

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ISABELLA DE SOUZA MOTA

***PRIMING* EPIGENÉTICO COMO ESTRATÉGIA PARA REALÇAR O
POTENCIAL REGENERATIVO DAS CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS: FOCO NA COVID-19**

BRASÍLIA

2024

ISABELLA DE SOUZA MOTA

***PRIMING* EPIGENÉTICO COMO ESTRATÉGIA PARA REALÇAR O
POTENCIAL REGENERATIVO DAS CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS: FOCO NA COVID-19**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

BRASÍLIA

2024

Autorizo a reprodução e divulgação parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação:

Ficha catalográfica:

ISABELLA DE SOUZA MOTA

PRIMING EPIGENÉTICO COMO ESTRATÉGIA PARA REALÇAR O POTENCIAL
REGENERATIVO DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS: FOCO NA COVID-19

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 16 de maio de 2024.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo - Universidade de Brasília

Profa. Dra. Nailê Damé Teixeira - Universidade de Brasília

Prof. Dr. Robert Edward Pogue - Universidade Católica de Brasília

Profa. Dra. Ingrid Ferreira Metzger - Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

À Deus e a espiritualidade,

Agradeço aos meus pais, Shirley e Eduardo, por todo o apoio na minha vida acadêmica e pela paciência pelos dias ao longo dos dois anos de mestrado em que eu passei mais tempo na UnB do que em casa.

Agradeço à minha irmã Daniella e ao meu cunhado Rafael por sempre acreditarem em mim e por todos os incontáveis rodízios de sushi para me tirar dos experimentos no laboratório. Minha vida é muito melhor com vocês.

Agradeço a todos os alunos de pós-graduação, iniciação científica e colaboradores da UnB que me auxiliaram durante esse processo. Em especial o pessoal do Laboratório de Farmacologia Molecular (FarMol/UnB).

Agradeço as doutoras Amandda e Luma, ex alunas do LHCT, e as alunas que atualmente fazem parte (Naomí, Nakaly, Letícia e Elizabete) por todo alívio cômico e suporte ao longo desse processo, tornando menos difícil e mais divertido. Agradeço, em especial, a Amandda, que me ensinou e me ajudou imensamente, além de ter dividido comigo incontáveis litros de café.

Agradeço a minha família de coração, Juliana, Gabriel e a Cláudia, por sempre me lembrarem do meu potencial e pelo infinito suporte ao longo da vida.

Expresso minha gratidão ao Dr. Felipe Saldanha de Araújo, meu orientador, pela oportunidade de ingressar em seu laboratório, pelos inestimáveis ensinamentos transmitidos, pela confiança depositada em meu trabalho, por me colocar em valiosas colaborações em outros projetos e por impulsionar meu desenvolvimento profissional.

Agradeço de antemão aos membros da banca avaliadora por dispor de seu tempo para apreciação do meu trabalho.

Agradeço a Universidade de Brasília, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, e a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por prover a bolsa de mestrado ao longo dos 24 meses.

Por fim, agradeço as coincidências da vida. Em 2021, fui diagnosticada com um sarcoma fibromixóide, um câncer com origem em células mesenquimais, e por coincidência, hoje eu redijo essa dissertação de mestrado sobre o aprimoramento do potencial regenerativo dessas mesmas células, visando seu uso terapêutico.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Células Estromais Mesenquimais.....	13
1.2 Regeneração.....	15
1.3 Otimização de CEMs e <i>priming</i> epigenético.....	17
1.4 Aplicação clínica das CEMs.....	20
1.5 COVID-19.....	21
1.6 Aplicação clínica das CEMs na COVID-19	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivos gerais.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Obtenção das CEMs.....	29
3.2 Cultivo celular.....	29
3.3 Caracterização fenotípica.....	29
3.4 Confeção dos esferoides de CEM.....	30
3.5 Caracterização dos esferoides por microscopia eletrônica de varredura.....	30
3.6 <i>Priming</i> epigenético.....	31
3.7 Viabilidade celular.....	31
3.8 Produção de meio condicionado.....	31
3.9 Proliferação celular.....	32

3.10 Ensaio de migração de fibroblastos.....	32
3.11 Ensaio de apoptose celular.....	33
3.12 Liberação de Lactato Desidrogenase (DHL).....	33
3.13 Atividade das Caspase 3/7.....	34
3.14 Extração de ácido nucleico (RNA) e transcrição de cDNA.....	34
3.15 PCR em tempo real (qPCR).....	35
3.16 Análise estatística.....	35
4. RESULTADOS.....	37
ETAPA I: <i>priming</i> epigenético das CEMs.....	37
4.1 Fenótipo das CEMs de tecido adiposo com e sem <i>priming</i> epigenético	37
4.2 O <i>priming</i> epigenético com 5-Aza por 72 horas modula a expressão de transcritos envolvidos em regeneração e imunossupressão nas CEMs	38
4.3 O <i>priming</i> epigenético com 5-Aza não compromete a viabilidade das CEMs.....	40
4.4 5-Aza aumenta a proliferação das CEMs.....	40
4.5 5-Aza não realça o potencial migratório das CEMs	41
ETAPA II: Confecção de esferoides das CEMs.....	42
4.6 Produção de esferoides de CEMs.....	43
4.7 O <i>priming</i> epigenético com 5-Aza na CEM 3D não causa lise de membrana celular e liberação de DHL.....	44
4.8 O esferóide de CEMs apresenta expressão elevada de genes regenerativos e de pluripotência, comparado ao modelo de CEMs 2D.....	44

4.9 O meio condicionado das CEMs 2D e 3Ds tratadas com 5-Aza potencializa a atividade migratória dos fibroblastos e induz aumento da expressão de <i>CXCR4</i> e <i>CXCR7</i>	45
ETAPA III: Uso de CEMs licenciadas com 5-Aza e em formato 3D em modelo <i>in vitro</i> de injúria de células pulmonares expostas aos antígenos NS do SARS-CoV2.....	49
4.10 Viabilidade das células CALU-3 frente ao antígeno NS do SARS-CoV2 e IFN- γ	49
4.11 Impacto do meio condicionado de CEMs 2D e 3D na viabilidade das células CALU-3 inflamadas com antígeno NS do SARS-CoV2 e IFN- γ	51
4.12 O meio condicionado de CEM 3D com 5-Aza atenua a atividade das caspases 3 e 7	52
4.13 Expressão de genes associados a regeneração e morte em células CALU-3 expostas ao antígeno NS + IFN- γ e tratadas com o meio condicionado de CEM 3D com 5-Aza.....	53
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO.....	65
7. PERSPECTIVAS.....	66
8. REFERÊNCIAS.....	67

RESUMO

MOTA, Isabella de Souza. PRIMING EPIGENÉTICO COMO ESTRATÉGIA PARA REALÇAR O POTENCIAL REGENERATIVO DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS: FOCO NA COVID-19. Brasília, 2024. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

A terapia celular está em franca evolução nas últimas décadas, sendo as células estromais mesenquimais (CEMs) um dos componentes celulares mais investigados nesse campo. As CEMs possuem capacidade de modular o sistema imune para um fenótipo imunossuprimido, como também podem gerenciar processos de angiogênese e reparo tecidual. Atualmente, umas das áreas de estudo mais exploradas é a busca por estratégias de *priming* das CEMs, de modo a potencializar as propriedades funcionais dessas células. Neste estudo, inicialmente, buscamos explorar se o *priming* epigenético das CEMs, através do uso do inibidor de DNA Metiltransferase (DNMT) 5-Azacitidina (5-Aza), poderia modular o potencial regenerativo dessas células. Em seguida, testamos a capacidade regenerativa de CEMs mantidas em cultivo 2D e em formato esferoide (3D) em modelo *in vitro* de infecção de célula pulmonar exposta aos antígenos Spike e Nucleocapsídeo do SARS-CoV2. Notamos que CEMs em formato 3D apresentam maior capacidade regenerativa que as 2D. Mais importante, o *priming* com 5-Aza foi capaz de modular nas CEMs a expressão de genes envolvidos em processos regenerativos, imunomoduladores e de pluripotência, como *VEGF*, *IDO*, *IL-10* e *SOX2*. Nossos dados mostraram que as CEMs 3D submetidas ao *priming* com 5-Aza garantiram maior viabilidade às células CALU-3, reduzindo a atividade das caspases 3/7 nessas células e modulando transcritos relacionados a regeneração, pluripotência e resposta imune, incluindo *PDGF*, *FGF2*, *SOX2* e *IL-10*. De maneira geral, os resultados obtidos neste trabalho mostram que CEMs cultivadas em modelo 3D e submetidas ao *priming* com 5-Aza apresentam maior capacidade regenerativa e que são capazes de prevenir a extensão dos danos celulares ocasionados às células pulmonares expostas aos antígenos do SARS-CoV2

Palavras-chave: *Priming* epigenético, esferoide, célula estromal mesenquimal, regeneração, SARS-CoV2.

ABSTRACT

MOTA, Isabella de Souza. EPIGENETIC *PRIMING* AS A STRATEGY TO ENHANCE THE REGENERATIVE POTENTIAL OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS: FOCUS ON COVID-19. Brasília, 2024. Dissertation (Master's Degree in Pharmaceutical Sciences) - Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, 2024.

Cell therapy has evolved rapidly in recent decades, with mesenchymal stromal cells (MSCs) being one of the most investigated cell components in this field. MSCs have the ability to modulate the immune system towards an immunosuppressed phenotype, and can also manage angiogenesis and tissue repair processes. Currently, one of the most explored areas of study is the search for *priming* strategies for MSCs, in order to enhance the functional properties of these cells. In this study, we initially sought to explore whether epigenetic *priming* of MSCs, through the use of the DNA methyltransferase (DNMT) inhibitor 5-Azacytidine (5-Aza), could modulate the regenerative potential of these cells. Next, we tested the regenerative capacity of MSCs maintained in 2D culture and in spheroid format (3D) in an *in vitro* model of lung cell infection exposed to the Spike and Nucleocapsid antigens of SARS-CoV2. We found that 3D MSCs have greater regenerative capacity than 2D ones. More importantly, *priming* with 5-Aza was able to modulate the expression of genes involved in regenerative, immunomodulatory and pluripotency processes, such as *VEGF*, *IDO*, *IL-10* and *SOX2*. Our data showed that 3D MSCs primed with 5-Aza ensured greater viability of CALU-3 cells, reducing the activity of caspases 3/7 in these cells and modulating transcripts related to regeneration, pluripotency and immune response, including *PDGF*, *FGF2*, *SOX2* and *IL-10*. Overall, the results obtained in this study show that MSCs cultured in a 3D model and primed with 5-Aza have a greater regenerative capacity and are capable of preventing the extent of cell damage caused to lung cells exposed to SARS-CoV2 antigens.

Keywords: Epigenetic *priming*, spheroid, mesenchymal stromal cell, regeneration, SARS-CoV2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Entrada do vírus SARS-CoV2 a partir da interação com a enzima ECA2.....	23
Figura 2: Perfil fenotípico de CEMs de tecido adiposo.....	37
Figura 3: Painel fenotípico da CEM de tecido adiposo após <i>priming</i> epigenético com 10µM de 5-Aza por 72h.....	38
Figura 4: Expressão do gene <i>VEGF</i> nas CEMs submetidas a diferentes estratégias de <i>priming</i> epigenético.....	38
Figura 5: Análise de expressão gênica.....	39
Figura 6: Análise de morte celular.....	40
Figura 7: Análise da proliferação celular com CFSE.....	41
Figura 8: Ensaio de migração com CEM.....	42
Figura 9: Esferoides controle e tratado com 10uM de 5-Aza por 72h.....	43
Figura 10 : DHL de CEM 3D com e sem 5-Aza.....	44
Figura 11: Análise de expressão gênica. Comparação da expressão dos genes (A) <i>VEGF</i> , (B) <i>EGF</i> , (C) <i>ANGPT1</i> e (D) <i>SOX-2</i> entre CEMs 2D e 3D.....	45
Figura 12: Ensaio de migração em fibroblasto.....	46
Figura 13: Análise de expressão gênica dos genes <i>CXCR4</i> e <i>CXCR7</i> em fibroblastos expostos ao meio condicionado de CEM 2D com ou sem 5-Aza.....	47
Figura 14: Ensaio de migração em fibroblasto.....	48
Figura 15: Análise de expressão gênica dos genes <i>CXCR4</i> e <i>CXCR7</i> em fibroblastos expostos ao meio condicionado de CEM 3D com ou sem 5-Aza.....	49

Figura 16: Ensaio de viabilidade por MTT de células CALU-3 expostas a doses crescentes de IFN- γ	50
Figura 17: Ensaio de viabilidade por MTT e liberação de DHL em célula CALU-3 exposta ao antígeno NS e de IFN- γ por 48h e 72h.....	51
Figura 18: Ensaio de MTT em células CALU-3 expostas ao antígeno NS e IFN- γ e meio condicionado de CEM 2D e 3D com ou sem 5-Aza.	52
Figura 19: Atividade de caspase 3/7.....	53
Figura 20: Análise da expressão gênica.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. Células Estromais Mesenquimais

Devido às suas propriedades imunológicas e seu potencial de reparo tecidual, as células estromais mesenquimais (CEM) se tornaram alvo de estudo ao longo das últimas décadas para o uso em terapia celular e medicina regenerativa. As CEMs representam células progenitoras com capacidade multipotente, capazes de originar tecidos de sustentação do corpo, devido ao seu potencial osteogênico, condrogênico e adipogênico (PITTENGER et al., 1999; MO et al., 2016).

O isolamento das CEMs pode ser realizado por múltiplas fontes devido à sua variada presença no organismo. Essas células são encontradas no tecido adiposo (GRONTHOS et al., 2001), dentes decíduos (MIURA et al., 2003), em frações da medula óssea (0,001-0,01% da população total de células nucleadas) (PITTENGER et al., 1999), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001) cordão umbilical (ROSADA et al., 2003), sangue fetal (BIEBACK et al., 2004), dentre outros (COVAS et al., 2008).

A presença das CEMs no desenvolvimento fetal pode estar associada aos importantes processos imunes e de tolerância que ocorrem no período fetal. Nessa linha, é importante destacar que um dos principais mecanismos associados ao controle imunológico desempenhado pelas CEMs ocorre por intermédio da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) (MEISEL et al., 2004), uma enzima que atua catalisando a oxidação do triptofano, induzindo supressão de linfócitos T (MELLOR et al., 2003; MELLOR et al., 2004).

As CEM são definidas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) mediante três critérios: propriedade de se diferenciar *in vitro* em osteócitos, adipócitos e condrócitos; imunofenótipo com positividade para marcadores CD44, CD73, CD90 e CD105, negatividade para marcadores da linhagem hematopoiética (CD11, CD14, CD34 e CD45)

(DOMINICI et al., 2006) e aderência ao plástico quando submetido à cultura, com morfologia fibroblastóide (HORWITZ et al., 2005).

A capacidade das CEMs de modular a resposta imunológica ainda não está totalmente esclarecida, mas existem evidências claras de que esse processo ocorra, em parte, por mecanismos parácrinos envolvendo a secreção de moléculas anti-inflamatórias, incluindo a adenosina (SALDANHA-ARAÚJO et al., 2011), Fator de Crescimento Transformador β (TGF- β) (DI NICOLA et al., 2002), IDO (MEISEL et al., 2004), interleucina-10 (IL-10) (AGGARWAL; PITTENGER., 2005), interleucina-6 (IL-6) (RAICEVIC et al., 2010), Prostaglandina E2 (PGE2) (AGGARWAL; PITTENGER., 2005), Galectina-1 (GAL-1) (GIESEKE et al., 2010), Proteína do gene 6 induzível pelo Fator de Necrose Tumoral (TSG-6) (CHOI et al., 2011), entre diversos outros fatores.

A atuação parácrina das CEMs também é decorrente da produção de vesículas extracelulares (SEREJO et al., 2019), que através de bioativos transportados para células-alvo, conseguem modular sua funcionalidade (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). As CEMs também possuem capacidade de realizar contato célula-célula e, quando em um ambiente inflamado, intensificam seu efeito imunossupressor sobre células imunes, por intermédio da via PD-1/PDL1 (AUGELLO et al., 2005), além do aumento de expressão de moléculas de adesão VCAM-1 (CD106) e ICAM-1 (CD54) (MAJUMDAR et al., 2003).

Adicionalmente, é bem estabelecido que as CEMs são capazes de induzir um fenótipo imunossupressor em linfócitos, aumentando a produção de células T regulatórias (Tregs). É importante notar que esse efeito ocorre pela produção de moléculas anti-inflamatórias, incluindo o Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF) e TGF- β 1 (MACCARIO et al., 2005; PREVOSTO et al., 2007).

Os Tregs são definidos pela expressão da molécula CD25 e do fator de transcrição FOXP3 (CAMPBELL et al., 2007; SOJKA et al., 2008) e são um subtipo de linfócitos

auxiliares que desempenham papel fundamental no processo de tolerância imunológica, tanto central quanto periférica (ABBAS et al., 2005). Essas células atuam no processo de supressão da resposta imune através da diminuição da sinalização do receptor de células T (TCR), o que é mediado por FOXP3 (CAMPBELL et al., 2007), pela liberação de fatores de supressão como IL-10 e TGF- β 1 (PICCIRILLO., 2008; SOJKA et al., 2008), bem como pela competição por interleucina-2 (IL-2), interferindo na maturação linfocitária (SAKAGUCHI et al., 1995).

Além de atuar na geração dos Tregs, foi demonstrado que as CEMs também são capazes de regular a proliferação dessas células (MELIEF et al., 2013) e o seu potencial de ação. Mais ainda, as CEMs controlam a resposta de linfócitos T auxiliares (CD4+), T citotóxicos (CD8+), Natural Killer (NK) e B reguladores (DI NICOLA et al., 2002). Por não expressarem o Complexo de Histocompatibilidade Humana II (MHC classe II), as CEMs possuem negatividade para o Antígeno Leucocitário Humano (HLA-DR) diminuindo consideravelmente seu grau de imunogenicidade (MAITRA et al., 2004).

A capacidade de secretar diversos fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatórias torna possível que a CEM crie um ambiente regenerativo em locais lesionados, impedindo a apoptose, estimulando a angiogênese, potencializando a mitose das células progenitoras do tecido, resultando em uma atividade trófica (CAPLAN., 2007).

1.2 Regeneração

Devido ao seu potencial de diferenciação em linhagens mesodérmicas bem estabelecido *in vitro*, os mecanismos biológicos envolvidos na propriedade regenerativa das CEMs vem sendo cada vez mais estudados. As CEMs possuem potencial regenerativo pela secreção de fatores de crescimento, como também por seu efeito migratório *in vitro* para regiões lesionadas (ambientes inflamados, situações de hipóxia, estresse oxidativo), que se dá através de quimiotaxia por superexpressão de citocinas e outras proteínas liberadas nesses processos lesivos, principalmente do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) (MOORE et al.,

2001), Fator de Crescimento derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF) (NG et al., 2008), Ligante 5 de Quimiocina CC (CCL5) e da interleucina 18 (IL-18) (WANG et al., 2002; SPRING et al., 2005).

A diferenciação das CEMs em células mesodérmicas pode ser realizada *in vitro*, a partir do uso de fatores estimulatórios específicos. Para a diferenciação adipogênica é necessário intervir durante o cultivo celular com insulina e isobutilmetilxantina (IBMX), um antagonista de receptor de adenosina e potente inibidor da fosfodiesterase. A osteogênese é possível através do uso de ácido ascórbico, 10% de soro fetal bovino (SFB), dexametasona e beta glicerol fosfato. Na diferenciação em condrócitos é necessário que as CEMs sejam cultivadas com estímulo de Fator de Crescimento Transformador Alfa (TGF- α) e na ausência de soro fetal bovino (SFB) (PITTENGER et al., 1999).

Destaca-se que o efeito regenerativo das CEMs pode estar atrelado não especificamente a sua capacidade de diferenciação, mas sim aos seus mecanismos imunomodulatórios (NAUTA; FIBBE., 2007), que auxiliam na diminuição da inflamação e desse modo permitem a cicatrização tecidual. A acentuada atividade da enzima telomerase (MARTIN et al., 2008) também indica alto potencial de renovação celular e de sobrevivência, contribuindo no processo de revascularização e remodelamento tecidual.

Em processos de cicatrizes hipertróficas e queloides, foi observado que CEMs de diferentes fontes diminuem a inflamação local e o excesso da deposição de fibroblastos e miofibroblastos em amostras de pele humana e em modelos experimentais, sendo percebido o sucesso tanto na prevenção da formação da cicatriz hipertrófica quanto no tratamento, resultando na diminuição de queloides (BOJANIC et al., 2021).

As CEMs estão sendo investigadas como terapia para desordens pulmonares e de forma promissora os estudos apresentaram diminuição da inflamação, melhora na angiogênese e funcionalidade pulmonar, também reduzindo a deposição anormal de tecido cicatricial que

resulta em fibrose pulmonar (LAI et al., 2015; MONSEL et al., 2015; ZHANG et al., 2019). Além do uso das CEMs, a avaliação das suas vesículas extracelulares demonstrou maior vascularização pulmonar e maior sobrevivência celular, sendo o VEGF considerado um fator crítico para o processo de diminuição da lesão pulmonar hiperóxica neonatal (CHANG et al., 2014; AHN et al., 2018).

Apesar das CEMs parecerem promissoras para terapias pulmonares, é importante ressaltar que, como mecanismo de primeira passagem e também pela alta atividade do sistema fagocitário mononuclear, ocorre aprisionamento pulmonar de 50-80% das CEMs após sua infusão intravenosa (FERRINI et al., 2021). Essa limitação fisiológica atrapalha o mecanismo de homing para locais lesionados, mas parece ser favorável em casos de doenças pulmonares.

O aprimoramento do potencial regenerativo e imunoregulador das CEMs vem sendo explorado na literatura ao longo das últimas décadas com o intuito de intensificar sua ação quando utilizada como terapia. A terapia com CEMs requer administração de grande quantidade de células (em média 1 milhão por quilo corporal, variando caso seja intravenoso, arterial ou intramuscular) (KELLER et al., 2018), o que justifica buscar maneiras de potencializar sua ação, diminuindo o excesso de expansão *in vitro* e aprimorando sua efetividade.

