

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

“Caracterização fenotípica e funcional de células estromais  
mesenquimais de cordão umbilical pré-condicionadas com agentes  
farmacológicos”

José Lucas Martins Rocha

**Ribeirão Preto - SP**  
**2021**

**José Lucas Martins Rocha**

“Caracterização fenotípica e funcional de células estromais mesenquimais de cordão umbilical pré-condicionadas com agentes farmacológicos”

**Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).**

Dissertação apresentada junto a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências  
Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias

**Ribeirão Preto - SP  
2021**

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

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Rocha, José Lucas Martins

Caracterização fenotípica e funcional de células estromais mesenquimais de cordão umbilical pré-condicionadas com agentes farmacológicos, 2021. 110 p. il.; 30cm.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Malmegrin de Farias, Kelen Cristina Ribeiro

**1.** células estromais mesenquimais **2.** 5-azacitidina **3.** tacrolimo **4.** terapia celular **5.** imunomodulação **6.** regeneração tecidual.

## Folha de Aprovação

José Lucas Martins Rocha

“Caracterização fenotípica e funcional de células estromais mesenquimais de cordão umbilical pré-condicionadas com agentes farmacológicos”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Ciências.  
Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kelen Cristina Ribeiro  
Malmegrim de Farias

Aprovado em,

Banca examinadora

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho a meus pais e irmã pelo apoio pessoal imensurável nessa jornada, a todos os indivíduos que cederam suas amostras para a pesquisa e à construção do conhecimento científico de excelência.

Agradecimentos especiais,

À minha família por ser tudo em minha vida.

À Profª Drª Kelen Cristina R. Malmegrim de Farias (coordenadora do Lab. de Terapia Celular FCFRP-USP), por me acolher, acreditar em meu potencial, e, especialmente por apoiar minhas idéias, guiando-as pelo caminho mais coeso. Obrigado pelos intermináveis ensinamentos. Você é fonte de inspiração, nota 10!

À minha colega de laboratório, tutora de desenvolvimento prático dos trabalhos, Drª Nádia Noronha... sem você eu não sei o que seria de mim. Obrigado pela seriedade, “puxões de orelha”, paciência e por me socorrer sempre que precisei.

Agradecimentos gerais,

À Profª Drª Andréia Machado Leopoldino (coordenadora do Lab. de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer FCFRP-USP), por ter nos ajudado com análises importantes de nosso projeto, com toda a boa vontade e atenção.

À Profª Drª Fabíola Attié de Castro (coordenadora do Lab. de Hematologia FCFRP-USP), por ter cedido parte de seu material e espaço para a realização de alguns de nossos experimentos.

À Profª Drª Maria Carolina de Oliveira Rodrigues (coordenadora do Lab. de Imunologia Celular FMRP-USP), pelas trocas de ideias e discussões enriquecedoras durante nossas reuniões semanais do grupo de pesquisa.

Aos técnicos MSc. Luciana Ambrósio do Lab. de Hematologia FCFRP-USP e Luiz Fernando Chaim do Lab. de Terapia Celular FCFRP-USP, pelo carinho, presteza e eficiência. Dupla fenomenal!

Às técnicas Camila e Patrícia (responsáveis pelo Lab. de Citometria de Fluxo FUNDHERP). Vocês me ajudaram a obter resultados valiosos que aqui estão apresentados. Obrigado pela atenção e gentileza todas as vezes em que nos encontramos!

À Drª Amanda Mizukami, pela cordialidade e assessoria científica, sempre solícita.

Aos membros do Lab. de Transferência Gênica - FUNDHERP, pelo fornecimento de equipamentos e espaço, em suas dependências, sempre que precisei.

Aos membros do Lab. de Terapia Celular – FUNDHERP (coordenado pela Dr<sup>a</sup> Maristela Delgado Orellana) pelo fornecimento de amostras para alguns de nossos experimentos.

À Sandra, que melhorou e padronizou a qualidade das figuras aqui apresentadas.

Às funcionárias Carmen, Dalvinha, Marjorie e Renata Aparecida por todas as interações que tivemos e pelo suporte durante minha jornada no Hemocentro - FUNDHERP.

Aos demais funcionários da FUNDHERP e ao Dr. Dimas Tadeu Covas por possibilitarem a realização deste trabalho e pela oportunidade de participar de vários cursos/eventos nas instalações da FUNDHERP.

À Ana Cristine (secretária do programa de pós-graduação Imunologia Básica e Aplicada, IBA), pela atenção, gentileza e afetuosidade para comigo, preocupando-se com o meu bem-estar.

Ao IBA por elevar minha formação científica e profissional.

Aos meus colegas do Lab. de Terapia Celular FCFRP-USP, Rafaela Felício, Waldir César, Paula e Marcela pela parceria e gentilezas trocadas.

Aos alunos do Lab. de Hematologia FCFRP-USP, em especial, Juçara Cominal e Vitor Bassan, pela amizade, apoio e consideração.

Aos meus amigos Murillo Duarte, Jefferson Elias (ambos de longa data) e, ao Cícero Juliano (que conheci ao iniciar a pós) por serem tão bons, fiéis e legais. A amizade de vocês é insubstituível e a levarei comigo até o fim.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e recebeu fomento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 134190/2018-1.

*“Pode levar um tempinho, mas a vida pode ficar maravilhosa. Se a gente  
mantiver a simplicidade, dizer não às insanidades e retomar o controle,  
poderemos quebrar as correntes e construir palácios”* **Nelly Furtado**



## RESUMO

ROCHA, JLM. **Caracterização fenotípica e funcional de células estromais mesenquimais de cordão umbilical pré-condicionadas com agentes farmacológicos.** 2021. XX f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

As células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) correspondem a uma população heterogênea de células que podem ser isoladas do estroma de diversos tecidos. Apesar das MSCs possuírem propriedades imunomoduladora e regenerativa, as mesmas são limitadas *in vivo* devido ao microambiente patológico inóspito. Neste contexto, estratégias de pré-condicionamento de MSCs têm sido propostas para melhorar a sobrevivência, viabilidade, enxertia, funções e eficácia terapêutica destas células para aplicação clínica. O objetivo desse estudo foi caracterizar fenotípica e funcionalmente células estromais mesenquimais de cordão umbilical - MSC(CB), pré-condicionadas *in vitro* com 5-azacitidina (fármaco modulador epigenético) ou com tacrolimo (fármaco imunossupressor). MSCs foram isoladas de cordões umbilicais e cultivadas para confecção de um banco de células primárias em segunda e terceira passagens. Em seguida, as MSC(CB) foram expandidas, incubadas na presença ou ausência dos fármacos 5-azacitidina (5-AZA) ou tacrolimo (FK506) por períodos pré-determinados e submetidas aos ensaios *in vitro* para caracterização de identidade e potência: imunofenotipagem, viabilidade e crescimento celular, diferenciação celular em adipócitos e osteócitos, inibição da proliferação de células T, processo autofágico, análises do secretoma das MSC(CB), migração de células endoteliais e de neoangiogênese induzidas pelo secretoma das MSC(CB). Os pré-condicionamentos de MSC(CB) com 5-AZA ou FK506 não alteraram as características básicas desse tipo celular, mantendo a viabilidade celular, o imunofenótipo característico e a capacidade de diferenciação multipotencial. As MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA apresentaram aumento da secreção de moléculas relacionadas a angiogênese (VEGF, uPA, TIMP-4, artemina, TGF- $\beta$ 1) e inflamação (CCL2, CHI3-L1, VCAM-1, CD105, CD147), além de modularem positivamente vários outros fatores pró-angiogênicos e inflamatórios. A 5-AZA potencializou as propriedades pró-angiogênicas das MSC(CB), caracterizada pelo aumento da migração de células endoteliais e da formação de estruturas semelhantes a capilares sanguíneos em ensaios de neoangiogênese, induzidas pelo meio condicionado das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA. As MSC(CB) pré-condicionadas com FK506 apresentaram um aumento de seu efeito imunossupressor demonstrado pelo aumento da inibição da proliferação de linfócitos T. O FK506 aumentou a secreção de moléculas relacionadas a angiogênese (endostatina, PDGF-AA, VEGF, TGF- $\beta$ 1) e a inflamação (CXCL1, CXCL5, trombospondina 1, PGE2) além de modular negativamente outras moléculas (tais como LIF, CD105, FGF19, HGF, MMP9, Serpina E1). Portanto, as abordagens avaliadas neste estudo são promissoras e devem ser testadas em modelos pré-clínicos para avaliação de estabilidade, enxertia, função regenerativas e/ou imunossupressora *in vivo* e eficácia terapêutica das células pré-condicionadas, visando futuras aplicações clínicas.

**Palavras-chave:** células estromais mesenquimais, 5-azacitidina, tacrolimo, terapia celular, imunomodulação, regeneração tecidual.

## ABSTRACT

ROCHA, JLM. **Phenotypic and functional characterization of umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells preconditioned with pharmacological agents.** 2021. XX f. Master's Dissertation, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto.

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) correspond to a heterogeneous population of cells that can be isolated from the stroma of different tissues. Despite the fact MSCs display immunomodulatory and regenerative properties, they cannot engraft properly due to the noxious pathological *in vivo* microenvironment. In this context, preconditioning approaches of MSCs have been proposed to improve survival, viability, grafting, functions, and efficacy of these cells for clinical applications. The aim of this study was to characterize phenotypic and functionally umbilical cord mesenchymal stromal cells - MSC(CB), preconditioned *in vitro* with 5-azacytidine (epigenetic modulator drug) or with tacrolimus (immunosuppressive drug). MSCs were isolated from three umbilical cords and cultured to make a primary cell bank in second and third passages. Then, the MSC(CB) were expanded, incubated in the presence or absence of the drugs 5-azacytidine (5-AZA) or tacrolimus (FK506) for predetermined periods and submitted to *in vitro* assays to characterize their identity and potency: immunophenotyping, cell viability and growth, cell differentiation into adipocytes and osteocytes, inhibition of T cell proliferation, autophagic process, MSC(CB) secretome analyses, endothelial cell migration and neoangiogenesis, induced by the MSC(CB) secretome. MSC(CB) preconditioning with 5-AZA or FK506 did not change the basic characteristics of this cell type, maintaining cell viability, their characteristic immunophenotype and multipotential differentiation capacity. MSC(CB) preconditioned with 5-AZA showed increased secretion of angiogenesis (VEGF, uPA, TIMP-4, artemin, TGF- $\beta$ 1) and inflammation (CCL2, CHI3-L1, VCAM-1, CD105, CD147) related molecules, in addition to positively modulating several other pro-angiogenic and inflammatory factors. 5-AZA potentiated the pro-angiogenic properties of MSC(CB), characterized by increased migration of endothelial cells and the formation of structures like blood capillaries in neoangiogenesis assays, induced by the conditioned medium of preconditioned MSC(CB) with 5-AZA. MSC(CB) preconditioned with FK506 showed an increase in their immunosuppressive effect demonstrated by the increased inhibition of T lymphocyte proliferation. FK506 increased the secretion of molecules related to angiogenesis (endostatin, PDGF-AA, VEGF, TGF- $\beta$ 1) and inflammation (CXCL1, CXCL5, thrombospondin 1, PGE2), in addition to negatively modulate other molecules (such as LIF, CD105, FGF19, HGF, MMP9, Serpin E1). Therefore, the approaches evaluated in this study are promising and should be further tested in preclinical models to assess stability, grafting, regenerative and/or immunosuppressive function *in vivo* and therapeutic efficacy of preconditioned cells, aiming at future clinical applications.

**Keywords:** mesenchymal stromal cells, 5-azacytidine, tacrolimus, cell therapy, immunomodulation, tissue regeneration.

## **Lista de Figuras**

<b>Figura 1</b> – Propriedades biológicas gerais das MSCs.....	<b>25</b>
<b>Figura 2</b> – Estudos clínicos com MSCs finalizados.....	<b>29</b>
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática das modalidades de pré-condicionamento de MSCs atuais e mais comuns.....	<b>31</b>
<b>Figura 4</b> – Análise da morfologia de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.....	<b>49</b>
<b>Figura 5</b> – Análise de viabilidade das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.....	<b>49</b>
<b>Figura 6</b> – Cinética de crescimento das MSC(CB) pré-condicionadas com diferentes concentrações de 5-AZA e fatores de expansão calculados .....	<b>50</b>
<b>Figura 7</b> – Perfil imunofenotípico das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.....	<b>51</b>
<b>Figura 8</b> – Diferenciação das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA em adipócitos e osteócitos.....	<b>52</b>
<b>Figura 9</b> – Análise do processo e fluxo autofágicos de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA ou FK506.....	<b>53</b>
<b>Figura 10</b> – Perfil de citocinas no secretoma de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.....	<b>55</b>
<b>Figura 11</b> – Análise da concentração de PGE-2 e IDO no secretoma de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.....	<b>56</b>
<b>Figura 12</b> – Perfil de fatores angiogênicos no secretoma de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.....	<b>57</b>
<b>Figura 13</b> – Porcentagem de inibição da proliferação de linfócitos T por MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.....	<b>58</b>
<b>Figura 14</b> – Efeito do meio condicionado de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA sobre a migração de células endoteliais derivadas do cordão umbilical humano (HUVECs).....	<b>59</b>
<b>Figura 15</b> – Potencial angiogênico do meio condicionado de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.....	<b>60</b>
<b>Figura 16</b> – Análise da morfologia de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.....	<b>61</b>
<b>Figura 17</b> – Análise de viabilidade das MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.....	<b>61</b>
<b>Figura 18</b> – Cinética de crescimento das MSC(CB) pré-condicionadas com diferentes concentrações de FK506 e fatores de expansão calculados.....	<b>62</b>
<b>Figura 19</b> – Perfil imunofenotípico das MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.....	<b>63</b>

<b>Figura 20</b> – Diferenciação das MSC(CB) pré-condicionadas com FK506 em adipócitos e osteócitos.....	<b>64</b>
<b>Figura 21</b> – Perfil de citocinas no secretoma de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.....	<b>66</b>
<b>Figura 22</b> – Análise da concentração de PGE-2 e IDO no secretoma de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.....	<b>67</b>
<b>Figura 23</b> – Perfil de fatores angiogênicos no secretoma de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.....	<b>68</b>
<b>Figura 24</b> – Porcentagem de inibição da proliferação de linfócitos T por MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.....	<b>69</b>
<b>Figura 25</b> – Efeito do meio condicionado de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506 sobre a migração de células endoteliais derivadas do cordão umbilical humano (HUVECs).....	<b>70</b>
<b>Figura 26</b> – Potencial angiogênico do meio condicionado de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.....	<b>71</b>

### **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Lista anticorpos utilizados no Western blotting e suas respectivas diluições.....	<b>46</b>
--	-----------

## Lista de Abreviaturas e Siglas

**$\alpha$ -MEM** = meio essencial mínimo alfa

**xg** = força da gravidade

**$\mu$ g** = microgramas

**$\mu$ L** = microlitros

**$\mu$ M** = micromolar

**5-AZA** = 5-azacitidina

**Act** = proteína semelhante à actina

**ADAMTS2** = gene ADAM metalopeptidase com motivo 2 de trombospondina 1

**AgNO<sub>3</sub>** = nitrato de prata

**AKT** = proteína quinase B

**AMP e ATP** = adenosina mono- e trifosfato

**AMPK** = proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina

**ANG** = gene da angiogenina

**ANGPT1** = gene da angiopoietina tipo 1

**Atgs** = proteínas de autofagossoma

**ATR** = proteína relacionada à ataxia telangiectasia e Rad3

**AZA1/2/5** = 5-azacitidina à 1, 2.5 e 5 $\mu$ M

**B7-H4** = inibidor 1 de ativação de células T contendo domínio definido em V

**Bax** = proteína X associada a Bcl2

**Bcl-2** = proteína linfoma de células B-2

**Beclin-1** = proteína espiralada semelhante a miosina que interage com Bcl2

**BH3-only** = domínio 3 de homologia com Bcl2

**BMP** = proteína morfogenética óssea

**BPC** = banco primário de células

**BT** = banco de trabalho

**CCL e CXCL** = quimiocinas ligantes de motivos C-C e C-X-C

**CCR e CXCR** = receptores de quimiocinas

**CD** = grupos de diferenciação

**CFSE** = carboxifluoresceína succinimidil éster

**CHI3-L1** = proteína 1 semelhante a quitinase-3

**cm<sup>2</sup>** = centímetros quadrados

**CO** = monóxido de carbono

**COL** = colágeno

**COX-2** = ciclo-oxigenase tipo 2

**CQ** = cloroquina

**CTC-FUNDHERP** = centro de terapia celular da fundação hemocentro de ribeirão preto

**DAMPs** = padrões moleculares associados à dano

**DNA** = ácido desoxirribonucleico

**DNMTs** = DNA metiltransferases

**DPT** = gene da dermatopontina

**EBM** = meio basal para células endoteliais

**EDTA** = ácido etilendiamino tetra-acético

**EGF** = fator de crescimento epidermal

**EGM** = meio de crescimento para células endoteliais

**ELISA** = ensaio de imunoabsorção enzimática

**ELN** = gene da elastina

**EP2/3** = receptor tipo 2 e 3 de PGE-2

**ERK1/2** = quinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares

**ESM1** = molécula específica de célula endotelial 1

**ETS** = gene dos fatores de transcrição C-ets

**ETV** = fator de transcrição variante de ETS

**FACS** = separador de células ativado por fluorescência

**FAK** = quinase de adesão focal

**Fas e FasL** = antígeno indutor de apoptose tipo 1 e seu ligante

**FBLN** = gene da fibulina

**FCFRP** = faculdade de ciências farmacêuticas de ribeirão preto

**FGF** = fator de crescimento de fibroblastos

**FK1/5/10** = tacrolimo à 1, 5 e 10 $\mu$ g/mL

**FKBP12** = proteína 12 de ligação ao FK506

**FK506** = fármaco tacrolimo

**FMOD** = gene da fibromodulina

**FMRP** = faculdade de medicina de ribeirão preto

**FOXO3** = fator de transcrição “*forkhead box*” tipo 3

**GDF-15** = fator de crescimento e diferenciação celular 15

**GM-CSF** = fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

**GNDF** = fator neurotrófico derivado de células gliais

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** = peróxido de hidrogênio

**HAPLN1** = gene da proteína 1 de ligação de hialuronano e proteoglicano

**HB-EGF** = fator de crescimento semelhante ao EGF ligante de heparina

**HCl** = ácido clorídrico

**HGF** = fator de crescimento hepatocítico

**HLA** = antígeno leucocitário humano

**HO-1** = heme oxigenase tipo 1

**HTRA1** = gene da serino-protease HTRA 1

**HUVECs** = células endoteliais extraídas de cordão umbilical humano

**IDO** = indoleamina 2,3-dioxigenase

**IFN- $\gamma$**  = interferon gama

**IGF-1** = fator de crescimento do tipo 1 semelhante à insulina

**IGFBP** = proteína de ligação à IGF-1

**IL** = interleucina(s)

**iNOS** = óxido nítrico sintase induzida

**ISCT** = sociedade internacional de terapia celular

**JAG1** = proteína jagged 1

**JAK1** = janus quinase 1

**Kg** = quilogramas

**LAMP-2** = proteína 2 associada a membrana lisossomal

**LC3B-I e -II** = cadeia leve 3 associada a microtúbulos subunidade 1 e 2  
**LepR** = receptor de leptina  
**LIF** = fator inibidor de leucemias  
**LOX** = lisil-oxidase  
**LPS** = lipopolissacarídeo bacteriano  
**M** = molar  
**M1 e M2** = macrófagos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios respectivamente  
**MAPK** = quinase ativada por mitógenos  
**MC** = meio condicionado  
**MCP-1** = proteína quimiotática de monócitos tipo 1  
**M-CSF** = fator estimulador de colônias de macrófagos  
**MFAP2/4** = glicoproteínas 2 e 4 associadas a microfibrilas  
**MIF** = fator inibidor da migração de macrófagos  
**min** = minuto(s)  
**miR** = micro RNAs  
**mL** = mililitros  
**MLR** = reação mista de linfócitos  
**mM** = milimolar  
**MMPs** = metaloproteinases de matriz  
**MRN** = complexo enzimático de reparo ao DNA MRE11, RAD50 e NBS1  
**RNA<sub>m</sub>** = RNA mensageiro  
**MSCs** = células estromais mesenquimais multipotentes  
**mTOR** = proteína alvo da rapamicina  
**n.s** = resultado não significativo  
**Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** = tiosulfato de sódio  
**NaCl** = cloreto de sódio  
**NB-2** = nível de biossegurança 2  
**NF-κB** = factor nuclear kappa B  
**ng** = nanogramas  
**NID2** = nidogênio 2  
**NK** = células assassinas naturais  
**nM** = nanomolar  
**NO** = óxido nítrico  
**ODN1826** = oligonucleotídeo CpG de classe B agonista de TLR9  
**PAMPs** = padrões moleculares associados a patógenos  
**PBMCs** = células mononucleares do sangue periférico  
**PBS** = tampão fosfato-salino  
**PD-1/L1** = receptor de morte celular programada tipo 1 e seu ligante  
**PDGF/R** = fator de crescimento derivado da plaquetas e seu receptor  
**PE** = fosfatidiletanolamina  
**PGE-2** = prostaglandina E2  
**pH** = potencial hidrogeniônico  
**PHA-M** = fitohemaglutinina M  
**PI** = fosfatidilinositol  
**PI3K3** = subunidade catalítica tipo 3 da fosfatidilinositol quinase 3  
**PIGF** = fator de crescimento placentário  
**PIP2 e PIP3** = fosfatidilinositol bi- e trifosfato  
**PK1** = piruvato quinase 1  
**Poli(I:C)** = ácido policitidílico inosínico agonista de TLR3  
**PTN** = gene da pleiotrofina  
**PVDF** = membrana de fluoreto de polivinilideno  
**RNA** = ácido ribonucleico  
**ROS** = espécies reativas de oxigênio  
**rpm** = rotação por minuto  
**RPMI** = meio *roswell park memorial institute*  
**SDS-PAGE** = eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio  
**SEM** = erro padrão da média  
**SFB** = soro fetal bovino  
**SHBG** = globulina ligadora de hormônios sexuais  
**SOD** = superóxido dismutase  
**STAT3** = proteína 3 de ativação dos transdutores de sinal para o núcleo  
**STC1** = hormônio estaniocalcina  
**TA** = temperatura ambiente  
**TBS/T** = salina tamponada com tris e polissorbato 20  
**TGF-β** = fator de crescimento transformador beta  
**Th1/Th2/Th17/Treg** = subtipos de linfócitos T auxiliares responsáveis pelos padrões de respostas tipo 1, 2, 17 e regulador respectivamente  
**TIMPs** = inibidores de metaloproteinases de matriz  
**TLR** = receptores semelhantes à Toll  
**TNF-α** = fator de necrose tumoral α  
**TSG-6** = gene 6 estimulado por TNF-α  
**uPA/R** = ativador de plasminogênio do tipo uroquinase e seu receptor  
**V** = Volt  
**VCAM** = molécula de adesão vascular.  
**VEs** = vesículas extracelulares  
**VLA-4** = integrina A4β1

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1. Células estromais mesenquimais multipotentes: aspectos gerais.....	17
1.2. Papel fisiológico das MSCs e suas propriedades biológicas.....	18
1.2.1. <i>Licenciamento e migração.....</i>	19
1.2.2. <i>Imunomodulação e imunossupressão.....</i>	20
1.2.3. <i>Regeneração tecidual.....</i>	25
1.2.4. <i>MSCs e autofagia.....</i>	26
1.3. Aplicação clínica das MSCs.....	28
1.4. Pré-condicionamento de MSCs.....	29
1.4.1. <i>Tacrolimo.....</i>	32
1.4.2. <i>5-Azacitidina.....</i>	33
<b>2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....</b>	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1. Gerais.....	36
3.2. Específicos.....	36
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
4.1. Delineamento Experimental.....	37
4.2. Biobanco, cultivo e expansão de MSC(CB) em condições assépticas.....	37
4.3. Protocolos de pré-condicionamento de MSC(CB).....	39
4.3.1. <i>Grupo MSC(CB)+FK506.....</i>	39
4.3.2. <i>Grupo MSC(CB)+5AZA.....</i>	39
4.3.3. <i>Grupo Controle.....</i>	39
4.4. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico humano.....	39
4.5. Análise da cinética de crescimento de MSC(CB).....	40
4.6. Análise do perfil imunofenotípico de MSC(CB).....	40
4.7. Análise da viabilidade de MSC(CB) pós-cultivo.....	41
4.8. Análise do potencial de diferenciação de MSC(CB).....	41
4.9. Análise proteômica do meio condicionado de MSC(CB).....	42
4.10. Ensaio funcionais de MSC(CB) <i>in vitro</i> .....	43
4.10.1. <i>Avaliação do potencial imunossupressor de MSC(CB) em cocultivo.....</i>	43
4.10.2. <i>Análise da migração endotelial induzida pelo MC de MSC(CB).....</i>	43
4.10.3. <i>Avaliação do potencial angiogênico do MC de MSC(CB).....</i>	44
4.11. Extração e análise de proteínas das MSC(CB).....	45
4.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida de SDS-PAGE e Western blotting.....	45
4.13. Quantificação deIDO e PGE-2.....	46
4.14. Análise estatística dos dados.....	47
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
5.1. Pré-condicionamento das MSC(CB) com 5-Azacitidina.....	48
5.1.1. <i>Expansão e caracterização de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.....</i>	48
5.1.2. <i>Análise de autofagia em MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.....</i>	52

5.1.3.	<i>Análise do secretoma das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.....</i>	<i>54</i>
5.1.4.	<i>Avaliação do potencial imunossupressor de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.....</i>	<i>58</i>
5.1.5.	<i>Avaliação do potencial angiogênico de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.....</i>	<i>58</i>
5.2.	<i>Pré-condicionamento das MSC(CB) com Tacrolimo.....</i>	<i>60</i>
5.2.1.	<i>Expansão e caracterização de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.....</i>	<i>60</i>
5.2.2.	<i>Análise de autofagia em MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.....</i>	<i>64</i>
5.2.3.	<i>Análise do secretoma das MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.....</i>	<i>65</i>
5.2.4.	<i>Avaliação do potencial imunossupressor de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.....</i>	<i>69</i>
5.2.5.	<i>Avaliação do potencial angiogênico de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.....</i>	<i>69</i>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>108</b>
9.1.	Anexo I.....	108
9.2.	Anexo II.....	109
9.3.	Anexo III.....	110



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Células estromais mesenquimais multipotentes: aspectos gerais

As Células Estromais Mesenquimais Multipotentes (MSCs, do inglês “*Multipotent Mesenchymal Stromal Cells*”) correspondem a uma população heterogênea de células, que podem ser isoladas e expandidas do estroma de diversos tecidos, tais como medula óssea, tecido adiposo, pele, polpa dentária e anexos embrionários (por exemplo, cordão umbilical, geleia de Wharton e placenta) (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018). Nos últimos anos, elas têm sido extensivamente estudadas acerca do seu potencial biológico, e, apesar das particularidades dessas populações celulares, sabe-se que essas células compartilham propriedades anti-inflamatórias e regenerativas, justificando seu uso em novas modalidades terapêuticas (Andreeva *et al.*, 2017; Najj *et al.*, 2019).

