteins of keratohyalin granules. **J Dermatol**, v. 19, n. 11, p. 756-760, 1992.

TISSUELABS. MatriXpec™ Hydrogels. Disponível em: <<https://www.tissuelabs.com/matrixpec-hydrogels>>. Acesso em: 24 jan 2022.

TOAI, C. T. et al. In vitro culture of keratinocytes from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells: the Saigonesse culture. **Cell Tissue Bank**, v. 12, n. 2, p. 125-133, 2011.

VAN VLIET, M. et al. Soft tissue sarcomas at a glance: clinical, histological, and MR imaging features of malignant extremity soft tissue tumors. **Eur Radiol**, v. 19, p. 1499-1511, 2009. doi.org/10.1007/s00330-008-1292-3

VAN ZUIJLEN, P. et al. Tissue engineering in burn scar reconstruction. **Burns Trauma**, v. 3, p. 18, 2015.

WANG, H. et al. Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 14, n. 4, p. 423-430, 2012.

WANG, H. S. et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1330-1337, 2004.

WANG, W. et al. IL-36 γ inhibits differentiation and induces inflammation of keratinocyte via Wnt signaling pathway in psoriasis. **Int J Med Sci**, v. 14, n. 10, p. 1002-1007. Aug 2017. doi:10.7150/ijms.20809

WASIAK, J. et al. Predictors of health status and health-related quality of life 12 months after severe burn. **Burns**, v. 40, n. 4, p. 568-574, 2014.

WEISSMAN, I. L.; SHIZURU, J. A. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. **Blood**, v. 112, n. 9, p. 3543-3553, 2008.

WETZIG, A. et al. Differential marker expression by cultures rich in mesenchymal stem cells. **BMC Cell Biol**, v. 14, p. 54, 2013.

WILLIAMS, A. R.; HARE, J. M. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. **Circ Res**, v. 109, n. 8, p. 923-940, 2011.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer : Polycaprolactone in the 21st century. **Prog Polym Sci**, v. 35, n. 10, p. 1217-1256, 2009. doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

WRIGHT, A.; ARTHAUD-DAY, M. L.; WEISS, M. L. Therapeutic Use of Mesenchymal Stromal Cells: The Need for Inclusive Characterization Guidelines to Accommodate All Tissue Sources and Species. **Front. Cell Dev. Biol**, v. 9, p. 632717, 2021. doi:10.3389/fcell.2021.632717

WUCHTER, P.; WAGNER, W.; HO, A. D. Mesenchymal stem cells: an oversimplified nomenclature for extremely heterogeneous progenitors. **Regenerative Medicine**, v. 3, n. 3, p. 377-395, 2011.

XIE, S. Y. et al. Adult stem cells Seeded on electrospinning silk fibroin nanofibrous scaffold enhance wound repair and regeneration. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 16, n. 6, p. 5498-5505, 2016.

XIE, Y. et al. Development of a three-dimensional human skin equivalent wound model for investigating novel wound healing therapies. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 16, n. 5, p. 1111-1123, Oct 2010. doi:10.1089/ten.TEC.2009.0725.

YANNAS, I. V.; BURKE, J. F. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. **J Biomed Mater Res**, v. 14, p. 65-81, 1980.

YAZDANPANA, A. et al. Bioengineering of fibroblast-conditioned Polycaprolactone/Gelatin electrospun scaffold for skin tissue engineering. **Artif Organs**. 2022 Jan 10.

YI, S. et al. (2016). Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Curr Stem Cell Res Ther**.2016 Sep 4.[Epub ahead of print].

YOUSSEF, A.; ABOALOLA, D.; HAN, V. K. The Roles of Insulin-Like Growth Factors in Mesenchymal Stem Cell Niche. **Stem Cells Int**, v. 2017, p. 9453108, 2017.

ZATZ, M.; NUNES, V. A. Terapia Celular: Esperança de tratamento para distrofias musculares? In: *Conduitas em Neurologia. Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas da FMUSP*. Eds. Ricardo Nitrini, Getúlio Daré Rabello, Ida Fortini, Paulo Caramellie Marcelo Calderaro. São Paulo, v. 1, p. 47-61, 2005.

ZAULYANOV, L.; KIRSNER, R. S. A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. **Clin Interv Aging**, v. 2, n. 1, p. 93-98, 2007.