1.3 Otimização de CEMs e *priming* epigenético

Diversas metodologias como indução de hipóxia, licenciamento com fatores inflamatórios, drogas, uso de exossomos como terapia livre de célula, modelo de cultura tridimensional e *priming* epigenético vem sendo empregadas de modo a otimizar as propriedades funcionais das CEMs (NORONHA et al., 2019).

Do mesmo modo, formas estruturais distintas de cultivo das CEMs, como 2D e 3D, conferem diferentes resultados quanto à expressão de genes e potencialização das suas propriedades regenerativas e imunoreguladoras. Tais alterações decorrem de mudanças na

interação célula-célula, grau de complexidade e distribuição de nutrientes, o que modifica o microambiente celular (EDMONDSON et al., 2014).

Comumente, o cultivo 2D é utilizado por ser mais prático e por haver distribuição homogênea de nutrientes pela monocamada celular. Porém, o cultivo 3D possui maior semelhança ao que ocorre in vivo por evitar a indução de polaridade apical-basal que ocorre no modelo 2D (IHALAINEN et al., 2015), além de haver na literatura dados exibindo modificações estruturais nas células após infusão, mostrando a formação de pequenos agregados, o que modifica as propriedades biológicas das CEMs (JUNGWIRTH et al., 2018).

Por ser um modelo mais simples, estudos com a conformação 2D são majoritários na literatura e mostram maior potencial imunossupressor das CEMs frente ao modelo 3D, envolvendo inibição da proliferação de células T e diminuição da expressão de *IDO* (SILVA-CARVALHO et al., 2022).

Como otimização das CEMs, o *priming* epigenético é uma metodologia inovadora que permite a modulação da expressão gênica sem modificar a sequência de nucleotídeos (CHEN et al., 2017). Mecanismos como metilação, acetilação, sumoilação, ubiquitinação e fosforilação permitem um novo perfil de regulação transcricional e são alvos de estudo para o tratamento de diversas doenças (MOORE et al., 2013; SINGH et al., 2017; GALLAGHER et al., 2017). Neste trabalho, realizamos a inibição do processo de metilação através do uso do inibidor de DNA metiltransferase (DNMT), 5-Azacidina (5-Aza).

A metilação, através da DNMT, permite a inserção de grupamento metil em sequências de nucleotídeos citosina e guanina (ilhas CpG), realizando o importante papel de regulação gênica por estarem próximas a regiões promotoras, condensando a cromatina e bloqueando a ligação da RNA polimerase e, conseqüentemente, a transcrição gênica (JAENISCH., 1997). As DNMTs são subdivididas em duas principais funções: manutenção dos padrões de metilação pré-estabelecidos (DNMT1) e metilação de novas regiões do DNA (DNMT3A e 3B), sendo o

equilíbrio de ambos necessário para a viabilidade celular (OKANO et al., 1999; JURKOWSKA et al., 2011).

Dessa forma, neste trabalho, utilizamos o 5-Aza, um inibidor de DNMT1 empregado no tratamento de leucemias agudas e síndromes mielodisplásicas (DOMBRET et al., 2015; ORAN et al., 2020). O 5-Aza foi descoberto em 1964 e possui a interessante característica de ser um análogo da citosina (SORM et al., 1964). Nele, há a substituição do átomo de nitrogênio pelo carbono, conferindo propriedades biológicas únicas. Por ser um inibidor de DNMT1, sua atividade consiste em reativar genes que antes foram silenciados pela metilação e que podem estar relacionados à diferenciação celular e proliferação (KIZILTEPE et al., 2007; CHRISTMAN et al. 2002).

O 5-Aza possui como mecanismo de ação sua incorporação na fita de DNA, realizando ligações covalentes na DNMT ao longo do processo de replicação, bloqueando a adição do grupamento metil na posição 5 da citosina (JONES; TAYLOR et al., 1980). Estudos demonstram que o 5-Aza parece promover melhorias quanto ao processo de regeneração tecidual, como mostra o recente trabalho de Behnaz Ahmadi e colaboradores (2023), em que há ganho de potencial de miogênese no tecido esquelético de ratos. Também em ratos, o uso do 5-Aza promoveu melhora na capacidade regenerativa em lesões de pele, aumentando a expressão de TGF- β , importante citocina envolvida no crescimento, diferenciação e proliferação celular (GOMES et al., 2014; MORIKAWA et al., 2016).

Em pulmão, o uso do 5-Aza como agente hipometilante do transcrito FoxM1 resultou em maior reparo tecidual e proliferação endotelial em modelo de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) mediada por sepse, reduzindo IL-6 e TNF- α e garantindo maior sobrevida aos camundongos (HUANG et al., 2023).

De forma inovadora, o uso do 5-Aza liofilizado foi utilizado por Philip Kuehl e colaboradores (2020) como nova terapia para câncer de pulmão, mostrando que a inalação do pó confere diminuição de mitose tumoral de células CALU-3, CALU-6, H358 e RH2.

Os achados dos trabalhos supracitados indicam que 5-Aza pode potencializar vias anti-inflamatórias, bem como atuar em processos de regeneração tecidual, portanto, o *priming* com esse inibidor epigenético pode se tornar uma metodologia interessante de uso no aprimoramento das CEMs.

1.4 Aplicação clínica das CEMs

O uso de medicamentos à base de CEMs está aprovado na Coreia, Índia, Japão e Europa. Atualmente existem dois medicamentos aprovados para tratamento de fístula perianal relacionados a doença de Chron, sendo o darvadstrocel (Alofisel®) (GARCIA-OLMO et al., 2022) na Europa e Cupistem® na Coréia (WRIGHT et al., 2021). Também na Coréia, o tratamento do infarto agudo do miocárdio após angioplastia pode ser beneficiado pelo uso do Cellgram®-AMI, além do tratamento para osteoartrite degenerativa ou por trauma com Cartistem® (PARK et al., 2017).

Eficazes no processo de sustentação do tecido hematopoiético (RAAIJMAKERS et al., 2010), as CEM são utilizadas como uma ferramenta para impedir o desenvolvimento da doença do enxerto versus hospedeiro, após o transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas. Nesse contexto, as CEMs desempenham atividades imunomoduladoras em relação à tolerância do paciente ao transplante, autoimunidade e impedem o processo de evasão tumoral (NAUTA et al., 2007). Dessa forma, o Japão aprovou a comercialização do TEMCELL® HS, medicamento usado para atenuar a rejeição pós transplante de medula óssea (CUENDE et al., 2018).

Na Índia, houve a aprovação do medicamento Stempeucel® (GUPTA et al., 2016) para o tratamento da tromboangeíte obliterante ou doença de Buerger, angiopatia grave associada ao

tabagismo, com alta prevalência na região (60% dos casos segundo site orphanet). A injeção do Stempeucel® na musculatura isquêmica possibilitou cicatrização acelerada por promover aumento da angiogênese, além de atenuar gradualmente a dor e a pressão sistólica local, sendo considerado uma alternativa segura de tratamento.

As CEMs também estão sendo exploradas como terapia para desordens pulmonares, com estudos abordando displasia broncopulmonar (ASLAM et al., 2009), síndrome respiratória aguda grave (ASMUSSEN et al., 2014) e fibrose cística (LOI et al., 2006). O interesse pelo uso das CEMs se justifica por sua capacidade de remodelar o ambiente pulmonar, diminuindo a infiltração de citocinas pró-inflamatórias (PEDRAZZA et al., 2017) e favorecendo o processo de regeneração tecidual (BARCZYK et al., 2015).

Nessa linha, com o impacto da pandemia pelo coronavírus 2019 (COVID-19) em meados de 2020, diversas pesquisas foram conduzidas de modo a investigar se as CEMs poderiam ser uma alternativa terapêutica contra os danos pulmonares causados por essa doença (LIU et al., 2020; VERMA et al., 2021; HUANG et al., 2022).

1.5 COVID-19

Desde o surgimento da pandemia do COVID-19, a busca por terapias que não sejam apenas paliativas cresceu exponencialmente. Uso de anticorpos anti-receptor de IL-6 (SALAMA et al., 2021), antivirais como o Paxlovid (AMANI et al., 2022) e remdesivir (GRUNDEIS et al., 2023) e terapia com plasma convalescente (LI et al., 2020) são exemplos de estratégias utilizadas.

O vírus SARS-CoV2 possui como classificação taxonômica a família Coronaviridae, gênero Betacoronavirus, subgênero Sarbecovirus, espécie Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV). O material genético desse vírus consiste em RNA fita simples, envelopado, com diâmetro de até 120nm. A estrutura do SARS-CoV2 envolve a

expressão de quatro proteínas: nucleocapsídeo (N), glicoproteína de membrana (M), envelope (E) e espicular (S1 e S2) (TROYANO-HERNÁEZ et al., 2021).

A patogênese da COVID-19 está associada às vias de entrada do vírus nas células hospedeiras (Figura 1). A interação entre a proteína S e a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2), proteína de membrana expressa em uma variedade de células, permite que haja a internalização das partículas virais (ZHOU et al., 2020). ECA2 é uma variante da ECA1, responsável por controlar a pressão arterial convertendo angiotensina I em II, sendo um potente vasoconstritor. ECA2 possui função oposta ao ECA1, causando vasodilatação (LUBBE et al., 1979; EVANS et al., 2021).

A interação entre a proteína S e a ECA2 ocorre no modelo chave-fechadura e sua presença em células renais (NAVIS et al., 1996), hepáticas (MARJOT et al., 2021), endoteliais (VARGA et al., 2020) e cardíacas (NAVARATNARAJAH et al., 2021) fortalecem a virulência. Outro ponto interessante é que sua acoplagem a proteína S concede alterações no controle da pressão arterial (ZHANG et al., 2020). Estudos sugerem que a proteína S reduz a atividade da ECA2 (ZHANG et al., 2020). Dessa forma, há o acúmulo de angiotensina II e a sua função de contrabalançar a ação da ECA1 é limitada, potencializando a vasoconstrição e aumento da pressão arterial (FERRARIO et al., 2005).

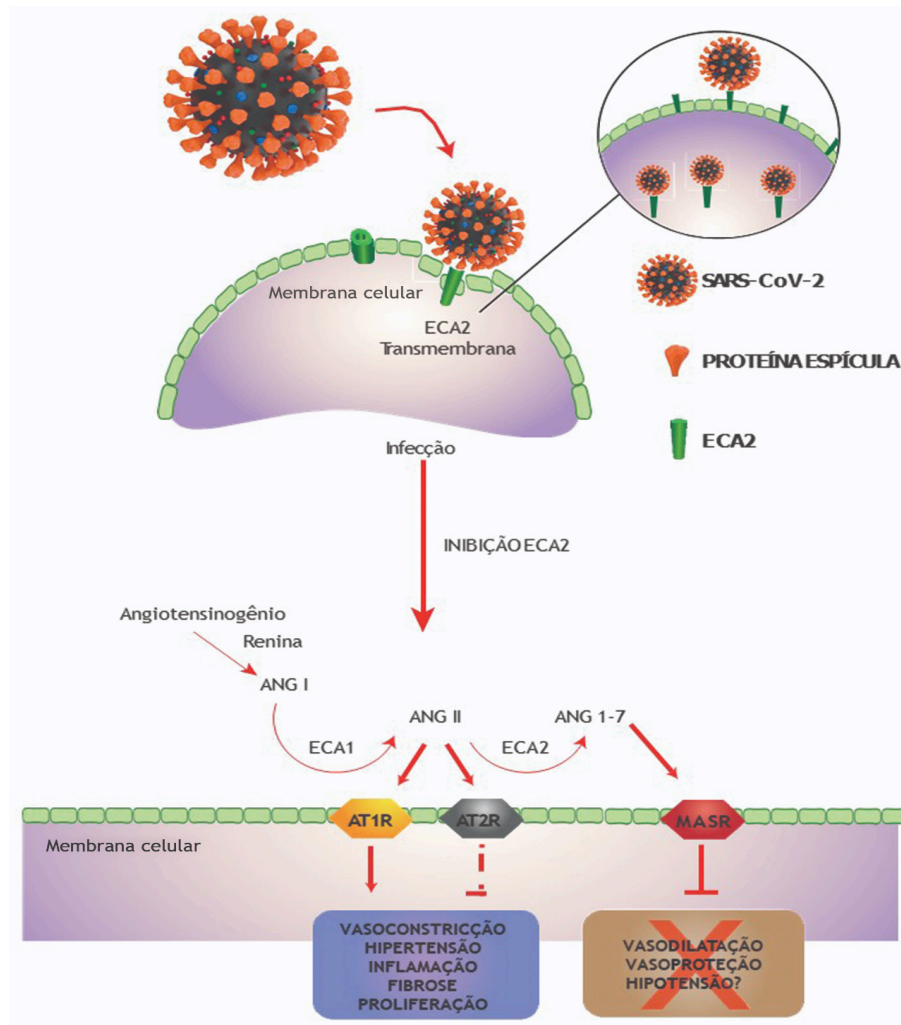


Figura 1: Entrada do vírus SARS-CoV2 a partir da interação com a enzima ECA2. Essa interação atenua a atividade da ECA2 reduzindo a ação das angiotensinas 1-7. AT21 = Receptor de angiotensina 1. ATR2= Receptor de angiotensina 2. MASR = receptor MAS da angiotensina 1-7. **Fonte:** BRANDÃO et al., 2020.

Ademais, durante o processo de internalização do vírus após a acoplagem da proteína S, foi descoberto que proteases humanas atuam como facilitadoras. A serina protease ligada à transmembrana tipo II (TMPRSS2) age de forma sinérgica para potencializar a infectividade do SARS-CoV2. A clivagem da proteína S em S1 e S2, unidas por ligações que não são covalentes, acontece mediante ação da TMPRSS2 e essa mudança conformacional nas subunidades S1 e S2 permite a exposição do seu domínio de ligação ao receptor (RBD) (TANG

et al., 2020) e do sítio proteolítico com atividade de fusão, respectivamente, que facilita a fusão entre o envelope viral e a membrana celular (receptor de ECA2) (LU et al., 2015).

A proteína TMPRSS2 é um zimógeno expresso nas células do trato respiratório, sistema digestório e próstata, sendo mais expressa em fumantes (SAHEB et al., 2020; THUNDERS et al., 2020). Células que possuem dupla expressão de ECA2 e TMPRSS2 são mais suscetíveis a infecção pelo SARS-CoV2. Caso a clivagem da proteína S ocorra antes da sua acoplagem à célula, sua infectividade será reduzida (SHAPIRA et al., 2022).

A proteína S é fundamental na patogênese, pois além de participar do processo de reconhecimento pela célula hospedeira, ela também sofre diversas mutações que acarretam em novas variantes (TYRKALSKA et al., 2022). Foi relatado que a proteína S está envolvida na inflamação causada pelo SARS-CoV2 por danificar a integridade das células endoteliais, aumentando a produção de citocinas como TNF α , interleucina 1 β (IL-1 β) e IL-6 por intermédio da via NF- κ B, bem como o aumento da expressão de Fator Tecidual (FT) e Fator 8 (FVIII), desenvolvendo um quadro inflamatório e pró-coagulante. Esses relatos foram observados tanto *in vitro* (Células HUVEC) como em camundongos (ROBLES et al., 2022). A proteína S também estimulou a produção de fatores pró-apoptóticos e citocinas pró-inflamatórias em pericitos cardíacos humanos (AVOLIO et al., 2021).

Enquanto a proteína S desempenha papel chave na patogênese da COVID-19, a proteína N participa de forma conjunta com a proteína M no ciclo de vida do vírus, atuando na montagem da estrutura viral e empacotamento do RNA viral para produção de novos vírions (YADAV et al., 2021) Além disso, curiosamente, observou-se que a proteína N suprime a ativação da piroptose, embora favoreça os mecanismos de apoptose. A infecção pelo SARS-CoV2 causa ativação de caspase-1 (CASP1) e de NLRP3, fatores essenciais para a ativação do inflamossoma, resultando na formação de poros na membrana celular durante a piroptose. Foi observado que proteína N se liga a gasdermina, impedindo sua clivagem e a

ativação da CASP1 (WANG et al., 2022). Mais ainda, a interação entre as proteínas N e M induz regulação negativa de PDK1-PKB/Akt, importante via antiapoptótica, sendo a proteína N um potencializador deste processo regulatório (REN et al., 2021).

A imunopatologia da COVID-19 causa desequilíbrio da homeostase pulmonar. O vírus infecta as células epiteliais alveolares planas e finas do tipo 1 e 2 (AT1 e AT2) que são responsáveis por realizar a diapedese e produzir surfactantes, respectivamente, ocasionando apoptose e outros tipos de morte celular, sobretudo nas células AT2 por terem maior expressão de ECA2 (GUMASHTA et al., 2020).

A morte celular junto aos mecanismos de virulência desencadeia a ativação do processo inflamatório (WANG et al., 2020). A disfunção alveolar é caracterizada por inflamação vascular, ruptura de células endoteliais, edema com presença de infiltrado de células mononucleares bloqueando a diapedese e causando a falta de ar (ACKERMANN et al., 2020). As células infectadas são reconhecidas por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) e causam a ativação de diversas interleucinas associadas à inflamação, como interleucina 1 (IL-1), IL-6 e principalmente a produção de TNF- α e interferon gama (IFN- γ) que intensificam a febre e a atividade fagocítica (TUFAN et al., 2020).

O IFN- γ e o TNF- α são citocinas extensivamente produzidas durante a infecção pelo SARS-CoV2 e levam ao desenvolvimento da Panoptose, um tipo de morte celular difusa que engloba apoptose, piroptose e necroptose (CHRISTGEN et al., 2020; JOSE et al., 2020). Foi relatado que a sinergia entre essas citocinas é responsável pelo agravamento do quadro clínico da COVID-19 (MEHTA et al., 2020), aumentando a produção de marcadores como Lactato Desidrogenase (DHL), Proteína C Reativa (PCR), transaminases (ALT e AST), ferritina e aumento de hematócrito, induzindo o paciente a um estado inflamatório grave (KARKI et al., 2021).

A destruição do tecido pulmonar pelo excesso de interleucinas pró-inflamatórias, edema, infecções secundárias, danos ao epitélio alveolar e capilar pulmonar e fibrose, acarreta no aparecimento do padrão de “vidro-fosco” na tomografia computadorizada, diminuindo, portanto, a expansividade, diapedese e função pulmonar (TIAN et al., 2020).

Como mencionado anteriormente, as CEMs vêm sendo estudadas como possível estratégia de tratamento para as lesões pulmonares causadas pela COVID-19 (ALZHRANI et al., 2020), contando com 93 estudos clínicos listados no ClinicalTrials.gov (abril, 2024). É importante ressaltar que a infusão de CEMs tem se mostrado segura, bem tolerada, sem relatos de complicações graves associadas (MENG et al., 2020; ABU-EL-RUB et al., 2021).

1.6 Aplicação clínica das CEMs na COVID-19

Recentemente, diversos estudos foram realizados para testar as CEMs ou seus produtos no tratamento da COVID-19 (CARVALHO et al., 2021). Por exemplo, um ensaio clínico realizado no hospital Huangshi de Medicina Tradicional Chinesa analisou a eficácia da terapia intravenosa com CEMs de cordão umbilical (2×10^6 células/kg) em pacientes com COVID-19 grave. Foi relatado que em relação ao grupo controle, o tratamento com as CEMs de cordão umbilical resultou em melhora expressiva da fadiga, falta de ar e dessaturação. Houve redução de IL-6 e PCR, sendo evidente a diminuição da inflamação pulmonar analisada por tomografia computadorizada, principalmente após o 7º dia de infusão (SHU et al., 2020).

Utilizando CEMs derivadas de sangue menstrual (9×10^7 células/kg), o trabalho de Xiao Wei Xu e colaboradores, em 2021, constatou melhora significativa da saturação de oxigênio, exames de imagem, além de alívio imediato da falta de ar após o primeiro dia de infusão, com 85% dos pacientes obtendo um desfecho clínico favorável ao final do mês de tratamento (CEMs + medicamentos) em comparação aos 50% do grupo tratado com apenas medicamentos convencionais.

Também foi relatado o sucesso da terapia com CEMs no estudo de Sadeghi e colaboradores, em 2021, utilizando as CEMs derivadas da placenta (1×10^6 células/kg) para tratamento da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) causada por COVID-19. Neste estudo, foi avaliado principalmente o impacto das CEM na tempestade de citocinas, havendo importante diminuição da produção de IL-6, ligante de quimiocina 12 (CCL12), PCR e Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (G-CSF) após o uso das CEMs.

Com base nos estudos supracitados é possível sugerir que há eficiência na terapia com CEMs na COVID-19. Alguns estudos abordam que a CEM é capaz de reduzir a morte celular, mas esse processo ainda não está claro na COVID-19 (NAJI et al., 2019; SAULER et al., 2019). É bem estabelecido que as CEMs possuem capacidade de atenuar quadros fibróticos promovendo angiogênese (EL-AGHA et al., 2017), mas em se tratando de pulmão, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda são pouco conhecidos.

Com a finalidade de esclarecer as limitações mencionadas, e sabendo que são necessárias milhares de células por Kg corporal para uso clínico, e que a expansão *in vitro* gera senescência replicativa, este trabalho utiliza o cultivo 3D e o *priming* epigenético com 5-Aza como metodologias de otimização das CEMs, e posteriormente, a utiliza como tratamento em um modelo de inflamação pulmonar causado pela combinação das proteínas S e N do SARS-CoV2 e da citocina pró-inflamatória IFN- γ em células CALU-3.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Definir um modelo de cultivo e uma estratégia de licenciamento epigenético das CEMs para testar o potencial desse modelo em regenerar células pulmonares expostas aos antígenos do SARS-CoV2.

2.2 Objetivos específicos:

ETAPA I- Avaliação do *priming* epigenético como potencializador das propriedades regenerativas das CEMs.

- Caracterizar o perfil fenotípico das CEMs de tecido adiposo;
- Caracterizar o impacto do inibidor epigenético no perfil regenerativo das CEMs;

ETAPA II- Confeção de esferoides como potencializador das CEMs.