Originalmente, as MSCs foram identificadas como “Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos” presentes na medula óssea de cobaias na década de 60. Nos anos seguintes, as MSCs foram definidas pela capacidade de formarem tecido ósseo, por isso, também denominadas “precursoras osteogênicas” (Friedenstein *et al.*, 1970; Wang *et al.*, 2014). O nome “Células-Tronco Mesenquimais” passou a ser adotado pela comunidade científica após ser verificada a capacidade dessas células se diferenciarem em outras células da linhagem mesodérmica *in vitro* e *in vivo* (Caplan, 1991).

Em 2005, uma nova nomenclatura para as células-tronco mesenquimais foi proposta pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT, do inglês *International Society for Cell Therapy*), devido ao fato que somente um pequeno grupo de células isoladas do estroma possui características típicas de células-tronco, como a capacidade de autorrenovação. Por esse motivo, o termo “células estromais mesenquimais multipotentes” (MSCs, do inglês “*Multipotent Mesenchymal Stromal Cells*”) vem sendo utilizado pela comunidade científica (Horwitz *et al.*, 2005; Dominici *et al.*, 2006; Viswanathan *et al.*, 2021).

A ISCT determinou normativas para a caracterização das MSCs a fim de assegurar a identidade e potência destas células entre os diferentes grupos de pesquisa do mundo. As MSCs devem ser capazes de aderirem-se a estruturas plásticas e apresentarem morfologia semelhante a fibroblastos em meio de cultivo

padrão. Além disso, as MSCs devem expressar as moléculas de superfície CD73, CD90 e CD105, e serem negativas para CD11b, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79a e HLA-DR. E que também, seja comprovado o potencial de diferenciação das MSCs em adipócitos, osteócitos e condrócitos (Caplan & Bruder, 2001; Le Blanc *et al.*, 2005, Le Blanc & Mougiakakos, 2012).

Recentemente, o Grupo de Consultoria em Codificação e Rotulagem de Terapias do Conselho Internacional de Padronização e Automação em Bancos de Sangue e o Comitê de Estudos com MSCs da ISCT, publicou recomendações específicas sobre a nomenclatura dessas células com base no modelo de terminologia da ISCT 128, visando harmonizar a descrição de subpopulações de MSCs adaptadas à cultura, conforme seus tecidos/fontes de isolamento. Deste modo, agora, as MSCs derivadas da medula óssea passam a ser MSC(M); as MSCs derivadas do sangue de cordão umbilical, MSC(CB); as MSCs derivadas do tecido adiposo, MSC(AT) e as MSCs da geléia de Wharton, MSC(WJ), e assim por diante. Essas recomendações são válidas para todo o espectro de pesquisas pré-clínicas, translacionais e clínicas, mas não obrigatoriamente às pesquisas básicas focadas na ontologia ou funcionalidades de células progenitoras endógenas (Viswanathan *et al.*, 2021).

O Comitê de Estudos com MSCs da ISCT tem hipotetizado o uso de novos marcadores funcionais para MSCs humanas, os receptores de leptina (LepR) e do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), que normalmente são co-expressos em células progenitoras endógenas produtoras de CCL2, CXCL12 e fator de células-tronco (SCF) (Galipeau *et al.*, 2021; Aoki *et al.*, 2021). Esses receptores estão associados a maior geração de unidades formadoras de colônias em células progenitoras e, portanto, poderiam ser utilizados como marcadores de capacidade replicativa em biobancos de MSCs. Além disso, a determinação da expressão de LepR e PDGFR é um prelúdio para a suplementação de meios de cultura com PDGF (mitógeno, ligante de PDGFR), buscando otimizar o rendimento de células para terapias (Galipeau *et al.*, 2021; Trinh & Broxmeyer, 2021).

## **1.2. Papel fisiológico das MSCs e suas propriedades biológicas**

As MSCs participam da homeostase do organismo por meio de dois processos abrangentes: “reposição celular” (adaptado da expressão em inglês “*cell replacement*”) e “capacitação celular” (adaptada da expressão em inglês “*cell*

*empowerment*”) (Fayyad-Kazan *et al.*, 2016). A reposição celular dá-se pela capacidade das MSCs proliferarem e diferenciarem-se em um tipo celular local, para que haja a regeneração do tecido lesado (Pittenger *et al.*, 2019). Em contrapartida, a capacitação celular baseia-se na influência que as MSCs exercem no microambiente circunjacente, proporcionando um nicho favorável ao reparo tecidual por outras células-tronco ou precursoras residentes no tecido (Baer *et al.*, 2018; Pittenger *et al.*, 2019).

Em 2017, Caplan propôs que as MSCs não deveriam ser denominadas células-tronco mesenquimais, mas sim “células sinalizadoras medicinais”, uma vez que se domicíliam nos sítios de injúria e por lá secretam fatores bioativos terapêuticos (Caplan, 2017) que incluem moléculas solúveis, como fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, além de vesículas extracelulares envolvidas na transferência de RNAm, miRNAs e mitocôndrias para células-alvo (De Castro *et al.*, 2019; Mohammadalipour, Dumbali e Wenzel *et al.*, 2020; Qian *et al.*, 2020). O contato célula-célula, da mesma forma, é importante para os efeitos imunomodulador/imunossupressor, angiogênico e anti-fibrótico das MSCs (Carmeliet & Jain, 2014; Cao *et al.*, 2017, Sweeney & Foldes, 2018).

Sabe-se que as MSCs estão ativamente envolvidas no processo de suporte à hematopoiese, já que proporcionam estímulos necessários à sobrevivência, autorrenovação e maturação das células-tronco hematopoiéticas (Fajardo *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2018; Crippa *et al.*, 2021). Outro papel fisiológico conhecido é desempenhado por uma subpopulação de MSCs, os pericitos, que auxiliam na estabilização e arrimo de capilares e pequenos vasos, emitindo extensões citoplasmáticas que alcançam a face abluminal do endotélio (Tian, Brookes & Battaglia, 2017; Cathery *et al.*, 2018; Courtney & Sutherland, 2020).

Todavia, estudos têm sugerido que a principal atividade das MSCs consiste em modular as resposta imunes teciduais por meio de mecanismos diversos (Weiss & Dahlke, 2019; Qian *et al.*, 2020).

### 1.2.1. Licenciamento e migração

As MSCs são capazes de detectar vários estímulos inflamatórios (por exemplo, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e LPS) com seu repertório de receptores de superfície celular, os quais desencadeiam alterações no padrão de expressão das moléculas de adesão presentes na membrana plasmática (Kyurkchiev *et al.*, 2014;

Wang *et al.*, 2014; Najar *et al.*, 2018). A migração das MSCs, por sua vez, é guiada pelos receptores de quimiocinas CCR2, CCR3, CCR4, CCR7, CCR10, e CXCR4-7 (Naji *et al.*, 2019; Ullah, Liu, Thakor, 2019; Cuesta-Gomez, Graham e Campbell, 2021).

As MSCs realizam a adesão e o rolamento sobre o endotélio vascular dependentemente de VLA-4 para migrarem em direção ao gradiente inflamatório (Naji *et al.*, 2019; Ullah, Liu, Thakor, 2019). Isso acontece em resposta à quimiocinas que levam à ativação de moléculas VLA-4 nas MSCs, as quais se ligam às moléculas VCAM-1 expressas nas células endoteliais (Zhao & Zhang, 2016). O balanço da atividade das MMP-1, -2, -3 e -9, seus antagonistas endógenos (TIMPs, inibidores de metaloproteinases) e fatores quimiotáticos permite a passagem das MSCs pelo endotélio vascular, e conseqüentemente, sua migração pelo interstício até o sítio de inflamação (Almaki & Agrawal, 2016).

Uma vez domiciliadas, as MSCs recrutam leucócitos e modulam células imunes locais por meio de sua maquinaria enzimática que produz as enzimas óxido nítrico sintase induzida (iNOS), heme-oxigenase tipo 1 (HO-1) e ciclooxigenase tipo 2 (COX-2), que por sua vez, geram óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO) e prostaglandina E2 (PGE2), respectivamente (Omori *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2018; Leyendecker *et al.*, 2018). Esses mediadores induzem vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular (Omori *et al.*, 2014; Koçer, Nasircilar Ülker e Sentürk, 2018).

As quimiocinas secretadas pelas MSCs tais como CCL2-6, CCL20, CCL26, CX3CL1, CXCL1, CXCL2, CXCL5 e CXCL8-12 atraem células do sistema imune ao sítio inflamatório por meio dos capilares previamente dilatados (Shi *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2019; Naji *et al.*, 2019; Cuesta-Gomez, Graham e Campbell, 2021).

### 1.2.2. *Imunomodulação e imunossupressão*

As MSCs apresentam propriedades anti-inflamatória, imunossupressora e imunomoduladora, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Markov *et al.*, 2021). Elas atuam sobre diversas populações celulares do sistema imune inato e adaptativo (Shi *et al.*, 2018), como representado na **Figura 1**. Os mecanismos responsáveis pela imunossupressão promovida pelas MSCs ainda não foram elucidados por completo, entretanto, sabe-se que são mediados tanto pelo contato celular direto como pela secreção de várias moléculas bioativas solúveis que atuam nas células-alvo (Qian *et al.*, 2020).

As MSCs apresentam moléculas inibidoras em sua superfície tais como B7-H4, PD-L1, FASL e HLA-G1/3/5, e moléculas de adesão intercelular como CD54 e VCAM-1, que são imprescindíveis para a imunomodulação mediada por contato célula-célula. Dentre estas, destacam-se PD-L1 e FASL, que são regulados positivamente imediatamente após um estímulo inflamatório, ficando expressos na membrana citoplasmática das MSCs (Yen *et al.*, 2020; Markov *et al.*, 2021). Estas moléculas ligam-se a seus respectivos receptores, PD-1 e FAS, presentes na superfície de linfócitos T ativados, fornecendo estímulos inibitórios e eventualmente induzindo apoptose celular caso sejam mantidas ligações de longa-duração (Shi *et al.*, 2018).

Davies *et al.* (2017) mostraram que células mesenquimais derivadas da medula óssea são capazes de exercer um efeito imunossupressor em culturas mistas de linfócitos (MLR, do inglês “*mixed lymphocyte reaction*”) por meio da secreção de ligantes solúveis de PD1 (sPD-L1 e sPD-L2). Segundo os autores, sPD-L1/2 restringem a ativação da quinase AKT e do fator de transcrição FOXO3, e conseqüentemente induzem as células T a um estado de hiporresponsividade. O estudo sugere que sPD-L1 e sPD-L2 são um dos vários dos mecanismos de indução de tolerância periférica mediado por MSC(M) (Davies *et al.*, 2017).

As MSCs são potentes inibidoras da expansão de células NK por meio do contato célula-célula e pela supressão da secreção de IFN- $\gamma$  e IL-2 em ensaios de cocultura. A expressão de PGE-2, IDO, TGF- $\beta$  e IL-6 pelas MSCs são alguns dos mecanismos de ação envolvidos (Kaundal, Bagai e Rakha, 2018; Weiss & Dahlke, 2019). A IL-10 e TSG-6 inibem as vias de sinalização JAK1/STAT3 e MAPK/NF- $\kappa$ B, impedindo a expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 em células dendríticas desafiadas com LPS (Rocha *et al.*, 2020).

Vários trabalhos mostraram que as MSCs também secretam outros mediadores solúveis, tais como IL-10, HGF, sHLA-G5, LIF, PGE-2, TGF- $\beta$  e TSG-6, que em conjunto, são capazes de inibir a maturação de células dendríticas, a degranulação de neutrófilos, a atividade citolítica de células NK e células T CD8<sup>+</sup>, a proliferação de células B (incluindo a redução da produção de imunoglobulinas), bem como promover a diminuição da frequência de linfócitos Th1, Th17 e o aumento da frequência de células T reguladoras (Tregs) (Jitschin *et al.*, 2013; Kaundal, Bagai e Rakha, 2018; Rocha *et al.*, 2020). Deste modo, os efeitos imunossupressores das MSCs são amplificados com a geração de subpopulações celulares reguladoras (Khosravi, *et al.*, 2018; Ko *et al.*, 2020).

As MSCs humanas expressam indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima capaz de depletar triptofano no microambiente circundante, levando ao acúmulo local de quinurenina (Pham *et al.*, 2021). A quinurenina, por sua vez, perturba a cascata de sinalização de mTOR, diminuindo a glicólise e promovendo apoptose em linfócitos (Deretic, 2021). Esse mecanismo leva à inibição da ativação e da proliferação de células T e B (Luk *et al.*, 2017; Pour *et al.*, 2019; Burnham, Foppiani e Horwitz, 2020).

A secreção de IDO constitui um dos principais mecanismos pelos quais as MSCs induzem a diferenciação de macrófagos pró-inflamatórios M1 em macrófagos M2, estes últimos conhecidos pela função anti-inflamatória e regenerativa (Ko *et al.*, 2020). Ademais, a geração de macrófagos M2 também pode ser induzida pela secreção de PGE-2 pelas MSCs ou pela eferocitose de MSCs apoptóticas (Vasandan *et al.*, 2016; Weiss & Dahlke, 2019). Portanto, as MSCs são capazes de “licenciar” monócitos e diferenciá-los por mecanismos variados (Shi *et al.*, 2018).

MSCs de todas as fontes expressam receptores semelhante a Toll (TLR, do inglês “*Toll-Like Receptors*”), que as permite reconhecer padrões associados à patógenos (Rocha *et al.*, 2020). Ao todo foram identificados 10 tipos de TLRs em MSCs humanas a nível transcricional e proteico, e suas expressões variam conforme a fonte de isolamento dessas células. Por exemplo, MSC(WJ) expressam TLR3 e 4; MSC(CB) TLR1,3-6 e 9; MSC(M) TLR1-6 e as MSC(AT) TLR1-6 e 9 (De Castro *et al.*, 2019). O tipo de TLR e ligante envolvido direciona as MSCs para um perfil mais ou menos anti-inflamatório. Por exemplo, a ativação de TLR3 via Poli(I:C) estimula a síntese de IDO, PGE-2, IL-4, IL-1RA e, TLR4 com LPS leva à produção de IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ . Já a estimulação de TLR9 nas MSCs por ODN1826, culmina na síntese de adenosina pelas MSCs (Kaundal, Bagai e Rakha, 2018).

Em ambientes inflamatórios, as MSCs também expressam HO-1. Essa enzima é um sensor endógeno de estresse celular que está especialmente relacionada ao equilíbrio redox dos íons de ferro citoplasmáticos (Mehta, 2021). Mediante ao catabolismo do grupo heme da hemoglobina, a HO-1 gera os subprodutos ferro ferroso, bilirrubina e monóxido de carbono (CO) (Wang *et al.*, 2017). A bilirrubina dispersa no meio extracelular, é secundariamente convertida em biliverdina, e juntamente ao CO, proporciona efeitos anti-inflamatórios e citoprotetores (Wang *et al.*, 2019; Szade *et al.*, 2021). Esses efeitos foram observados em modelos experimentais

de endotoxemia letal, marcados pela diminuição da tempestade de citocinas e do infiltrado leucocitário em cobaias (Funes *et al.*, 2020).

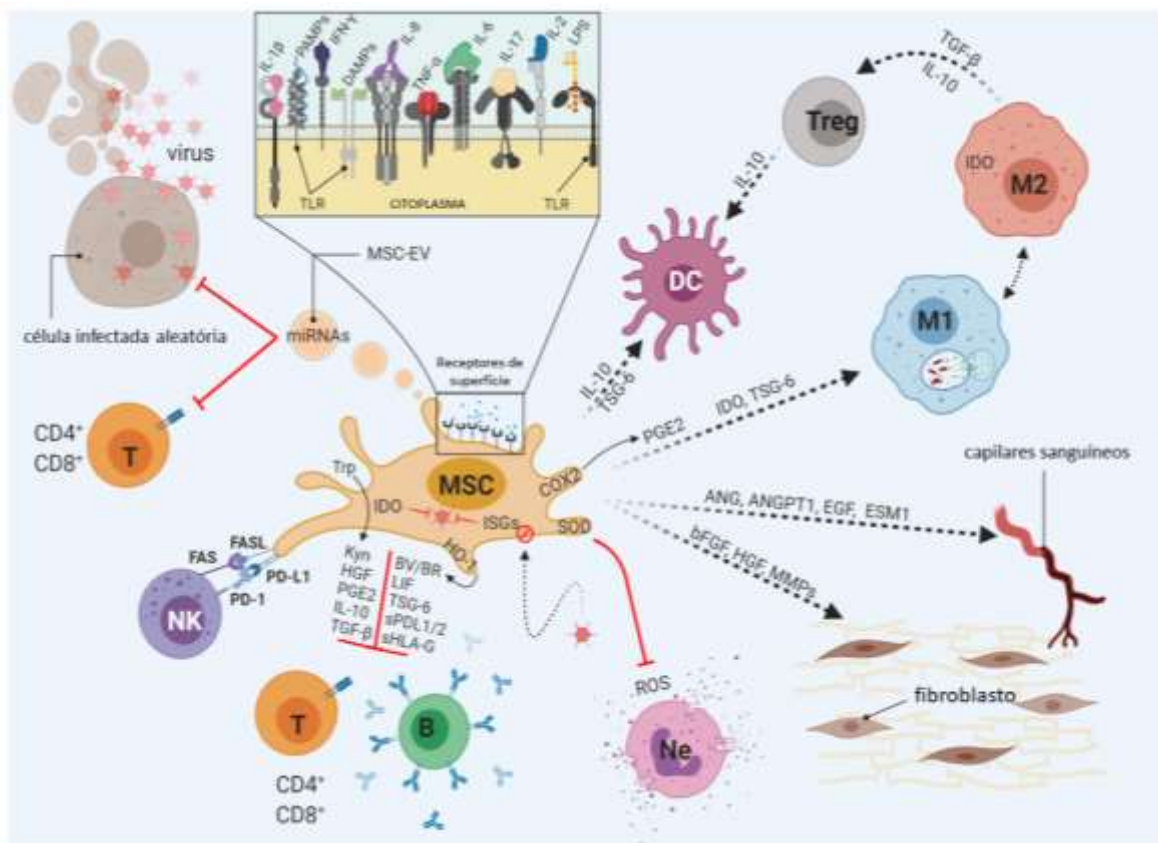
Outro mecanismo que protege tanto as MSCs quanto o próprio tecido do estresse oxidativo, é a expressão da enzima superóxido dismutase (SOD) pelas mesmas. A SOD converte ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que por sua vez acaba sendo hidrolisado/inativado espontaneamente. Desta forma, atenua os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês “*Reactive Oxygen Species*”), que são principalmente produzidas por neutrófilos (Jiang *et al.*, 2016; Sah, Agrahari e Kim, 2020). Contudo, MSCs parecem exercer um possível efeito aditivo sobre neutrófilos nas etapas iniciais de controle a infecções bacterianas, visto que a ativação das MSCs por LPS via TLR3 induz a produção de IL-6 e IL-8, potentes ativadores de neutrófilos (De Castro *et al.*, 2019; Bernhard *et al.*, 2021).

As ROS lesam quimicamente o tecido, gerando a liberação de alarminas e padrões de moléculas associadas à danos (DAMPs, do inglês “*Damage-Associated Molecular Patterns*”), que por sua vez, incitam mais inflamação, lançando grandes quantidades de adenosina trifosfato (ATP) no meio extracelular. Em decorrência disso, maior é a oferta de energia às células inflamatórias (Di Virgilio, Sarti e Coutinho-Silva, 2020). Entretanto, as moléculas de ATP podem ser processadas pelas ectonucleotidases CD39 e CD73, que são expressas na superfície de Tregs e MSCs, respectivamente. O ATP é transformado em AMP pelas Tregs CD39+, e o AMP em adenosina pelo CD73 expresso na superfície das MSCs. A adenosina, então, liga-se aos receptores A2a e inibe a atividade de células NK, DC e linfócitos T (Kerkelä *et al.*, 2016; Galgaro *et al.*, 2021). Kerkelä & coautores (2016) sugerem que a imunossupressão adenosinérgica requer uma cooperação intercelular entre MSCs e Tregs (Kerkelä *et al.*, 2016).

Além dos fatores solúveis, as vesículas extracelulares (VEs) também compõem o secretoma das MSCs, sendo um importante recurso de comunicação intercelular. As VEs são categorizadas pelo tamanho, chamadas de exossomos (30-100nm), microvesículas (100-1.000nm) e corpos apoptóticos (1.000-5.000nm) (Ferreira *et al.*, 2018). O conteúdo delas é repleto de fatores solúveis, como os já descritos aqui, além de carregarem DNA, lipídeos, pequenas organelas (por exemplo, mitocôndrias) e diferentes classes de RNAm e micro RNAs (Teli, Kale e Vaidya, 2021). As VEs atingem as células-alvo e desencadeiam alterações nas mesmas, de acordo com o

tipo de conteúdo intravesicular, muitas vezes oriundos de produtos reciclados da autofagia (Xing *et al.*, 2021).

Nas VEs das MSCs são encontrados múltiplos metabólitos imunorreguladores, tais como adenosina, arginina, ácido aspártico, colesterol, glutamina, nicotinamida, UDP-N-acetilglucosamina, 5-deoxi5-metiloadenosina, ácido palmítico, isoleucina, ceramida, lisofosfatidilcolinas e fosfolípídeos fosfatidiletanolaminas, que juntos, participam da formação de rafts da membrana plasmática e induzem a polarização de macrófagos para o fenótipo M2 e linfócitos T para células Tregs (Showalter *et al.*, 2019). Além disso, os exossomos são ricos em micro RNAs, dentre os mais comuns estão miR-99a-5p, miR-128, miR-124-3p, miR-22-3p e miR-99b-5p, envolvidos no processamento de RNA, fosforilação de proteínas e vias de sinalização de genes relacionados à imunorregulação e angiogênese (Teli, Kale e Vaidya, 2021).



**Figura 1** – Propriedades biológicas gerais das MSCs. As MSCs são capazes de detectar uma ampla gama de sinais (citocinas, DAMPs, PAMPs entre outros) por meio de seus receptores de citocinas e TLRs, que quando engatilhados, desencadeiam respostas que inibem as células do sistema imune por uma série de fatores solúveis (IL-10, LIF, PGE-2, TGF- $\beta$  e demais proteínas imunomoduladoras), moléculas de superfície (PD-L1, FASL, dentre outros), maquinaria enzimática (SOD, COX2, IDO, HO1) e microvesículas carregadas de miRNA reguladores do imunometabolismo. Essas células participam ativamente do reparo tecidual, secretando fatores pró-angiogênicos (ANG, ANGPT1, EGF, ESM1) e anti-fibróticos (bFGF, HGF, MMPs). Fonte: modificado de Rocha *et al.*, (2020).



### 1.2.3. Regeneração tecidual

O secretoma das MSCs contém dezenas de fatores pró-angiogênicos, anti-apoptóticos e anti-fibróticos que auxiliam no reparo de tecidos danificados, resumidos na **Figura 1** (Kong *et al.*, 2013; Kehl *et al.*, 2019). Inflamações crônicas, infecções estabelecidas e queimaduras severas, por exemplo, levam à destruição tecidual prolongada. Nesse contexto, o aporte de oxigênio e nutrientes é prejudicado, e, resulta em isquemia. Em vista disso, a formação de novos vasos é essencial para otimizar a perfusão sanguínea, e conseqüentemente, maximizar o número de células residentes viáveis, reduzir a fibrose, e por fim, restaurar a função do tecido acometido (Di Pietro *et al.*, 2016; Ho *et al.*, 2017; Kehl *et al.*, 2019).

Kehl & colegas (2019) mostraram que as MSCs humanas possuem potencial angiogênico variável, característica que pode estar relacionada ao seu tecido de origem. Após a avaliação do perfil proteômico do meio condicionado de MSCs isoladas do tecido adiposo, de medula óssea e do cordão umbilical, os autores observaram que o meio condicionado das MSCs da medula óssea e do cordão umbilical apresentam maiores concentrações de fatores pró-angiogênicos e eliciam maiores quantidades de macrófagos (Kehl *et al.*, 2019).

Vários estudos em modelos animais demonstram que os macrófagos são cruciais no remodelamento da matriz extracelular, uma vez que auxiliam na degradação da matriz velha e estimulam outros tipos celulares (por exemplo, fibroblastos, endoteliócitos, pericitos e células musculares lisas), que em conjunto, regeneram o tecido danificado (Corliss *et al.*, 2016). Nesse sentido, as MSCs são essenciais por promoverem a expansão de populações celulares que restauram a malha tissular, incluindo os macrófagos (Jin *et al.*, 2019).

MSCs humanas expressam vários genes que codificam moléculas relacionadas a mecanismos anti-fibróticos, tais como ADAMTS2, bFGF, COL15A1, COL16A2, COL18A1, COL5A3, DPT, ELN, FBLN2, FBLN5, FMOD, HAPLN1, HGF, HTRA1, LOX, MFAP2/4, MMPs, NID2 e TIMP2, que juntas coordenam a deposição e organização das fibrilas de colágeno, fibronectina e elastina pela atividade dos fibroblastos (Motegi & Ishikawa, 2017; Kehl *et al.*, 2019). Dentre os genes que codificam fatores pró-angiogênicos e antiapoptóticos também expressos pelas MSCs, estão o ANG,

ANGPT1, bFGF, CXCL12, EGF, ESM1, IGF-1, IL-6, JAG1, LIF, MCP-1, MMP-1, PDGF, PIGF, PTN, STC1, TGF- $\beta$  (Kehl *et al.*, 2019; Maacha *et al.*, 2020).

Além da comunicação parácrina, Kong & colaboradores (2013) demonstraram que as MSCs de placenta [MSC(P)] podem se diferenciar em endoteliócitos após transplantá-las em feridas de ratos diabéticos. As MSC(P) coradas com CM-Dil foram rastreadas, e encontradas em arranjos semelhantes à cordões, integrados à endoteliócitos (corados com FITC-UEA-I) nas biópsias desses animais. A histologia revelou maior índice de células CD31+, CD45+, VEGF+ e  $\alpha$ -SMA+ colocalizadas nas regiões em que encontravam-se as MSC(P), com presença de tecido granuloso recém-depositado e uma densidade capilar quatro vezes mais elevada em relação ao grupo controle (animais diabéticos não tratados). Sugerindo que as MSC(P) são capazes de repor populações celulares específicas *in vivo*, bem como, auxiliar processos regenerativos em modelos de lesões cutâneas (Kong *et al.*, 2013).

#### 1.2.4. MSCs e autofagia

A autofagia é um processo catabólico caracterizado pela digestão intravesicular de proteínas citosólicas mal-envelopadas, organelas disfuncionais e de substâncias tóxicas pinocitadas, que logo são inativadas, recicladas e reutilizadas (Dyshlovoy, 2020). Ela é comumente relatada como último recurso das células diante o dano/estresse, e, nos últimos anos, sua participação na defesa do organismo (regulando a imunidade inata e adaptativa), no rejuvenescimento celular e no desenvolvimento de outros processos biológicos foi mais explorada (Jiang *et al.*, 2019; Dyshlovoy, 2020; Zhou *et al.*, 2020). Seu papel também tem sido evidenciado em cenários clínicos, por exemplo, nas doenças neurodegenerativas, infecciosas, isquêmicas e neoplásicas, em que o estresse oxidativo, a expressão de proteínas aberrantes, o alto consumo energético ou a deprivação nutricional levam à um desbalanço metabólico que resulta em autofagia (Khandia *et al.*, 2019; Deng *et al.*, 2020).

A autofagia acontece em três etapas abrangentes: iniciação/nucleação, alongamento e maturação. A iniciação se dá quando AMPK inibe mTOR, levando a ativação do complexo ULK1/2, que por sua vez, recruta os complexos PI3KC3 e Beclin-1, formando uma membrana dupla lipídica de isolamento (fagóforo) a partir das paredes do complexo de Golgi ou retículos endoplasmáticos (De Tito *et al.*, 2020; Kawabata & Yoshimori, 2020). O complexo Beclin-1 converte PIP2 em PIP3,

resultando no local de nucleação do fagóforo. Em seguida, a pró-LC3 é clivada em LC3B-I pela ação de Atg4 e então em LC3B-II, via Atg5/12/16L e PE. LC3B-II (subunidade clivada) se liga à membrana do fagóforo, estendendo-o (fase de alongamento), enquanto recruta receptores/seletores de substrato (por exemplo, p62) até a completa oclusão do fagóforo, gerando um autofagossomo maduro (Pugsley, 2017). Na fase de maturação, os autofagossomos trafegam através do citoplasma por meio de centros organizadores de microtúbulos até, eventualmente, se fundirem aos lisossomos. À medida que se forma o autofagolisossomo, o conteúdo mistura-se e então, a LC3B-II e p62 são degradadas junto aos substratos (Kawabata & Yoshimori, 2020). Se esta etapa é bloqueada, por exemplo, usando o fármaco cloroquina (CQ), espera-se o acúmulo de LC3B-II e principalmente de p62 (Ferreira *et al.*, 2021).

Existem basicamente três vias de autofagia: a macroautofagia (mecanismo descrito acima), microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. Essas vias se diferem pelos meios de entrega de substratos ao autofagolisossomo. Na microautofagia, os substratos são incorporados diretamente nos lisossomos mediante invaginações na membrana da vesícula lisossômica. Já na via das chaperonas, a translocação de determinadas proteínas ao interior lisossomal é realizada por intermédio do receptor LAMP-2, resultando na degradação dos substratos (Abdrakhmanov, Gogvadze e Zhivotovsky, 2020). Esses processos ocorrem em níveis basais (fisiológicos) e são os defeitos nas vias de sinalização da autofagia que podem levar ao desenvolvimento e/ou agravamento de várias patologias (Petibone, Majeed e Casciano, 2017).

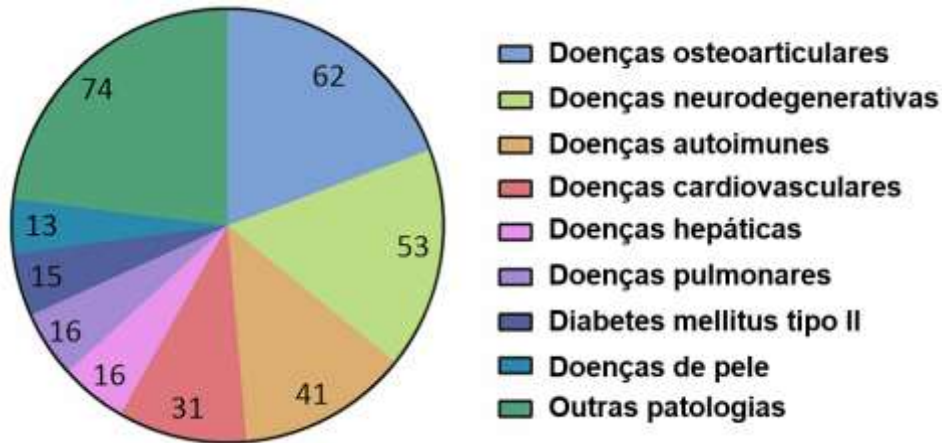
A macroautofagia é o mecanismo mais estudado nas MSCs. Acredita-se que os benefícios terapêuticos da autofagia nas MSCs estejam relacionados à modulação direta de suas funções biológicas, e indiretamente, por modularem o fluxo autofágico de outras populações celulares (Ceccariglia *et al.*, 2019). Evidências crescentes mostram que a autofagia regula positivamente o eixo COX-2/PGE-2 e promove a secreção deIDO, IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF pelas MSCs, sugerindo que essas moléculas participam dos benefícios observados em modelos experimentais de doença do enxerto contra hospedeiro, encefalomielite autoimune, isquemia de membro inferior e lúpus eritematoso sistêmico (Hu *et al.*, 2019; Ceccariglia *et al.*, 2019; Deng *et al.*, 2020).

### 1.3. Aplicação clínica das MSCs

Diferentes trabalhos da literatura afirmam que as MSCs podem ser transplantadas de forma autóloga, alogênica, e até mesmo xenogênica em modelos experimentais imunocompetentes (Scarfe *et al.*, 2017). Nesses modelos foram verificados os efeitos imunomoduladores e regenerativos das MSCs, evidenciados por respostas terapêuticas significativas após infusão das células, sem rejeição ou formação de tumores (Liang *et al.*, 2018). Em situações de homeostase, essas células expressam baixos níveis de HLA-ABC e de moléculas coestimuladoras como CD80, CD83, CD86, CD154 sendo, portanto, células hipoinmunogênicas (Klimczak *et al.*, 2016; Najj *et al.*, 2019).

As MSCs têm sido avaliadas para tratamento de diversos modelos experimentais imunocompetentes, incluindo rejeição à transplantes, doença do enxerto contra hospedeiro, doenças isquêmicas, autoimunes (esclerose múltipla, artrite reumatoide, colite, diabetes tipo 1, lúpus eritematoso sistêmico), úlceras crônicas de pele, dentre outros (Vu *et al.*, 2014; Leyendecker Jr. *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Burnham, Foppiani e Horwitz, 2020; Markov *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021). Além dos estudos em animais, as MSCs humanas são utilizadas como opção terapêutica complementar aos tratamentos convencionais, favorecendo a qualidade de vida e/ou a sobrevida de pacientes portadores de diversas condições clínicas (Yang *et al.*, 2020).

A primeira infusão de MSCs autólogas em seres humanos foi realizada em 1995 e sete anos depois, de forma alogênica (Lazarus *et al.*, 1995; Le Blanc *et al.*, 2004). Nos últimos 25 anos, aproximadamente 1400 ensaios clínicos envolvendo a administração de MSCs foram registrados no mundo inteiro. Atualmente, mais de 391 encontram-se em andamento (4 deles no Brasil) para avaliar a eficácia, estabilidade e segurança das MSCs ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Os resultados obtidos até o momento indicam que a administração de MSCs em seres humanos é segura e apresentam poucos efeitos indesejáveis (Dorransoro *et al.* 2013; Zhou *et al.*, 2021). A **Figura 2** mostra o número de estudos clínicos com MSCs já concluídos.



**Figura 2** – Estudos clínicos com MSCs finalizados (n=321), agrupados conforme os tipos de desordens/sistemas. Fonte: Modificado de Yang *et al.*, 2020.

#### 1.4. Pré-condicionamento de MSCs

Apesar das MSCs apresentarem suas propriedades funcionais *in vitro* e benefícios em alguns modelos *in vivo*, os resultados em ensaios clínicos ainda são bastante conflitantes com respostas clínicas aquém do esperado (Arango-Rodriguez *et al.*, 2015; Kaundal, Bagai e Rakha, 2018). Essas discrepâncias podem ser atribuídas, em parte, pela incapacidade dessas células sobreviverem e/ou exercerem suas funções no microambiente “inflamado” ou lesionado após serem transplantadas (Kean *et al.*, 2013; Ezquer *et al.*, 2017). Nesse sentido, muitos trabalhos têm buscado diversas estratégias para melhorá-las funcionalmente e aumentar a sobrevivência das MSCs transplantadas, modificando as condições de cultivo das células pré-infusão (Najar *et al.*, 2018; Noronha *et al.*, 2019; Giri & Galipeau, 2020).

Atualmente, o grande desafio seria desenvolver produtos para terapias celulares, compostos por MSCs e/ou suas VEs, que sejam otimizados para aplicações clínicas específicas. Devido à alta sensibilidade dessas células às condições de cultivo, a senescência replicativa, ao congelamento/descongelamento, às contaminações por microorganismos e a falta de padronização dos protocolos de isolamento, existem muitos resultados inconsistentes na literatura, tanto de pesquisas básicas quanto de estudos clínicos (Jossen *et al.*, 2018).

Neste cenário, novas estratégias de pré-condicionamento (do inglês “*priming*”) das MSCs que visem o melhoramento da viabilidade celular, capacidade replicativa e migratória, bem como das propriedades imunossupressoras/imunomoduladoras e regenerativas, se fazem necessárias (Naji *et al.*, 2019; Noronha *et al.*, 2019; Miceli *et*

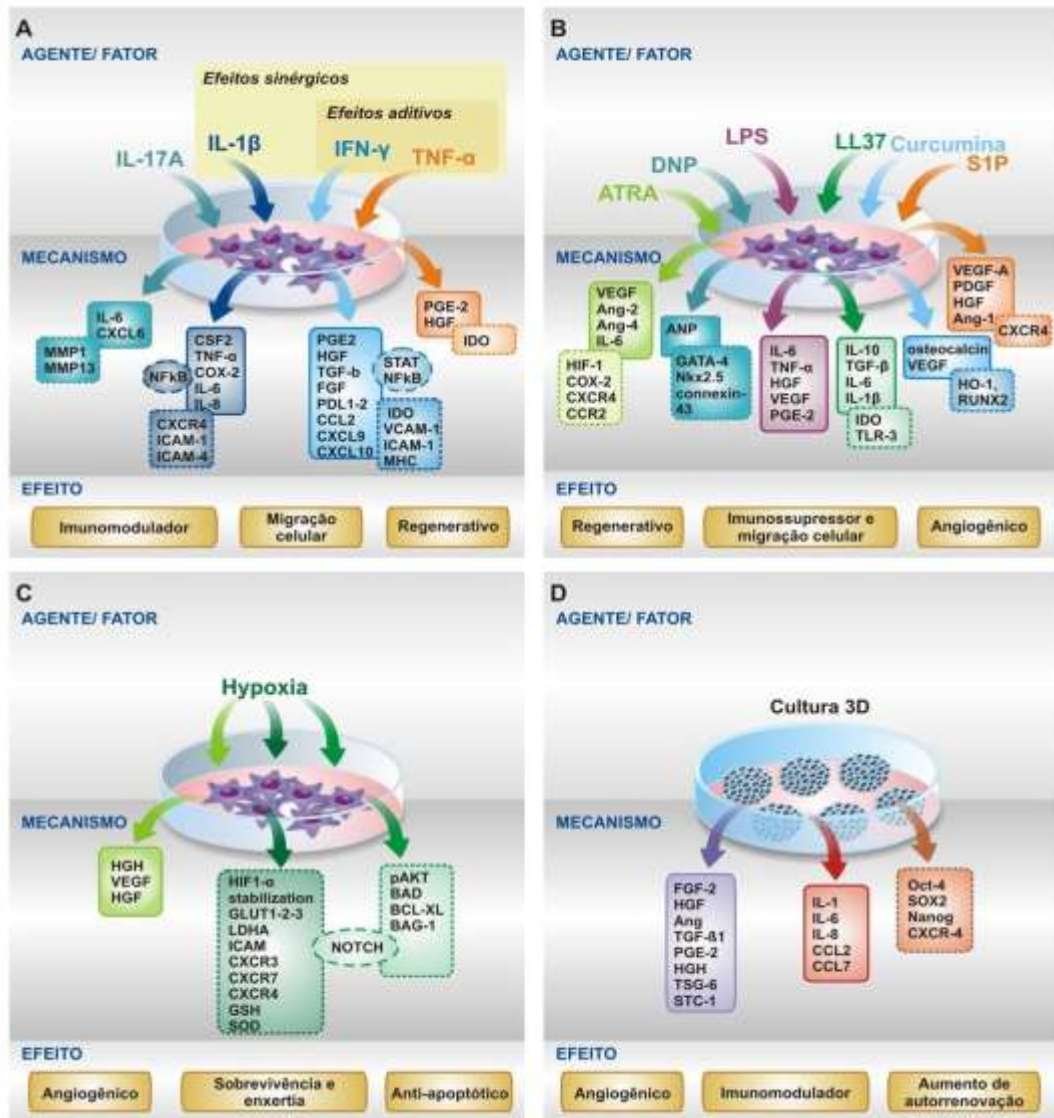
*al.*, 2021). Dentre estas estratégias, destaca-se o uso de pequenas moléculas, hormônios, citocinas, fármacos e diferentes condições de cultivo celular (por exemplo, hipóxia, cultivo 3D), que estão resumidas na **Figura 3** (Noronha *et al.*, 2019; Koh *et al.*, 2020; Amin *et al.*, 2021).

Ao contrário de outros tipos celulares, as MSCs exibem uma grande plasticidade intrínseca, pela qual pressupõe-se, maior tolerância e responsividade a diferentes tratamentos (Wang *et al.*, 2014). Neste caso, o pré-condicionamento com agentes farmacológicos pode promover ou não, alterações biológicas que culminem na melhora de alguma(s) função(ões) das MSCs.

Os fármacos escolhidos para o “*priming*” de MSCs, geralmente são os mesmos usados para tratamento de pacientes portadores de doenças hematológicas, imunomediadas, metabólicas, neoplásicas, neurodegenerativas, de pele ou ósseas/cartilaginosas. Entretanto, ainda não se sabe à rigor, quais são as alterações biológicas que acontecem nas MSCs em virtude da existência de muitos protocolos de pré-condicionamento e de inúmeros fármacos utilizados (Klimczak *et al.*, 2016; de Witte *et al.*, 2016; Sangiorgi *et al.*, 2016; Najjar *et al.*, 2017).

Vários estudos exploraram o pré-condicionamento de MSCs empregando o ácido micofenólico, ácido trans-retinóico total, ácido valpróico, azatioprina, azacitidina, ciclosporina, deferoxamina, dexametasona, metotrexato, rapamicina, resveratrol, tacrolimo, dentre outros (Hoogduijn *et al.*, 2008; Mancheño-Corvo *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2015; Takeda *et al.*, 2018, Noronha *et al.*, 2019). Esses estudos apresentaram resultados interessantes mostrando a potencialização de determinadas funções das MSCs, porém, a inibição de outras. E, alguns destes fármacos, não apresentaram qualquer influência sobre as funções, viabilidade e senescência das MSCs.

Em vista disso, uma análise criteriosa da literatura nos revelou que os fármacos, tacrolimo e 5-azacitidina, poderiam ser opções relevantes para o pré-condicionamento de MSCs de cordão umbilical, sendo assim, deveriam ser mais estudados para futura translação desse conhecimento e prospecção de MSCs pré-condicionadas em casos de doenças imunomediadas, inflamatórias, úlceras de pele ou queimaduras.



**Figura 3 – Representação esquemática das modalidades de pré-condicionamento de MSCs atuais e mais comuns: a) citocinas ou fatores de crescimento, b) agentes químicos/fármacos, c) hipóxia e d) culturas 3D. Os mecanismos de efeitos conhecidos de cada pré-condicionamento estão citados em retângulos com linhas retas (para moléculas secretadas) e com linhas pontilhadas (para genes expressos), vinculados por setas. Os efeitos gerais causados por estes pré-condicionamentos estão mostrados nos retângulos em amarelo. Fonte: modificado de Noronha *et al.* (2019).**

#### 1.4.1. Tacrolimo

O tacrolimo (FK506) é um membro dos macrolídeos e é sintetizado por bactérias filamentosas do solo, *Streptomyces tsukubaensis* (McCauley *et al.*, 1991). Age como uma droga imunossupressora eficaz no tratamento de conjuntivite alérgica, doenças ósseas e reduz os riscos de rejeição contra transplantes, por exemplo, de córnea, rins, coração e fígado (Tamura *et al.*, 2002; Fukunaga *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2013; Fukushima *et al.*, 2014; Ha *et al.*, 2016).

O mecanismo pelo qual o FK506 age, é pela formação de um complexo com a imunofilina FKBP12 (Tong & Jiang, 2016). Após o estabelecimento de FK506/FKBP12, o complexo liga-se ao sítio catalítico da calcineurina, bloqueando a atividade fosfatase dessa enzima, independente da presença de cálcio. Com a inibição da calcineurina, a desfosforilação do fator nuclear de células T (NFAT) é impedida, conseqüentemente, sua translocação ao núcleo. Desta forma, não ocorre a ativação dos linfócitos T (Ellouk-Achard *et al.*, 1998; Plosker, 2000; Caplan & Bruder, 2001).

Atualmente existem poucos estudos na literatura científica que avaliaram o pré-condicionamento de MSCs com FK506. A maioria deles, focou na modulação do potencial osteogênico de MSC(M), MSC(AT) e MSCs da gengiva pelo pré-condicionamento com FK506, visando a aplicação em distúrbios ósseos (Nakamura *et al.*, 2013; Ha *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). Contudo, no que se refere às demais características e funções das MSCs, os resultados além de escassos e contraditórios, carecem de novas análises.

Poncelet & colaboradores (2008) pesquisaram os efeitos do uso concomitante de fármacos imunomoduladores (pertencentes a classes farmacológicas distintas) e MSC(M) na resposta alogênica *in vitro*. A série experimental foi dividida em três grupos relacionados ao tacrolimo: grupo droga-controle [FK506 10ng/mL vs. PBMCs] correspondente a IC<sub>50</sub> da cultura mista; grupo com MSC(M) [MSC(M) vs. PBMCs, proporções 1:2 a 1:64] e grupo combinado [FK506 10ng/mL + MSC(M) vs. PBMCs, proporções 1:2 a 1:64]. Ao final do cultivo, o grupo combinado apresentou o maior índice de inibição da MLR em todas as proporções (Poncelet *et al.*, 2008). Em contrapartida, Buron *et al.* (2009) observaram que a combinação MSC(M) e tacrolimo [1ng/mL] não inibiu a resposta alogênica com a mesma eficiência que o grupo droga-controle (Buron *et al.*, 2009).

Outro estudo obteve resultados similares, onde os grupos droga-controle também exibiram maior inibição da proliferação de linfócitos, de maneira dose-dependente em relação aos grupos combinados (Hoogduijn *et al.*, 2008). Este mesmo estudo verificou que o pré-condicionamento com 1ng/mL FK506 durante 48 horas melhorou a eficiência das MSCs derivadas do tecido cardíaco em MLR, estendendo os iniciais 43% de inibição para aproximadamente 65% (na proporção estipulada 1:10 MSC:PBMCs). Os autores concluíram que a incubação prévia potencializa o efeito



imunossupressor das MSCs de tecido cardíaco contra células T aloarreativas (Hoogduijn *et al.*, 2008).

Segundo Girdlestone & coautores (2015), o pulso com tacrolimo à 50ng/mL duas horas antes do cocultivo, acentuou significativamente a atividade inibitória das MSC(CB) sobre PBMCs obtidos de três doadores diferentes, nas proporções 1:2, 1:10 e 1:50 (Girdlestone *et al.*, 2015).

Portanto, essa revisão da literatura nos mostrou que o FK506 é um fármaco interessante para potencializar as propriedades imunomoduladoras das MSCs. Todavia, os mecanismos envolvidos ainda não foram elucidados, nem os efeitos do fármaco em outras características biológicas e funções das MSCs.

#### 1.4.2. 5-Azacitidina

A 5-azacitidina (5-AZA) é um fármaco modulador epigenético, análogo à citidina, capaz de inibir as DNA metil-transferases (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B) e RNA metil-transferases, que catalisam a transferência de grupos metil quando reconhecem os dinucleotídeos CpG no DNA e RNA, ou seja, sítios onde existem citosina seguida de guanina no sentido 5'-3' (Jiang & Gong, 2018). Quando esse fármaco se liga irreversivelmente ao sítio catalítico das DNMTs, o DNA torna-se hipometilado e, por consequência, o perfil de expressão de múltiplos genes é alterado. Este fármaco tem sido usado clinicamente para tratar neoplasias hematológicas, por exemplo, leucemia mieloide aguda (Das & Singal, 2004; Lyko & Brown, 2005; Brodská *et al.*, 2011).

Um estudo utilizou MSC(AT) de pacientes idosos (média  $\pm 67$  anos) e as pré-condicionou com 5-AZA à 1 $\mu$ M durante 48 horas (Kornicka *et al.*, 2017). Essas células exibiram um aumento significativo de unidades formadoras de colônias, da síntese de microvesículas e da expressão de Lin28, marcador de pluripotência/indiferenciação celular (Stolzinger *et al.*, 2008; Kornicka *et al.*, 2017). Além disso, foi observado que este fármaco reduziu a produção de ROS, NO e aumentou, simultaneamente, a atividade da enzima SOD nessas células (Kornicka *et al.*, 2017).

Este estudo ainda mostrou que MSC(AT) senescentes tratadas com 5-azacitidina apresentaram uma viabilidade melhor que o grupo não-tratado, pois, um menor porcentual de células senescentes (beta-galactosidase+) e apoptóticas (caspase-3+) foi detectado e, também, apresentaram maior taxa Bcl-2/BAX pós-cultura (Kornicka *et al.*, 2017). Estes resultados sugerem que a demetilação do

DNA/RNA exerce um efeito antioxidante, antiapoptótico e rejuvenecedor em MSC(AT) de doadores idosos ou procedentes de passagens tardias.