- Confeccionar esferoides de CEMs e caracterizá-los;
- Avaliar o potencial regenerativo dos esferoides de CEMs;
- Comparar a expressão de genes regenerativos e de pluripotência em CEMs cultivadas em modelo 2D e 3D;

ETAPA III- Uso de CEMs licenciadas com 5-Aza e em formato 3D em modelo de injúria produzido em células CALU-3 expostas aos antígenos NS do SARS-CoV2 e IFN- γ .

- Estabelecer um modelo de inflamação e morte celular a partir de proteínas que compõem o vírus SARS-CoV2, utilizando como célula pulmonar a CALU-3;
- Avaliar o impacto regenerativo das CEMs submetidas ao *priming* epigenético sobre células CALU-3 expostas aos antígenos do SARS-CoV2 e IFN- γ .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das CEMs

As CEMs utilizadas neste estudo foram isoladas a partir do procedimento de lipoaspiração realizado na clínica Carpaneda de Cirurgia Plástica (Brasília, DF). Para isso, a gordura foi submetida a lavagem com PBS com 100µg/ml estreptomicina e 100µg/ml penicilina (1% ATB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por duas vezes, e centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm. O processo de digestão enzimática da gordura foi realizado durante 30 minutos com 1mg/mL de colagenase tipo IA na proporção de 1:1. Após a digestão, a colagenase foi inativada utilizando meio alfa-mínimo essencial (α -MEM) (Gibco, Waltham, MA, EUA) com 15% Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de ATB. Posteriormente, o material digerido foi centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspendido em α -MEM com 15% SFB e 1% de ATB, e distribuído em garrafas de cultivo celular de 75cm² para a expansão das células.

3.2 Cultivo celular

As CEMs foram cultivadas em garrafas específicas para cultivo celular de 75cm², em meio α -MEM acrescido de 15% SFB e 1% ATB, ocorrendo a troca do meio a cada 48h. Para utilização das células nos experimentos subsequentes, houve o processo de dissociação com tripsina 0,05% (Gibco). As células utilizadas nesse estudo estavam entre a 3^a e 6^a passagem. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde.

3.3 Caracterização fenotípica

A caracterização imunofenotípica das CEMs foi realizada seguindo a preconização da Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006), por uso do Kit *Human MSC Analysis* (BD Biosciences). Para isso, as CEMs foram marcadas com anticorpos específicos para CD44, CD73, CD90 e CD105. Como marcadores negativos, foram avaliados: CD11b, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR. A intensidade de marcação dos anticorpos supracitados foi avaliada no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, East Rutherford, NJ, EUA), mediante aquisição de 10.000 eventos. Os dados foram analisados no software FlowJo 10.0.7 (FlowJo LLC, USA).

3.4 Confeção dos esferoides de CEMs

Para preparar os esferoides de CEMs utilizamos 70 μ L de agarose filtrada, preparada em meio α -MEM sem SFB e com 1% ATB para revestir os poços da placa de 96 poços (FRIEDRICH et al., 2009). Após 30 minutos de secagem em luz ultravioleta (UV), as placas foram armazenadas ao abrigo da luz por 24h. Posteriormente, foram plaqueadas 25.000 CEMs em 200 μ L de meio α -MEM com 1% de ATB e 15% de SFB e a placa foi mantida em incubadora por 72h, tempo necessário para compactação total das células em esferoides.

3.5 Caracterização dos esferoides por microscopia eletrônica de varredura

Os esferoides de CEMs foram caracterizados com relação a morfologia e tamanho através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), no Instituto de Biologia-UnB (IB-UnB). Após a formação, os esferoides foram armazenados por 24h em solução de Karnovsky. Em seguida, os esferoides passaram por etapas de fixação com tetróxido de ósmio, desidratação com concentrações crescentes de acetona, secagem com CO² e metalização com ouro. A aquisição das imagens ocorreu em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM

7001F), com apoio da Ingrid Gracielle Martins, técnica do Laboratório de Microscopia e Microanálise/IB.

3.6 *Priming* epigenético

Para realizar a modulação epigenética, foi utilizado o agente hipometilante 5-Azacitidina (5-Aza, Sigma-Aldrich), por 72h, em doses de 5 μ M e 10 μ M. (FASOLINO et al., 2017; JOSHI et al., 2018; KADEKAR et al., 2020; BAGHERI et al., 2021; AHMADI et al., 2023).

3.7 Ensaio de viabilidade celular

Usamos a técnica de MTT {brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio]} para avaliar se a ação inflamatória (ROBLES et al., 2022) e apoptótica (REN et al., 2021) mediada pela as proteínas estruturais NS do SARS-CoV2 (Nucleocapsid/Spike Protein (RBD) Recombinant Protein) (Thermo Fisher) na concentração de 2 μ g/mL compromete a viabilidade da célula CALU-3. Para isso, 5000 células CALU-3 foram plaqueadas em placa de 96 poços com 100 μ L de Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% de SBF e 1% ATB. Após 48h e 72h, 10 μ L de MTT (5mg/mL) foram acrescentados nos poços e as placas foram incubadas por 4h a 37^oC, protegidas da luz. Após esse período, o meio de cultura com MTT foi cuidadosamente removido e substituído por dimetilsulfóxido (DMSO) para promover a dissolução dos cristais de formazan. A absorbância foi quantificada através do espectrofotômetro de placa Multiskan FC (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a 570nm.

Também avaliamos pela mesma metodologia supracitada, em células CALU-3, se as doses de 10, 25 e 50ng/mL de IFN- γ seriam citotóxicas em 48h e 72h.

3.8 Produção de meio condicionado

Para obtenção do meio condicionado, $2,9 \times 10^5$ CEMs expostas ou não a $10 \mu\text{M}$ do inibidor 5-Aza foram mantidas em cultura com $2.900 \mu\text{L}$ de meio α -MEM com 15% de SFB e 1% de ATB. Após esse período, o meio foi descartado, as células foram lavadas 3x com PBS e o meio α -MEM sem SFB com 1% ATB foi acrescentado ao cultivo por 48h. Posteriormente, o sobrenadante (meio condicionado) foi recolhido, filtrado em filtro com poros de $0,22 \mu\text{m}$ e armazenado em freezer -80°C até a sua utilização.

3.9 Ensaio de proliferação celular

Para avaliar se o inibidor 5-Aza poderia modular a proliferação das CEMs, essas células foram marcadas com $10 \mu\text{M}$ do marcador éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE). Em suma, após a marcação com CFSE, 5×10^4 células foram plaqueadas em placas 24 poços em $500 \mu\text{L}$ de meio α -MEM com 15% SFB e 1% ATB, tratadas ou não com $10 \mu\text{M}$ de concentração do inibidor 5-Aza e mantidas em cultura por 72 horas. Após esse período, as células foram recolhidas e 10.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSVerse (IB/UnB). Os dados foram analisados no software FlowJo 10.0.7 (FlowJo LLC, USA).

3.10 Ensaio de migração de fibroblastos

Para avaliar se o *priming* epigenético com o inibidor 5-Aza poderia modular o potencial regenerativo das CEMs, realizamos um ensaio de migração celular com fibroblastos. Para isso, fibroblastos da derme de linhagem primária, gentilmente cedidos pela professora Dra. Juliana Lott de Carvalho (Faculdade de Medicina, UnB), foram cultivados com o meio condicionado obtido de CEMs 2D e 3D, previamente expostas ou não a $10 \mu\text{M}$ de 5-Aza. Após os fibroblastos plaqueados na placa de 12 poços atingirem a confluência, com o auxílio da ponteira p200, foi realizado um risco no centro dos poços. Em seguida, realizamos três vezes a lavagem das

células com PBS a fim de retirar as que descolaram após o risco e remover o SFB. Neste momento, adicionamos o meio condicionado das CEMs e acompanhamos o processo de migração dos fibroblastos, através da captação de imagem a cada 12h de experimento, utilizando o microscópio Primo Vert (Carl Zeiss). A análise das imagens foi realizada no software ImageJ combinado ao algoritmo Fiji (SCHINDELIN et al., 2012).

3.11 Ensaio de apoptose celular

Para identificar se o 5-Aza poderia comprometer a viabilidade das CEMs, essas células foram marcadas com anexina V e iodeto de propídio (PI) e analisadas por citômetro de fluxo. Em suma, 5×10^4 células foram plaqueadas em placa de 24 poços com 500 μ L de meio α -MEM com 15%SFB e 1% ATB. Após 72h, as células foram recolhidas por uso de accutase (Gibco), lavadas com PBS e marcadas com Anexina V-FITC e PI. A análise ocorreu no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, East Rutherford, NJ, EUA) nos canais FL1 e FL2, mediante aquisição de 10.000 eventos. A análise dos dados foi realizada no software FlowJo 10.0.7 (FlowJo LLC, USA).

3.12 Ensaio de liberação de Lactato Desidrogenase (DHL)

Avaliamos a liberação de LDH pelas CEMs submetidas ao *priming* epigenético com 5-Aza nos modelos 2D e 3D, através do *kit Cytotox 96* (ThermoFisher), conforme as instruções do fabricante. Para isso, após cultivo celular, 100 μ L de sobrenadante das CEMs expostas ou não ao 5-Aza foram recolhidos para determinação da liberação de LDH. Esses 100 μ L foram dispostos na placa de 96 poços. Posteriormente, foi acrescentado 50 μ L do *reaction mixture* nos poços com sobrenadante e a placa foi protegida da luz e armazenada à temperatura ambiente por 30 minutos. Para interromper a reação, foi acrescentado 50 μ L de *stop solution*. A leitura foi

realizada no espectrofotômetro de placa DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter), a 490 nm, sendo a absorbância do branco descontada da absorbância das amostras.

O ensaio de LDH também foi realizado nas células CALU-3 buscando avaliar se haveria aumento da liberação desta enzima após o uso da combinação de 50ng/mL de IFN- γ com 2ug/mL do antígeno NS, em 48h e 72h. A metodologia para detecção do LDH foi a mesma supracitada.

3.13 Caspase 3/7 por luminescência

Para avaliar se as CEMs submetidas ao *priming* com 10 μ M de 5-Aza eram capazes de modular a morte celular e a atividade das caspases 3/7 em células pulmonares CALU-3 expostas ao antígeno NS do SARS-CoV2 e IFN- γ , utilizamos o kit Caspase-Glo® 3/7 (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 5000 células CALU-3 foram plaqueadas em placa de 96 poços com fundo branco, com 100 μ L de DMEM 10% SFB e 1% ATB. No dia seguinte, as células foram expostas a 2ug/mL do antígeno NS do SARS-CoV2 (SARS-CoV-2 Nucleocapsid/Spike Protein (RBD) Recombinant Protein) (ThermoFisher) e a 50ng/mL de IFN- γ e receberam como tratamento 100 μ L do meio condicionado das CEMs 3D submetidas ou não ao *priming* epigenético. Após 72h, foi adicionado 100 μ L do *Caspase-Glo® 3/7 Reagent* e a placa foi protegida da luz por 1h, em temperatura ambiente. Posteriormente, a leitura do sinal de luminescência ocorreu no equipamento GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader (Promega) do Laboratório de Baculovírus-IB, UnB.

3.14 Extração de ácido ribonucléico (RNA) e transcrição para cDNA

Para melhor caracterizar os eventos moleculares envolvidos nos desfechos funcionais observados nesse estudo, realizamos a extração de RNA das células CEMs, fibroblastos e da

linhagem CALU-3. As extrações foram realizadas por uso de TRI Reagent (Sigma-Aldrich), conforme as recomendações do fabricante.

Após a obtenção do RNA, analisamos a qualidade do material e o quantificamos utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ One (Thermo Fisher). Posteriormente, utilizamos 1000 ng de RNA para a síntese do cDNA, por uso do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher).

3.15 PCR em tempo real (qPCR)

Analisamos o perfil de expressão de genes relacionados a processos regenerativos, imunológicos, de pluripotência e de morte celular, através da técnica de PCR em tempo real (qPCR). Os primers utilizados neste estudo foram desenhados e validados no Laboratório de Hematologia e Células-Tronco da Faculdade de Ciências da Saúde (LHCT-FS/UnB). As reações ocorreram em duplicata e foram desenvolvidas pela metodologia SYBR Green (Thermo Fisher), no equipamento QuantStudio 1 (Thermo Fisher).

Para normalizar os resultados, utilizamos o gene endógeno Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*). As análises ocorreram pela metodologia 2^{-DDCT} (LIVAK et al., 2001), utilizando a média das amostras do grupo controle como referência.

3.16 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA). A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade Shapiro-wilk e, posteriormente, os dados foram submetidos à análise de assimetria e curtose. Dados paramétricos distribuídos em dois grupos experimentais foram avaliados pelo teste t de Student e para comparação de três ou mais grupos experimentais, utilizamos

ANOVA. Dados não-paramétricos foram analisados por Mann-Whitney quando envolviam dois grupos experimentais ou por Kruskal-Wallis para três ou mais grupos experimentais.

Valores de $p \leq 0.05$ foram considerados como estatisticamente significativos e os resultados foram apresentados como Média \pm Desvio Padrão.

4. RESULTADOS

ETAPA 1: Avaliação do *priming* epigenético como potencializador das propriedades regenerativas das CEMs.

4.1 Fenótipo das CEMs de tecido adiposo com e sem *priming* epigenético

As CEMs utilizadas neste trabalho apresentaram perfil fenotípico clássico, com positividade para CD44 (99,1%), CD73 (98,2%), CD90 (94,5%) e CD105 (96,6%) (Figura 2).

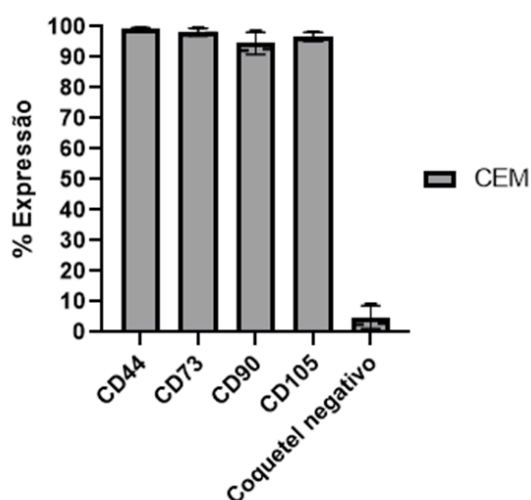


Figura 2: Perfil fenotípico de CEMs de tecido adiposo. Apresentação representativa de uma CEM de tecido adiposo utilizada neste estudo, com fenótipo positivo para os marcadores CD44, CD73, CD90 e CD105 avaliados por citometria de fluxo.

Para utilizar o 5-Aza como modelo de *priming* epigenético nesse estudo, avaliamos se esse inibidor epigenético poderia alterar o fenótipo clássico das CEMs. Como pode ser visto na figura 3, a expressão de CD44, CD73, CD90 e CD105 não é modificada após o uso do 10 μ M de 5-Aza.

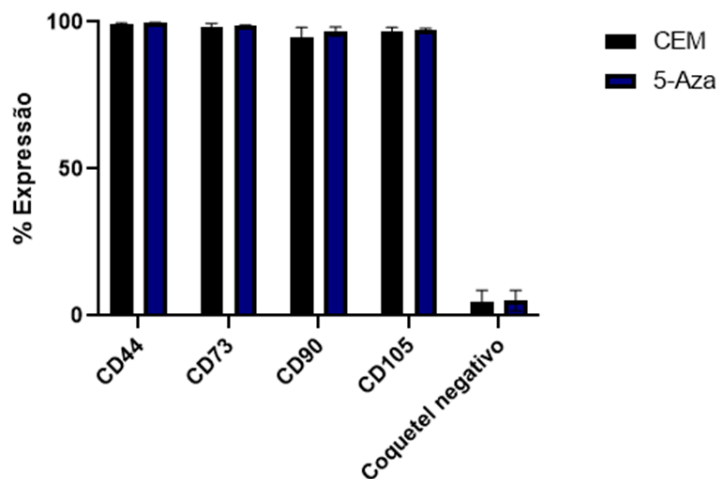


Figura 3: Painel fenotípico da CEM de tecido adiposo após *priming* epigenético com 10 μ M de 5-Aza por 72h. O gráfico demonstra não haver diferença entre a expressão dos marcadores CD44, CD73, CD90 e CD105 na CEM com 5-Aza em relação a CEM controle.

4.2 O *priming* epigenético com 5-Aza por 72 horas modula a expressão de transcritos envolvidos em regeneração e imunossupressão nas CEMs

Avaliamos o efeito modulador do 5-Aza na expressão do gene *VEGF*, principal gene associado ao processo de regeneração de tecidos endoteliais (BERNATCHEZ et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2014). Para isso, testamos os tempos de *priming* epigenético por 24h e 72h e as concentrações 5 μ M e 10 μ M. Importante, o uso de 10 μ M de 5-Aza por 72h realçou a expressão do *VEGF* ($p=0.02$) (Figura 4).

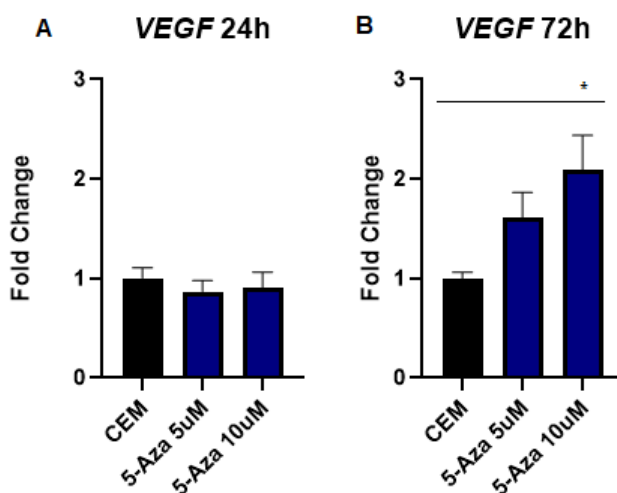


Figura 4: Expressão do gene *VEGF* nas CEMs submetidas a diferentes estratégias de *priming* epigenético.

Expressão por qPCR de *VEGF* por 24h (A) e 72h (B) em CEMs tratadas com 5-Aza (5 μ M e 10 μ M). Os grupos controle (CEMs não tratadas) foram usados como referência na análise. O grupo tratado com 10 μ M de 5-Aza por 72h apresentou maior expressão de *VEGF*, comparando com o grupo controle (CEM). * significa $p \leq 0.05$.

Considerando os dados preliminares obtidos, mostrando que 10 μ M de 5-Aza por 72h é capaz de realçar a expressão de *VEGF* nas CEMs, nós avaliamos se essa estratégia de *priming* poderia modular genes adicionais relacionados à resposta imune (*PDL-1*, *IL-10* e *IDO*), pluripotência (*KLF4*, *SOX2*, *cMyc* e *OCT4*) e regeneração celular (*EGF*, *ANGPT1* e 2). Importante, evidenciamos que além de modular fatores anti-inflamatórios com *IDO* ($p=0.5$) e *IL-10* ($p=0.05$), o *priming* das CEMs com 10 μ M de 5-Aza foi capaz de realçar os níveis transcricionais de mediadores regenerativos como, *EGF* ($p=0.05$), *ANGPT1* ($p=0.05$), *ANGPT2* ($p=0.05$) e de *SOX2* ($p=0.02$) (Figura 5).

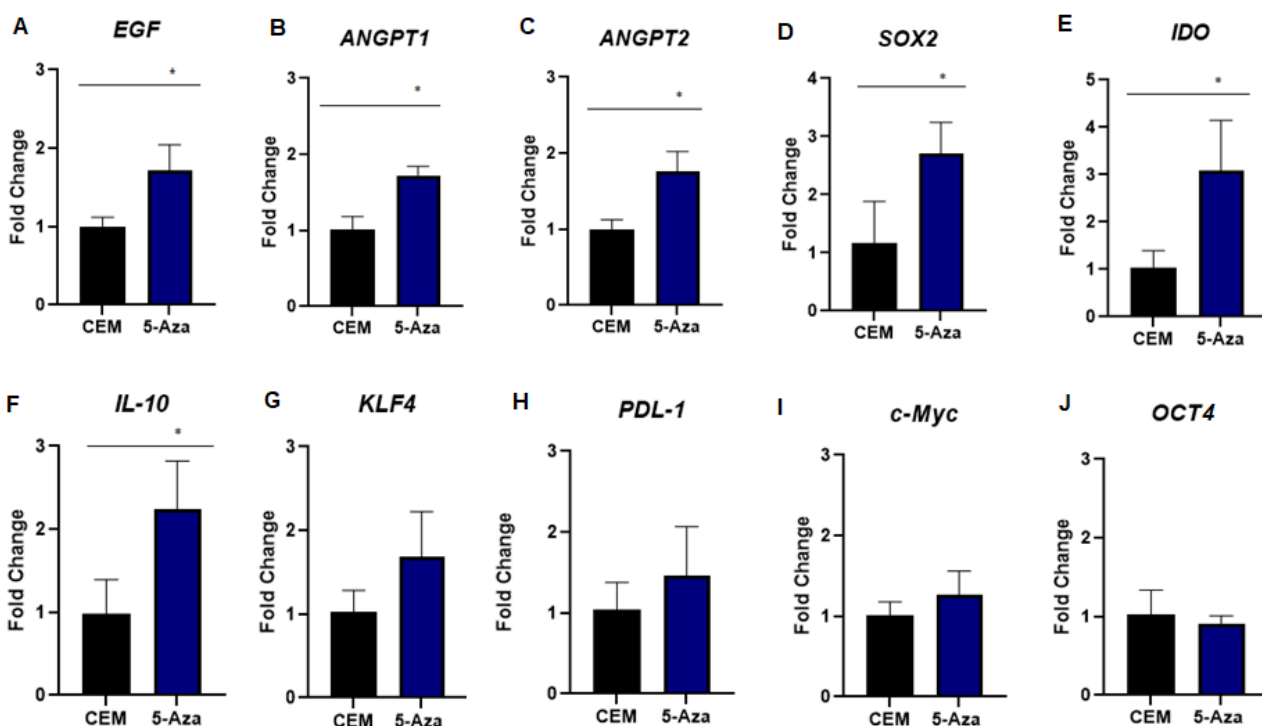


Figura 5: Análise de expressão gênica. CEMs submetidas ao *priming* com 10 μ M de 5-Aza foram avaliadas quanto à expressão dos genes *EGF* (A), *ANGPT1* (B), *ANGPT2* (C), *SOX2* (D), *IDO* (E), *IL-10* (F), *KLF4* (G), *PDL-1* (H), *c-Myc* (I) e *OCT4* (J). As CEMs apresentaram maior expressão dos genes *EGF*, *ANGPT1*, *ANGPT2*,

SOX-2, *IDO*, e *IL-10*. após 5-Aza. Os resultados foram normalizados para expressão do gene endógeno *GAPDH*. * significa $p \leq 0.05$.