Xu & colaboradores (2018) mostraram que o *priming* prolongado de MSC(M) com decitabina, variante farmacológica da 5-AZA à 3 $\mu$ M, induz diferenciação endotelial após 12 dias em cultura. O pré-condicionamento nessas condições acarretou alterações fenotípicas, caracterizadas pelo aumento da expressão de marcadores endoteliais típicos como CD31, CD105, eNOS, VE-Caderina, na síntese abundante de ETS1, ETS2, ETV1, ETV4, FGF1, FGF2, FGF9 e VEGF (moléculas fundamentais na regulação do desenvolvimento vascular), e também adquiriram a capacidade de captar LDL no meio de cultura, de modo semelhante aos endoteliócitos (Xu *et al.*, 2018).

Outros estudos demonstraram que a 5-AZA à 10 $\mu$ M, bem como a decitabina em igual concentração, foram capazes de aumentar a expressão das moléculas de histocompatibilidade do tipo I não-clássicos HLA-G1, -G2 e -G3 (isoformas membranares) em MSCs de vários tecidos em diferentes passagens (Teklemarian *et al.*, 2014; Yen *et al.*, 2020). Ademais, Lee & coautores (2015) relataram o aumento da expressão de PTGES, COX-2 e seu produto, PGE-2, após 24 horas incubando MSC(CB) com 5-AZA à 2 $\mu$ M (Lee *et al.*, 2015). Estes resultados indicaram que estes agentes demetilantes potencializam a expressão e/ou secreção de alguns fatores imunomoduladores em MSCs oriundas de fontes distintas.

## 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

De acordo com a literatura atual, as MSCs isoladas de tecidos humanos em seu estado natural apresentam atividades imunomoduladoras, imunossupressoras e regenerativas limitadas em terapias celulares. Após infusão, estas células não enxertam e/ou permanecem prolongadamente no tecido. Isto ocorre, provavelmente, porque o microambiente inflamatório inóspito (abundante em radicais livres, espécies reativas de oxigênio e outras substâncias tóxicas) reduz a sobrevivência das células transplantadas e seu tempo de ação. Partindo dessa premissa, o pré-condicionamento de MSCs poderia tornar as células mais resistentes, para que “se ajustem” mais rapidamente aos estímulos do microambiente logo após a infusão nos pacientes.

Portanto, faz-se fundamental o desenvolvimento de novas abordagens biotecnológicas que aumentem a sobrevivência e o potencial terapêutico das MSCs, e dessa forma possibilitem a produção de produtos celulares robustos que atendam demandas clínicas específicas, de acordo com as normas das agências regulatórias.

As MSCs derivadas de tecidos neonatais, especialmente do cordão umbilical apresentam várias vantagens como disponibilidade, logística, aspectos éticos e estão sendo cada vez mais utilizadas em protocolos de pesquisas clínicas.

Nesse estudo, escolhemos realizar o pré-condicionamento de MSC(CB) com os fármacos tacrolimo e 5-azacitidina e avaliar seus impactos nas propriedades biológicas dessas células. Nossa hipótese é que o pré-condicionamento com esses fármacos potencializam as propriedades imunossupressoras e/ou regenerativas das MSC(CB).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Caracterizar fenotípica e funcionalmente células estromais mesenquimais de cordão umbilical pré-condicionadas com 5-azacitidina (fármaco modulador epigenético) ou com tacrolimo (fármaco imunossupressor).

#### 3.2. Específicos

- Caracterizar a viabilidade, capacidade de expansão celular, o perfil imunofenotípico e potencial de diferenciação de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-azacitidina ou tacrolimo;
- Avaliar a capacidade funcional de imunossupressão e de angiogênese das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-azacitidina ou tacrolimo *in vitro*;
- Caracterizar o secretoma de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-azacitidina ou tacrolimo;
- Avaliar a modulação do processo autofágico na MSC(CB) pré-condicionadas com 5-azacitidina ou tacrolimo;
- Quantificar a secreção das moléculas imunossupressoras IDO e PGE2, pelas MSC(CB) pré-condicionadas com 5-azacitidina ou tacrolimo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Delineamento Experimental

As MSCs isoladas do cordão umbilical humano [MSC(CB)] foram obtidas diretamente do biorrepositório intitulado “Biorrepositório de Células Estromais Mesenquimais de Cordão Umbilical” (nº 020/2020) estabelecido pela MSc. Nádia de Cássia Noronha e de responsabilidade da Profª Drª Kelen Cristina R. Malmegrim de Farias (**Anexo I**). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HC/FMRP-USP sob nº 4.536.135 (**Anexo II**) e pelo CEP da FCFRP-USP sob nº 4.651.687 (**Anexo III**).

Após a elaboração do banco primário de células (BPC) em segunda e terceira passagens, as MSC(CB) foram expandidas e posteriormente incubadas na presença ou ausência dos fármacos por períodos pré-determinados, em seguida, submetidas aos ensaios *in vitro* de caracterização da identidade e potência das MSC(CB) pré-condicionadas ou não (imunofenotipagem, viabilidade e crescimento celular, diferenciação celular, inibição da proliferação de células T, ensaio de migração endotelial, ensaio de angiogênese, análises do secretoma das MSCs, avaliação do processo autofágico, determinação da assinatura funcional pela secreção de moléculas imunossupressoras ou pró-angiogênicas), propostos no projeto. Foram utilizadas MSCs isoladas de três cordões umbilicais saudáveis (N=3). Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e triplicata experimental.

### 4.2. Biobanco, cultivo e expansão de MSC(CB) em condições assépticas

Criotubos retirados do BPC foram usados para a formação do banco celular de trabalho (BT), com limite de repique até a sexta passagem para a realização dos experimentos (p4-p6). As amostras descongeladas do BPC foram transferidas gota-a-gota com o auxílio de uma pipeta pasteur ao meio  $\alpha$ -MEM (*Alpha Minimum Essencial Medium*; Invitrogen Corporation, EUA) fresco, pH ajustado a 7.1 e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino HyClone (SFB; GE Healthcare Life Sciences, EUA). As MSC(CB) foram centrifugadas a 1.200rpm/6min em temperatura ambiente (TA) e o sobrenadante então descartado. O “*pellet*” celular foi ressuspendido em meio  $\alpha$ -MEM 10%SFB e a concentração celular determinada pelo método de exclusão com o corante azul de Trypan 4% v/v, sob visualização em microscópio óptico convencional

(Nikon, modelo Alphaphot ys2-H, Japão). Posteriormente, a suspensão celular foi fracionada e transferida para garrafas de poliestireno estéreis (frascos T75cm<sup>2</sup>; Greiner Bio-One, Alemanha) completando o volume para 15mL com meio de cultura, mantendo-as em estufa (Panasonic, MCO-170AICUVL-PA) a 37°C e 5%CO<sub>2</sub> até o momento do repique para constituir o BT.

A metade do volume do meio de cultivo foi trocada à cada 3-4 dias e, atingindo 80-90% de confluência, realizou-se a tripsinização das MSC(CB). Para desaderí-las do frasco T75cm<sup>2</sup>, o meio foi totalmente removido e adicionado 4mL de Tryple Express 1X (Gibco, EUA) ou Tripsina-EDTA 10X (Invitrogen, EUA) diluída a 10% em PBS 1X pH=7,1. Os frascos foram levados à incubadora e deixados por 5min a 37°C. Para finalizar o processo de tripsinização, foram aplicadas batidas manuais com vigor na lateral das garrafas, desprendendo assim o restante das células. Adicionou-se 8mL de meio  $\alpha$ -MEM 10%SFB fresco à suspensão para inativação das enzimas. A suspensão (contendo meio, células e enzimas inativas) foi retirada e reservada, logo depois, o interior do frasco T75cm<sup>2</sup> foi lavado com PBS 1X para a remoção completa de células remanescentes. Após a incorporação das suspensões, o conteúdo foi centrifugado a 1.200rpm/6min/TA, o sobrenadante foi descartado e as células novamente ressuspendidas em meio de cultura fresco. As MSC(CB) foram contadas e destinadas ao repique, pré-condicionamentos, experimentação direta ou congelamento ( $1 \times 10^6$  células/criotubo) em solução de SFB 10%DMSO em freezer - 80°C.

Todo o material e amostras biológicas foram manipulados em cabine de fluxo laminar NB-2 (Telstar Bio II-A, std:en-12469-2000), seguindo instruções de boas práticas laboratoriais. Após o preparo, os meios de cultura e reagentes foram filtrados (quando não obtidos em condições estéreis de fábrica) bem como os materiais/instrumentos de trabalho devidamente desinfetados e/ou autoclavados. Em conformidade aos protocolos de qualidade aplicados às pesquisas coordenadas pelo CTC-FUNDHERP, antibióticos não foram usados nos cultivos celulares deste projeto. Diariamente avaliava-se a qualidade do cultivo (ausência de contaminação), examinando possíveis alterações do meio de cultura (turbidez e/ou acidificação) e buscando minuciosamente a presença de microrganismos com a ajuda de um microscópio óptico invertido (Zeiss, modelo Micro axiovert 25, Alemanha). Por fim, MSC(CB) de 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> ou 6<sup>a</sup> passagens foram utilizadas nos experimentos descritos a seguir.

### 4.3. Protocolos de pré-condicionamento de MSC(CB)

As MSC(CB) em 3<sup>a</sup> a 5<sup>a</sup> passagens receberam opções abrangentes de condicionamento, divididas em 3 grupos: células tratadas com tacrolimo [MSC(CB)+FK506], tratadas com 5-azacitidina [MSC(CB)+5AZA] e não tratadas (controles). Cada grupo foi submetido aos fármacos de maneira dose-crescente em três concentrações. Ao término do tratamento, as células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes com PBS 1X em TA e testadas.

#### 4.3.1. Grupo MSC(CB)+FK506

Aos 60% de confluência, foi adicionado FK506 (Sigma-Aldrich, EUA) às concentrações de 1, 5 ou 10µg/mL na cultura sob condições de pH=7.1, oxigênio dissolvido mantido a 20%, temperatura a 37°C durante 72 horas. Adaptado a partir de Ha *et al.* 2016a/2016b. Ao término do pré-condicionamento, a confluência celular era de 80%.

#### 4.3.2. Grupo MSC(CB)+5AZA

Aos 70% de confluência, foi adicionada 5-AZA (Sigma-Aldrich, EUA) às concentrações de 1, 2.5 ou 5µM na cultura sob condições de pH=7.1, oxigênio dissolvido mantido a 20%, temperatura a 37°C durante 24 horas. Adaptado a partir de Lee *et al.*, 2015 e Kornicka *et al.*, 2017. Ao término do pré-condicionamento, a confluência celular era de 80%.

#### 4.3.3. Grupo controle

Correspondente às células MSC(CB) que cresceram somente em meio α-MEM 10%SFB sem a influência de fármacos (de acordo com o **item 4.2**) sob condições de pH=7.1, oxigênio dissolvido mantido a 20% e temperatura igual a 37°C.

### 4.4. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico humano

As amostras de sangue periférico de voluntários sadios (N=3) foram processadas logo após a coleta. Inicialmente, o sangue foi diluído na proporção um volume de sangue para dois volumes de PBS 1X e designado ao método de separação de frações por gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences, EUA). Os tubos contendo células e Ficoll-Hypaque foram centrifugados a 800×g/30min/TA. A nuvem de células presente na interfase do Ficoll-Hypaque foi aspirada, lavada duas vezes com 20mL de tampão PBS 1X e centrifugada a 300×g/10min/TA (centrífuga Eppendorf 5810R). As células mononucleares do sangue

periférico humano (PBMCs) foram ressuspensas em PBS 1X 0,1% albumina sérica humana (Sigma-Aldrich, EUA), contadas e reservadas em estufa até o momento de uso (descrito no **item 4.10.1**).

#### **4.5. Análise da cinética de crescimento de MSC(CB)**

Para avaliar e comparar a capacidade de expansão das MSC(CB) durante sete dias, foram pipetadas 3.800 células/mL (2.000 células/cm<sup>2</sup>) por poço e distribuídas em placas de 24 poços (dia 0). O ensaio foi realizado em duplicatas experimentais, onde 2 poços/condição de cultivo eram tripsinizados a cada 24 horas para contagem até o dia 7. Uma única troca de 50% do meio de cultura ( $\alpha$ -MEM 10% SFB) foi realizada no dia 3. Determinou-se a concentração celular nos poços pelo método de exclusão por Trypan 4% v/v. O fator de expansão foi estimado pelo valor médio de células obtidas por dia em relação à quantidade inicialmente semeada.

#### **4.6. Análise do perfil imunofenotípico de MSC(CB)**

As MSC(CB) de cada condição foram analisadas em relação a seus antígenos de superfície celular por meio de marcação com anticorpos monoclonais (específicos para cada molécula) conjugados com fluoróforos. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo FACS Calibur™ (BD Biosciences, EUA) utilizando o software *CELLQuest™* (BD Biosciences, EUA). Foi estabelecido um painel de 14 marcadores segundo os critérios estabelecidos pela ISCT: CD13 APC, CD14 PE, CD29 APC, CD31 FITC, CD34 PercP, CD44 FITC, CD45 FITC, CD49e PE, CD73 PE, CD90 PE, CD105PercP, CD166 PE, HLA-ABC FITC e -DR APC. Todos os anticorpos foram adquiridos do mesmo fabricante (BD Biosciences, EUA).

As células foram centrifugadas a 1.800rpm/3min em tubo apropriado, o sobrenadante descartado e as células então lavadas com 2mL de PBS 1X. Elas foram ressuspensas em PBS 1X, subdivididas em alíquotas identificadas contendo 100 $\mu$ L de suspensão celular ( $1 \times 10^5$  células/tubo) e marcadas com 5 $\mu$ L de anticorpo específico durante 20min protegidas da luz. Após a marcação, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e ressuspensas em 100 $\mu$ L de PBS 1X para análise de 10.000 eventos/tubo no citômetro de fluxo (em diferentes comprimentos de onda). Todo o processo de marcação e aquisição das células foi realizado em TA.

#### **4.7. Análise da viabilidade de MSC(CB) pós-cultivo**



Paralelamente à imunofenotipagem, realizou-se a análise de MSC(CB) pró-apoptóticas e/ou mortas sobre o valor total de células adquiridas (10.000 eventos). A marcação foi feita com 3µL de Anexina-V APC em 300µL tampão de ligação durante 20min, longe da luz. Imediatamente à análise, adicionou-se 50µL de Iodeto de Propídeo (PI) no tubo destinado ao estudo de viabilidade.

#### **4.8. Análise do potencial de diferenciação de MSC(CB)**

Um total de  $4 \times 10^4$  células/poço foram semeadas em placas de cultura 24 poços com meio  $\alpha$ -MEM 10%SFB. Próximo aos 70-80% de confluência, o meio foi totalmente retirado e substituído por 1mL de seus respectivos meios de indução (suplemento + meio basal, proporção 1:10) dos kits *StemPro® Adipogenesis Differentiation*, *StemPro® Osteogenesis Differentiation* (Gibco, EUA). Realizou-se troca parcial (50%) dos meios indutores a cada 3-4 dias e ao final da terceira semana de cultivo (21 dias), as MSC(CB) foram coradas com Sudan-II escarlata (MERCK, Alemanha) para visualização das vesículas lipídicas citoplasmáticas (diferenciação adipogênica) e pelo método de Von Kossa para visualização dos depósitos extracelulares de cálcio, também chamados de cristais hidroxiapatita (diferenciação osteogênica) (Daddi, 1896; Von Kossa, 1901).

Para ambas as técnicas de coloração, é necessária a remoção total do meio indutor e fixação da camada celular antes da inclusão do corante. Feita a fixação da com paraformaldeído 4% durante 30min, os poços foram lavados suavemente com 1mL de água ultrafiltrada obtida do sistema de osmose reversa (Gehaka, OS10LX). As etapas subsequentes foram específicas para cada método de coloração. Para adipócitos, adicionou-se 100µL de álcool 70% por 2min e, em seguida, 300µL de Sudan-II. Após 1h30 de incubação e uma breve reexposição ao álcool 70%, os poços foram lavados com água ultrafiltrada, contra-corados com 300µL de hematoxilina por 1min e lavados repetidamente.

Para osteócitos, primeiramente adicionou-se 300µL de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) mantendo a placa protegida da luz por 30min. Depois de duas lavagens com água ultrafiltrada, a placa foi deixada sob luz intensa durante 1h30. Após a exposição à luz/calor, 200µL de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) foi adicionado e retirado rapidamente, fez-se uma lavagem com água ultrafiltrada e, tal como no método anterior, a hematoxilina foi empregada. Ao final das colorações Sudan-II escarlata

(Daddi, 1896) e Van Kossa (Von Kossa, 1901), adicionou-se 200µL de PBS 1X sobre as amostras para a visualização microscópica.

A análise do potencial de diferenciação dos grupos de MSC(CB) tratados com os fármacos e controles (não-tratados e negativos) foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico de fase invertida com câmera acoplada (Olympus, IX71-DP71), em diferentes aumentos. As fotografias dos resultados foram capturadas e documentadas pelo software *DP Controller*® (Olympus).

#### **4.9. Análise proteômica do meio condicionado de MSC(CB)**

Para análise do proteoma das MSC(CB), utilizou-se o *Proteome Profiler*™ Array (R&D Systems, MN-EUA), um imunoenensaio tipo sanduíche baseado no uso de membranas, método semiquantitativo. Nesse ensaio, as amostras de meio condicionado (MC) foram incorporadas a uma mistura de anticorpos de detecção biotinilados, depois, incubadas junto a uma membrana de arranjo que possuía anticorpos de captura adsorvidos (específicos às proteínas-alvo). Através dos sinais produzidos pelo reagente quimioluminescente de detecção, foi possível determinar e validar em valores relativos (intensidade de pixels), a quantidade dos analitos ligados à membrana.

O MC das MSC(CB) controle (N=2) foi recolhido depois de quatro dias da troca total do meio de cultura. No momento da coleta, as células encontravam-se 90% confluentes. O MC dos grupos tratados (N=2) foram recolhidos da mesma maneira que o grupo anterior, após quatro dias de cultivo. As amostras foram centrifugadas a 12.000×g/20min/4°C (microcentrífuga refrigerada, Vision VS-15000CFN II) para a exclusão de debris e submetidas a análise de fatores solúveis pelo *Human Angiogenesis Array*® kit e *Human XL Cytokine Array*® kit conforme as instruções do fabricante (R&B Systems, MN-EUA). Além do controle, somente o MC das MSC(CB) condicionadas com FK506 10µg/mL ou 5-AZA 5µM foram testados neste experimento.

#### 4.10. Ensaios funcionais de MSC(CB) *in vitro*

##### 4.10.1. Avaliação do potencial imunossupressor de MSC(CB) em cocultivo

As MSC(CB) ( $2,5 \times 10^4$  células) foram semeadas em placa de cultura de 24 poços e após 6 horas de incubação (tempo necessário para adesão total ao fundo do poço), os PBMCs foram adicionados em concentrações crescentes ( $5 \times 10^4$  a  $2,5 \times 10^5$  células), marcados com  $5 \mu\text{M}$  de corante CFSE (*Carboxy-Fluorescein Succinimidyl Ester*, Invitrogen Life Technologies, EUA) a  $37^\circ\text{C}/10\text{min}$ . A marcação foi interrompida com a adição de cinco volumes de meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*; Gibco, EUA) a 10%SFB gelado, seguida de incubação em gelo e no escuro por 5min. Os PBMCs foram novamente centrifugados a  $400 \times g/10\text{min}/4^\circ\text{C}$  e lavados duas vezes com 20mL de meio RPMI 10%SFB gelado.

Para estimular a proliferação dos linfócitos, foi utilizado fitohemaglutinina-M (PHA-M, Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de  $2\text{mg/mL}$  em meio RPMI 10%SFB. As proporções de MSC:PBMCs foram testadas em 1:2, :5, :10, :20. Ao 4º dia de cultivo em estufa, os PBMCs foram coletados, marcados com anticorpo monoclonal anti-CD3 PECy-5 (BD Biosciences, Canadá) e analisou-se a diluição do CFSE (perda de fluorescência) em populações de linfócitos T  $\text{CD3}^+$  pelo citômetro de fluxo. Os PBMCs estimulados com PHA-M (também marcados com CFSE) não cultivados com MSC(CB), corresponderam ao nosso controle positivo (proliferação celular máxima) e foram utilizados no cálculo do percentual de inibição da proliferação dos linfócitos T  $\text{CD3}^+$ , seguindo a equação:

$$\text{Inibição (\%)} = \left( \frac{((C^+ \text{ CFSE low}) - (\text{PBMCs} + \text{MSC CFSE low}))}{(C^+ \text{ CFSE low})} \right) \times 100$$

##### 4.10.2. Análise da migração endotelial induzida pelo meio condicionado de MSC(CB)

As células endoteliais maduras extraídas da veia do cordão umbilical humano (HUVECs, do inglês "*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*"), cedidas pelo Laboratório de Terapia Celular – FUNDHERP, foram expandidas até p5, e semeadas a uma concentração inicial de  $2 \times 10^4$  células/poço em placas de 48 poços com meio completo EGM-2 (*Endothelial Cell Growth Medium 2*; Lonza, EUA). Realizou-se a troca parcial do meio de cultivo a cada dois dias e após atingirem 80% de confluência,

foi feita uma ranhura longitudinal com ponteira de 200µL sob a camada de HUVECs aderidas. As células foram lavadas com PBS 1X para remoção de debris, e então foi adicionado 500µL de MC das MSC(CB) controle e tratadas (FK506 a 10ng/mL e 5-AZA a 5µM), conforme a descrição no **item 4.9**. As HUVECs mantidas em meio EBM 2%SFB (*Endothelial Basal Medium*; Lonza, EUA) foram utilizadas como controle negativo e em meio EGM-2 2%SFB, como controle positivo.

Com a assistência de um microscópio óptico de fase invertida com câmera acoplada (Olympus, modelo IX71-DP71, Japão), os resultados foram fotografados imediatamente à lavagem (0h) e novamente após 20 horas. As imagens foram documentadas pelo software *DP Controller*® (Olympus, Japão) e analisou-se 3 campos/grupo, onde as médias das áreas obtidas à 0h e às 20h foram utilizadas para calcular o percentual de fechamento/migração via software ImageJ™ (NIH, Maryland, EUA).

#### 4.10.3. *Avaliação do potencial angiogênico do meio condicionado de MSC(CB)*

O potencial angiogênico das MSC(CB), pré-condicionadas ou não, foi avaliado pela indução da formação de estruturas tubulares derivadas de células endoteliais em meio Matrigel™ (BD Biosciences, EUA). Para isso, o Matrigel™ gelado foi inserido em uma placa de 96 poços (1,96mg/cm<sup>2</sup>) e levado à estufa a 37°C/30min. Posteriormente, as HUVECs em p5 foram plaqueadas (1×10<sup>5</sup> células/poço) com 100µL de MC das MSC(CB) (pré-condicionadas ou não) sobre o Matrigel™, mantidas a 37°C e 5%CO<sub>2</sub>. Após 15 horas de incubação, examinou-se a presença de estruturas semelhantes a vasos sanguíneos, sendo medidas a área total ocupada, o número de entroncamentos e de tubos formados, bem como o comprimento total deles.

As fotografias foram tiradas com o auxílio de um microscópio óptico de fase invertida com câmera acoplada (Olympus, modelo IX71-DP71, Japão) e as imagens documentadas pelo software *DP Controller*® (Olympus, Japão). Analisou-se 3 campos/grupo, onde os valores brutos dos itens supracitados foram obtidos pela ferramenta *Angiogenesis Analyzer*® do software ImageJ™ (NIH, Maryland, EUA). As médias foram calculadas e plotadas em gráficos.

#### 4.11. Extração e análise de proteínas das MSC(CB)

Após os pré-condicionamentos, as MSCs foram lavadas com PBS 1X e lisadas com tampão de lise (*Cell Lytic™ M*, C2978, Sigma Aldrich) suplementado com inibidores de proteases e fosfatases (P8340 e P0044, Sigma Aldrich, respectivamente) para a obtenção de lisados proteicos. Os lisados foram submetidos a sonicação por três pulsos de dez segundos na potência 50% do aparelho *Sonic Dismembrator* (Modelo 100, *Thermo Fisher Scientific*, EUA) e centrifugados a 1.000×g/10min/4°C para retirar os debris celulares. A concentração de proteínas nos extratos celulares foi determinada por reação de Bradford utilizando o reagente *Bio-Rad protein assay* (500-0006, *Bio-Rad Laboratories*, CA, EUA), segundo instruções do fabricante. Os lisados foram armazenados em freezer -80°C até a execução dos experimentos.