4.3 O *priming* epigenético com 5-Aza não compromete a viabilidade das CEMs

Realizamos os ensaios de anexina V e PI e dosagem de DHL para avaliar se o tratamento com 10 μ M de 5-Aza poderia causar morte celular na concentração utilizada neste trabalho. De fato, a exposição ao 5-Aza não compromete a viabilidade das CEMs (Figura 6).

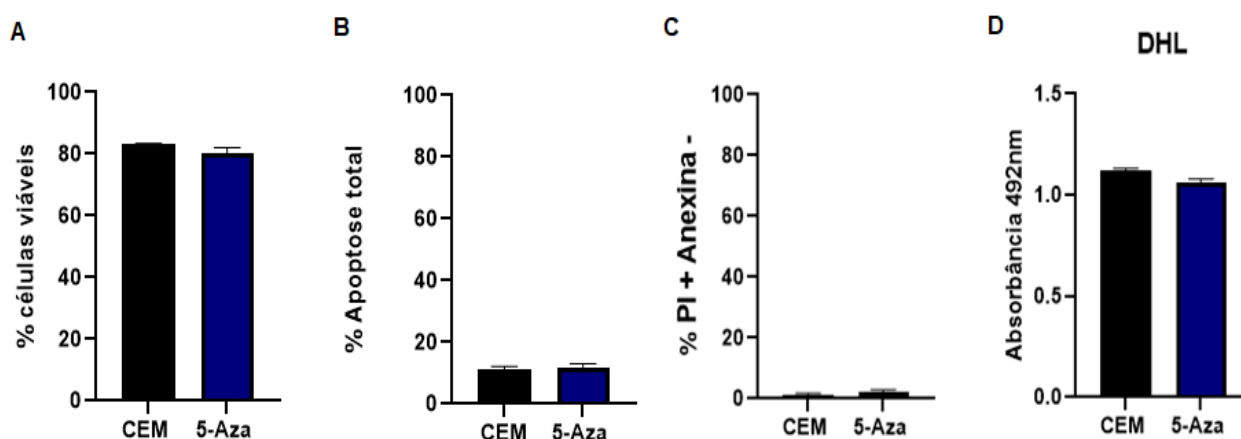


Figura 6: Análise de morte celular. CEMs expostas a 10 μ M de 5-Aza foram avaliadas quanto à marcação com Anexina V/PI (A-C) e liberação de DHL (D), indicando ausência de lesão a nível de membrana celular e nuclear.

4.4 O *priming* com 5-Aza aumenta a proliferação das CEMs

Avaliamos se a proliferação celular das CEMs seria potencializada após o uso de 10 μ M de 5-Aza. Como pode ser visto na figura 6, o uso de 5-Aza como estratégia de *priming* foi capaz de realçar significativamente a proliferação das CEMs em todos os tempos observados, 24h ($p=0.05$), 72h ($p=0.05$) e 120h ($p=0.05$) (Figura 7).

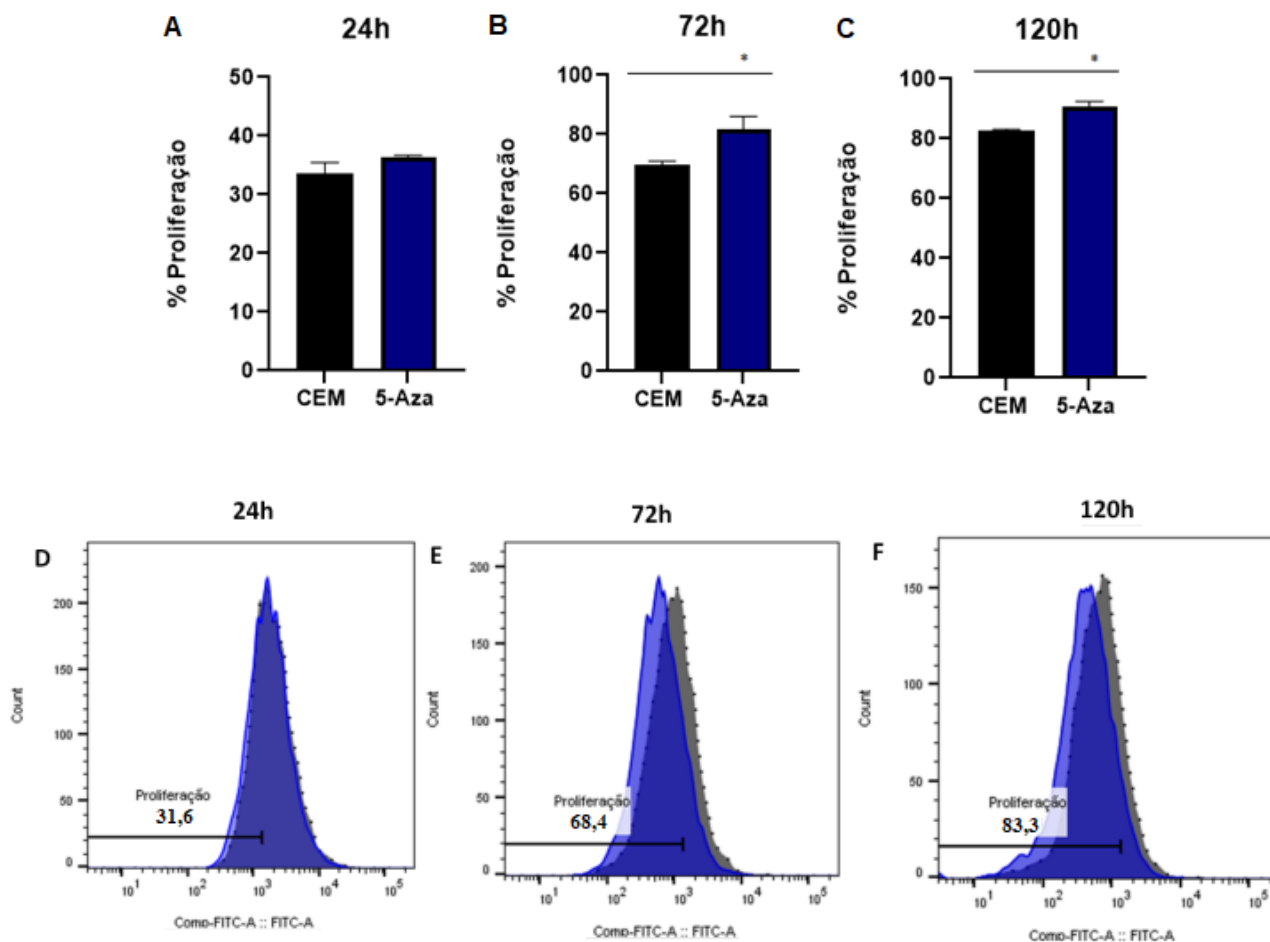


Figura 7: Análise da proliferação celular com CFSE. As CEMs tratadas com 10 μ M de 5-Aza por 72h apresentaram maior capacidade proliferativa, quando comparado ao grupo controle nos tempos 24h (A), 72h (B) e 120h (C) de experimento. As imagens D, E e F mostram de forma respectiva os histogramas representativos de 24h, 72h e 120h. * significa $p \leq 0.05$.

4.5 5-Aza não realça o potencial migratório das CEMs

Considerando a ampla modulação molecular observada nas CEMs após *priming* com 10 μ M de 5-Aza, investigamos se essa estratégia poderia modular funcionalmente propriedades regenerativas das CEMs. Inicialmente, avaliamos o potencial migratório das CEMs. Evidente na figura 8, não identificamos diferenças estatisticamente significativas no potencial migratório das CEMs submetidas ao *priming* com 5-Aza, em relação ao grupo controle.

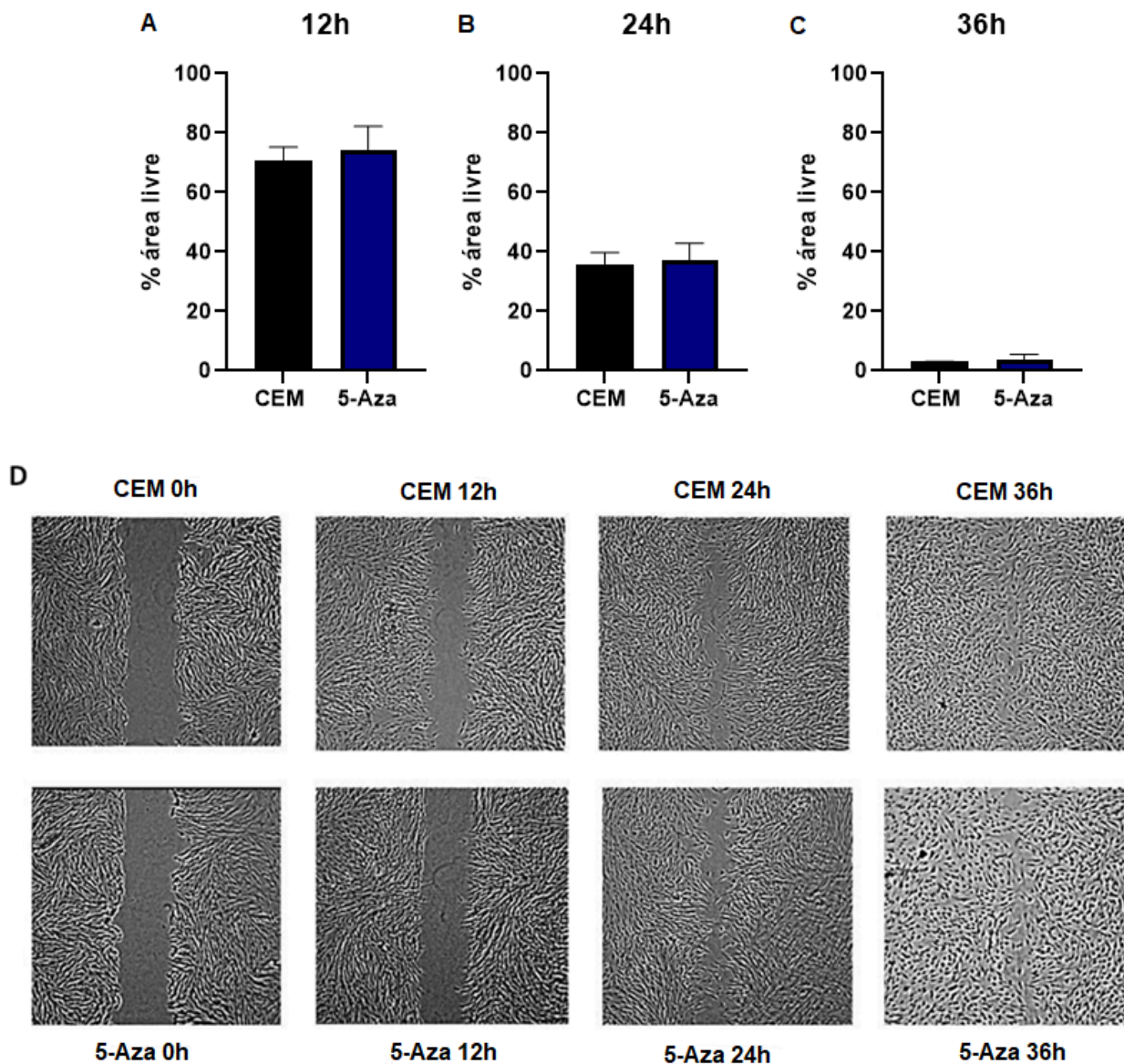


Figura 8: Ensaio de migração com CEM. CEMs controle e licenciadas com $10\mu\text{M}$ de 5-Aza foram avaliadas quanto ao potencial migratório em 12h (A), 24h (B) e 36h (C) de cultivo. (D) Imagens representativas do experimento demonstram que não há diferença em relação à migração das CEMs em ambas as condições experimentais.

ETAPA II: Confecção de esferoides como potencializador das CEMs.

4.6 Produção de esferoides

A fim de compararmos os efeitos do 5-Aza nos modelos 2D e 3D de cultivo celular, inicialmente produzimos esferoides a partir das CEMs fenotipadas e analisamos sua morfologia através do microscópio Primo Vert (Carl Zeiss) com aumento de 100x (Figura 9 A e B), e por microscopia eletrônica de transmissão (MEV). Por MEV, obtivemos o diâmetro do esferoides controle e tratado com 10 μ M de 5-Aza, com 410nm (C) e 450nm (D), respectivamente.

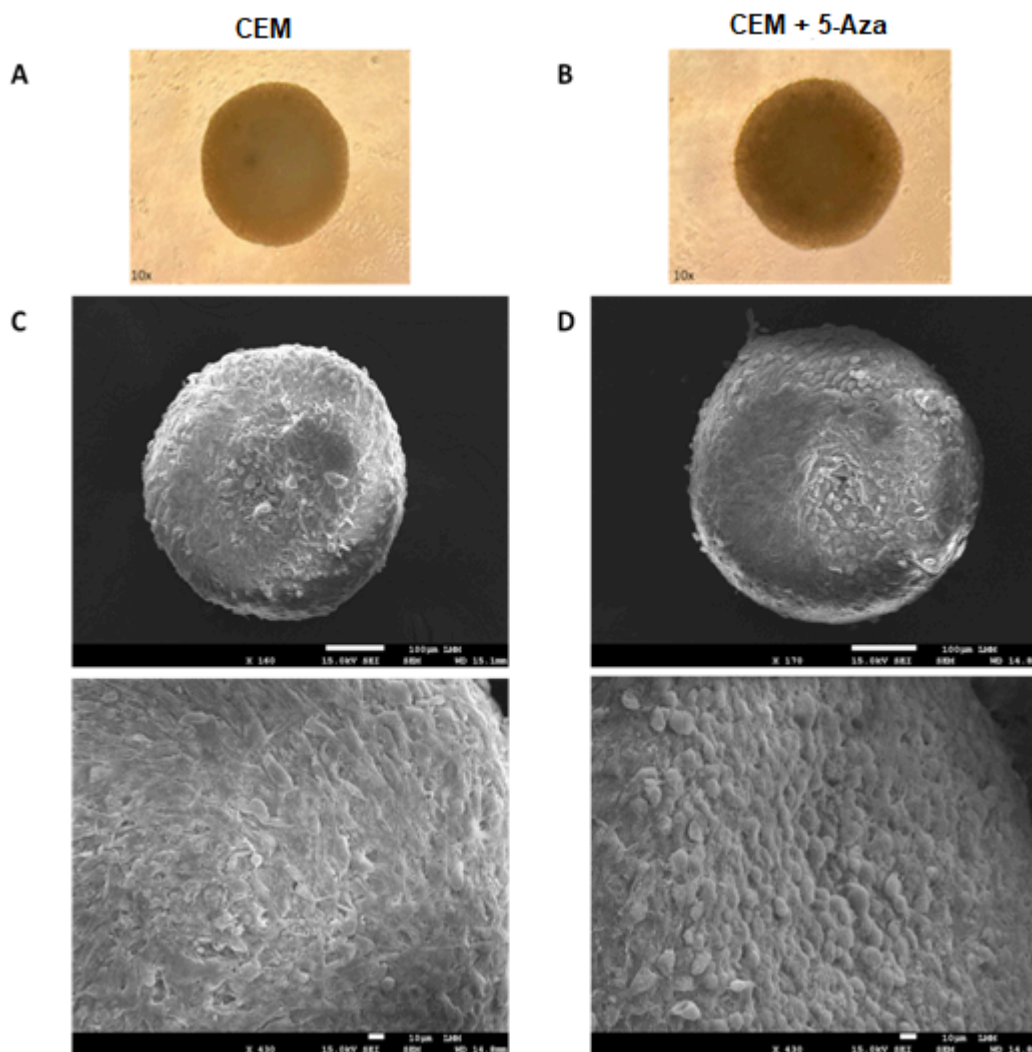


Figura 9: Esferoides controle e tratado com 10 μ M de 5-Aza por 72h. Imagens estruturais dos esferoides controle e tratado com 5-Aza, no aumento de 100x pelo microscópio invertido, representados respectivamente em A e B. Microscopia Eletrônica de Varredura detalhando a morfologia dos esferoides controle (representado em C) e após *priming* epigenético com 5-Aza (D), com ampliação de 160x. É importante observar que não há modificações estruturais entre os grupos. A mudança de coloração no grupo 5-Aza na MEV (D) ocorreu por baixa

metalização durante o preparo dessa amostra. A barra de escala de tamanho no primeiro aumento dos esferoides na MEV (160x) demonstrados em C e D é de 100µm. Na maior ampliação (430x), a barra está em 10µm.

4.7 O *priming* epigenético com 5-Aza na CEM 3D não causa lise de membrana celular e liberação de DHL

Realizamos a mensuração de DHL com a finalidade de avaliar se o *priming* epigenético com 5-Aza no modelo de cultivo celular 3D poderia causar extravasamento de componentes citoplasmáticos das CEMs que compõem o esferoide. Não foi observado diferença na liberação da enzima em relação a CEM 3D controle, mostrando não haver dano de membrana celular relacionado ao uso do 5-Aza (Figura 10).

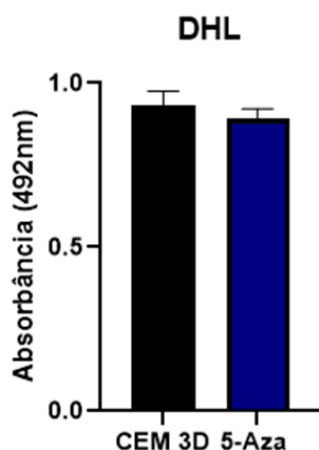


Figura 10: DHL de CEM 3D com e sem 5-Aza. A CEM 3D exposta ao 5-Aza não aumenta a liberação de DHL, demonstrando que o *priming* epigenético não causa ruptura de membrana citoplasmática..

4.8 O esferoide de CEMs apresenta expressão aumentada de genes regenerativos e de pluripotência, comparado ao modelo de CEMs 2D

Comparamos a ação do 5-Aza na modulação de genes regenerativos e de pluripotência celular entre o modelo 2D e 3D de CEMs. Constatamos que a expressão de *VEGF* ($p=0.009$) e *SOX2* ($p=0.006$) alcançam níveis mais elevados no modelo 3D de CEMs expostas ao *priming* com 5-Aza. Além disso, é importante notar que o *priming* com 5-Aza aumenta a expressão de

VEGF em 2x no modelo 2D e em 7x no modelo 3D, quando comparados a CEM 2D (Figura 11).

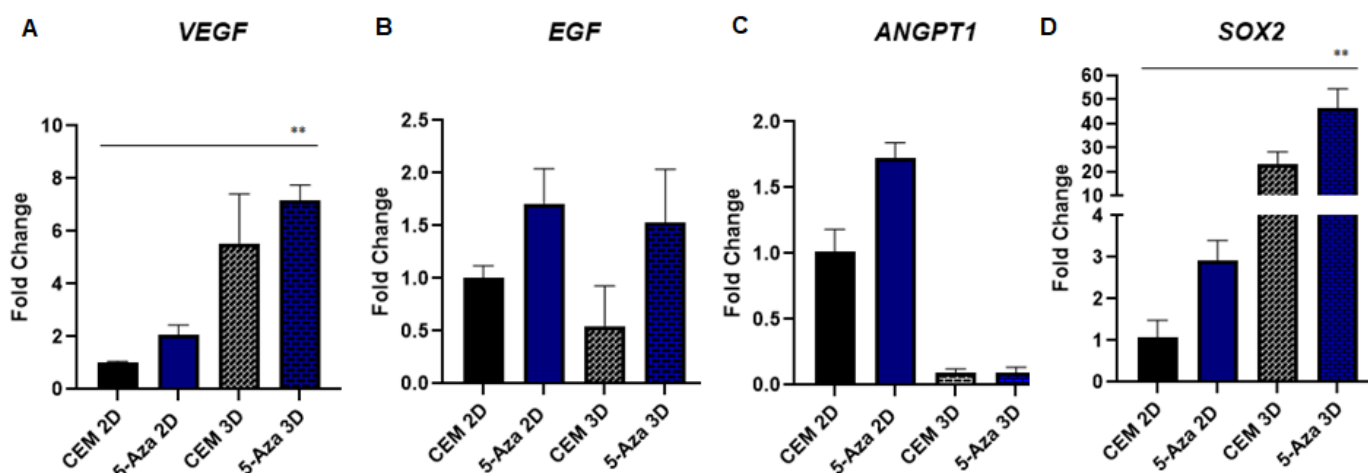


Figura 11: Análise de expressão gênica. Comparação da expressão dos genes (A) *VEGF*, (B) *EGF*, (C) *ANGPT 1* e (D) *SOX2* entre CEMs 2D e 3D. A expressão gênica foi avaliada por qPCR. Os valores de média do Ct obtido da CEM 2D controle foram utilizados como referência para análise entre os grupos. Os resultados foram normalizados para expressão do gene endógeno *GAPDH*. * significa $p < 0.01$.**

4.9 O meio condicionado das CEMs 2D e 3Ds tratadas com 5-Aza potencializam a atividade migratória dos fibroblastos e induzem aumento da expressão de *CXCR4* e *CXCR7*

Utilizando meio condicionado das CEMs submetidas ou não ao *priming* epigenético com 5-Aza, realizamos ensaio de migração celular com fibroblastos de derme a fim de avaliar se haveria ganho de potencial migratório nos grupos submetidos ao *priming* com 5-Aza. O meio condicionado de CEM 2D com 5-Aza promoveu aumento da capacidade de migração dos fibroblastos em relação ao grupo controle, em 36h ($p=0.05$) (Figura 12).