#### 4.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida de SDS-PAGE e Western blotting

Amostras de proteínas (10 ou 20µg) foram separadas por SDS-PAGE em gel 15% segundo Laemmli (Laemmli, 1970). Foi utilizado o sistema vertical de eletroforese Mini-PROTEAN® (*Bio-Rad Laboratories*, EUA) conforme instruções do fabricante. Foi utilizado padrão de massa molecular para proteínas *Page Ruler™ Pre-stained Protein Ladder* (26616, *Thermo Fisher Scientific*, EUA). As condições de eletroforese configuradas foram as seguintes: voltagem constante de 90V durante 90min. A corrida foi feita em tampão de eletroforese Tris-glicina (Tris 25mM, glicina 250mM, SDS 0.1%, pH=8.3). Em seguida as proteínas foram eletro-transferidas para membranas de PVDF com poro de 0,22µm (10600021, GE Healthcare, Reino Unido), com tampão de transferência (bicarbonato de sódio 10mM e carbonato de sódio 3,0mM, pH=9.9) por 1h20 a 350mA/gel. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (solução de leite 5% em solução salina tamponada de Tris (TBS/T) – Tris HCl 25mM, pH=7.5, NaCl 150mM, Tween-20 0,1%) por 1h/TA. Após bloqueio, a membrana foi lavada com TBS/T e incubada com o anticorpo primário em TBS/T, na diluição específica para cada anticorpo (**Tabela 1**) *overnight* a 4°C. A seguir, a membrana foi novamente lavada com TBS/T durante 5min, três vezes, e incubada por 1h com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído em solução de bloqueio, seguido de lavagem com TBS/T e visualização de quimioluminescência utilizando solução de luminol (Tris 0,1M pH=8.5, ácido p-cumárico 400µM, luminol

2,5mM) acrescido de 0,009% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A membrana de PVDF foi exposta a filme de autorradiografia ou analisada em equipamento *ChemiDoc™ MP imager* (Bio-Rad Laboratories) para a verificação da imunomarcção. A quantificação das bandas foi realizada por densitometria usando o software ImageJ™ (NIH, Maryland, EUA).

**Tabela 1. Lista anticorpos utilizados no Western blotting e suas respectivas diluições.**

Anticorpo	Código	Origem	Diluição	Fabricante
Anti-β actina	sc-47778	camundongo	1:4.000	Santa Cruz
Anti-LC3B (D11)	3868	coelho	1:2.000	<i>Cell Signaling</i>
Anti-SQSTM1 (D3)	sc-28359	camundongo	1:1000	Santa Cruz
Anti-camundongo	074-1806	cabra	1:10.000	KPL
Anti-coelho	074-1516	cabra	1:10.000	KPL

#### 4.13. Quantificação de IDO e PGE2

Realizou-se a quantificação da enzima IDO e da proteína PGE-2 pelo método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”). Os analitos foram quantificados no sobrenadante da cultura (meio condicionado, MC) de MSC(CB) pré-condicionadas ou não com 5-AZA (5μM) e FK506 (10μg/mL). O MC das MSC(CB) controle foi recolhido depois de quatro dias da troca total do meio de cultura. No momento da coleta, as células encontravam-se 90% confluentes. O MC dos grupos tratados foram recolhidos da mesma maneira que o grupo anterior, após quatro dias de cultivo. As amostras foram centrifugadas a 12.000×g/20min/4°C (microcentrífuga refrigerada, Vision VS-15000CFN II) para a exclusão de debris e submetidas a análise da concentração molecular.

Os experimentos foram realizados seguindo a bula/protocolo dos kits DuoSet® ELISA *Development System Humam Indoleamine 2,3-dioxygenase/IDO* (cn: DY6030-05) e Parameter™ *Prostaglandin E2 Assay* (cn: KGE004B) (R&D Systems, EUA). Em resumo, os experimentos foram realizados em microplacas de 96 poços com anticorpos de captura adsorvidos ao fundo, com alta afinidade para os analitos de interesse. Após a incubação das amostras diluídas, do padrão e dos controles, os anticorpos conjugados de detecção, estreptavidina-HRP foram adicionados e depois a solução substrato, então, lidos por um densitômetro óptico. A quantidade de sinal produzido é proporcional à quantidade de analitos ligados. Para detecção de IDO as amostras de sobrenadante foram diluídas 2 vezes para detecção de IDO e 3 vezes

para quantificação de PGE-2. Para este experimento de análise de sobrenadante, N=3.

#### **4.14. Análise estatística dos dados**

Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados utilizando o programa GraphPad Prisma 8.0.1. (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Quando a distribuição em todas as variáveis foi considerada normal, aplicou-se o teste T pareado bicaudal seguido do pós-teste de Dunn para comparação de dois grupos experimentais. Nos casos em que a distribuição não foi gaussiana, utilizou-se o teste pareado bicaudal Wilcoxon para dois grupos experimentais. One-Way ANOVA (pós-teste de Turkey) para múltiplos grupos. Os resultados foram apresentados em gráficos, como a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM, do inglês “*Standard Error of the Mean*”) dos valores obtidos para diferentes doadores de células. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  (5%).

## 5. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados separadamente para cada tipo de pré-condicionamento (5-azacitidina ou tacrolimo) para ressaltar e detalhar seus efeitos específicos, e também, porque, este trabalho não teve como objetivo comparar os dois tipos de pré-condicionamentos entre si.

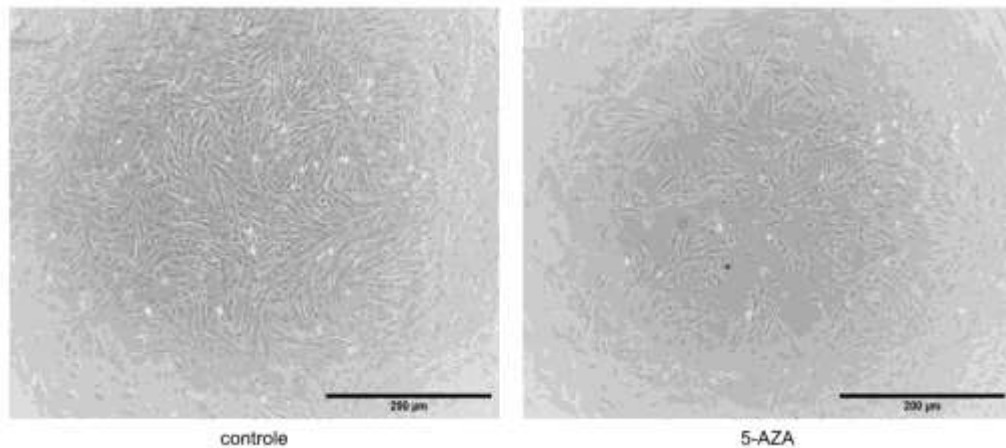
A caracterização das MSCs neste estudo foi conduzida com base nos critérios para identificação de populações mesenquimais, estabelecidos pelo Comitê de Estudos com MSCs da ISCT (Domini *et al.*, 2006). As MSC(CB) não pré-condicionadas foram inoculadas na densidade de 3.000 unidades/cm<sup>2</sup> (ou 2,25×10<sup>5</sup>) em frascos T75cm<sup>2</sup> e após algumas horas, as células que aderiram ao material plástico distribuíram-se em monocamada e exibiram morfologia fibroblastoide. Em torno de sete dias, as MSC(CB) não pré-condicionadas confluíram a 70-80%, com duas trocas parciais de meio  $\alpha$ -MEM 10%SFB neste período. A taxa de replicação variou para cada amostra de MSC(CB), sendo variação mais evidente ao sétimo dia de cultivo. Todas as amostras MSC(CB) controles apresentaram qualitativamente o mesmo potencial de diferenciação, quantitativamente o mesmo imunofenótipo (% de células positivas para vários marcadores de superfície) e índices de viabilidade celulares (86,0%  $\pm$ 1,8) similares.

### 5.1. Pré-condicionamento das MSC(CB) com 5-Azacitidina

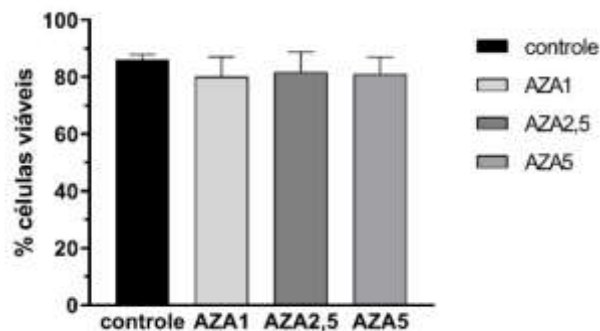
#### 5.1.1. Expansão e caracterização de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA

MSC(CB) foram pré-condicionadas ou não com 1, 2.5 ou 5 $\mu$ M do fármaco 5-AZA por 24 horas. A morfologia fibroblastóide manteve-se ao longo do cultivo na presença ou ausência de 5-AZA. Pela análise microscópica observamos que, com mesmo tempo de cultura as MSC(CB)+5AZA proliferaram menos que as MSC(CB) do grupo controle (**Figura 4**). Para verificar se o fármaco estaria afetando a viabilidade das células, as amostras foram marcadas com Anexina-V/PI e o percentual de células pró-apoptóticas (em fase inicial e final de morte celular) foi analisado por citometria de fluxo. O pré-condicionamento não alterou a viabilidade das MSC(CB)+5AZA em relação às células controles (**Figura 5**).





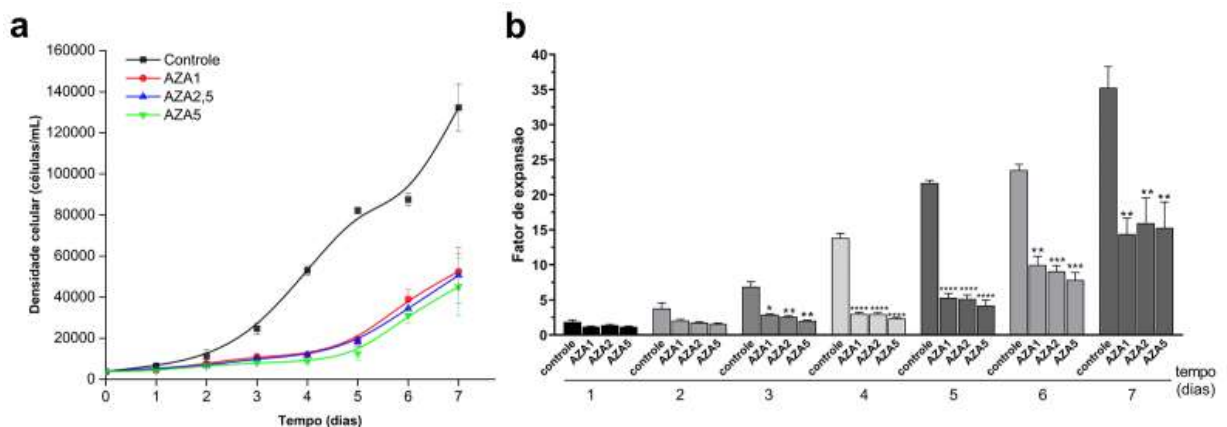
**Figura 4 – Análise da morfologia de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.** As MSCs em sexta passagem foram cultivadas com meio de cultura padrão suplementado com 5-AZA em três diferentes concentrações (1, 2.5 e 5µM), O grupo controle não recebeu tratamento farmacológico. As células foram fotografadas no 7º dia após o plaqueamento para análise da morfologia e do crescimento. As células controles apresentaram morfologia e crescimento característicos com 70-80% de confluência. As células pré-condicionadas com 5-AZA controles apresentaram morfologia característica e crescimento diminuído com 40-50% de confluência (imagem de MSCs do grupo 5-AZA, dose 5µM). Magnificação 100X.



**Figura 5 – Análise de viabilidade das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.** As células em passagem 6 foram cultivadas durante 7 dias com meio de cultura padrão suplementado com 5-AZA nas últimas 24h, em três diferentes concentrações (1, 2.5 e 5µM), sendo o grupo controle aquele que não recebeu tratamento farmacológico. Ao atingirem 80% de confluência, as células obtidas foram contadas, separadas, marcadas com Anexina-V APC/PI e imediatamente analisadas por citometria de fluxo. N=3. As barras verticais correspondem às médias (%) e ao SEM dos eventos adquiridos.

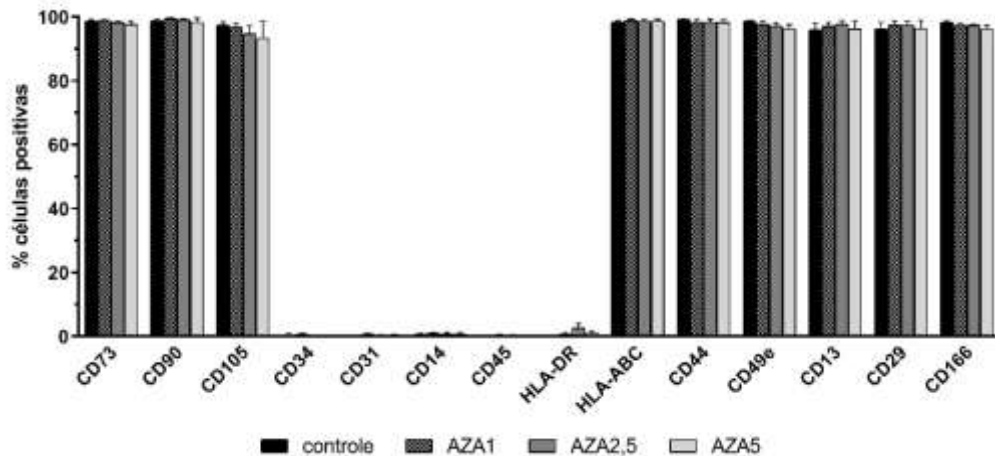
A cinética de crescimento das MSC(CB) pré-condicionadas ou não com 5-AZA foi estabelecido a partir do número de células obtidas a cada 24 horas até o dia 7. A concentração celular inicial de 2.000 células/cm<sup>2</sup> foi utilizada para todos os grupos (controle, 5-AZA à 1, 2.5 e 5µM). Os resultados mostraram que o grupo MSC(CB)+5AZA, teve a proliferação fortemente reduzida pelo tratamento com o fármaco ao logo do período de 7 dias, independentemente da dose. No último dia da curva, a densidade celular variou de  $5,5 (\pm 0,8) \times 10^4$  a  $5,8 (\pm 1,4) \times 10^4$  células/mL contra  $13,4 (\pm 1,1) \times 10^4$  células/mL do grupo controle (**Figura 6a**). Para facilitar a comparação entre as condições, calculou-se também o fator de expansão, que demonstrou uma

diferença crescente da taxa de proliferação do grupo MSC(CB)+5AZA a partir dos dias 4 e 5 em relação ao controle, com fatores de expansão que foram iguais a 3,0 ( $\pm 0,2$ ) e 5,3 ( $\pm 0,6$ ) respectivamente, significativamente menores que do grupo controle nos períodos correspondentes (13,8  $\pm 0,6$  e 21,6  $\pm 0,4$ ). Tendo o grupo MSC(CB)+5AZA alcançado um fator de expansão igual a 15,9 ( $\pm 3,6$ ) vezes a quantidade celular inicial, sem diferenças estatísticas entre as concentrações de 5-AZA ao sétimo dia (**Figura 6b**).



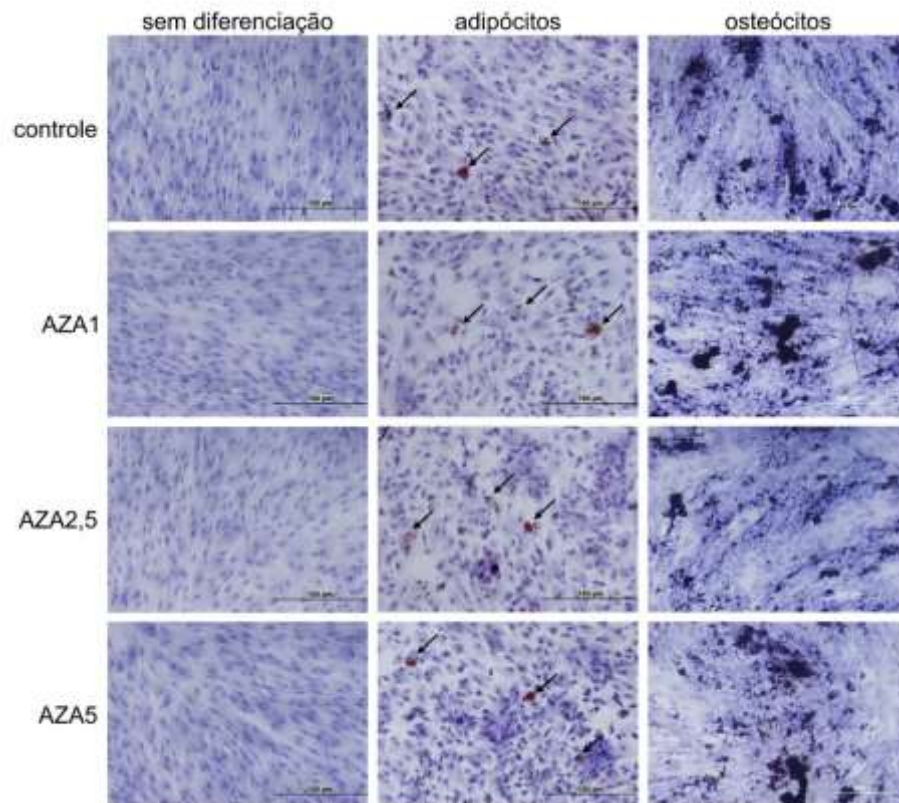
**Figura 6 – Cinética de crescimento das MSC(CB) pré-condicionadas com diferentes concentrações de 5-AZA (a) e fatores de expansão calculados (b) durante sete dias de cultivo em placas de 24 poços, com inóculo inicial de  $2,0 \times 10^3$  células/mL, volume de trabalho igual a 1mL/poço, meio  $\alpha$ -MEM 10%SFB, 37°C. N=3. Os valores plotados correspondem às médias e ao SEM das contagens de MSC(CB) em passagem 5. Foram consideradas significativas as diferenças quando \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Grupo: AZA1, recebeu 1 $\mu$ M; AZA2,5, recebeu 2,5 $\mu$ M; AZA5, recebeu 5 $\mu$ M.**

A caracterização imunofenotípica das MSC(CB) (**Figura 7**) demonstrou que todos os grupos exibiram o fenótipo de superfície característico de MSCs, evidenciado pela alta porcentagem de células positivas para CD13, CD29, CD44, CD49, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA-ABC e negativas para CD14, CD31, CD34, CD45 e HLA-DR conforme detalhado pela ISCT (Dominici *et al.*, 2006). Não houve diferenças relevantes no perfil imunofenotípico de MSC(CB) pré-condicionadas ou não com 5-AZA.



**Figura 7 – Perfil imunofenotípico das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.** As células em sexta passagem foram cultivadas com meio de cultura padrão suplementado com 5-AZA em três diferentes concentrações (1, 2.5 e 5µM). O grupo controle não recebeu tratamento farmacológico. As células obtidas foram contadas, separadas, marcadas com anticorpos específicos e imediatamente analisadas por citometria de fluxo. N=3. As barras verticais correspondem às médias (%) e ao SEM dos eventos adquiridos.

O potencial de diferenciação celular das MSC(CB) foi avaliado por ensaios de indução de diferenciação em adipócitos e osteócitos durante 21 dias. Foi possível a identificação de alguns depósitos multiloculares de gordura (múltiplas vesículas citosólicas contendo triglicerídeos) ainda que a adipogênese das MSC(CB) seja limitada, na presença ou não do fármaco 5-AZA. A osteogênese foi identificada pela coloração substancial de cristais hidroxiapatita no meio extracelular. As MSC(CB) de todos os grupos foram capazes de se diferenciar em adipócitos ou osteócitos (**Figura 8**).



**Figura 8 – Diferenciação das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA em adipócitos e osteócitos.** As células em passagem 5, previamente tratadas com 5-AZA em três diferentes concentrações (1, 2.5 e 5 $\mu$ M), foram cultivadas com meio indutor de diferenciação durante 21 dias. O grupo controle não recebeu tratamento farmacológico. Para a identificação de adipócitos foram utilizadas a coloração com SUDAN-II escarlate (setas pretas indicam a presença de gotículas lipídicas) e o método Von Kossa para osteócitos (áreas escuras são depósitos extracelulares de cálcio). N=3. Magnificação 200X, 200X e 100X respectivamente.

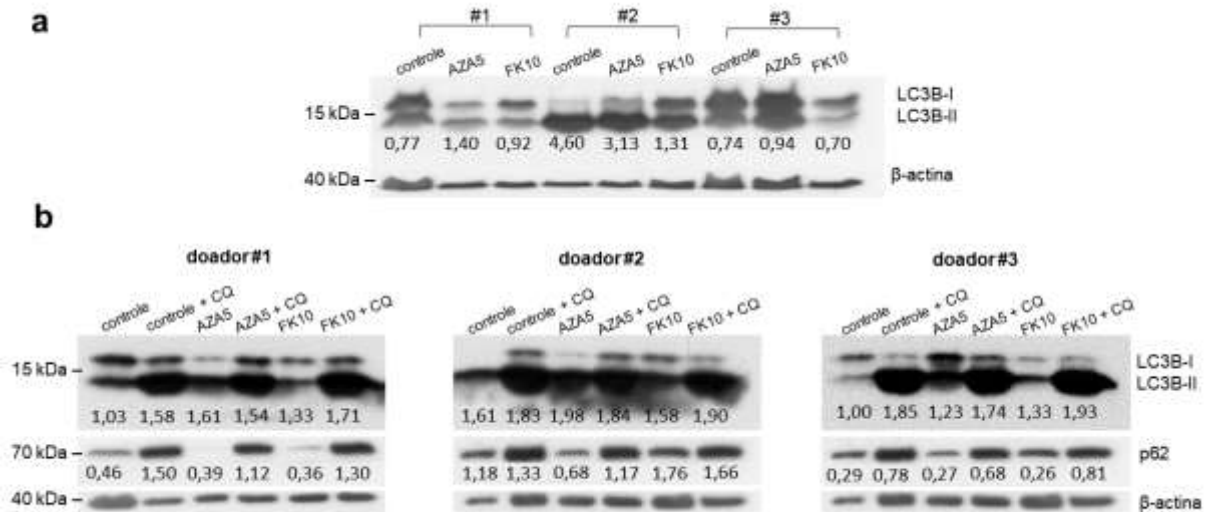
### 5.1.2. Análise de autofagia em MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA

Apesar da 5-AZA não ter afetado a morfologia, viabilidade, perfil imunofenotípico e potencial de diferenciação das MSC(CB), promoveu alterações significativas na proliferação celular. No entanto, não houve correlação entre a diminuição da proliferação com o aumento da concentração do fármaco. Em vista disso, a maior concentração do fármaco (5 $\mu$ M) foi selecionada para a realização dos ensaios funcionais subsequentes.

Com objetivo de verificar se a 5-AZA gera estresse celular, e com isso, aumento do processo autofágico nas MSC(CB), foi avaliada a expressão de LC3B-I, proteína essencial deste processo e de seu produto de clivagem, a LC3B-II. Para avaliação da autofagia a razão LC3B-II/LC3B-I deve ser calculada. Quanto maior esta razão, mais estimulado o processo autofágico. Houve uma grande variação inter-amostral, sendo as razões LC3B-II/LC3B-I mais elevadas nas células dos doadores #1 e #3 do grupo

MSC(CB)+5AZA (1,40 e 0,94 respectivamente) do que em seus controles (0,77 e 0,74 respectivamente), enquanto o doador #2 do grupo tratado exibiu resultado inverso (4,60 vs. 3,13 do controle #2) (**Figura 9a**).

Buscando confirmar se o fluxo autofágico estaria também aumentado nas MSC(CB) sob a influência do fármaco, adicionou-se cloroquina (CQ, um inibidor químico da autofagia) na cultura e a expressão das proteínas LC3B-I, LC3B-II e p62 foi analisada (**Figura 9b**). Dentro do grupo MSC(CB)+5AZA, a razão LC3B-II/LC3B-I do doador #3 foi igual a 1,40 e a razão p62/ $\beta$ -actina igual a 2,48. Já os doadores #1 e #2 apresentaram razões LC3B-II/LC3B-I inferiores (0,95 e 0,93 respectivamente) e p62 igual a 2,87 e 1,71, respectivamente. Na comparação grupo controle vs. MSC(CB)+5AZA, as razões LC3B-II/LC3B-I dos controles (#1 = 1,54, #2 = 1,13 e #3 = 1,84) foram maiores que os grupos de tratamento (#1 = 0,95, #2 = 0,93, #3 = 1,40). Em relação a p62/ $\beta$ -actina, a razão também foi superior para os controles dos doadores #1 e #3 (3,27 e 2,67 respectivamente) contra seus respectivos grupos de tratamento (#1 = 2,87 e #3 = 2,48), porém, a razão p62/ $\beta$ -actina do doador #2 tratado (1,71) foi superior ao seu controle (1,11) (**Figura 9c**).



**Figura 9 – Análise do processo e fluxo autofágicos de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA ou FK506.** As MSC(CB) previamente pré-condicionadas ou não com 5-AZA ou FK506, foram lisadas e submetidas à análise da expressão de proteínas da autofagia por eletroforese e Western blotting. (**a**)

Análise do processo autofágico. A intensidade das bandas LC3B-I e LC3B-II foi mensurada e foi calculada a razão LC3B-II/LC3B-I. **(b)** Análise do fluxo autofágico. Após exposição das MSC(CB) à cloroquina (CQ), intensidade das bandas das proteínas LC3B-I, LC3B-II, p62 e  $\beta$ -actina foi mensurada e foram calculadas as razões LC3B-II/LC3B-I e p62/ $\beta$ -actina. **(c)** Na tabela estão apresentados os valores calculados do fluxo autofágico, com base na razão de LC3B-II/LC3B-I e p62/ $\beta$ -actina previamente calculada para cada grupo. Fluxo autofágico: valor da razão da amostra tratada com CQ dividido pelo valor da razão da amostra não tratada com CQ, para cada grupo avaliado. Grupos: controle, sem fármaco; AZA5, recebeu 5 $\mu$ M de 5-AZA; FK10, recebeu 10 $\mu$ g/mL de FK506. N=3 (doadores #1, #2 e #3).