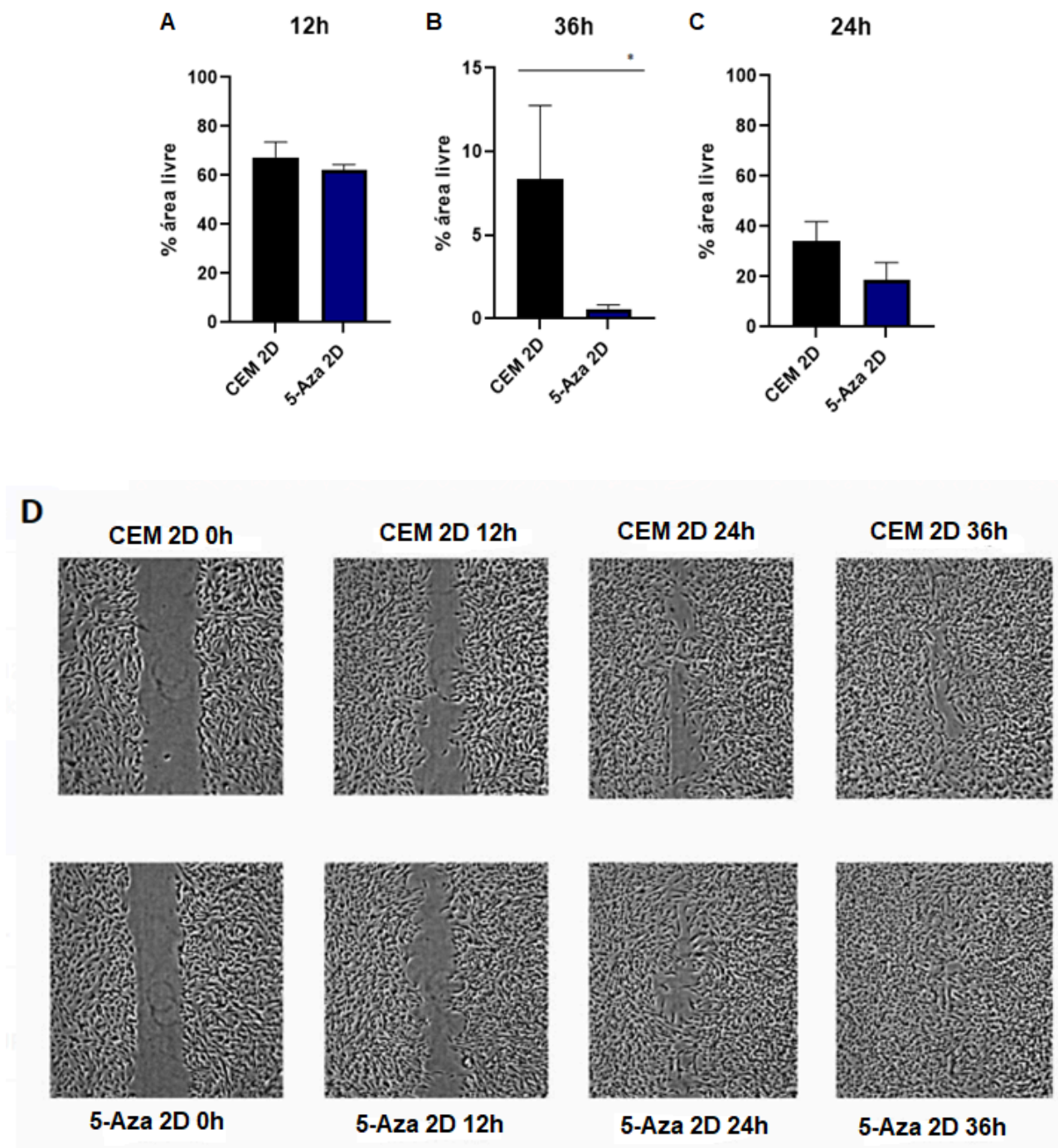


Figura 12: Ensaio de migração em fibroblasto. Fibroblastos foram avaliados quanto ao seu potencial migratório após serem expostos ao meio condicionado de CEM 2D com ou sem 5-Aza em 12h (A), 24h (B) e 36h (C) de cultivo. (D) Imagens representativas do experimento destacam as diferenças observadas. *significa $p \leq 0.05$.

Em linha com o estudo funcional realizado, o *priming* com 5-Aza induziu a expressão de *CXCR4* ($p=0.05$) e *CXCR7* ($p=0.05$) nos fibroblastos (Figura 13).

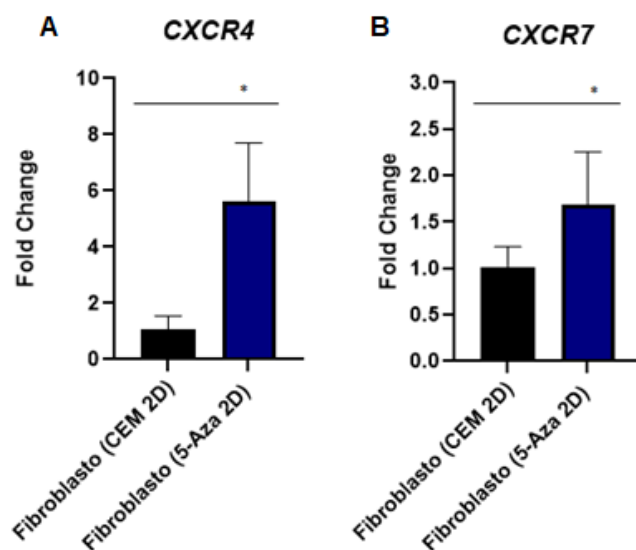
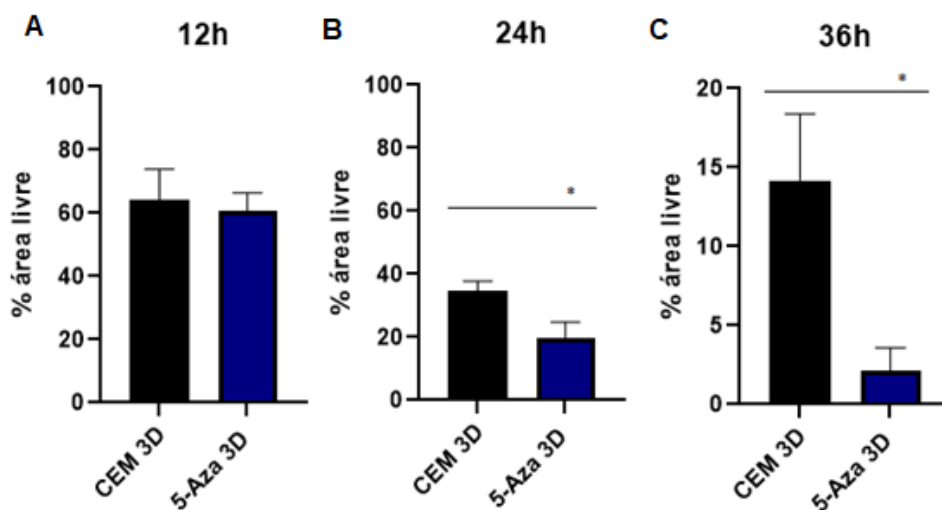


Figura 13: Análise de expressão gênica dos genes *CXCR4* e *CXCR7* em fibroblastos expostos ao meio condicionado de CEM 2D com ou sem 5-Aza. O gráfico A ilustra a expressão do gene *CXCR4* enquanto que a expressão do gene *CXCR7* está representada no gráfico B, ambos os genes realizados por qPCR. *significa $p \leq 0.05$. Os resultados foram normalizados para expressão do gene endógeno *GAPDH*.

O meio condicionado das CEMs 3D submetidas ao *priming* epigenético também foi capaz de promover maior migração dos fibroblastos nos tempos 24h ($p=0.05$) e 36h ($p=0.05$) (Figura 14).



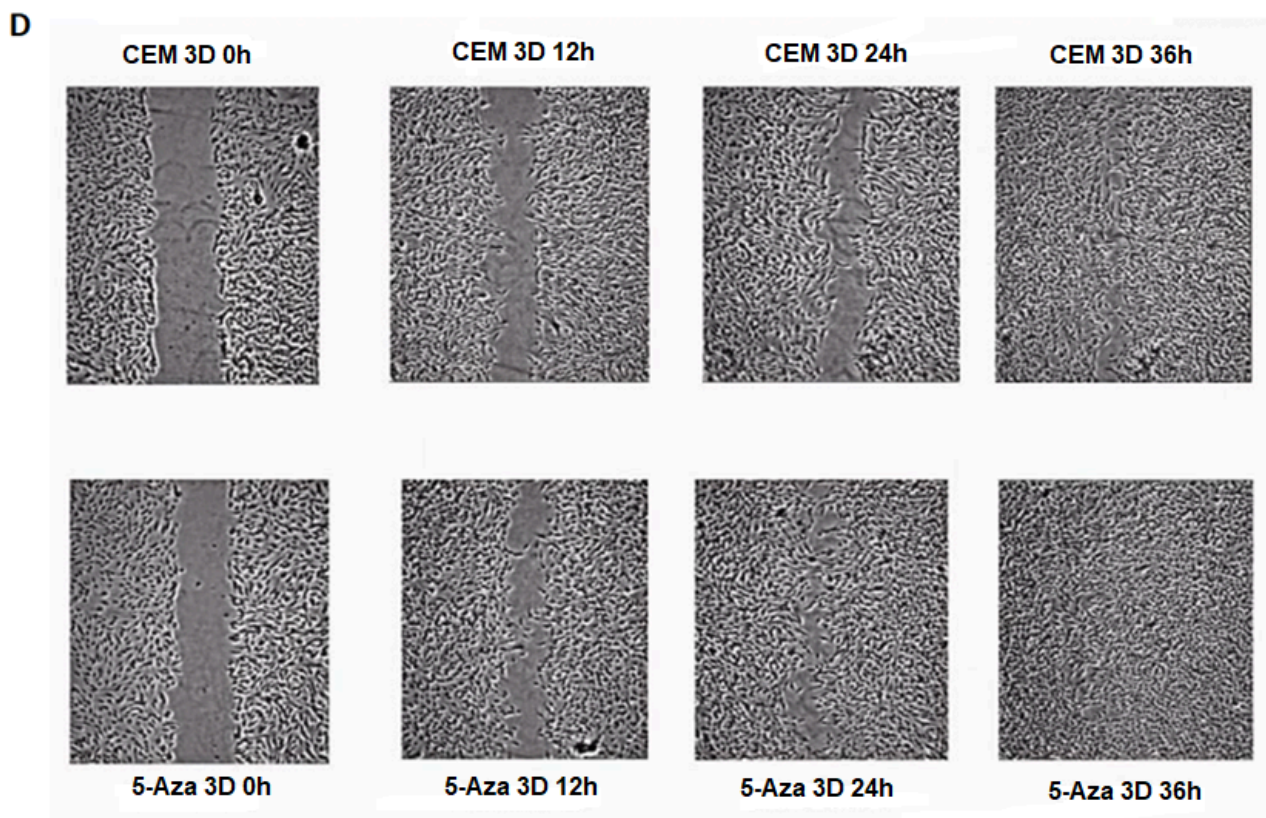


Figura 14: Ensaio de migração em fibroblasto. Fibroblastos foram avaliados quanto ao seu potencial migratório após serem expostos ao meio condicionado de CEM 3D com ou sem 5-Aza em 12h (A), 24h (B) e 36h (C) de cultivo. (D) Imagens representativas do experimento destacam as diferenças observadas. *significa $p \leq 0.05$.

Em consonância com a maior atividade de migração dos fibroblastos supracitada, o meio condicionado de CEMs 3D após *priming* epigenético com 5-Aza também favoreceu a expressão dos genes *CXCR4* ($p=0.0002$) e *CXCR7* ($p=0.05$) nos fibroblastos (Figura 15).

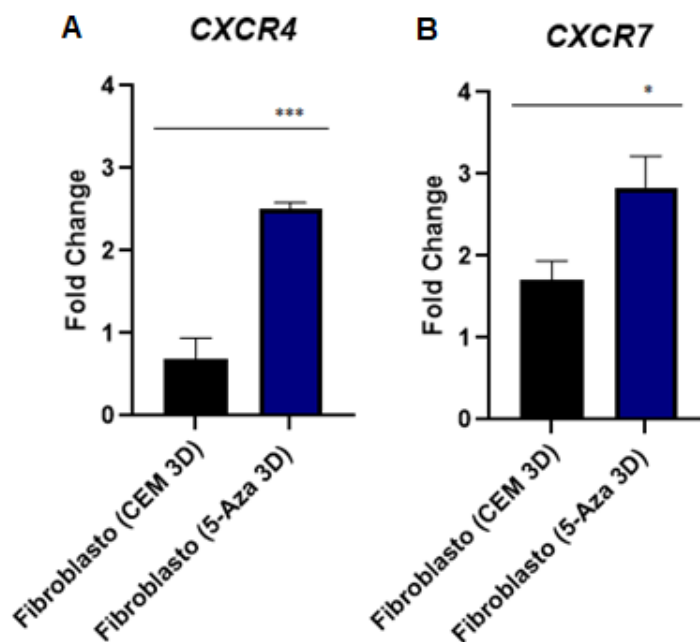


Figura 15: Análise de expressão gênica dos genes *CXCR4* e *CXCR7* em fibroblastos expostos ao meio condicionado de CEM 3D com ou sem 5-Aza. O gráfico A ilustra a expressão do gene *CXCR4* enquanto que a expressão do gene *CXCR7* está representada no gráfico B. * significa $p \leq 0.05$ e *** significa $p < 0.001$.

ETAPA III- Uso de CEMs licenciadas com 5-Aza e em formato 3D em modelo de injúria produzido em células CALU-3 expostas aos antígenos NS do SARS-CoV2 e IFN- γ .

4.10 Viabilidade das células CALU-3 frente ao antígeno NS do SARS-CoV2 e IFN- γ

Para mimetizar a inflamação promovida pelo SARS-CoV2, submetemos as células CALU-3 a concentrações crescentes de IFN- γ e antígenos NS (SARS-CoV-2 Nucleocapsid/Spike Protein (RBD) Recombinant Protein) (Thermo Fisher), e avaliamos a citotoxicidade celular através do ensaio de MTT e liberação de DHL em 48h e 72h.

Para definir a dose de IFN- γ capaz de causar citotoxicidade, testamos por MTT as concentrações de 10ng/mL, 25ng/mL e 50ng/mL em 48h e 72h. Em ambos os tempos de 48h e 72h, a concentração de 50ng/mL foi citotóxica para as células CALU-3 ($p=0.01$ e 0.02 , respectivamente) (Figura 16).

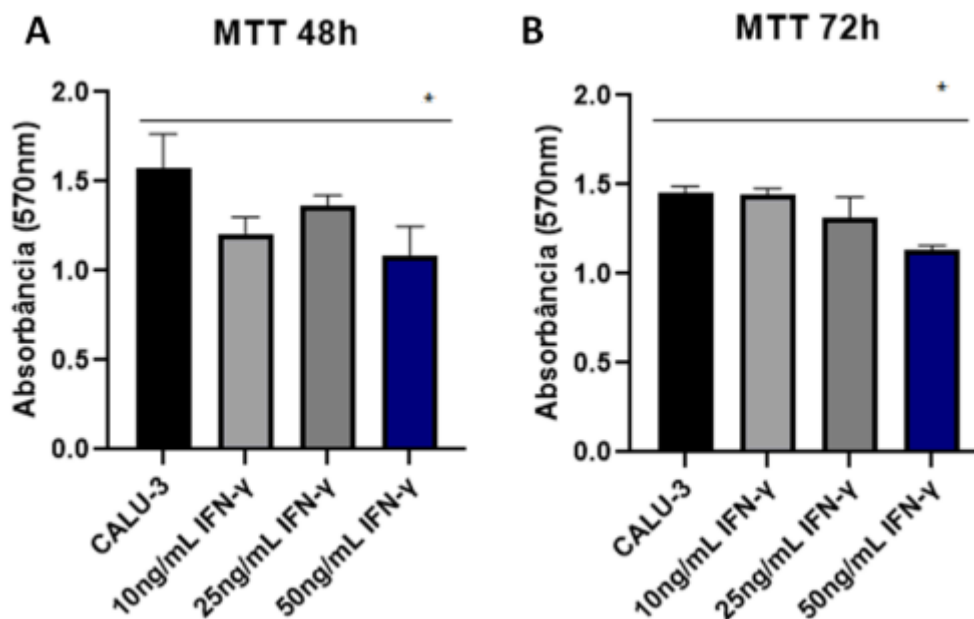


Figura 16: Ensaio de viabilidade por MTT de células CALU-3 expostas a doses crescentes de IFN- γ . O gráfico A ilustra o resultado do MTT em 48h, enquanto o gráfico B apresenta o resultado em 72h. Em ambas as condições experimentais, o grupo com 50ng/mL de IFN- γ apresentou maior citotoxicidade em relação às outras concentrações de 10 e 25ng/mL. * significa $p < 0.05$.

Após investigarmos o papel citotóxico do IFN- γ , avaliamos por MTT e dosagem de lactato desidrogenase (DHL) se a combinação de 50ng/mL de IFN- γ com 2 μ g/mL do antígeno NS poderia potencializar o efeito de citotoxicidade na célula CALU-3. De fato, essa combinação realçou a toxicidade nas células CALU-3 ($p=0.01$) e ($p=0.006$), comparado ao uso do IFN- γ e dos antígenos NS de forma isolada, em 48h (A) e 72h (C), respectivamente. Em concordância, foi observado aumento na liberação de DHL em 48h (B) ($p=0.02$) e 72h (D) ($p=0.02$) (Figura 17)

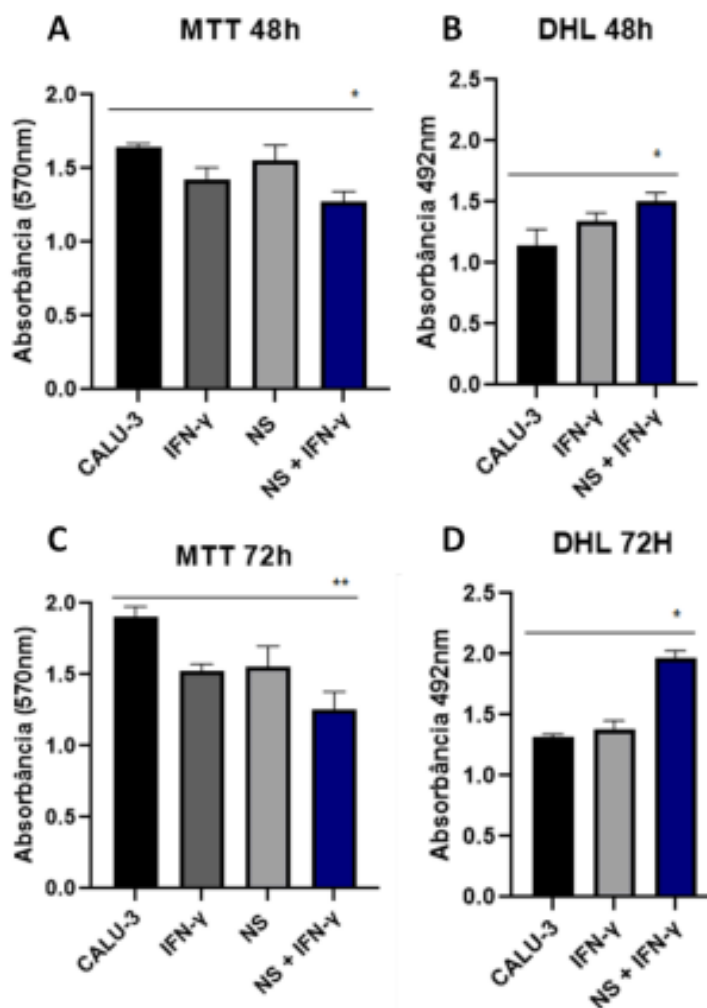


Figura 17: Ensaio de viabilidade por MTT e liberação de DHL em célula CALU-3 exposta ao antígeno NS e de IFN- γ por 48h e 72h. Está representado nos gráficos A e C o ensaio de viabilidade celular mediado por MTT em 48h e 72h, respectivamente. Em A, * significa $p \leq 0.05$ e em C, ** significa $p < 0.01$. Em se tratando dos gráficos B e D que expressam a liberação da enzima DHL nos tempos 48h e 72h, respectivamente, * significa $p \leq 0.05$.

4.11 Impacto do meio condicionado de CEMs 2D e 3D na viabilidade das células CALU-3 inflamadas com antígeno NS do SARS-CoV2 e IFN- γ

Buscamos identificar através do ensaio de MTT se o meio condicionado das CEMs 2D e 3D, com ou sem 5-Aza, poderia reduzir a citotoxicidade mediada pelo antígeno NS e IFN- γ na CALU-3. Para isso, utilizamos a concentração de 100% de meio condicionado por 72h. Apesar de não haver diferenç a estatística, identificamos maior sobrevida das células quando

expostas a 100% do meio condicionado de CEM 3D, havendo 60% de células viáveis no grupo CEM 3D e 53% no grupo 5-Aza 3D quando comparados ao grupo antígeno NS e IFN- γ com apenas 33% de células CALU-3 viáveis (Figura 18).

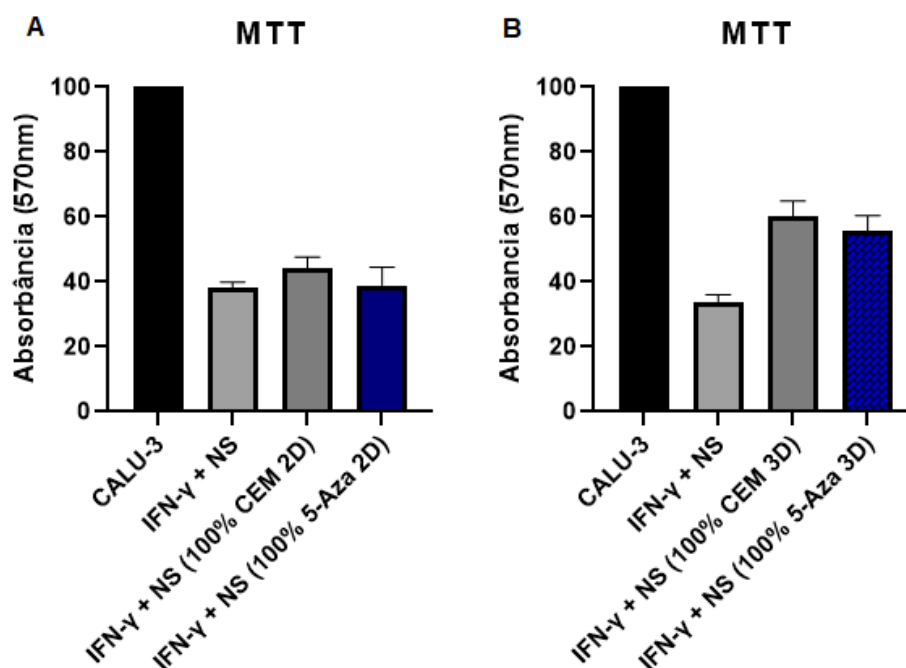


Figura 18: Ensaio de MTT em células CALU-3 expostas ao antígeno NS e IFN- γ e meio condicionado de CEM 2D e 3D com ou sem 5-Aza. Os gráficos apresentam o resultado do uso da concentração de 100% de meio condicionado, sendo em A a representação do uso do meio condicionado de CEM 2D e em B, meio condicionado de CEM 3D. Os valores são expressos como porcentagem de células viáveis para cada condição em relação às células controle.

4.12 O meio condicionado de CEM 3D com 5-Aza atenua a atividade das caspases 3 e 7

Avaliamos a atividade das caspases 3/7 nas células CALU-3 expostas ao antígeno NS e ao IFN- γ e identificamos que após adição do meio condicionado de CEM 3D com 5-Aza há diminuição da sua atividade ($p=0.01$) (Figura 19).

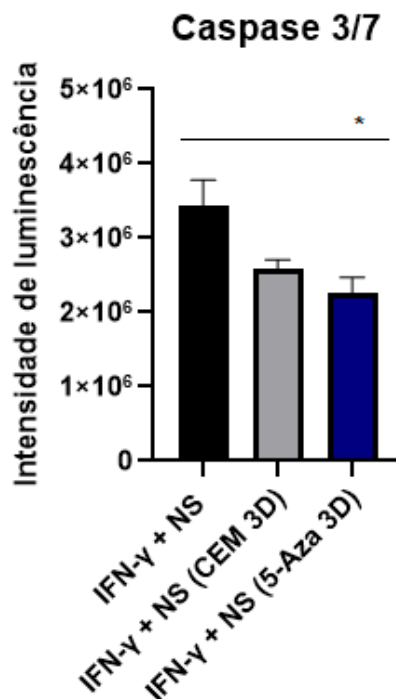


Figura 19: Atividade de caspase 3/7. O gráfico representa a atividade de caspase 3/7 em células CALU-3 após a inflamação com antígeno NS + IFN- γ e uso do meio condicionado de CEM 3D com e sem 5-Aza. * significa $p \leq 0.05$.

4.13 Expressão de genes associados a regeneração e morte em células CALU-3 expostas ao antígeno NS + IFN- γ e tratadas com o meio condicionado de CEM 3D com 5-Aza

Observamos o aumento da expressão de genes relativos à regeneração tecidual e angiogênese nas células CALU-3 expostas ao meio condicionado de CEM 3D com 5-Aza, como *FGF2* ($p=0.05$) e *PDGF* ($p=0.05$). Também, identificamos aumento da expressão de *SOX2* ($p=0.05$). Além disso, observamos diminuição da expressão de *IL-10* ($p=0.05$), seguido de menor expressão de *KLF4* ($p=0.05$) e de *EGFR* ($p=0.05$) (Figura 20).

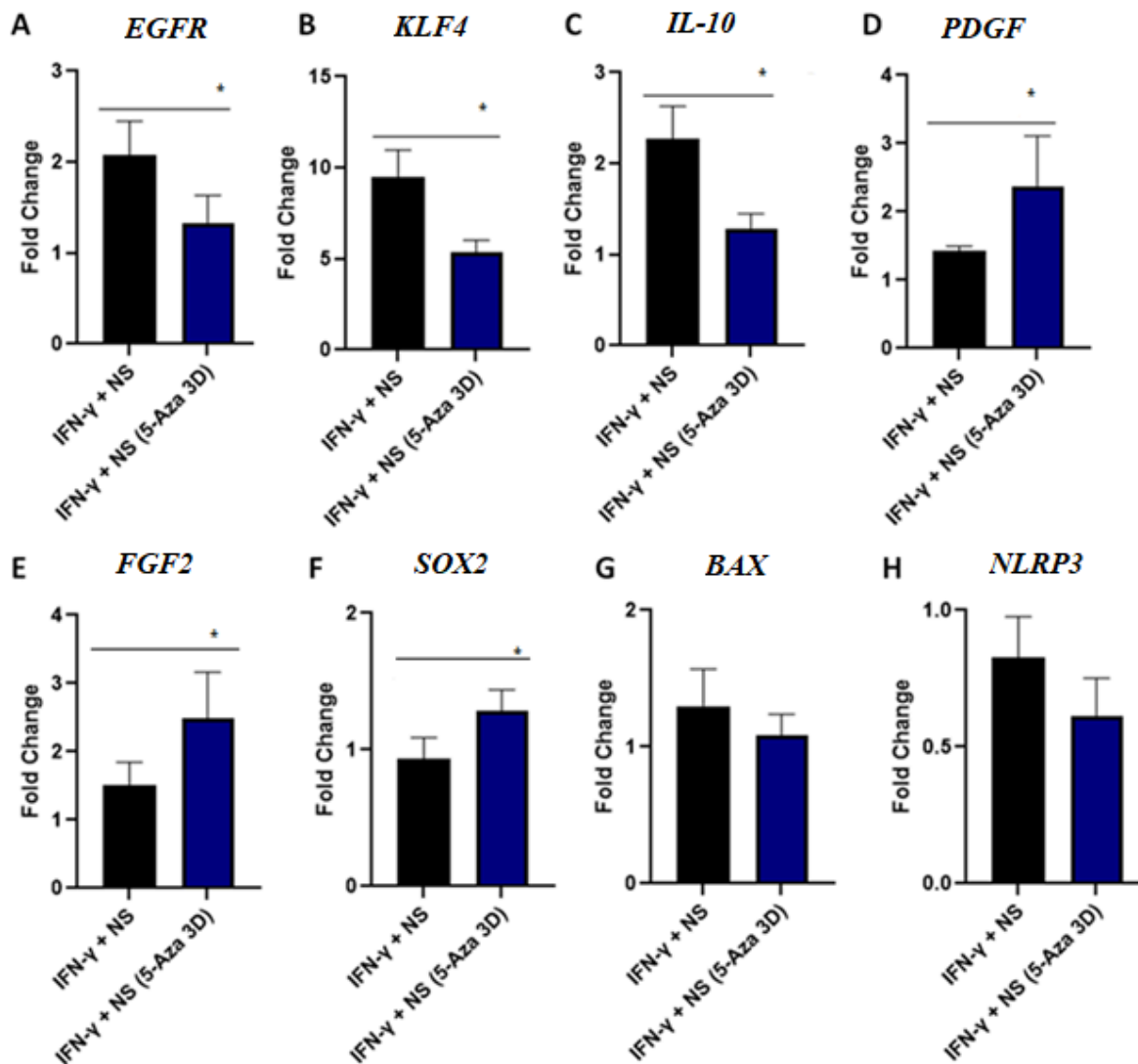


Figura 20: Análise da expressão gênica. Células CALU-3 expostas ao antígeno NS + IFN- γ e tratadas com o meio condicionado de CEM 3D com 5-Aza foram avaliadas através da qPCR quanto a expressão dos genes *EGFR* (A), *KLF4* (B), *IL-10* (C), *PDGF* (D), *FGF2* (E), *SOX2* (F), *BAX* (G) e *NLRP3* (H). * significa $p \leq 0.05$. Os resultados foram normalizados para expressão do gene endógeno *GAPDH*.

5. DISCUSSÃO

A terapia com CEMs é segura e conta atualmente com 1.153 ensaios clínicos sendo conduzidos de acordo com o site clinicaltrials.com (abril, 2024), sendo útil para uma série de desordens que variam entre doenças autoimunes (GAO et al., 2016), infarto (CHEN et al., 2004) até engenharia de tecidos (CAPLAN et al., 2007). É importante ressaltar que apesar de serem potentes, milhões de células são necessárias para que o efeito terapêutico seja observado. A repetida expansão *in vitro* para obter a quantidade de células necessárias para o tratamento gera senescência replicativa, o que diminui seu potencial terapêutico (KRETLOW et al., 2008). Embasados nessa limitação supracitada, neste trabalho, buscamos potencializar a capacidade regenerativa das CEMs por intermédio do *priming* epigenético com o agente hipometilante 5-Aza.

As CEMs de tecido adiposo aqui utilizadas apresentaram o perfil fenotípico determinado pela ISCT (DOMINICI et al., 2006), mesmo após o *priming* epigenético com 5-Aza, não apresentando diferença significativa quanto a expressão de CD44, CD73, CD90 e CD105 entre os grupos. Neste trabalho não foi induzida a diferenciação celular, porém, na literatura, o 5-Aza possui essa vertente de estudo a partir da CEM para cardiomiócitos, osteócitos e células similares a hepatócitos (SUPOKAWEKJ et al., 2013; YAN et al., 2014; AURICH et al., 2009).

Curiosamente, apesar do 5-Aza ser utilizado no tratamento da síndrome mielodisplásica por induzir apoptose das células que estão em proliferação desbalanceada (UNNIKRIISHNAN et al., 2017), nas CEMs ele potencializou a proliferação celular. Esse resultado é contraditório ao encontrado por Lee e colaboradores (2021), que demonstraram que concentrações entre 5-20 μ M diminuem a proliferação de CEM de cordão umbilical. Porém, no mesmo ano, Agnes Ong e colaboradores demonstraram que o uso de concentrações entre 5-20 μ M de 5-Aza em

CEMs isoladas da geleia de Wharton potencializou a proliferação celular em diferentes meios de cultura. Em 2017, Kornicka relatou que o uso de 1 μ M de 5-Aza foi suficiente para aumentar a proliferação celular, formação de colônias e diminuir o tempo necessário para duplicar a população de CEMs de tecido adiposo.

Como estudos mostram potencial efeito citotóxico do 5-Aza em linhagens de CEM de medula óssea de camundongos (WU et al., 2010) e de leucemia mieloide aguda (HOLLENBACH et al., 2010) com concentrações a partir de 1 μ M, buscamos avaliar se a concentração utilizada neste estudo corrobora com esses dados. Não houve citotoxicidade e indução de apoptose nas CEMs, após o tratamento com 5-Aza. Também não identificamos aumento da liberação de DHL, o que mostra ausência de lesão de membrana celular nas CEMs

Para compreender de que forma a ação hipometilante do 5-Aza poderia estar modulando as marcas epigenéticas da CEM, fizemos a análise da expressão de genes relacionados a regeneração, pluripotência e imunossupressão. Observamos aumento na expressão de *SOX2*, gene associado à maior capacidade de renovação celular e pluripotência, indicando, de forma preliminar, que o *priming* epigenético com 5-Aza poderia melhorar os aspectos de envelhecimento/maturação celular (SILVA et al., 2008; WENG et al., 2022).

Ademais, o aumento da expressão de *VEGF*, *ANGPT 1*, *ANGPT 2* e *EGF* nas CEMs submetidas ao *priming* com 5-Aza mostra um perfil de ganho de função regenerativa, considerando a atuação desses fatores na angiogênese e reparo tecidual. O gene *VEGF* é considerado o principal mediador responsável pela produção e sobrevivência das células endoteliais, regulando também sua atividade migratória (BERNATCHEZ et al., 1999; MATSUMOTO et al., 2014). A expressão do *EGF* é associada a alta capacidade reepitelizante (RHEINWALD et al., 1977). As angiopoietinas 1 e 2 são necessárias no processo de ramificação de novos vasos sanguíneos (SINGER et al., 1999). Em conjunto, nossos achados apontam para um maior potencial regenerativo das CEMs quando expostas ao 5-Aza.

As CEMs possuem capacidade imunossupressora quando estimuladas por citocinas como IFN- γ , TNF- α , entre outros fatores (NAJAR et al., 2016; NORONHA et al., 2019). Dessa forma, avaliamos se o *priming* com 5-Aza poderia modular os genes *IDO*, *IL-10* e *PDL-1*. De modo importante, identificamos maior nível transcricional de *IDO* e *IL-10* nas CEMs, após o tratamento com 5-Aza. Esse achado mostra que as CEMs passam a apresentar um perfil anti-inflamatório mais potente, após o *priming* epigenético realizado. Importante notar que *IDO* tem papel fundamental para inibir a proliferação de linfócitos T (MUNN et al., 2016) e a *IL-10* desempenha um significativo papel anti-inflamatório por regular a síntese de citocinas inflamatórias (FIORENTINO et al., 1989).

Apesar de não haver diferença estatística, comparado às CEMs controle, o tratamento com 5-Aza aumentou em 41% a expressão de PDL-1. A via PD-1/PDL1 intensifica o efeito imunossupressor das CEMs sobre células imunes (AUGELLO et al., 2005) e, em CEMs senescentes, sua menor capacidade imunorreguladora está associada a menor expressão desse gene (GAO et al., 2023).

Considerando o perfil de modulação gênica anteriormente descrito, buscamos compreender se as CEMs poderiam se beneficiar dos próprios produtos gerados, realizando o ensaio de migração celular. Surpreendentemente, não detectamos alteração no perfil migratório das CEMs expostas ao 5-Aza, indicando que seus produtos não exercem efeito benéfico para si, pelo menos no que diz respeito à capacidade migratória.

Após identificarmos que o *priming* epigenético com 5-Aza induziu a proliferação celular e a expressão de transcritos regenerativos, imunossupressores e de pluripotência em CEM no modelo 2D, produzimos esferoides e comparamos se o modelo 3D de cultivo celular com 5-Aza poderia ser superior ao 2D. É bem estabelecido que o cultivo 3D favorece a expressão de *SOX2* frente ao modelo 2D (BARTOSH et al., 2010), sendo mais resistentes e

sofrendo menos com o processo de senescência, além de ser mais fidedigno aos mecanismos que ocorrem no organismo *in vivo* (JUNGWIRTH et al., 2018).

É importante buscar metodologias que preservem a CEM dos sinais de envelhecimento que o cultivo celular exerce sobre elas. Alterações parácrinas, redução na capacidade de pluripotência, modificações estruturais (as células se tornam mais finas e alongadas) são resultados da desregulação epigenética gerada por diferentes estímulos ao longo do seu cultivo (GRECO et al., 2007; LI et al., 2011).

Observamos que a modulação com 5-Aza nos esferoides estimulou maior produção de *VEGF* e principalmente de *SOX2* quando comparada a CEM 2D e 3D controles, como também a CEM 2D com 5-Aza. Isso é importante para não só preservar como também potencializar essa atividade de auto-renovação intrínseca. Os resultados supracitados nos indicam que a CEM 3D com 5-Aza parece ser ainda mais favorável que a 2D em se tratando de uso em terapia regenerativa.

Pensando em comparar o uso do meio condicionado da CEM 2D e 3D com ou sem 5-Aza de forma funcional, realizamos o ensaio de migração celular utilizando fibroblasto de derme como célula migratória. Após 36h de migração, descobrimos que a migração celular foi mais estimulada nos grupos tratados com 5-Aza. Corroborando com o resultado da migração realizada, identificamos aumento da expressão de *CXCR4* e *CXCR7* nos fibroblastos expostos ao meio condicionado das CEM tratadas com 5-Aza (tanto 2D como 3D).

CXCR4 e *CXCR7* são receptores de quimiocinas metabotrópicos, ou seja, acoplados à proteína G. Ambos se ligam a quimiocinas homeostáticas, diferentemente de outros *CXCRs* que interagem com quimiocinas inflamatórias (NOMIYAMA et al., 2011), estando o *CXCR4* e *CXCR7* envolvidos em processos de migração, proliferação e maior sobrevivência celular, recrutando progenitores endoteliais (HUYNH et al., 2020).

Diversos estudos demonstram que a alta expressão de *CXCR4* e *CXCR7* está atrelada com o aumento da capacidade de proliferação e migração celular, podendo estar relacionados, a depender do contexto, com a progressão de metástases e invasão de outros tecidos (BURGER et al., 2009). O trabalho de Cai e colaboradores, 2012, mostrou que a inibição do *CXCR4* levou à redução significativa da capacidade migratória de células HeLa, bem como à redução da proliferação celular. Também foi observado o aumento da expressão de *CXCR4* nas células HUVECS (células endoteliais da veia umbilical humana) e em fibroblastos de pele quando submetidos ao ensaio de migração utilizando oxigênio hiperbárico para promover regeneração tecidual (HUANG et al., 2020). Xu, em 2023, investigou se o aumento da expressão de *CXCR7* poderia aumentar a migração de fibroblastos laringotraqueais, sendo confirmada a correlação.

Finalizando a etapa inicial de aprimoramento da CEM com 5-Aza nos modelos 2D e 3D, progredimos e investigamos se seu meio condicionado poderia reduzir os danos pulmonares gerados por um processo inflamatório *in vitro* mediado por antígenos do SARS-CoV2 e IFN- γ . Para isso, inicialmente submetemos a linhagem CALU-3 ao IFN- γ , citocina associada a morte celular inflamatória na COVID-19 (KARKI et al., 2021), e a combinação de antígeno nucleocapsídeo e proteína spike (NS). Identificamos que a junção de 50ng/mL de IFN- γ e 2 μ g/mL de antígeno NS por 72h foi capaz de induzir citotoxicidade e mimetizar o ambiente inflamatório gerado pelo vírus (RAMASAMY et al., 2021).

Posteriormente, identificamos através do ensaio de MTT, que o uso do meio condicionado de CEM 2D tanto com como sem 5-Aza não foi eficaz para atenuar a inflamação gerada pela combinação de IFN- γ e antígeno NS na CALU-3. Em contrapartida, apesar de não haver diferença estatística, percebemos que o uso de 100% de meio condicionado de CEM 3D com e sem 5-Aza foi interessante, visto que permitiu 60% de viabilidade celular no grupo com meio condicionado de CEM 3D e 53% de células viáveis no grupo com meio condicionado de CEMs 3D com 5-Aza, em relação ao grupo inflamado (38% de células viáveis). Possivelmente,

esse efeito poderia ser atribuído a maior expressão de *VEGF* e *SOX2* que a CEM 3D possui, quando comparada a CEM 2D, que também foi relatado por Lee e colaboradores em 2021, permitindo que o mecanismo de *homing* exercido pela CEM favoreça a sobrevivência celular (SILVA et al., 2008; ZOU et al., 2021).

É conhecido que o SARS-CoV2 exerce um efeito múltiplo de morte celular chamado panoptose (JOSE et al., 2020), onde é acionada uma cascata de mecanismos como piroptose, necrose e apoptose que resultam em morte celular. Possivelmente esse mecanismo seja o causador das lesões pulmonares associadas à doença. Com base nessa condição, investigamos se o sobrenadante da CEM 3D com e sem 5-Aza poderia reduzir a ativação de caspases 3/7 que são ativadas durante a apoptose (LAKHANI et al., 2006). Positivamente, obtivemos menor ativação das caspases 3/7 em ambos os casos, principalmente na presença de meio condicionado de CEM 3D com 5-Aza.

As caspases, que recebem esse nome por serem proteases aspárticas de cisteína, são proteínas que mantêm a homeostase do organismo participando do mecanismo de apoptose celular, regulando a sobrevivência das células. Para isso, elas exercem sua atividade por intermédio da via intrínseca e extrínseca, sendo subdivididas em caspases iniciadoras (2, 8, 9, 10), inflamatórias (1, 4, 5) e efetoras (3, 6, 7). A ativação das caspases 3/7 é mediada pela via extrínseca, resultando em fragmentação do DNA e do citoesqueleto por serem consideradas “caspases efetoras”, com atividade proteolítica (ELMORE et al., 2007).

As CEMs possuem capacidade anti-apoptótica em lesões pulmonares. Jiang, em 2015, apresentou que a infusão intravenosa de CEMs de tecido adiposo atenuou a inflamação pulmonar gerada pela radiação em camundongos, diminuindo a expressão de caspase 3 e BAX, proteína responsável por causar lesão na membrana mitocondrial durante a apoptose por via intrínseca (ANTONSSON et al., 2001). O mesmo indício de redução de expressão de caspase 3

foi relatado por El Metwaly, em 2019, após o uso de CEM de medula óssea para tratamento de lesão pulmonar aguda induzida por ácido clorídrico, além da diminuição do estresse oxidativo.

Neste estudo, observamos redução na expressão de *KLF4* nas células CALU-3 inflamadas com antígeno NS e INF- γ e tratadas com meio condicionado de CEM 3D com 5-Aza, gene que usualmente está associado ao impedimento da apoptose, bloqueando a expressão de BAX (GHALEB et al., 2017). Porém, estudos sugerem que *KLF4* pode ter dupla função regulatória, podendo então exercer atividade pró-apoptótica a depender do contexto. Existe a hipótese que o *KLF4* superexpresso pode favorecer indiretamente a replicação viral do SARS-CoV2 por inibir o promotor do gene *IFNB*, regulando negativamente a resposta antiviral das células (LUO et al., 2016; SAMENI et al., 2023).

De forma curiosa, após o tratamento com meio condicionado de CEM 3D com 5-Aza observamos a diminuição da expressão de *IL-10* na CALU-3, potente citocina anti-inflamatória. Apesar de parecer contraditório, é interessante que haja essa diminuição pois foi relatado altos níveis de *IL-10* em pacientes com a forma grave da doença, sendo então associado a pior prognóstico (LUCAS et al., 2020). É discutido que a *IL-10* é elevada antes mesmo da *IL-6*, citocina pró-inflamatória relacionada à síndrome da tempestade de citocinas. Isso pode se justificar pela diminuição de linfócitos T que ocorre durante a COVID-19, além do seu fenótipo de exaustão por hiperexpressão de PD-1 (DIAO et al., 2020). Tilg e colaboradores, em 2002, mostraram em seu estudo sobre tratamento para doença de Chron que utilizar IL-10 pressupondo diminuir o processo inflamatório, na verdade, estimula o aumento de IFN- γ , sendo o efeito dependente da dose.