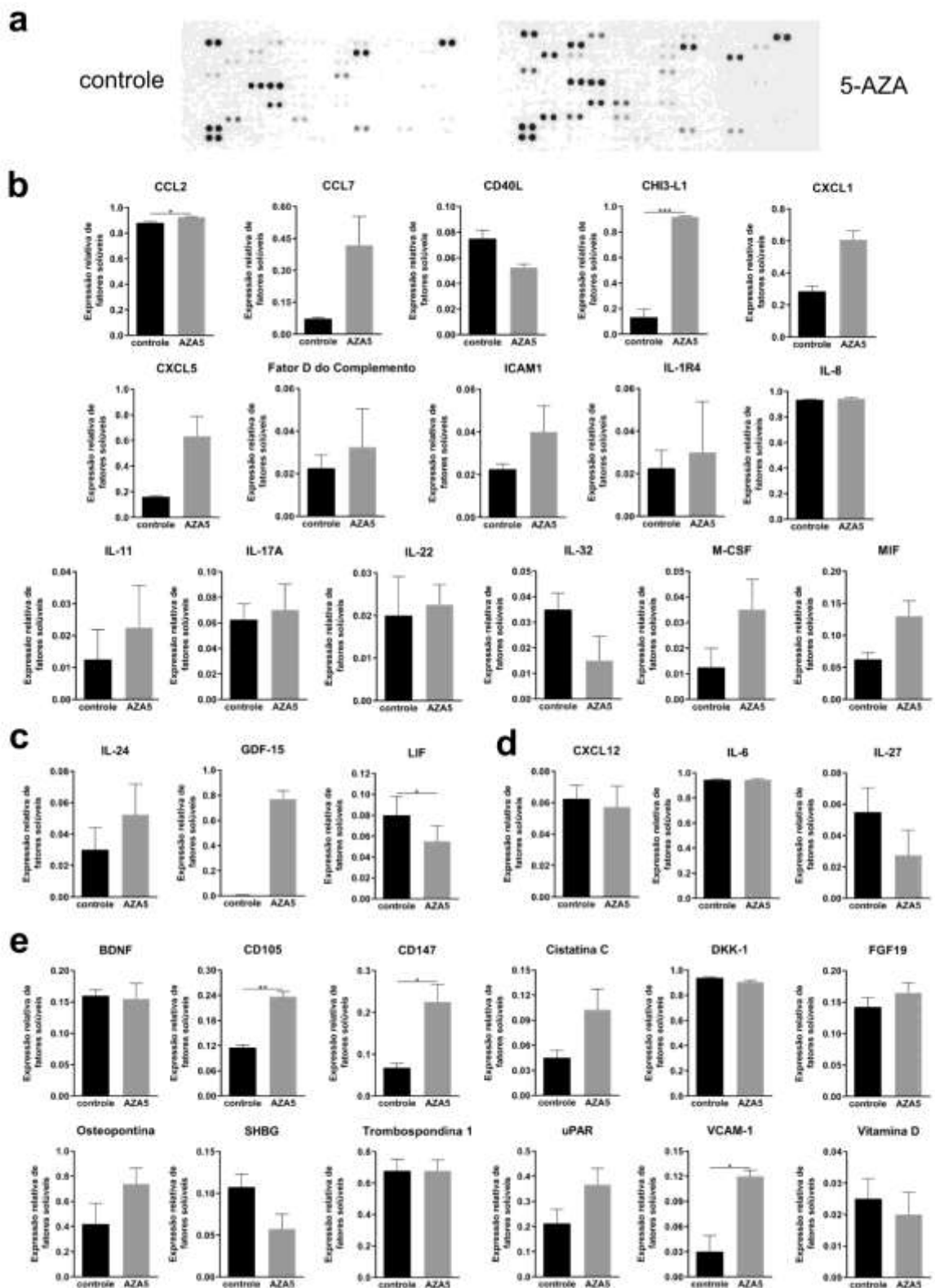
### 5.1.3. Análise do secretoma das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA

O meio condicionado (MC) das MSC(CB) foi submetido à quantificação de 105 fatores solúveis (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, dentre outros), utilizando um imunoenensaio de membrana comercial, conforme metodologia descrita em Material e Métodos.

Das 105 proteínas avaliadas, 34 proteínas foram detectadas e categorizadas como pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e pleiotrópicas. Os níveis relativos de expressão proteica foram quantificados e comparados entre os grupos (**Figura 10a**). O grupo MSC(CB)+5AZA apresentou um aumento significativo da expressão de CCL2, CD105, CD147, CHI3-L1, VCAM-1 e diminuição significativa de LIF.

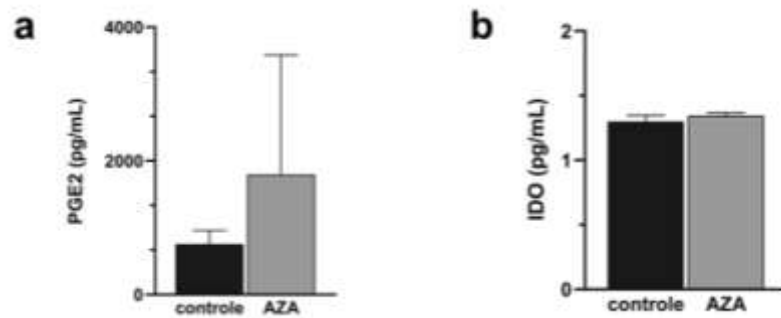
Todavia, observou-se uma tendência positiva, ou seja, aumento sem significância estatística, da expressão de diversas moléculas, tais como CCL7, cistatina C, CXCL1, CXCL5, GDF-15, ICAM1, IL-24, M-CSF, MIF, osteopontina e uPAR, além da redução de outras proteínas em relação ao grupo controle, tais como CD40L, IL-27, IL-32, SHBG e vitamina D. (**Figura 10b-e**).

Foi realizada também a quantificação de PGE-2 eIDO (em pg/mL) no MC de MSC(CB) pré-condicionadas ou não com 5-AZA, pelo método de ELISA. A PGE-2 foi secretada mais abundantemente pelas MSC(CB)+5AZA, cuja concentração foi 1792,0pg/mL versus 753,7pg/mL pelas células do grupo controle (**Figura 11a**). AIDO foi detectada em baixa quantidade e não houve diferença entre os grupos (**Figura 11b**).



**Figura 10 – Perfil de citocinas no secretoma de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.** O meio condicionado (MC) de MSC(CB) previamente tratadas com 5 $\mu$ M de 5-AZA ou não tratadas (grupo controle) foi analisado por um imunoenensaio de membrana semiquantitativo, pelo qual foram detectadas 34 proteínas solúveis (a) categorizadas em pró-inflamatórias (b), anti-inflamatórias (c), pleiotrópicas (d), outras (e). N=2. As barras verticais correspondem às médias da expressão relativa e ao SEM das amostras. As diferenças foram consideradas significativas quando \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ .

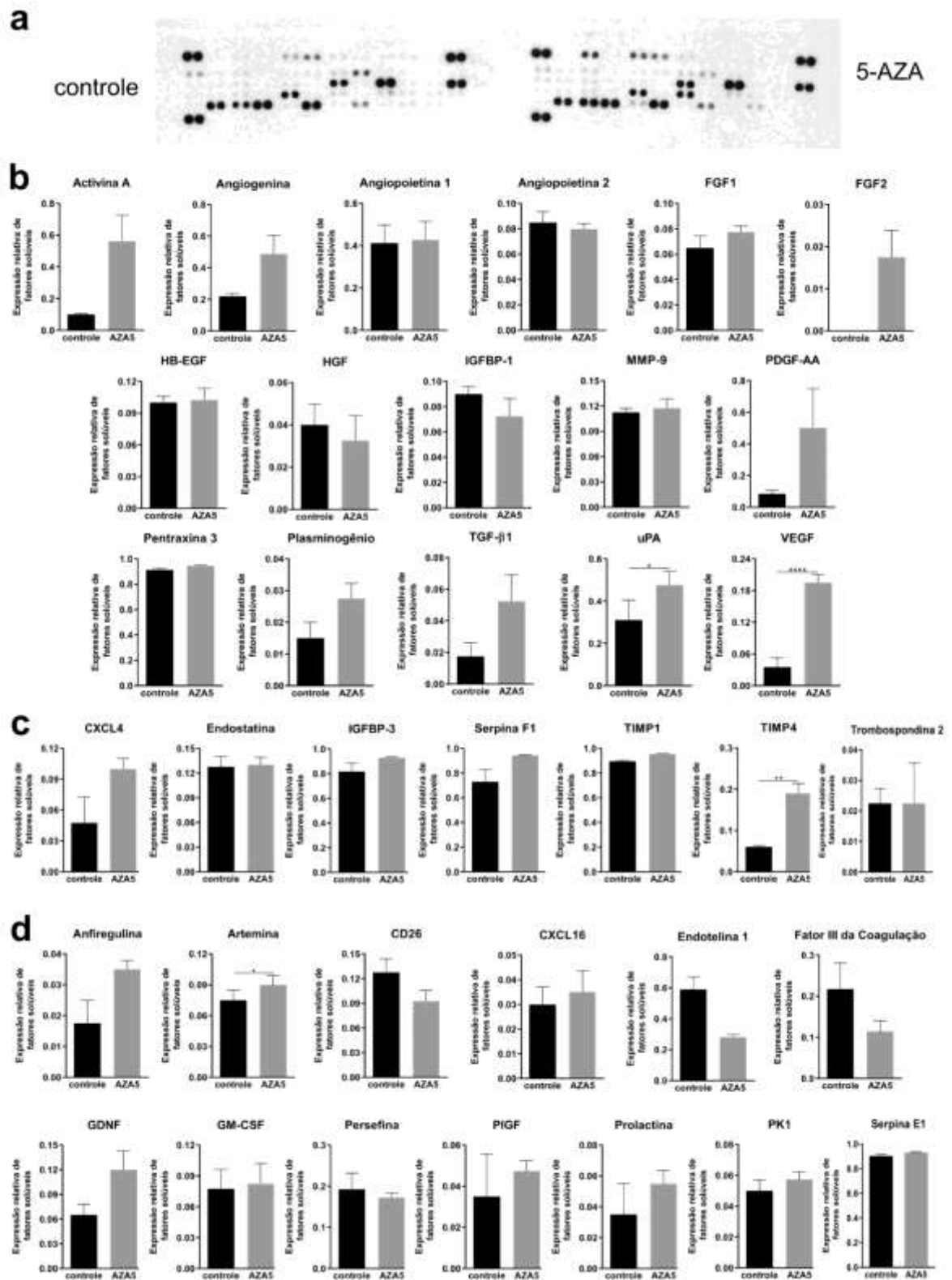




**Figura 11 – Análise da concentração de PGE-2 e IDO no secretoma de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.** O MC de MSC(CB) previamente tratadas com 5 $\mu$ M de 5-AZA ou não tratadas (grupo controle) foi analisado pela método de ELISA, onde absorbância detectada por um leitor de microplacas é diretamente proporcional à concentração das proteínas **(a)** PGE-1 e **(b)** IDO. N=3. As barras verticais correspondem às médias das concentrações dos analitos e ao SEM das amostras.

Foi utilizado também um imunoenensaio de membrana comercial para avaliar os perfis de expressão de 55 proteínas relacionadas à angiogênese, que foram classificadas como pró-angiogênicas, anti-angiogênicas ou outras moléculas relacionadas à angiogênese. Foram detectadas 36 proteínas das 55 analisadas (**Figura 12a**). A expressão de artemina, uPA, VEGF e TIMP4 encontraram-se significativamente elevadas. Contudo, uma tendência positiva também foi observada para a expressão de diversas proteínas, tais como, activina A, anfiregulina, angiogenina, CXCL4, CXCL16, FGF1, FGF2, GDNF, IGFBP-3, PDGF-AA, PIGF, plasminogênio, prolactina, PK1, serpina F1 e TGF- $\beta$ . Por outro lado, houve tendência na redução de HGF, IGFBP-1, CD26, endotelina-1 e fator III da coagulação em relação grupo controle (**Figura 12b-d**). As proteínas cujas expressões não foram alteradas pelo tratamento com 5-AZA também podem ser encontradas na **Figura 12b-d**.

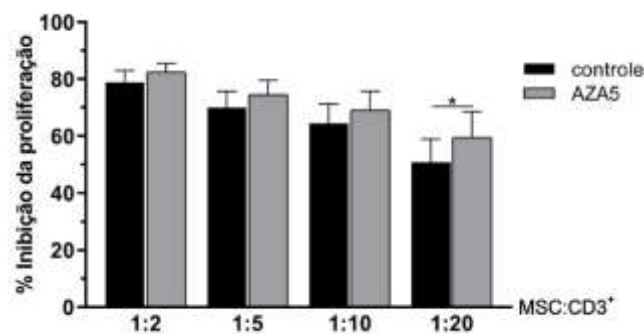




**Figura 12 – Perfil de fatores angiogênicos no secretoma de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.** O meio condicionado (MC) de MSC(CB) previamente tratadas com 5 $\mu$ M de 5-AZA ou não tratadas (grupo controle) foi analisado por um imunoenensaio de membrana semiquantitativo, pelo qual foram detectadas 36 proteínas solúveis (a) que foram categorizadas em pró-angiogênicas (b), anti-angiogênicas (c), outras (d). N=2. As barras verticais correspondem às médias da expressão relativa e ao SEM das amostras. As comparações foram consideradas significantes quando \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 5.1.4. Avaliação do potencial imunossupressor de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA

A inibição da proliferação de linfócitos T é um ensaio funcional *in vitro* realizado para avaliar as propriedades imunossupressoras/anti-proliferativas das MSCs. Para tal, MSC(CB) foram cocultivadas com PBMCs ativadas com PHA-M (previamente marcadas com CFSE) durante 4 dias, em proporções progressivas de MSC:PBMCs (1:2, :5, :10, :20). Conforme mostrado na **Figura 13**, as MSC(CB)pré-condicionadas com 5-AZA inibiram a proliferação de linfócitos T CD3<sup>+</sup> similarmente ao grupo controle nas três primeiras proporções MSC:CD3<sup>+</sup>. Contudo, na proporção 1:20, as MSC(CB)+5AZA foram capazes de inibir a proliferação de linfócitos T CD3<sup>+</sup> com maior eficiência (59,6% ±9,0) que o grupo controle de MSC(CB) não pré-condicionadas (50,8% ±8,2).

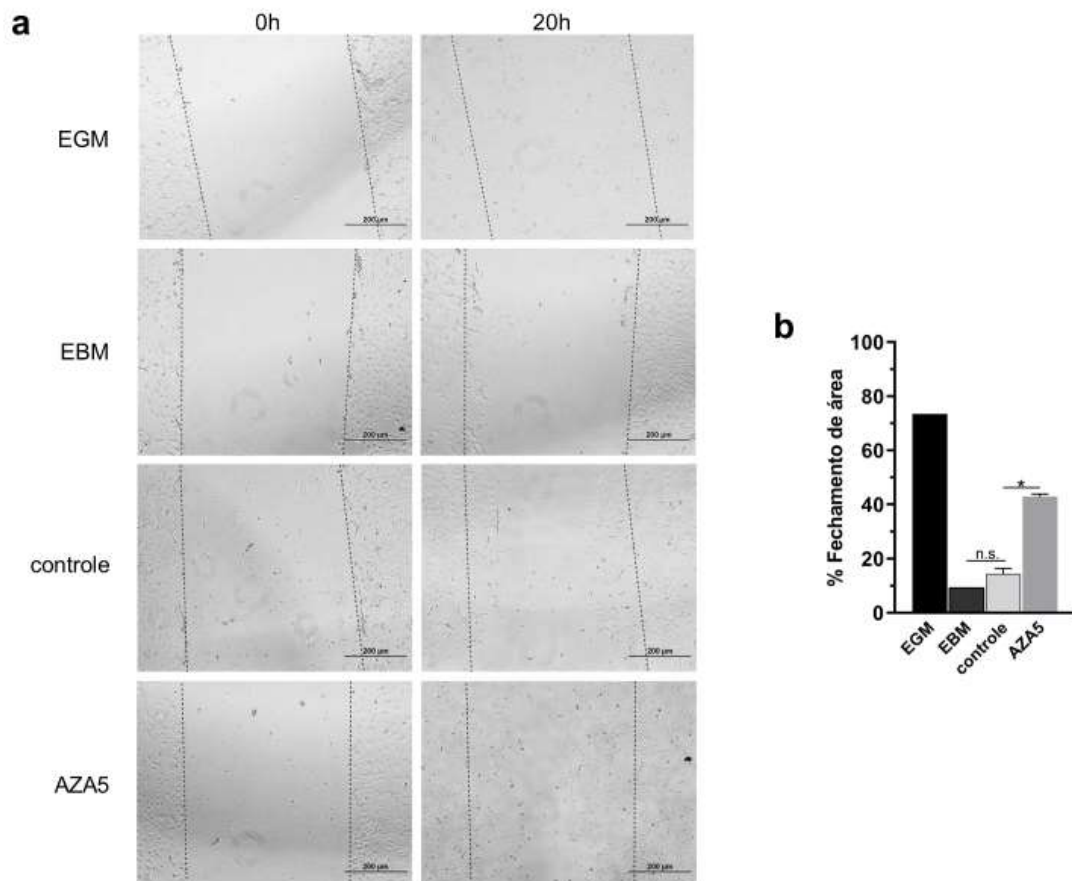


**Figura 13 – Porcentagem de inibição da proliferação de linfócitos T por MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.** As MSC(CB) em passagem 4, previamente tratadas com 5 $\mu$ M de 5-AZA ou não (grupo controle), cocultivadas durante quatro dias com PBMCs alogênicas ativadas por PHA-M, nas proporções 1:2, :5, :10 e :20. No dia 4, as PBMCs já previamente marcadas com CFSE foram incubadas coletadas e marcadas com anticorpo anti-CD3 e analisadas por citometria de fluxo. N=3. As barras verticais correspondem às médias (%) e ao SEM dos eventos adquiridos. Foram consideradas significativas as diferenças cujo valor de p foi <0,05.

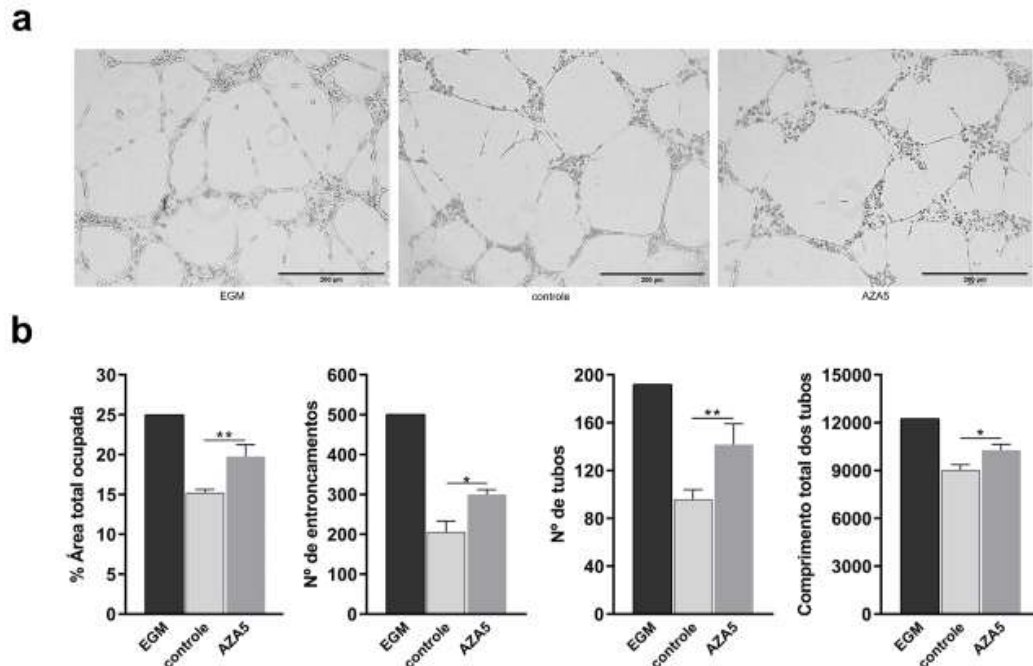
#### 5.1.5. Avaliação do potencial angiogênico de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA

O potencial angiogênico das MSC(CB) foi avaliado pela capacidade de induzirem a migração em células endoteliais e formação de estruturas semelhantes a vasos capilares. Para tal, o meio condicionado (MC) de MSC(CB) pré-condicionadas ou não com 5-AZA foi aplicado sobre as culturas de HUVECs e os efeitos, então, comparados em períodos previamente determinados. No ensaio de migração endotelial, 20 horas após a adição do MC, observou-se que as HUVECs incubadas com MC do grupo MSC(CB)+5AZA apresentaram uma redução significativa da área aberta (**Figura 14a**), correspondendo à 42,56% ( $\pm$ 1,0) de fechamento contra 14,43%

( $\pm 2,0$ ) do controle (**Figura 14b**). Da mesma forma, no ensaio de formação de vasos, o MC do grupo MSC(CB)+5AZA induziu a formação de estruturas mais numerosas e robustas no matrigel em relação ao grupo controle, após 15 horas de incubação (**Figura 15a**). O potencial angiogênico do MC das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA foi comprovado pelo percentual da área ocupada por estruturas endoteliais ( $19,77\% \pm 1,5$ ), número de entroncamentos ( $300 \pm 12,3$ ) e tubos ( $142 \pm 17,0$ ), bem como a soma total dos comprimentos tubulares na amostra ( $10.277 \pm 366,13$ ) (**Figura 15b**). Todos estes parâmetros avaliados foram significativamente maiores quando as HUVECs foram tratadas com o meio das MSC(CB) pré-condicionadas.



**Figura 14 – Efeito do meio condicionado de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA sobre a migração de HUVECs.** O ensaio de migração de células endoteliais (conhecido como “*Scratch Assay*”) foi realizado com HUVECs em p5 cultivadas com MC de MSC(CB) pré-condicionadas ou não com 5-AZA em placas de 48 poços. **a)** As imagens foram registradas imediatamente ao risco/ranhura (0h) e após 20h, **b)** as barras verticais correspondem às médias (%) e ao SEM do fechamento de área. Grupos: EGM ou controle de migração máxima; EBM ou controle de migração mínima; Controle, recebeu MC de MSC não-tratadas; AZA5, recebeu MC de MSC tratadas com 5-AZA à  $5\mu\text{M}$ . N=3. Diferenças foram consideradas significativas quando p foi  $<0,05$ . n.s= não significativo. Magnificação 100X.

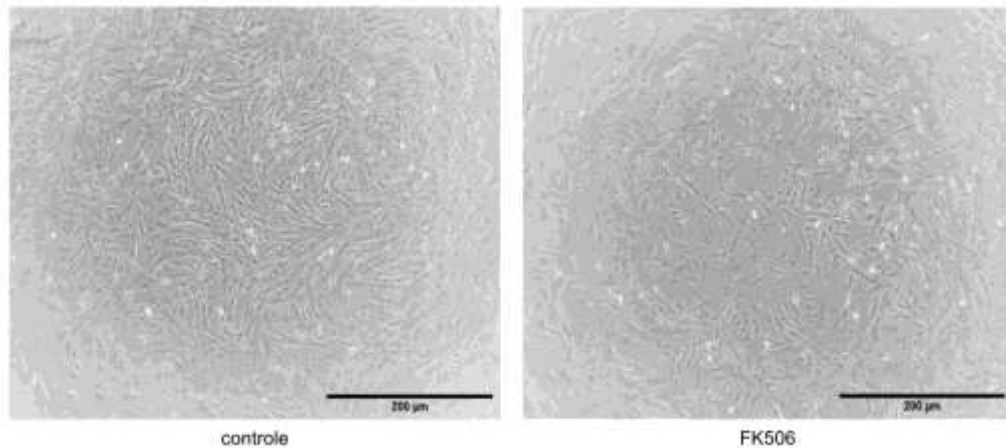


**Figura 15 – Potencial angiogênico do meio condicionado de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.** HUVECs em passagem 5 foram cultivadas com o MC de MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA ou não para avaliar a formação de estruturas semelhantes à vasos capilares, em placas de 96 poços. **a)** As imagens foram registradas 15 horas após a adição do MC, **b)** as barras verticais correspondem às médias e ao SEM dos elementos relacionados à angiogênese, dados em porcentual, unidades ou valores arbitrários (pixels). Grupos: EGM, controle máximo de angiogênese; Controle, recebeu MC de MSC não-tratadas; AZA5, recebeu MC de MSC tratadas com 5-AZA à 5µM. N=3. Foram consideradas significativas quando \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ . Magnificação 100X.