Apesar de não ter diferença estatística, percebemos tendência de diminuição de *BAX* e *NLRP3* no grupo tratado com meio condicionado de CEM 3D com 5-Aza. Ambos os genes estão envolvidos com processo de morte celular programada, sendo BAX pertencente a via intrínseca da apoptose e NLRP3 que participa da piroptose (WANG et al., 2022). Sabendo que

a infecção por SARS-CoV2 induz Panoptose, a diminuição desses transcritos, bem como a diminuição da atividade das caspases 3/7 e da expressão de *IL-10* nos indica um perfil anti-inflamatório e de maior sobrevivência celular.

Em apoio a esses achados, o aumento da expressão de *SOX2* nas células CALU-3 demonstra maior capacidade de auto renovação celular, tornando as células CALU-3 expostas ao antígeno NS e ao IFN- γ tratadas com meio condicionado de CEM 3D com 5-Aza mais resistentes, além do *SOX2* participar ativamente do processo de formação do epitélio pulmonar e traqueal (QUE et al., 2009). Por outro lado, estudos indicam que na COVID-19 a expressão de *SOX2* pode estar relacionada ao desenvolvimento da anosmia e ageusia, sintomas relatados em mais de 80% dos pacientes (LECHIEN et al., 2020). A explicação dessa hipótese aborda que o *SOX2* participa da supressão da diferenciação neural no epitélio pulmonar, afetando também células olfativas (BRANN et al., 2020). *SOX2* também participa da produção de células caliciformes, produtoras de muco (TOMPKINS et al., 2009; KHASHKHOSHA et al., 2020).

Por fim, visando a regeneração do epitélio pulmonar inflamado, avaliamos os transcritos *PDGF*, *FGF2* e *EGFR*. Em nosso estudo, percebemos aumento da expressão de *FGF2* após o tratamento com meio condicionado de CEM 3D com 5-Aza. Guzy e colaboradores, em 2015, identificaram que camundongos com expressão de *FGF2* tinham melhor ação de proteção epitelial após lesão pulmonar induzida por bleomicina. Camundongos com a inibição da expressão de *FGF2* evoluíram a óbito por terem problemas em restabelecer a integridade do epitélio pulmonar, além de não conseguirem conter o processo inflamatório, colocando em discussão o envolvimento do *FGF2* no processo patogênico da fibrose pulmonar. Para melhor compreensão, é necessário avaliar o papel dos outros 17 ligantes de FGF, pois o uso de inibidores de tirosina quinase que acabam afetando os receptores de FGF (FGFR)

diminui a fibrose pulmonar em camundongos também induzida por bleomicina (RICHELDI et al., 2011).

Em nosso trabalho observamos diminuição da expressão de *EGFR*, gene que está fortemente associado ao desenvolvimento de angiogênese patológica e fibrose pulmonar. O *EGFR* se tornou alvo de estudo para terapias contra câncer de pulmão e outras desordens pulmonares como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Camundongos deficientes na sinalização de *EGFR* parecem ser mais resistentes à fibrose pulmonar induzida por bleomicina (modelo bem estabelecido de fibrose pulmonar em camundongos) (MADTES et al., 1999; VALLATH et al., 2014). Também foi relatado que aumento da expressão de *EGFR* favorece o processo inflamatório mediado por NF- κ B/MAPK, além de induzir necroptose por ativação indireta de *RIP1* e *RIP3*. Isso acontece porque EGFR participa de diversas vias de ativação e também pode sofrer autofosforilação (ZHANG et al., 2023).

Constatamos aumento da expressão de *PDGF*, gene envolvido em processos angiogênicos e regulação do sistema imune. Foi relatado que em macrófagos expostos a ambiente inflamado por LPS e IFN- γ , o *PDGF* foi responsável por atenuar a síntese de TNF- α , citocina inflamatória e indutora de apoptose (BASU et al., 2022). Importante mencionar que o *PDGF* participa da formação dos alvéolos e estimula os progenitores de miofibroblastos alveolares (TSAO et al., 2016).

Ao todo, nossos achados demonstram que o *priming* epigenético com 5-Aza na CEM é capaz de aumentar a expressão de genes anti-inflamatórios, bem como transcritos relativos a pluripotência e regeneração nas CEMs, sendo observado vantagem do formato 3D (esferoides) em relação a expressão desses transcritos e a atividade funcional, potencializando a migração de fibroblastos.

O uso do meio condicionado do esferoide submetido ao *priming* epigenético com 5-Aza causou efeito protetivo nas células CALU-3 previamente expostas ao antígeno NS do

SARS-CoV2 e a citocina inflamatória IFN- γ por aumentar a sobrevivência celular, atenuar a atividade de caspases 3/7 e potencializar a expressão de genes relativos a angiogênese, mostrando ser uma estratégia interessante para auxiliar na recuperação do tecido pulmonar lesionado por SARS-CoV2.

É importante ressaltarmos as limitações atribuídas ao modelo de inflamação e morte celular por SARS-CoV2 utilizado neste trabalho. Pontuamos que os resultados obtidos mimetizariam de melhor forma a infecção caso utilizássemos nas culturas o vírus SARS-CoV2, o que não foi possível pela ausência de laboratório com nível de biossegurança necessária.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, concluímos que o *priming* epigenético com 5-Aza não modifica o fenótipo das CEMs de tecido adiposo, foi capaz de modular positivamente a expressão de *VEGF*, *SOX-2*, *ANGPT1*, *ANGPT2*, *EGF*, *IDO*, *IL-10* em CEMs, não induzindo apoptose celular e nem liberação de DHL nos modelos 2D e 3D. Quando em formato 3D, o *priming* com 5-Aza foi capaz de modular positivamente a expressão de *VEGF*, *SOX2*, *EGF* e *ANGPT1*, comparado ao modelo 2D de CEMs. O meio condicionado das CEMs 2D e 3D após *priming* epigenético com 5-Aza foi capaz de aumentar a capacidade de migração celular de fibroblastos de derme, obtendo também aumento de expressão de *CXCR4* e *CXCR7*.

Em se tratando do processo inflamatório estimulado nas células pulmonares CALU-3 por antígeno NS e IFN- γ , o meio condicionado dos esferóides de CEM com 5-Aza atenuou a atividade de caspase 3/7, como também foi capaz de potencializar a expressão de *PDGF*, *FGF2* e *SOX2*, enquanto diminui a expressão de *IL-10*, *EGFR*, *KLF4* nas células CALU-3. Dessa forma, utilizar a metodologia de *priming* epigenético com 5-Aza nas CEMs de tecido adiposo realça seu potencial regenerativo e anti-inflamatório, os quais são ainda mais expressivos no cultivo 3D.

7. PERSPECTIVAS

Como desenvolvimentos futuros buscando investigar de forma mais aprofundada os mecanismos moleculares por trás do processo regenerativo induzido através do uso do meio condicionado de CEM 3D após *priming* epigenético com 5-Aza, será de suma importância direcionar o estudo para a pesquisa translacional e avaliar, com maior fidelidade, os processos que ocorrem no organismo *in vivo*, com a adoção de um modelo murino de infecção pelo SARS-CoV2. Mais ainda, analisar de forma comparativa o efeito protetivo do meio condicionado de CEM 3D com 5-Aza no tecido pulmonar considerando a infecção mediada pela as diferentes variantes: alfa, beta, gama, delta e ômicron do SARS-CoV2, buscando investigar se as mutações sofridas pelo vírus poderiam impactar no desfecho protetivo que o meio condicionado das CEMs 3D após 5-Aza exerce sobre as células pulmonares.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; PILLAI, Shiv; LICHTMAN, Andrew H. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2019, 565 p.

ABU-EL-RUB, E.; KHASAWNEH, R. R.; ALMAHASNEH, F.; et al. Mesenchymal stem cells and COVID-19: What they do and what they can do. **World journal of stem cells**, v. 13, n. 9, p. 1318–1337, 2021.

ACKERMANN, M.; VERLEDEN, S. E.; KUEHNEL, M.; et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. **The New England journal of medicine**, v. 383, n. 2, p. 120–128, 2020.

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815–1822, 2005.

AHMADI, B. M.; NOORI, A.; ASHTIANI, M. K.; RAJABI, S.; TALKHABI, M. 5-Azacytidine incorporated skeletal muscle-derived hydrogel promotes rat skeletal muscle regeneration. **Cells & development**, v. 173, p. 203826, 2023.

AHN, S. Y.; PARK, W. S.; KIM, Y. E.; et al. Vascular endothelial growth factor mediates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles against neonatal hyperoxic lung injury. **Experimental & molecular medicine**, v. 50, n. 4, p. 1–12, 2018.

ALZHRANI, F. A.; SAADELDIN, I. M.; AHMAD, A.; et al. The Potential Use of Mesenchymal Stem Cells and Their Derived Exosomes as Immunomodulatory Agents for COVID-19 Patients. **Stem cells international**, v. 2020, p. 8835986, 2020.

AMANI, B.; AMANI, B. Efficacy and safety of nirmatrelvir/ritonavir (Paxlovid) for COVID-19: A rapid review and meta-analysis. **Journal of medical virology**, v. 95, n. 2,

p.28441, 2023.

ANTONSSON, B.; MONTESSUIT, S.; SANCHEZ, B.; MARTINOU, J. C. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells.

The Journal of biological chemistry, v. 276, n. 15, p. 11615–11623, 2001.

ASLAM, M.; BAVEJA, R.; LIANG, O. D.; et al. Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 180, n. 11, p. 1122–1130, 2009.

ASMUSSEN, S.; ITO, H.; TRABER, D. L.; et al. Human mesenchymal stem cells reduce the severity of acute lung injury in a sheep model of bacterial pneumonia. **Thorax**, v. 69, n. 9, p. 819–825, 2014.

AUGELLO, A.; TASSO, R.; NEGRINI, S. M.; et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. **European journal of immunology**, v. 35, n. 5, p. 1482–1490, 2005.

AURICH, H.; SGODDA, M.; KALTWASSER, P.; et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. **Gut**, v. 58, n. 4, p. 570–581, 2009.

AVOLIO, E.; CARRABBA, M.; MILLIGAN, R.; et al. The SARS-CoV-2 Spike protein disrupts human cardiac pericytes function through CD147 receptor-mediated signalling: a potential non-infective mechanism of COVID-19 microvascular disease. **Clinical science**, v. 135, n. 24, p. 2667–2689, 2021.

BAGHERI-HOSSEINABADI, Z.; SEYEDI, F.; MOLLAEI, H. R.; MOSHREFI, M.; SEIFALIAN, A. Combination of 5-azacytidine and hanging drop culture convert fat cell into cardiac cell. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 92–101, 2021.

BARCZYK, M.; SCHMIDT, M.; MATTOLI, S. Stem Cell-Based Therapy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Stem cell reviews and reports**, v. 11, n. 4, p. 598–620, 2015.

BARTOSH, T. J.; YLÖSTALO, J. H.; MOHAMMADIPOOR, A.; et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 31, p. 13724–13729, 2010.

BASU, S.; CHOUDHURY, I. N.; LEE, J. Y. P.; et al. Macrophages Treated with VEGF and PDGF Exert Paracrine Effects on Olfactory Ensheathing Cell Function. **Cells** , v. 11, n. 15, 2022.

BERNATCHEZ, P. N.; SOKER, S.; SIROIS, M. G. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 43, p. 31047–31054, 1999

BOJANIC, C.; TO, K.; HATOUM, A.; et al. Mesenchymal stem cell therapy in hypertrophic and keloid scars. **Cell and tissue research**, v. 383, n. 3, p. 915–930, 2021.

BRANDÃO, S. C. S.; GODOI, E. T. A. M.; RAMOS, J. DE O. X.; DE MELO, L. M. M. P.; SARINHO, E. S. C. Severe COVID-19: understanding the role of immunity, endothelium, and coagulation in clinical practice. **Jornal vascular brasileiro**, v. 19, p. e20200131, 2020.

BRANN, D. H.; TSUKAHARA, T.; WEINREB, C.; et al. Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. **Science advances**, v. 6, n. 31, 2020.

BURGER, J. A.; PELED, A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. **Leukemia**, v. 23, n. 1, p. 43–52, 2009.

CAI, C.; RODEPETER, F. R.; ROSSMANN, A.; et al. SIVmac₂₃₉-Nef down-regulates cell surface expression of CXCR4 in tumor cells and inhibits proliferation, migration and angiogenesis. **Anticancer research**, v. 32, n. 7, p. 2759–2768, 2012.

CAMPBELL, D. J.; ZIEGLER, S. F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 4, p. 305–310, 2007.

CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of cellular physiology**, v. 213, n. 2, p. 341–347, 2007.

CARVALHO, J. L.; SILVA-CARVALHO, A. E.; GARCEZ, E. M.; SALDANHA-ARAÚJO, F. Commentary: Mesenchymal Stem Cells: A New Piece in the Puzzle of COVID-19 Treatment. **Frontiers in immunology**, v.29. n.2, p. 182, 2021.

CHANG, Y. S.; AHN, S. Y.; JEON, H. B.; et al. Critical role of vascular endothelial growth factor secreted by mesenchymal stem cells in hyperoxic lung injury. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 51, n. 3, p. 391–399, 2014.

CHEN, S.-L.; FANG, W.-W.; YE, F.; et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. **The American journal of cardiology**, v. 94, n. 1, p. 92–95, 2004.

CHEN, Y.; HONG, T.; WANG, S.; et al. Epigenetic modification of nucleic acids: from basic studies to medical applications. **Chemical Society reviews**, v. 46, n. 10, p. 2844–2872, 2017.

CHOI, H.; LEE, R. H.; BAZHANOV, N.; OH, J. Y.; PROCKOP, D. J. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages. **Blood**, v. 118, n. 2, p. 330–338, 2011.

CHRISTGEN, S.; ZHENG, M.; KESAVARDHANA, S.; et al. Identification of the PANoptosome: A Molecular Platform Triggering Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PANoptosis). **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 237, 2020.

CHRISTMAN, J. K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. **Oncogene**, v. 21, n. 35, p. 5483–5495, 2002.

COVAS, D. T.; PANEPUCCI, R. A.; FONTES, A. M.; et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. **Experimental hematology**, v. 36, n. 5, p. 642–654, 2008.

CUENDE, N.; RASKO, J. E. J.; KOH, M. B. C.; DOMINICI, M.; IKONOMOU, L. Cell, tissue and gene products with marketing authorization in 2018 worldwide. **Cytotherapy**, v. 20, n. 11, p. 1401–1413, 2018.

DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P.; LUYTEN, F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis and rheumatism**, v. 44, n. 8, p. 1928–1942, 2001.

DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3838–3843, 2002.

DIAO, B.; WANG, C.; TAN, Y.; et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 827, 2020.

DOMBRET, H.; SEYMOUR, J. F.; BUTRYM, A.; et al. International phase 3 study of

azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. **Blood**, v. 126, n. 3, p. 291–299, 2015.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; 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.

EDMONDSON, R.; BROGLIE, J. J.; ADCOCK, A. F.; YANG, L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and drug development technologies**, v. 12, n. 4, p. 207–218, 2014.

EL AGHA, E.; KRAMANN, R.; SCHNEIDER, R. K.; et al. Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. **Cell stem cell**, v. 21, n. 2, p. 166–177, 2017.

EL-METWALY, S.; EL-SENDUNY, F. F.; EL-DEMERDASH, R. S.; ABDEL-AZIZ, A. F. Mesenchymal stem cells alleviate hydrochloric acid-induced lung injury through suppression of inflammation, oxidative stress and apoptosis in comparison to moxifloxacin and sildenafil. **Heliyon**, v. 5, n. 12, p. e02710, 2019.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

EVANS, J. P.; LIU, S.-L. Role of host factors in SARS-CoV-2 entry. **The Journal of biological chemistry**, v. 297, n. 1, p. 100847, 2021.

FASOLINO, I.; GUARINO, V.; CIRILLO, V.; AMBROSIO, L. 5-Azacytidine-mediated hMSC behavior on electrospun scaffolds for skeletal muscle regeneration. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 105, n. 9, p. 2551–2561, 2017.

FERRARIO, C. M.; JESSUP, J.; CHAPPELL, M. C.; et al. Effect of angiotensin-converting

enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. **Circulation**, v. 111, n. 20, p. 2605–2610, 2005.

FERRINI, E.; STELLARI, F. F.; FRANCESCHI, V.; et al. Persistency of Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Lungs. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 709225, 2021.

FIorentino, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **The Journal of experimental medicine**, v. 170, n. 6, p. 2081–2095, 1989.

FRIEDRICH, J.; SEIDEL, C.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009.

GALLAGHER, S. J.; SHKLOVSKAYA, E.; HERSEY, P. Epigenetic modulation in cancer immunotherapy. **Current opinion in pharmacology**, v. 35, p. 48–56, 2017.

GAO, F.; CHIU, S. M.; MOTAN, D. A. L.; et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. **Cell death & disease**, v. 7, n. 1, p. 2062, 2016.

GAO, Y.; CHI, Y.; CHEN, Y.; et al. Multi-omics analysis of human mesenchymal stem cells shows cell aging that alters immunomodulatory activity through the downregulation of PD-L1. **Nature communications**, v. 14, n. 1, p. 4373, 2023.

GARCIA-OLMO, D.; GILABERTE, I.; BINEK, M.; et al. Follow-up Study to Evaluate the Long-term Safety and Efficacy of Darvadstrocel (Mesenchymal Stem Cell Treatment) in Patients With Perianal Fistulizing Crohn's Disease: ADMIRE-CD Phase 3 Randomized Controlled Trial. **Diseases of the colon and rectum**, v. 65, n. 5, p. 713–720, 2022.

GHALEB, A. M.; YANG, V. W. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. **Gene**, v. 611, p. 27–37, 2017.

GIESEKE, F.; BÖHRINGER, J.; BUSSOLARI, R.; et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3770–3779, 2010.

GOMES, F. S.; DE-SOUZA, G. F.; NASCIMENTO, L. F.; et al. Topical 5-azacytidine accelerates skin wound healing in rats. **Wound repair and regeneration**, v. 22, n. 5, p. 640–646, 2014.

GRECO, S. J.; LIU, K.; RAMESHWAR, P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. **Stem cells**, v. 25, n. 12, p. 3143–3154, 2007.

GRONTHOS, S.; FRANKLIN, D. M.; LEDDY, H. A.; et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. **Journal of cellular physiology**, v. 189, n. 1, p. 54–63, 2001.

GRUNDEIS, F.; ANSEMS, K.; DAHMS, K.; et al. Remdesivir for the treatment of COVID-19. **Cochrane database of systematic reviews**, v. 1, n. 1, p. 14962, 2023.

GUMASHTA, J.; GUMASHTA, R. Role of the Backbenchers of the Renin-Angiotensin System ACE2 and AT2 Receptors in COVID-19: Lessons From SARS. **Cureus**, v. 12, n. 6, p. 8411, 2020.

GUPTA, P. K.; KRISHNA, M.; CHULLIKANA, A.; et al. Administration of Adult Human Bone Marrow-Derived, Cultured, Pooled, Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells in Critical Limb Ischemia Due to Buerger's Disease: Phase II Study Report Suggests Clinical Efficacy.

Stem cells translational medicine, v. 6, n. 3, p. 689–699, 2017.

GUZY, R. D.; STOILOV, I.; ELTON, T. J.; MECHAM, R. P.; ORNITZ, D. M. Fibroblast growth factor 2 is required for epithelial recovery, but not for pulmonary fibrosis, in response to bleomycin. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 52, n. 1, p. 116–128, 2015.

HOLLENBACH, P. W.; NGUYEN, A. N.; BRADY, H.; et al. A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9001, 2010.

HORWITZ, E. M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393–395, 2005.

HUANG, X.; LIANG, P.; JIANG, B.; et al. Hyperbaric oxygen potentiates diabetic wound healing by promoting fibroblast cell proliferation and endothelial cell angiogenesis. **Life sciences**, v. 259, p. 118246, 2020.

HUANG, X.; ZHANG, X.; MACHIREDDY, N.; et al. Endothelial FoxM1 reactivates aging-impaired endothelial regeneration for vascular repair and resolution of inflammatory lung injury. **Science translational medicine**, v. 15, n. 709, p.5755, 2023.

HUANG, Y.; LI, X.; YANG, L. Mesenchymal stem cells and their derived small extracellular vesicles for COVID-19 treatment. **Stem cell research & therapy**, v. 13, n. 1, p. 410, 2022.

HUYNH, C.; DINGEMANSE, J.; MEYER ZU SCHWABEDISSEN, H. E.; SIDHARTA, P. N. Relevance of the CXCR4/CXCR7-CXCL12 axis and its effect in pathophysiological conditions. **Pharmacological research**, v. 161, p. 105092, 2020.

IHALAINEN, T. O.; AIRES, L.; HERZOG, F. A.; et al. Differential basal-to-apical

accessibility of lamin A/C epitopes in the nuclear lamina regulated by changes in cytoskeletal tension. **Nature materials**, v. 14, n. 12, p. 1252–1261, 2015.

JAENISCH, R. DNA methylation and imprinting: why bother? **Trends in genetics: TIG**, v. 13, n. 8, p. 323–329, 1997.

JIANG, X.; JIANG, X.; QU, C.; et al. Intravenous delivery of adipose-derived mesenchymal stromal cells attenuates acute radiation-induced lung injury in rats. **Cytherapy**, v. 17, n. 5, p. 560–570, 2015.

JONES, P. A.; TAYLOR, S. M. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. **Cell**, v. 20, n. 1, p. 85–93, 1980.

JOSE, R. J.; MANUEL, A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. **The Lancet. Respiratory medicine**, v. 8, n. 6, p. 46–47, 2020.

JOSHI, J.; MAHAJAN, G.; KOTHAPALLI, C. R. Three-dimensional collagenous niche and azacytidine selectively promote time-dependent cardiomyogenesis from human bone marrow-derived MSC spheroids. **Biotechnology and bioengineering**, v. 115, n. 8, p. 2013–2026, 2018.

JUNGWIRTH, N.; SALINAS TEJEDOR, L.; JIN, W.; et al. Mesenchymal Stem Cells Form 3D Clusters Following Intraventricular Transplantation. **Journal of molecular neuroscience: MN**, v. 65, n. 1, p. 60–73, 2018.