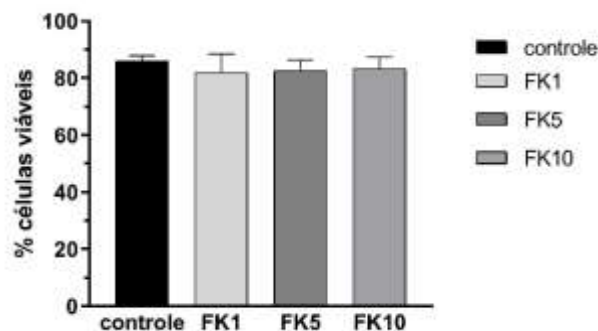
## 5.2. Pré-condicionamento das MSC(CB) com Tacrolimo

### 5.2.1. Expansão e caracterização de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506

MSC(CB) foram pré-condicionadas ou não com 1, 5 ou 10µg/mL do fármaco FK506 por 72 horas. A morfologia fibroblastóide manteve-se ao longo do cultivo na presença ou ausência do FK506 e sem demasiadas diferenças no crescimento (**Figura 16**). Para verificar se este fármaco estaria afetando a viabilidade das MSC(CB), as amostras foram marcadas com Anexina-V/PI para determinar o percentual de células pró-apoptóticas (em fase inicial e final de morte celular) via citometria de fluxo. O resultado do pré-condicionamento mostrou que não houve alteração na viabilidade das células em relação ao controle (**Figura 17**).



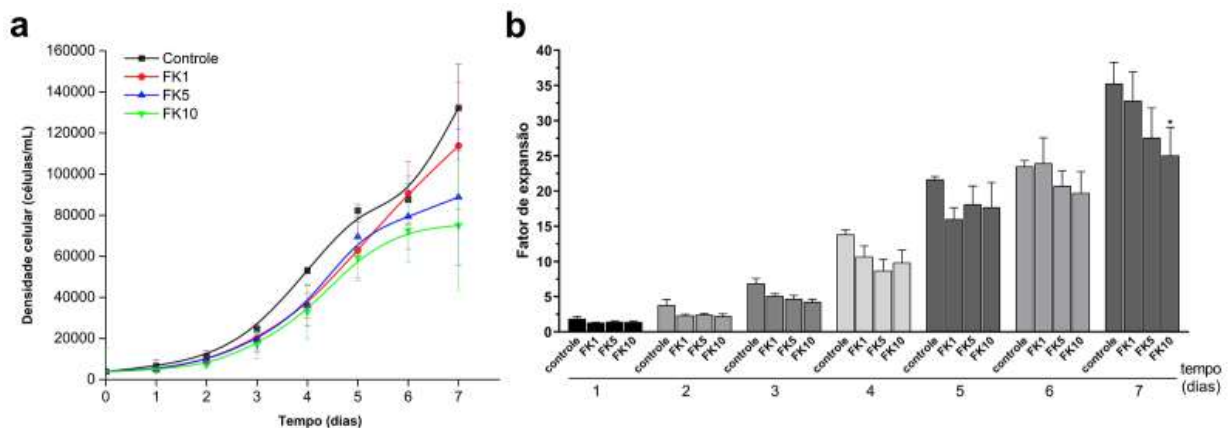
**Figura 16 – Análise da morfologia de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.** As MSCs em sexta passagem foram cultivadas com meio de cultura padrão suplementado com FK506 em três diferentes concentrações (1, 5 e 10µg/mL). O grupo controle não recebeu tratamento farmacológico. As células foram fotografadas no 7º dia após o plaqueamento para análise da morfologia e do crescimento. As células controles apresentaram morfologia e crescimento característicos com 70-80% de confluência. As células pré-condicionadas com FK506 controles apresentaram morfologia característica e crescimento sutilmente diminuído com 60-70% de confluência (imagem de MSCs do grupo FK506, dose 10µg/mL). Magnificação 100X.



**Figura 17 – Análise de viabilidade das MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.** As células em passagem 6 foram cultivadas durante 7 dias com meio de cultura padrão suplementado com FK506 nas últimas 24h, em três diferentes concentrações (1, 5 e 10µg/mL), sendo o grupo controle aquele que não recebeu tratamento farmacológico. Ao atingirem 80% de confluência, as células obtidas foram contadas, separadas, marcadas com Anexina-V/PI e imediatamente analisadas por citometria de fluxo. N=3. As barras verticais correspondem às médias (%) e ao SEM dos eventos adquiridos. Grupo: FK1, recebeu 1µg/mL; FK5, recebeu 5µg/mL; FK10, recebeu 10µg/mL.

A cinética de crescimento das MSC(CB) tratadas ou não com FK506 foi estabelecida a partir do número de células obtido a cada 24 horas durante 7 dias. A concentração celular inicial de 2.000 células/cm<sup>2</sup> foi utilizada para todos os grupos de comparação (controle, FK506 à 1, 5 ou 10µg/mL de FK506). Os resultados mostraram que as MSC(CB)+FK506 mantiveram a taxa de proliferação semelhante ao grupo controle no decorrer do período, especialmente na menor concentração do fármaco. No último dia da curva de crescimento, o número de células variou de 9,52 (±1,5) ×10<sup>4</sup> a 12,4 (±1,5) ×10<sup>4</sup> células/mL versus 13,4 (±1,1) ×10<sup>4</sup> células/mL no grupo controle,

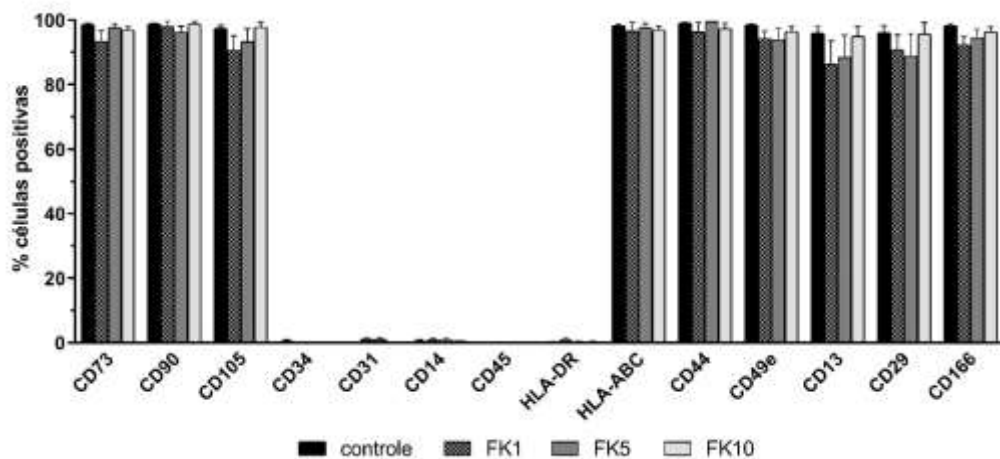
sem diferença estatística (**Figura 18a**). Para facilitar a comparação entre as condições, estimou-se também os fatores de expansão, que mostrou um decaimento sutil na taxa de proliferação do grupo MSC(CB)+FK506 no sétimo dia, mais evidente na cultura de MSC(CB) pré-condicionadas com 10 $\mu$ g/mL. Ao final da cinética de crescimento os fatores de expansão do grupo de MSC(CB) pré-condicionadas com de 1, 5 ou 10 $\mu$ g/mL foram 32,8 ( $\pm$ 4,1), 27,6 ( $\pm$ 4,2) e 25,0 ( $\pm$ 4,0), respectivamente. Os fatores de expansão do grupo MSC(CB)+FK506 não diferiram significativamente entre si (**Figura 18b**).



**Figura 18 – Cinética de crescimento das MSC(CB) pré-condicionadas com diferentes concentrações de FK506 (a) e fatores de expansão calculados (b) durante sete dias de cultivo em placas de 24 poços, com inóculo inicial de  $2,0 \times 10^3$  células/mL, volume de trabalho igual a 1 mL/poço, meio  $\alpha$ -MEM 10% SFB, 37°C. Os valores plotados correspondem às médias e ao SEM das contagens de MSC(CB) em passagem 5. Grupo: FK1, recebeu 1 $\mu$ g/mL; FK5, recebeu 5 $\mu$ g/mL; FK10, recebeu 10 $\mu$ g/mL. N=3. Foram consideradas significativas as diferenças quando \* $p < 0,05$ .**

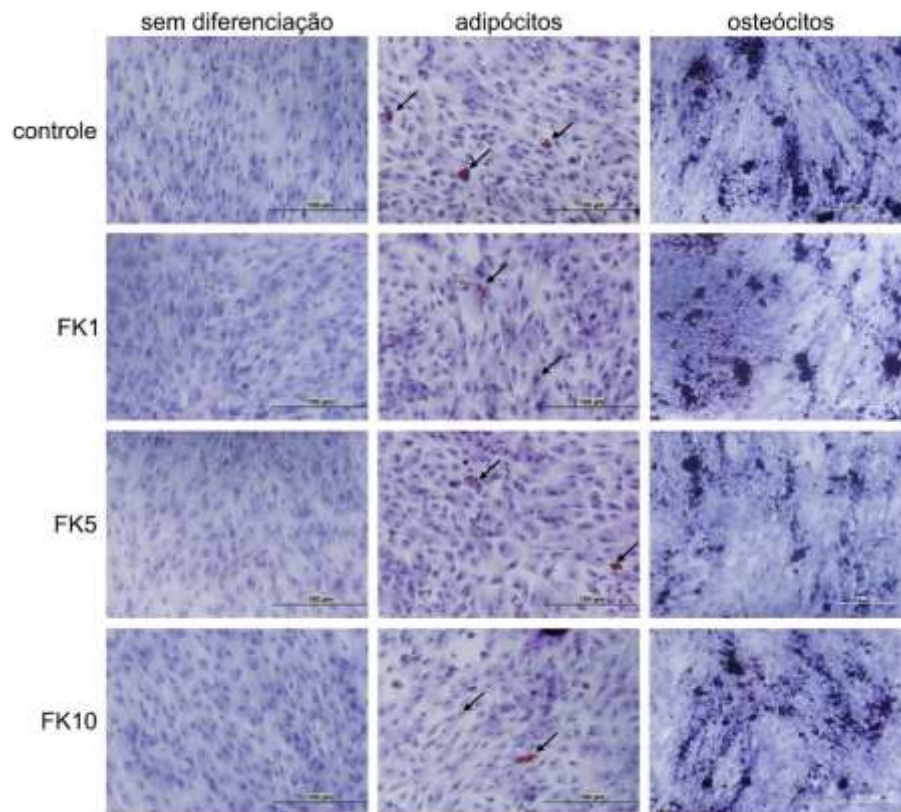
A caracterização imunofenotípica das MSC(CB) (**Figura 19**) demonstrou que todos os grupos exibiram o fenótipo de superfície característico de MSCs, caracterizado pela alta porcentagem de células positivas para CD13, CD29, CD44, CD49, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA-ABC e negativas para CD14, CD31, CD34, CD45 e HLA-DR conforme detalhado pela ISCT (Dominici *et al.*, 2006). Não houve diferenças relevantes no perfil imunofenotípico de MSC(CB) pré-condicionadas ou não com FK506.





**Figura 19 – Perfil imunofenotípico das MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.** As células em sexta passagem foram cultivadas com meio de cultura padrão suplementado com FK506 em três diferentes concentrações (1, 5 e 10µg/mL). O grupo controle não recebeu tratamento farmacológico. As células obtidas foram contadas, separadas, marcadas com anticorpos específicos e imediatamente analisadas por citometria de fluxo. N=3. As barras verticais correspondem às médias (%) e ao SEM dos eventos adquiridos.

O potencial de diferenciação celular das MSC(CB) foi avaliado por ensaios de indução de diferenciação em adipócitos e osteócitos durante 21 dias. O grupo MSC(CB)+FK506 exibiu escassos depósitos de gordura (triglicerídeos). Já a osteogênese, foi marcada pela presença de cristais hidroxiapatita no meio extracelular. Portanto, MSC(CB) pré-condicionadas ou não com diferentes concentrações de FK506 foram capazes de se diferenciarem nas linhagens adipogênica e osteogênica (**Figura 20**).



**Figura 20 – Diferenciação das MSC(CB) pré-condicionadas com FK506 em adipócitos e osteócitos.** As células em passagem 5, previamente tratadas com FK506 em três diferentes concentrações (1, 5 e 10 $\mu$ g/mL), foram cultivadas com meio indutor de diferenciação durante 21 dias. O grupo controle não recebeu tratamento farmacológico. Para a identificação de adipócitos foram utilizadas a coloração com SUDAN-II escarlate (setas pretas indicam a presença de gotículas lipídicas) e o método Von Kossa para osteócitos (áreas escuras são depósitos extracelulares de cálcio). N=3. Magnificação 200X, 200X e 100X respectivamente.

### 5.2.2. Análise do perfil autofágico de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506

O FK506 não promoveu alterações notórias sobre a proliferação celular, viabilidade e características imunofenotípicas das MSC(CB) tratadas com 1 e 5 $\mu$ g/mL de FK506. Embora a maior concentração do fármaco (10 $\mu$ g/mL) tenha afetado mais a expansão celular, a viabilidade e as demais características foram preservadas. Com objetivo de investigar se as propriedades funcionais das MSC(CB) estariam sendo alteradas pelo tratamento com FK506, a dose 10 $\mu$ g/mL foi selecionada para a realização dos ensaios subsequentes.

A avaliação do processo e fluxo autofágico foi também realizada em MSC(CB) pré-condicionadas ou não com o fármaco tacrolimo. As razões LC3B-II/LC3B-I entre os doadores do grupo MSC(CB)+FK506 foram heterogêneas (#1 = 0.92, #2 = 1.31, #3 = 0.70), sendo as células tratadas do doador #2 aquelas que exibiram a maior razão LC3B-II/LC3B-I. Quando são comparados controles vs. tratamento, verifica-se que as

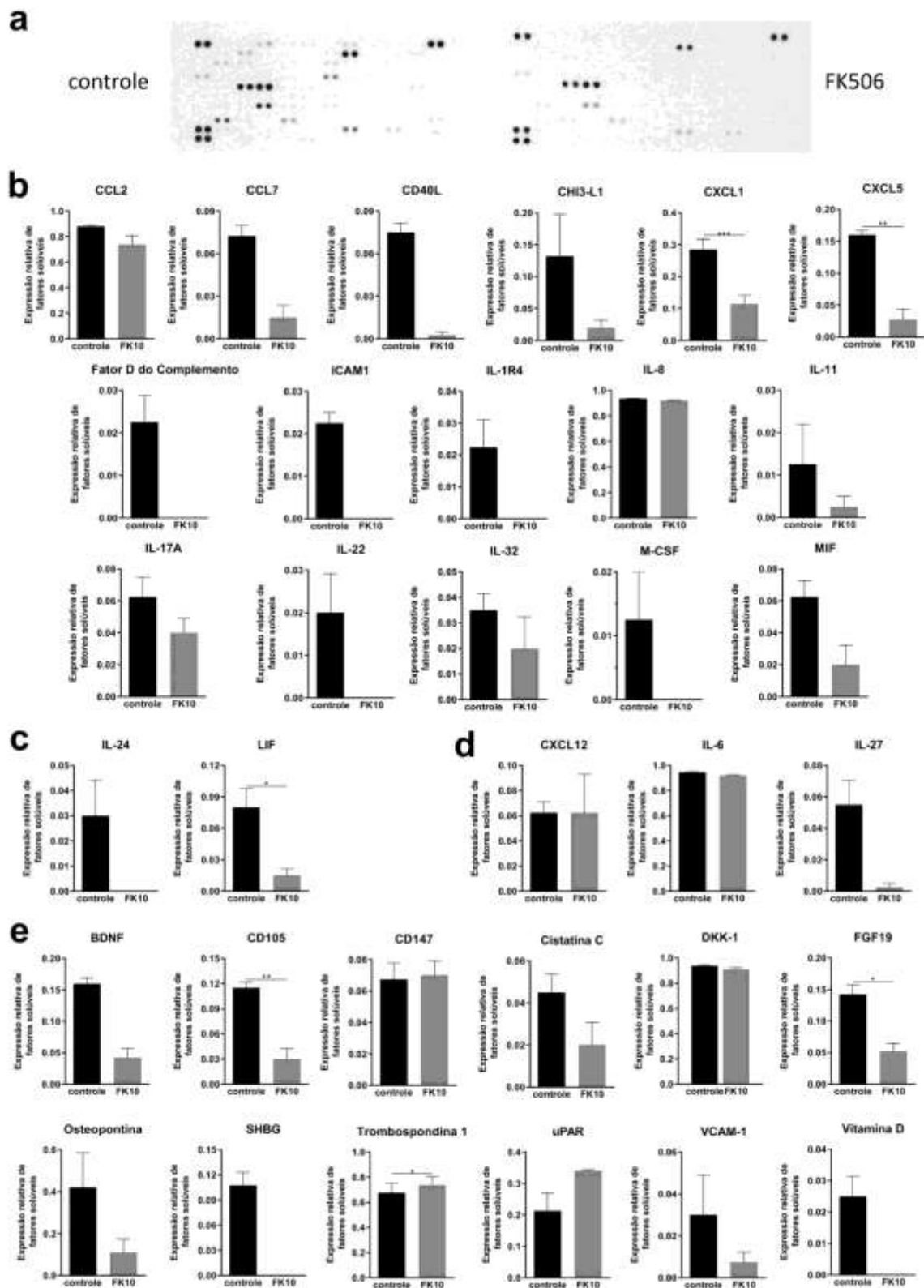


MSC(CB)+FK506 do doador #1 possuem razão LC3B-II/LC3B-I superior ao seu respectivo controle (0,77), do doador #2 possuem razão inferior ao seu respectivo controle (4,60) e as MSC(CB)+FK506 do doador #3 apresentam razão similar ao próprio controle (0,74) (**Figura 9a**). Com objetivo de avaliar o fluxo autofágico nas MSC(CB) pré-condicionadas com FK506, realizou-se um experimento adicionando CQ na cultura. A intensidade de expressão das bandas das proteínas LC3-I, LC3B-II e p62 foi analisada e as razões LC3B-II/LC3B-I e p62/ $\beta$ -actina calculadas (**Figura 9b**). Os valores calculados de fluxo autofágico nas MSC(CB) de todos os doadores foram relativamente homogêneos. A razão LC3B-II/LC3B-I foi 1,28 para doador #1, 1,20 para doador #2 e 1,45 para doador #3. A razão p62/ $\beta$ -actina também aumentou em todas as MSC(CB) após a adição de CQ. Na comparação grupo controle vs. MSC(CB)+FK506, as razões LC3B-II/LC3B-I dos controles #1 e #3 (1,54 e 1,84 respectivamente) foram maiores do que das células tratadas. Contudo, as MSC(CB)+FK506 do doador #2 apresentaram uma razão (1,20) ligeiramente superior ao próprio controle (1,13) (**Figura 9c**).

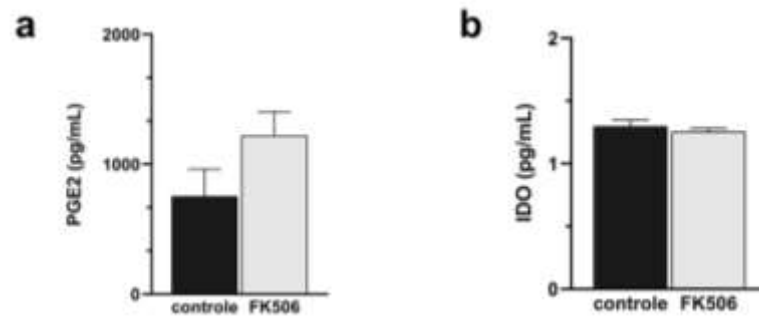
### 5.2.3. Análise do secretoma das MSC(CB) pré-condicionadas com FK506

Foi realizada a quantificação de 105 fatores solúveis (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, dentre outros) no meio condicionado (MC) de MSC(CB) pré-condicionadas ou não com tacrolimo. Foram detectadas e quantificadas 33 proteínas (**Figura 21a**). O grupo MSC(CB)+FK506 apresentou aumento de trombospondina 1 e uma redução significativa da expressão de CD105, CXCL1, CXCL5, FGF19 e LIF. Outras moléculas exibiram-se alteradas no MC do grupo tratado com FK506, e mesmo que sem o diferencial estatístico, chamaram a atenção pelos resultados. Por exemplo, uPAR parece ser mais secretado pelo grupo MSC(CB)+FK506 do que o controle, embora uma série de outras moléculas tiveram sua síntese/secreção restringida (**Figura 21b-e**).

A PGE-2 foi secretada em maior quantidade pelas MSC(CB)+FK506, cuja concentração foi 1.223,2pg/mL ( $\pm$ 182,17) contra 753,7pg/mL ( $\pm$ 208,1) do grupo controle (**Figura 22a**). AIDO foi detectada, embora sem diferença entre os grupos (**Figura 22b**).

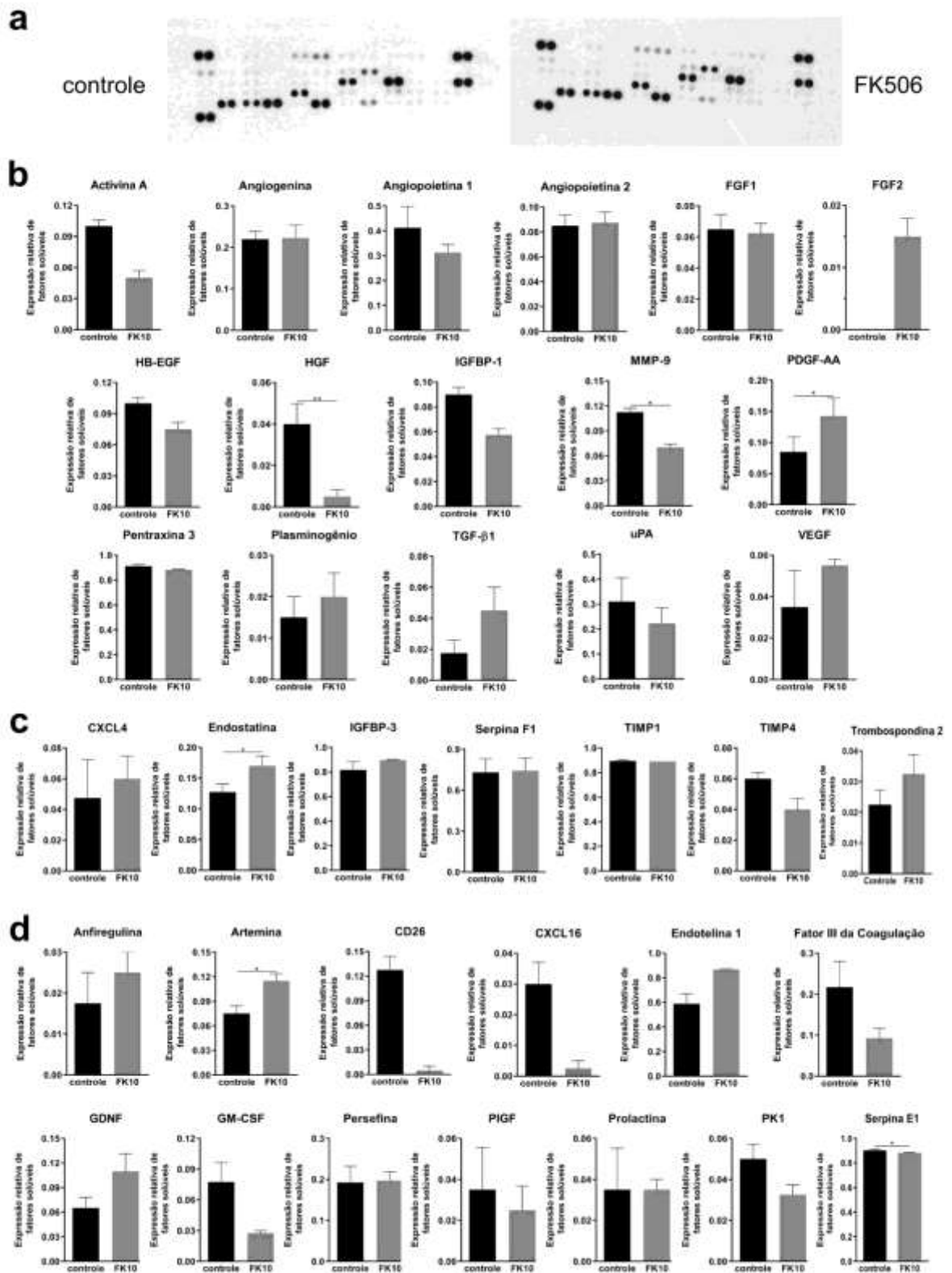


**Figura 21 – Perfil de citocinas no secretoma de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.** O meio condicionado (MC) de MSC(CB) previamente tratadas com 10 $\mu$ g/mL de FK506 ou não tratadas (grupo controle) foi analisado por um imunoenensaio de membrana semiquantitativo, pelo qual foram detectadas 34 proteínas solúveis (**a**) categorizadas em pró-inflamatórias (**b**), anti-inflamatórias (**c**), pleiotrópicas (**d**), outras (**e**). N=2. As barras verticais correspondem às médias da expressão relativa e ao SEM das amostras. As diferenças foram consideradas significativas quando \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ .



**Figura 22 – Análise da concentração de PGE-2 e IDO no secretoma de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.** O MC de MSC(CB) previamente tratadas com 10µg/mL de FK506 ou não tratadas (grupo controle) foi analisado pelo método de ELISA, onde absorvância detectada por um leitor de microplacas é diretamente proporcional à concentração das proteínas **(a)** PGE-1 e **(b)** IDO. N=3. As barras verticais correspondem às médias das concentrações dos analitos e ao SEM das amostras.