JURKOWSKA, R. Z.; JURKOWSKI, T. P.; JELTSCH, A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. **ChemBiochem: a European journal of chemical biology**, v. 12, n. 2, p. 206–222, 2011.

KADEKAR, S.; BARBE, L.; STODDART, M.; et al. Effect of the Addition Frequency of

5-Azacytidine in Both Micro- and Macroscale Cultures. **Cellular and molecular bioengineering**, v. 14, n. 1, p. 121–130, 2021.

KARKI, R.; SHARMA, B. R.; TULADHAR, S.; et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. **Cell**, v. 184, n. 1, p. 149–168.e17, 2021.

KELLER, C. A.; GONWA, T. A.; HODGE, D. O.; et al. Feasibility, Safety, and Tolerance of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Obstructive Chronic Lung Allograft Dysfunction. **Stem cells translational medicine**, v. 7, n. 2, p. 161–167, 2018.

KHASHKHOSHA, H. K.; ELHADI, M. A hypothesis on the role of the human immune system in covid-19. **Medical hypotheses**, v. 143, p. 110066, 2020.

KIZILTEPE, T.; HIDESHIMA, T.; CATLEY, L.; et al. 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 6, n. 6, p. 1718–1727, 2007.

KORNICKA, K.; MARYCZ, K.; MAREŹZIAK, M.; TOMASZEWSKI, K. A.; NICPOŃ, J. The effects of the DNA methyltransferases inhibitor 5-Azacytidine on ageing, oxidative stress and DNA methylation of adipose derived stem cells. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 21, n. 2, p. 387–401, 2017.

KRETLOW, J. D.; JIN, Y.-Q.; LIU, W.; et al. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. **BMC cell biology**, v. 9, p. 60, 2008.

KUEHL, P. J.; TELLEZ, C. S.; GRIMES, M. J.; et al. 5-Azacytidine inhaled dry powder formulation profoundly improves pharmacokinetics and efficacy for lung cancer therapy through genome reprogramming. **British journal of cancer**, v. 122, n. 8, p. 1194–1204, 2020

LAI, T.-S.; WANG, Z.-H.; CAI, S.-X. Mesenchymal stem cell attenuates neutrophil-predominant inflammation and acute lung injury in an in vivo rat model of ventilator-induced lung injury. **Chinese medical journal**, v. 128, n. 3, p. 361–367, 2015.

LAKHANI, S. A.; MASUD, A.; KUIDA, K.; et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 847–851, 2006.

LECHIEN, J. R.; CHIESA-ESTOMBA, C. M.; DE SIATI, D. R.; et al. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. **European archives of otorhino-laryngology**, v. 277, n. 8, p. 2251–2261, 2020.

LEE, S.; KIM, H.-S.; MIN, B.-H.; et al. Enhancement of anti-inflammatory and immunomodulatory effects of adipose-derived human mesenchymal stem cells by making uniform spheroid on the new nano-patterned plates. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 552, p. 164–169, 2021.

LI, L.; ZHANG, W.; HU, Y.; et al. Effect of Convalescent Plasma Therapy on Time to Clinical Improvement in Patients With Severe and Life-threatening COVID-19: A Randomized Clinical Trial. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 324, n. 5, p. 460–470, 2020.

LI, L.; ZHANG, W.; HU, Y.; et al. Effect of Convalescent Plasma Therapy on Time to Clinical Improvement in Patients With Severe and Life-threatening COVID-19: A Randomized Clinical Trial. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 324, n. 5, p. 460–470, 2020.

LIU, S.; PENG, D.; QIU, H.; et al. Mesenchymal stem cells as a potential therapy for COVID-19. **Stem cell research & therapy**, v. 11, n. 1, p. 169, 2020.

LIVAK, Kenneth; SCHMITTGEN, Thomas. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. v. 24, p. 402-408, 2001.

LOI, R.; BECKETT, T.; GONCZ, K. K.; SURATT, B. T.; WEISS, D. J. Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 173, n. 2, p. 171–179, 2006.

LU, G.; WANG, Q.; GAO, G. F. Bat-to-human: spike features determining “host jump” of coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 8, p. 468–478, 2015.

LUBBE, L.; COZIER, G. E.; OOSTHUIZEN, D.; ACHARYA, K. R.; STURROCK, E. D. ACE2 and ACE: structure-based insights into mechanism, regulation and receptor recognition by SARS-CoV. **Clinical science** , v. 134, n. 21, p. 2851–2871, 2020.

LUCAS, C.; WONG, P.; KLEIN, J.; et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 463–469, 2020.

LUO, W.-W.; LIAN, H.; ZHONG, B.; SHU, H.-B.; LI, S. Krüppel-like factor 4 negatively regulates cellular antiviral immune response. **Cellular & molecular immunology**, v. 13, n. 1, p.65–72, 2016.

MACCARIO, R.; PODESTÀ, M.; MORETTA, A.; et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. **Haematologica**, v. 90, n. 4, p. 516–525, 2005.

MADTES, D. K.; ELSTON, A. L.; HACKMAN, R. C.; DUNN, A. R.; CLARK, J. G. Transforming growth factor-alpha deficiency reduces pulmonary fibrosis in transgenic mice.

American journal of respiratory cell and molecular biology, v. 20, n. 5, p. 924–934, 1999.

MAITRA, B.; SZEKELY, E.; GJINI, K.; et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. **Bone marrow transplantation**, v. 33, n. 6, p. 597–604, 2004.

MAJUMDAR, M. K.; KEANE-MOORE, M.; BUYANER, D.; et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. **Journal of biomedical science**, v. 10, n. 2, p. 228–241, 2003.

MARJOT, T.; WEBB, G. J.; BARRITT, A. S., 4th; et al. COVID-19 and liver disease: mechanistic and clinical perspectives. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 18, n. 5, p. 348–364, 2021.

MARTIN, J.; HELM, K.; RUEGG, P.; et al. Adult lung side population cells have mesenchymal stem cell potential. **Cytotherapy**, v. 10, n. 2, p. 140–151, 2008.

MATSUMOTO, K.; EMA, M. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours. **Journal of biochemistry**, v. 156, n. 1, p. 1–10, 2014.

MEHTA, P.; MCAULEY, D. F.; BROWN, M.; et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1033–1034, 2020.

MEISEL, R.; ZIBERT, A.; LARYEA, M.; et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. **Blood**, v. 103, n. 12, p. 4619–4621, 2004.

MELIEF, S. M.; GEUTSKENS, S. B.; FIBBE, W. E.; ROELOFS, H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. **Haematologica**, v. 98, n. 6, p. 888–895, 2013.

MELLOR, A. L.; BABAN, B.; CHANDLER, P.; et al. Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. **Journal of immunology**, v. 171, n. 4, p. 1652–1655, 2003.

MELLOR, A. L.; CHANDLER, P.; BABAN, B.; et al. Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. **International immunology**, v. 16, n. 10, p. 1391–1401, 2004.

MENG, F.; XU, R.; WANG, S.; et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with COVID-19: a phase 1 clinical trial. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 172, 2020.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5807–5812, 2003.

MO, M.; WANG, S.; ZHOU, Y.; LI, H.; WU, Y. Mesenchymal stem cell subpopulations: phenotype, property and therapeutic potential. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 73, n. 17, p. 3311–3321, 2016.

MONSEL, A.; ZHU, Y.-G.; GENNAI, S.; et al. Therapeutic Effects of Human Mesenchymal Stem Cell-derived Microvesicles in Severe Pneumonia in Mice. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 192, n. 3, p. 324–336, 2015.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **American College of Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23–38, 2013.

MOORE, M. A.; HATTORI, K.; HEISSIG, B.; et al. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 938, p.

36–45, 2001.

MORIKAWA, M.; DERYNCK, R.; MIYAZONO, K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 8, n. 5, 2016.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. **Trends in immunology**, v. 37, n. 3, p. 193–207, 2016.

NAJAR, M.; RAICEVIC, G.; CROMPOT, E.; et al. The Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cells: A Story of a Regulatory Network. **Journal of immunotherapy**, v. 39, n. 2, p. 45–59, 2016.

NAJI, A.; FAVIER, B.; DESCHASEAUX, F.; et al. Mesenchymal stem/stromal cell function in modulating cell death. **Stem cell research & therapy**, v. 10, n. 1, p. 56, 2019.

NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3499–3506, 2007.

NAVARATNARAJAH, C. K.; PEASE, D. R.; HALFMANN, P. J.; et al. Highly Efficient SARS-CoV-2 Infection of Human Cardiomyocytes: Spike Protein-Mediated Cell Fusion and Its Inhibition. **Journal of virology**, v. 95, n. 24, p. 136821, 2021.

NAVIS, G.; FABER, H. J.; DE ZEEUW, D.; DE JONG, P. E. ACE inhibitors and the kidney. A risk-benefit assessment. **Drug safety: an international journal of medical toxicology and drug experience**, v. 15, n. 3, p. 200–211, 1996.

NG, F.; BOUCHER, S.; KOH, S.; 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.

NOMIYAMA, H.; OSADA, N.; YOSHIE, O. A family tree of vertebrate chemokine receptors for a unified nomenclature. **Developmental and comparative immunology**, v. 35, n. 7, p. 705–715, 2011.

NORONHA, N. DE C.; MIZUKAMI, A.; CALIÁRI-OLIVEIRA, C.; et al. Correction to: Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. **Stem cell research & therapy**, v. 10, n. 1, p. 132, 2019.

OKANO, M.; BELL, D. W.; HABER, D. A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247–257, 1999.

ONG, A. L. C.; LEE, S. H.; AUNG, S. W.; KHAING, S. L.; RAMASAMY, T. S. 5-Azacytidine pretreatment confers transient upregulation of proliferation and stemness in human mesenchymal stem cells. **Cells & development**, v. 165, p. 203659, 2021.

ORAN, B.; DE LIMA, M.; GARCIA-MANERO, G.; et al. A phase 3 randomized study of 5-azacitidine maintenance vs observation after transplant in high-risk AML and MDS patients. **Blood advances**, v. 4, n. 21, p. 5580–5588, 2020.

PARK, Y.-B.; HA, C.-W.; LEE, C.-H.; YOON, Y. C.; PARK, Y.-G. Cartilage Regeneration in Osteoarthritic Patients by a Composite of Allogeneic Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronate Hydrogel: Results from a Clinical Trial for Safety and Proof-of-Concept with 7 Years of Extended Follow-Up. **Stem cells translational medicine**, v. 6, n. 2, p. 613–621, 2017.

PEDRAZZA, L.; CUNHA, A. A.; LUFT, C.; et al. Mesenchymal stem cells improves survival

in LPS-induced acute lung injury acting through inhibition of NETs formation. **Journal of cellular physiology**, v. 232, n. 12, p. 3552–3564, 2017.

PICCIRILLO, C. A. Regulatory T cells in health and disease. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 395–401, 2008.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 1999.

PREVOSTO, C.; ZANCOLLI, M.; CANEVALI, P.; ZOCCHI, M. R.; POGGI, A. Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. **Haematologica**, v. 92, n. 7, p. 881–888, 2007.

QUE, J.; LUO, X.; SCHWARTZ, R. J.; HOGAN, B. L. M. Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea. **Development**, v. 136, n. 11, p. 1899–1907, 2009.

RAAIJMAKERS, M. H. G. P.; MUKHERJEE, S.; GUO, S.; et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. **Nature**, v. 464, n. 7290, p. 852–857, 2010.

RAICEVIC, G.; ROUAS, R.; NAJAR, M.; et al. Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. **Human immunology**, v. 71, n. 3, p. 235–244, 2010.

RAMASAMY, S.; SUBBIAN, S. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. **Clinical microbiology reviews**, v. 34, n. 3, 2021.

REN, Y.; WANG, A.; FANG, Y.; et al. SARS-CoV-2 Membrane Glycoprotein M Triggers Apoptosis With the Assistance of Nucleocapsid Protein N in Cells. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 706252, 2021.

RHEINWALD, James; GREEN, Howard. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. **Nature**. v. 265, p. 421-424, 1997.

RICHELDI, L.; COSTABEL, U.; SELMAN, M.; et al. Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis. **The New England journal of medicine**, v. 365, n. 12, p. 1079–1087, 2011.

ROBLES, J. P.; ZAMORA, M.; ADAN-CASTRO, E.; et al. The spike protein of SARS-CoV-2 induces endothelial inflammation through integrin $\alpha5\beta1$ and NF- κ B signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 298, n. 3, p. 101695, 2022.

ROSADA, C.; JUSTESEN, J.; MELSVIK, D.; et al. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. **Calcified tissue international**, v. 72, n. 2, p. 135–142, 2003.

SADEGHI, B.; ROSHANDEL, E.; PIRSALEHI, A.; et al. Conquering the cytokine storm in COVID-19-induced ARDS using placenta-derived decidual stromal cells. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 25, n. 22, p. 10554–10564, 2021.

SAHEB SHARIF-ASKARI, N.; SAHEB SHARIF-ASKARI, F.; ALABED, M.; et al. Airways Expression of SARS-CoV-2 Receptor, ACE2, and TMPRSS2 Is Lower in Children Than Adults and Increases with Smoking and COPD. **Molecular therapy. Methods & clinical development**, v. 18, p. 1–6, 2020.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **Journal of immunology**, v. 155, n. 3, p. 1151–1164, 1995.

SALAMA, C.; HAN, J.; YAU, L.; et al. Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. **The New England journal of medicine**, v. 384, n. 1, p. 20–30, 2021

SALDANHA-ARAÚJO, F.; FERREIRA, F. I. S.; PALMA, P. V.; et al. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. **Stem cell research**, v. 7, n. 1, p. 66–74, 2011.

SAMENI, M.; MIRMOTALEBISOHI, S. A.; DEGHAN, Z.; et al. Deciphering molecular mechanisms of SARS-CoV-2 pathogenesis and drug repurposing through GRN motifs: a comprehensive systems biology study. **Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 117, 2023.

SAULER, M.; BAZAN, I. S.; LEE, P. J. Cell Death in the Lung: The Apoptosis-Necroptosis Axis. **Annual review of physiology**, v. 81, p. 375–402, 2019.

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012

SEREJO, T. R. T.; SILVA-CARVALHO, A. É.; BRAGA, L. D. DE C. F.; et al. Assessment of the Immunosuppressive Potential of INF- γ Licensed Adipose Mesenchymal Stem Cells, Their Secretome and Extracellular Vesicles. **Cells**, v. 8, n. 1, 2019.

SHAPIRA, T.; MONREAL, I. A.; DION, S. P.; et al. A TMPRSS2 inhibitor acts as a pan-SARS-CoV-2 prophylactic and therapeutic. **Nature**, v. 605, n. 7909, p. 340–348, 2022.

SHU, L.; NIU, C.; LI, R.; et al. Treatment of severe COVID-19 with human umbilical cord mesenchymal stem cells. **Stem cell research & therapy**, v. 11, n. 1, p. 361, 2020.

SILVA, J.; SMITH, A. Capturing pluripotency. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 532–536, 2008.

SILVA-CARVALHO, A. É.; DA SILVA, I. G. M.; CORRÊA, J. R.; SALDANHA-ARAÚJO, F. Regulatory T-Cell Enhancement, Expression of Adhesion Molecules, and Production of

Anti-Inflammatory Factors Are Differentially Modulated by Spheroid-Cultured Mesenchymal Stem Cells. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 22, 2022.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **The New England journal of medicine**, v. 341, n. 10, p. 738–746, 1999.

SINGH, V.; RAM, M.; KUMAR, R.; et al. Phosphorylation: Implications in Cancer. **The protein journal**, v. 36, n. 1, p. 1–6, 2017.

SOJKA, D. K.; HUANG, Y.-H.; FOWELL, D. J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. **Immunology**, v. 124, n. 1, p. 13–22, 2008.

SORM, F.; PÍSKALA, A.; CIHÁK, A.; VESELÝ, J. 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. **Experientia**, v. 20, n. 4, p. 202–203, 1964.

SPRING, H.; SCHÜLER, T.; ARNOLD, B.; HÄMMERLING, G. J.; GANSS, R. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 50, p. 18111–18116, 2005.

SUPOKAWAJ, A.; KHEOLAMAI, P.; NARTPRAYUT, K.; et al. Cardiogenic and myogenic gene expression in mesenchymal stem cells after 5-azacytidine treatment. **Turkish journal of haematology**, v. 30, n. 2, p. 115–121, 2013

TANG, T.; BIDON, M.; JAIMES, J. A.; WHITTAKER, G. R.; DANIEL, S. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. **Antiviral research**, v. 178, p. 104792, 2020.

THUNDERS, M.; DELAHUNT, B. Gene of the month: (transmembrane serine protease 2). **Journal of clinical pathology**, v. 73, n. 12, p. 773–776, 2020.

TIAN, S.; XIONG, Y.; LIU, H.; et al. Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease

(COVID-19) through postmortem core biopsies. **Modern pathology**, v. 33, n. 6, p. 1007–1014, 2020.

TILG, H.; VAN MONTFRANS, C.; VAN DEN ENDE, A.; et al. Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. **Gut**, v. 50, n. 2, p. 191–195, 2002.

TOMPKINS, D. H.; BESNARD, V.; LANGE, A. W.; et al. Sox2 is required for maintenance and differentiation of bronchiolar Clara, ciliated, and goblet cells. **PloS one**, v. 4, n. 12, p. 8248, 2009.

TROYANO-HERNÁEZ, P.; REINOSA, R.; HOLGUÍN, Á. Evolution of SARS-CoV-2 Envelope, Membrane, Nucleocapsid, and Spike Structural Proteins from the Beginning of the Pandemic to September 2020: A Global and Regional Approach by Epidemiological Week. **Viruses**, v. 13, n. 2, 2021.

TSAO, P.-N.; MATSUOKA, C.; WEI, S.-C.; et al. Epithelial Notch signaling regulates lung alveolar morphogenesis and airway epithelial integrity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 29, p. 8242–8247, 2016.

TUFAN, A.; AVANOĞLU GÜLER, A.; MATUCCI-CERINIC, M. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs. **Turkish journal of medical sciences**, v. 50, n. SI-1, p. 620–632, 2020.

TYRKALSKA, S. D.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, A.; ARROYO, A. B.; et al. Differential proinflammatory activities of Spike proteins of SARS-CoV-2 variants of concern. **Science advances**, v. 8, n. 37, p.732, 2022.

UNNIKRISHNAN, A.; PAPAEMMANUIL, E.; BECK, D.; et al. Integrative Genomics

Identifies the Molecular Basis of Resistance to Azacitidine Therapy in Myelodysplastic Syndromes. **Cell reports**, v. 20, n. 3, p. 572–585, 2017.

VALLATH, S.; HYNDS, R. E.; SUCCONY, L.; JANES, S. M.; GIANGRECO, A. Targeting EGFR signalling in chronic lung disease: therapeutic challenges and opportunities. **The European respiratory journal**, v. 44, n. 2, p. 513–522, 2014.

VARGA, Z.; FLAMMER, A. J.; STEIGER, P.; et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. **The Lancet**, v. 395, n. 10234, p. 1417–1418, 2020.

VERMA, Y. K.; VERMA, R.; TYAGI, N.; et al. COVID-19 and its Therapeutics: Special Emphasis on Mesenchymal Stem Cells Based Therapy. **Stem cell reviews and reports**, v. 17, n. 1, p. 113–131, 2021.

WANG, C.; XIE, J.; ZHAO, L.; et al. Alveolar macrophage dysfunction and cytokine storm in the pathogenesis of two severe COVID-19 patients. **EBioMedicine**, v. 57, p. 102833, 2020.

WANG, L.; LI, Y.; CHEN, X.; et al. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. **Hematology**, v. 7, n. 2, p. 113–117, 2002.

WANG, W.; CHEN, J.; YU, X.; LAN, H.-Y. Signaling mechanisms of SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein in viral infection, cell death and inflammation. **International journal of biological sciences**, v. 18, n. 12, p. 4704–4713, 2022.

WENG, Z.; WANG, Y.; OUCHI, T.; et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies. **Stem cells translational medicine**, v. 11, n. 4, p. 356–371, 2022.

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. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 632717, 2021.

WU, S. C.; ZHANG, Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 9, p. 607–620, 2010.

XU, M.; HU, B.; CHEN, J.; et al. CXCR7 promotes the migration of fibroblasts derived from patients with acquired laryngotracheal stenosis by NF- κ B signaling. **Translational pediatrics**, v. 12, n. 9, p. 1634–1645, 2023.

XU, X.; JIANG, W.; CHEN, L.; et al. Evaluation of the safety and efficacy of using human menstrual blood-derived mesenchymal stromal cells in treating severe and critically ill COVID-19 patients: An exploratory clinical trial. **Clinical and translational medicine**, v. 11, n. 2, p. e297, 2021.

YADAV, R.; CHAUDHARY, J. K.; JAIN, N.; et al. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. **Cells**, v. 10, n. 4, 2021.

YAN, X.; EHNERT, S.; CULMES, M.; et al. 5-azacytidine improves the osteogenic differentiation potential of aged human adipose-derived mesenchymal stem cells by DNA demethylation. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e90846, 2014.

YÁÑEZ-MÓ, M.; SILJANDER, P. R.-M.; ANDREU, Z.; et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of extracellular vesicles**, v. 4, p. 27066, 2015.

ZHANG, H.; ZHANG, X.; LING, C.; et al. EGFR-TNFR1 pathway in endothelial cell facilitates acute lung injury by NF- κ B/MAPK-mediated inflammation and RIP3-dependent necroptosis. **International immunopharmacology**, v. 117, p. 109902, 2023.

ZHANG, P.; ZHU, L.; CAI, J.; et al. Association of Inpatient Use of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II Receptor Blockers With Mortality Among Patients With Hypertension Hospitalized With COVID-19. **Circulation research**, v. 126, n. 12, p. 1671–1681, 2020.

ZHANG, T.; ZHONG, S.; CAO, W. COVID-19 and Comorbid Hypertension: Is ACE2 the Culprit? **Prehospital and disaster medicine**, v. 35, n. 6, p. 700–701, 2020.

ZHANG, Y.; JIANG, X.; REN, L. Optimization of the adipose-derived mesenchymal stem cell delivery time for radiation-induced lung fibrosis treatment in rats. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 5589, 2019.