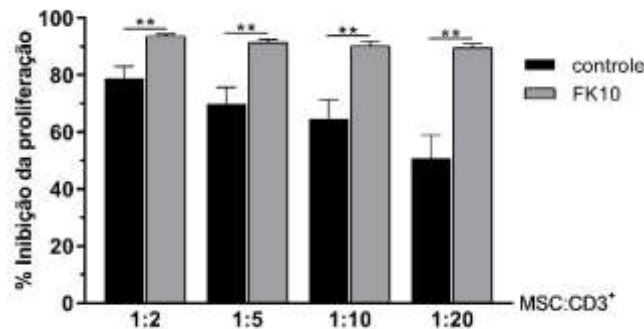
Além disso, foi avaliada também a expressão de 55 proteínas relacionadas à angiogênese e remodelamento tecidual no MC de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506 ou não. Foram detectadas 36 proteínas (**Figura 23a**), das quais apenas três encontraram-se significativamente elevadas (artemina, endostatina, PDGF-AA) e três significativamente diminuídas (HGF, MMP-9, serpina E1). Contudo, várias moléculas apresentaram uma tendência maior de expressão (sem significância estatística), tais como a anfiregulina, CXCL4, endotelina-1, FGF2, GDNF, plasminogênio, TGF-β, trombospondina 2 e VEGF. Ademais, outras proteínas apresentaram uma menor tendência de expressão, tais como activina A, angiopoietina 1, CD26, CXCL16, fator III da coagulação, GM-CSF, HB-EGF, IGFBP-1, PIGF, PK1, TIMP4, uPA) no grupo MSC(CB)+FK506 (sem significância estatística). **Figura 23b-d.**



**Figura 23 – Perfil de fatores angiogénicos no secretoma de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.** O meio condicionado (MC) de MSC(CB) previamente tratadas com 10 $\mu$ g/mL de FK506 ou não tratadas (grupo controle) foi analisado por um imunoensaio de membrana semiquantitativo, pelo qual foram detectadas 36 proteínas solúveis (a) que foram categorizadas em pró-angiogénicas (b), anti-angiogénicas (c), outras (d). N=2. As barras verticais correspondem às médias da expressão relativa e ao SEM das amostras. As comparações foram consideradas significantes quando \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

#### 5.2.4. Avaliação do potencial imunossupressor de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506

A inibição da proliferação de linfócitos T é um ensaio funcional *in vitro* feito para avaliar as propriedades imunossupressoras/anti-proliferativas exercidas pelas MSCs. Conforme mostrado na **Figura 24**, as MSC(CB) pré-condicionadas com FK506 exibiram inibição da proliferação de linfócitos T CD3<sup>+</sup> expressivamente maior do que o grupo controle em todas as proporções MSC:CD3<sup>+</sup> avaliadas. Na última proporção (1:20), as MSC(CB)+FK506 inibiram a proliferação dos linfócitos T CD3<sup>+</sup> em 89,5% ( $\pm 1,5$ ) contra 50,8% ( $\pm 8,2$ ) do grupo controle. Ao contrário das células do grupo controle, a imunossupressão promovida pelas MSC(CB) permaneceu elevada com o aumento progressivo do número de linfócitos na cocultura.

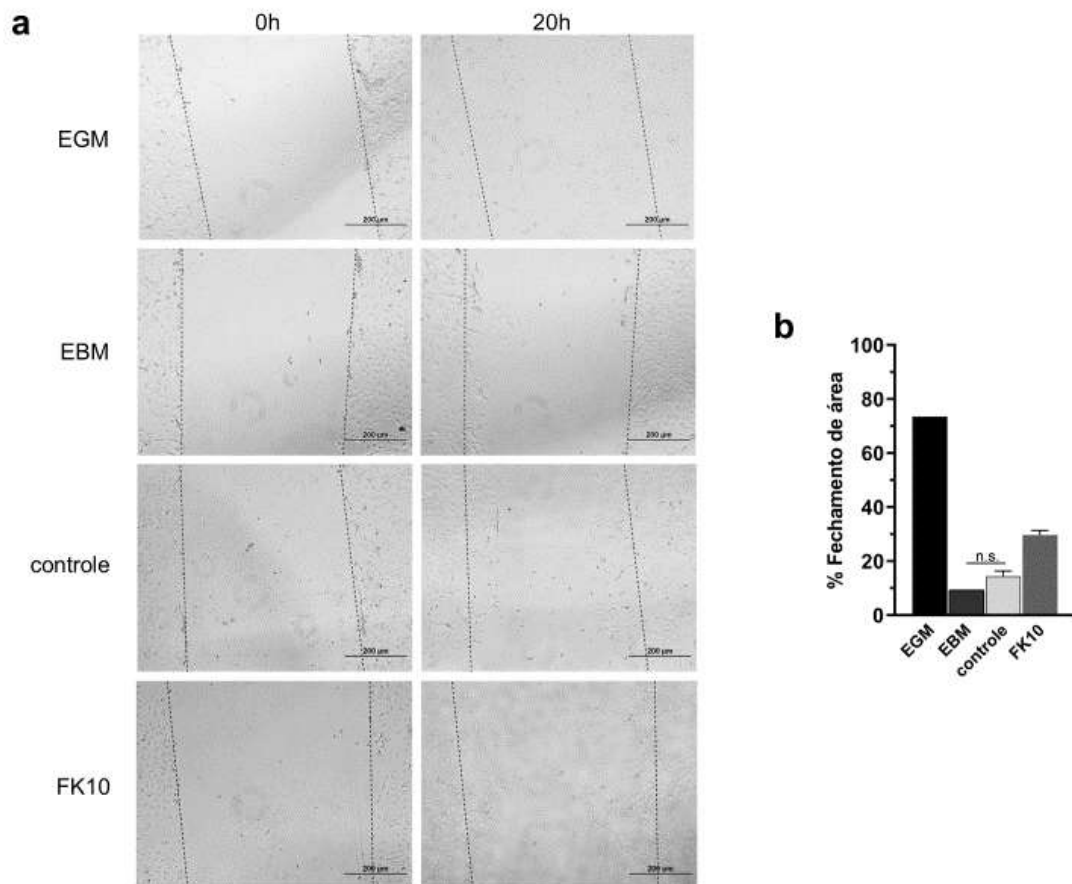


**Figura 24 – Porcentagem de inibição da proliferação de linfócitos T por MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.** As MSC(CB) em passagem 4, previamente tratadas com 10 $\mu$ g/mL de FK506 ou não (grupo controle), cocultivadas durante quatro dias com PBMCs alogênicas ativados por PHA-M, nas proporções 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20. No dia 4, as PBMCs já previamente marcadas com CFSE foram incubados coletadas e marcadas com anticorpo anti-CD3 e analisadas por citometria de fluxo. N=3. As barras verticais correspondem às médias (%) e ao SEM dos eventos adquiridos. Foram consideradas significativas as diferenças quando \*\*p<0,01.

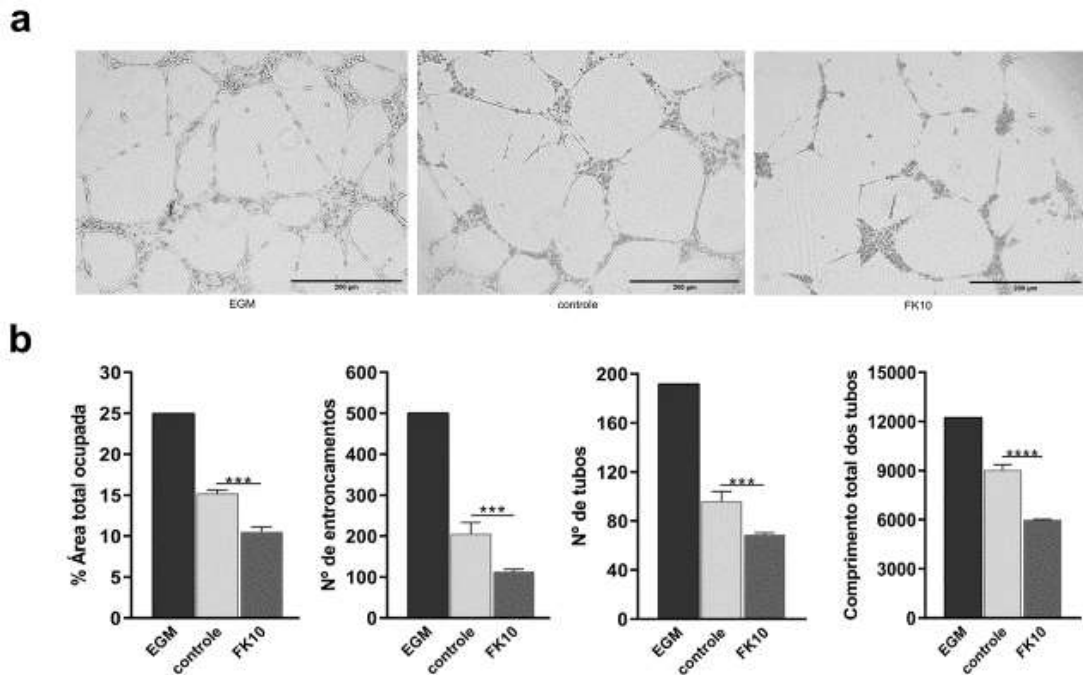
#### 5.2.5. Avaliação do potencial angiogênico de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506

Para examinar a capacidade das MSC(CB) de induzirem a migração em células endoteliais e formação de estruturas semelhantes a vasos sanguíneos, o meio condicionado (MC) de MSC(CB) pré-condicionadas ou não com FK506 foi avaliado em ensaios funcionais com HUVECs. No ensaio de migração endotelial, 20 horas após a adição do MC, observou-se que as HUVECs estimuladas com MC do grupo MSC(CB)+FK506 não apresentaram diferença estatística na migração celular comparadas às HUVECs que receberam o MC do grupo controle (**Figura 25a**), correspondendo à 29,65% ( $\pm 1,7$ ) de fechamento versus 14,43% ( $\pm 2,0$ ) do controle (**Figura 25b**). No ensaio de formação de vasos em matrigel, o MC do grupo

MSC(CB)+FK506 mitigou a formação de elementos relacionados ao endotélio vascular, cuja diferença estatística foi significativamente menor em relação ao grupo controle (**Figura 26a**). A diminuição do potencial angiogênico das MSC(CB) pelo pré-condicionamento com tacrolimo pode ser evidenciado pelo baixo percentual da área ocupada por estruturas endoteliais ( $10,51\% \pm 1,0$ ), número de entroncamentos ( $113 \pm 5,9$ ) e de tubos ( $68 \pm 1,8$ ), bem como a soma total dos comprimentos tubulares na amostra ( $5.994 \pm 36,14$ ) (**Figura 26b**). Todos estes parâmetros avaliados foram significativamente menores quando as HUVECs foram tratadas com o meio das MSC(CB) pré-condicionadas com tacrolimo (**Figura 26b**).



**Figura 25 – Efeito do meio condicionado de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506 sobre a migração de HUVECs.** O ensaio de migração de células endoteliais (conhecido como “*Scratch Assay*”) foi realizado com HUVECs em p5 cultivadas com MC de MSC(CB) pré-condicionadas ou não com FK506 em placas de 48 poços. **a)** As imagens foram registradas imediatamente ao risco/ranhura (0h) e após 20h, **b)** as barras verticais correspondem às médias (%) e ao SEM do fechamento de área. Grupos: EGM ou controle de migração máxima; EBM ou controle de migração mínima; Controle, recebeu MC de MSC não-tratadas; FK10, recebeu MC de MSC tratadas com FK506 à  $10\mu\text{g/mL}$ . n.s = não significativo. N=3. Magnificação 100X.



**Figura 26 – Potencial angiogênico do meio condicionado de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506.** HUVECs em passagem 5 foram cultivadas com o MC de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506 ou não para avaliar a formação de estruturas semelhantes à capilares sanguíneos, em placas de 96 poços. **a)** As imagens foram registradas 15 horas após a adição do MC, **b)** as barras verticais correspondem às médias e ao SEM dos elementos relacionados à angiogênese, dados em porcentual, unidades ou valores arbitrários (pixels). Grupos: EGM, controle máximo de angiogênese; Controle, recebeu MC de MSC não-tratadas; FK10, recebeu MC de MSC tratadas com FK506 à 10µg/mL. Foram consideradas significativas quando \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . N=3. Magnificação 100X.

## 6. DISCUSSÃO

A medula óssea humana é a principal fonte de MSCs, com frequência estimada em cerca de 0,001% a 0,01% das células (Calloni *et al.*, 2013). Contudo, MSCs foram isoladas de outros órgãos/tecidos, tais como o cordão umbilical e seu muco (geléia de Wharton), placenta, polpa dentária, rim, sangue periférico, tecido adiposo, derme, endométrio, membrana sinovial, dentre outros (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018). No entanto, MSCs isoladas de diferentes tecidos apresentam grande heterogeneidade, em parte responsável pelas discrepâncias observadas na capacidade de expansão e diferenciação celular, no secretoma, proteoma, transcriptoma, e nas propriedades funcionais (Hsieh *et al.*, 2013; Subramanian *et al.*, 2015; Kuntin & Genever, 2021). Portanto, um grande desafio atual é delinear qual fonte de MSCs é mais apropriada para determinada aplicação clínica (Lai *et al.*, 2021; Mo *et al.*, 2021; Muthu *et al.*, 2021; Shadmani *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2021).

Nesse estudo, o cordão umbilical foi utilizado por ser uma fonte de MSCs, pois trata-se de um material biológico de simples coleta, que não causa risco ao doador e geralmente é descartado após o nascimento (Arutyunyan *et al.*, 2016). Além disso, as MSC(CB) têm maior capacidade proliferativa devido ao menor tempo médio de duplicação, menor imunogenicidade, maior estabilidade genômica ao longo das passagens e menor frequência de alterações fenotípica e funcionais considerando a idade dos doadores, comparadas às MSCs provenientes de outras fontes adultas, sob as mesmas condições (Bai *et al.*, 2016; Amati *et al.*, 2017; Hoffmann *et al.*, 2017).

Atualmente, MSCs autólogas ou alogênicas são usadas para diversas aplicações clínicas (Naji *et al.*, 2019). O uso de MSCs autólogas apresenta restrições e/ou limitações devido a doença do paciente, pois se a demanda for urgente, o tempo para isolar e expandir células autólogas será um fator limitante (Kornicka *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2021), e também, porque em algumas doenças autoimunes ou neoplasias hematológicas, as MSCs apresentam alterações genéticas e funcionais que impedem sua administração (Cheng *et al.*, 2019; Cominal *et al.*, 2021).

Alguns estudos com MSCs alogênicas em fase clínica relatam uma eficácia terapêutica não tão satisfatória quanto os resultados em modelos animais. A falha terapêutica pode ser devido a diminuição da viabilidade das MSCs ao encontrar o ambiente excessivamente inflamatório no paciente, com demasiados radicais livres,



ausência de estímulos de sobrevivência (por exemplo, fatores de crescimento), e/ou pelos mecanismos de rejeição imunológica (Zhang *et al.*, 2019).

Apesar de maioria dos estudos vincularem o potencial imunomodulador das MSCs principalmente à secreção de moléculas imunossupressoras/citocinas anti-inflamatórias, novas evidências têm apontado que MSCs pró-apoptóticas, metabolicamente disfuncionais ou até mesmo rompidas/lisadas, também apresentam propriedades anti-inflamatórias relevantes (Weiss & Dahlke, 2019). Acredita-se que macrófagos reconheçam as MSCs senescentes/pró-apoptóticas devido a maior exposição de fosfatidilserina na membrana plasmática e as eferocitem (He *et al.*, 2021). Esse *clearance* de MSCs induz a expressão de COX-2 e IDO nos macrófagos, levando a secreção de PGE-2 e quinurenina, além da expressão de outras moléculas imunomoduladoras, como PD-L1 e IL-10, pela ativação das vias de AMPc e PKA (Cheung *et al.*, 2019). As MSCs podem sofrer lise mediada por complemento ou pela degranulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, reestimulando ainda mais eferocitose, conseqüentemente, a imunomodulação indireta via macrófagos (Shi *et al.*, 2018). Benefícios em virtude desse mecanismo já foram observados em modelos de punctura e ligação cecal e doença do enxerto contra o hospedeiro (Weiss & Dahlke, 2019).

Nesse contexto, muitos estudos têm buscado diversas estratégias para melhorar funcionalmente e/ou aumentar a sobrevivência dessas células *in vivo*, seja pela modificação do meio, condição de cultivo, ou com estimulação pró-inflamatória com citocinas e ativadores de TLR (Klimczak *et al.*, 2016; de Witte *et al.*, 2015; Sangiorgi *et al.*, 2016; Najjar *et al.*, 2017; Najjar *et al.*, 2018). Além disso, estudos têm demonstrado que o pré-condicionamento das MSCs altera/melhora o conteúdo e/ou quantidade de VEs produzidas pelas MSCs (Zheng *et al.*, 2018; Showalter *et al.*, 2020; Harrell *et al.*, 2020).

Neste estudo escolhemos dois fármacos amplamente empregados na prática clínica para realização do pré-condicionamento das MSC(CB), a 5-AZA e o tacrolimo. A 5-azacitidina (5-AZA) é uma opção relevante para o pré-condicionamento das MSC(CB) partindo da premissa de que esse fármaco promove alterações epigenéticas que resultam na readaptação funcional das células (Dimopoulos & Grønbaek, 2019). Uma vez que a 5-AZA é captada, passa a ser fosforilada por várias enzimas quinases (uridina citidina-, pirimidina monofosfato- e difosfatoquinases) até 5-azacitidina trifosfato, que em sua maioria é incorporada ao RNA, entretanto, em torno de 10-20%

é convertida em 5-aza-2'-deoxicitidina trifosfato por intermédio da ribonucleotídeo redutase, sendo por fim, integrada ao DNA (Navada *et al.*, 2014; Agrawal *et al.*, 2018).

Quando a 5-AZA e seu derivado (5-aza-2'-deoxicitidina) ligam-se ao material genético, bloqueiam irreversivelmente a ação das DNA metil-transferases durante a duplicação, ou seja, a adição progressiva de grupos metil nas fitas de transcritos e DNA, portanto, agem em duas vias do metabolismo de bases pirimídicas (Muller & Florek, 2010). Agrawal & colegas (2018), afirmam que a 5-AZA leva a reativação de múltiplos genes (anteriormente) silenciados, ainda que vários deles sejam supressores de tumor, estabilizando a célula entre G2 e mitose durante o ciclo celular (Agrawal *et al.*, 2018). Isto explicaria a cinética de crescimento mais lenta das MSC(CB) após o tratamento com 5-AZA, independente das doses utilizadas neste estudo.

O pré-condicionamento de MSC(CB) foi realizado de maneira dose crescente com 5-AZA (1, 2.5 e 5 $\mu$ M) para avaliar cautelosamente, como o crescimento e viabilidade estariam sendo afetados, e porventura, inviabilizando o pré-condicionamento de MSCs com este fármaco para aplicação clínica futura. As MSC(CB) tratadas com 5-AZA apresentaram os requisitos obrigatórios da ISCT (Dominici *et al.*, 2006) para caracterização da identidade de células estromais mesenquimais, pois as MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA aderiram ao plástico, exibiram morfologia fibroblastoide em meio de cultura padrão, apresentaram alta expressão ( $\geq 95\%$ ) dos antígenos de superfície CD105, CD73, CD90 e expressão negativa ( $\leq 2\%$ ) de CD14, CD31, CD34, CD45 e HLA-DR, bem como diferenciaram-se em adipócitos e osteócitos *in vitro*.

Apesar do pré-condicionamento com 5-AZA ou FK506 não ter afetado a morfologia, imunofenótipo, viabilidade e diferenciação multipotencial das MSC(CB), não significa, necessariamente, que “ajustes metabólicos” não tenham se iniciado nessas células. Sabendo que a 5-AZA, bem como o FK506, agem em sistemas e compartimentos intracelulares diferentes, as dinâmicas das vias de sinalização, vias metabólicas, expressão gênica e a síntese proteica são inevitavelmente alteradas. Portanto, o estímulo prolongado com tais fármacos poderia favorecer o surgimento de produtos/metabólitos citotóxicos, levando à senescência metabólica.

Nesse contexto, a autofagia é um processo essencial para reciclagem de componentes citosólicos e readaptação bioquímica que protege as células. Desta forma, estímulos estressores relacionados ao tratamento das MSC(CB) com 5-AZA

ou com FK506 poderiam ativar processo autofágico nas mesmas, o qual reestabeleceria a homeostase pela expressão de genes anti-apoptóticos, secreção autócrina de fatores de crescimento e pela exportação de VEs, agindo nas células da vizinhança na tentativa de balancear/reduzir o estresse causado pelos fármacos (Li *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2019; Weiss *et al.*, 2019).

A análise do processo autofágico em MSC(CB) pré-condicionadas ou não com 5-AZA revelou diferentes perfis de expressão de LC3B-I e LC3B-II, específicos para as células de cada doador. As razões LC3B-II/LC3B-I das MSC(CB) dos doadores #1 e #3, tratadas com 5-AZA, foram similares entre si e mais elevados que o grupo controle. Enquanto as MSC(CB) do doador #2 apresentaram resultado contrário. Uma possível interpretação biológica para a expressão maior de LC3B-II nas MSC(CB)+5AZA (doadores #1 e #3), é que a ativação do processo autofágico pelo estresse causado pelo fármaco foi maior nas células dos doadores #1 e #3 do que nas células do doador #2, provavelmente devido a heterogeneidade biológica intrínseca das amostras de cordão umbilical. O aumento do processo autofágico pelo tratamento com 5-AZA pode contribuir para a manutenção da viabilidade e sobrevivência das MSC(CB) *in vitro* e *in vivo*.

No entanto, o aumento do processo autofágico não implica necessariamente no aumento do fluxo autofágico, ou seja, a “velocidade” em que o processo autofágico ocorre, começa e termina. O aumento do fluxo autofágico ocorre quando a célula necessita, prontamente, reciclar materiais como proteínas ubiquitinizadas, toxinas, organelas disfuncionais, moléculas de RNAs mal-processadas, excesso de intermediários das vias do metabolismo de lipídios, dentre outros, para manter sua sobrevivência frente a estímulos estressores (Yang, Zhang e Ren, 2018; Chen, Chen e Huang, 2019; Abildgaard, Brynjólfssdóttir e Frankel, 2020; Restauo, Vitale e Giachino, 2020). Assim, para avaliar o impacto do pré-condicionamento com 5-AZA no fluxo autofágico, foi realizado um experimento de inibição da autofagia com CQ.

As análises de fluxo autofágico demonstraram que a relação LC3B-II/LC3B-I nas MSC(CB)+5AZA #3 foi mais alta (>1,0) do que nas células dos doadores #1 e #2. Isto é, LC3B-II acumulou-se com maior evidência, após o bloqueio da etapa final da autofagia, indicando indiretamente, maior formação de autofagossomos nas MSC(CB) do doador #3. Além disso, a expressão de p62 também aumentou, pois quando o processo autofágico (degradação dos componentes fagolisossomais junto ao material a ser reciclado) foi interrompido pela CQ, esta proteína se acumulou nessas células.

Vale ressaltar que a proteína LC3B-II e a p62 apresentam dinâmicas de expressão e funções diferentes no contexto da autofagia, sendo principalmente o acúmulo de p62 consequência do processo autofágico aumentado (Rastaldo, Vitale e Giachino, 2020).

No entanto, as MSC(CB) #1 e #2 tratadas com 5-AZA exibiram um razão LC3B-II/LC3B-I menor ( $<1,0$ ) após tratamento com CQ, por consequência, menos vesículas autofagossômicas pré-formadas. Além disso, houve um acúmulo de p62, em proporções discrepantes, entre as MSC(CB) #1 e 3 para com as MSC(CB) do doador #2.

As MSC(CB) controles (sem pré-condicionamento com 5-AZA) dos três doadores, apresentaram razões LC3B-II/LC3B-I (com CQ/sem CQ) superiores às células tratadas com 5-AZA. Ainda que as MSC(CB)+5AZA tenham expressado mais LC3B-II (consequentemente, mais autofagossomos recém-formados elas tinham), a dinâmica de expressão dessa molécula (após a adição de Cloroquina) pode ter sido alterada nos controles, e por isso, a razão LC3B-II/LC3B-I (com CQ/sem CQ) dos controles tenha sido superior à razão das células tratadas com 5-AZA. Embora a expressão de p62 nas MSC(CB) controles dos doadores #1 e #3 também tenha sido maior dentro dessa mesma comparação (controle vs. tratamento), no doador #2 ela foi mais alta nas MSCs tratadas com 5-AZA. Em resumo, entende-se que o fluxo autofágico ocorreu em velocidade diferente nas MSC(CB) de cada doador devido às suas características biológicas intrínsecas.

De modo geral, os resultados sugerem que o processo autofágico foi aumentado pela 5-AZA nas MSC(CB) dos doadores #1, #2 e #3, e que o fluxo autofágico, apesar de reduzido em relação ao controle, foi maior nas MSC(CB) do doador #3 comparado às demais. Já as células dos doadores #1 e #2 apresentaram apenas uma modulação do fluxo autofágico pelo fármaco. Estes achados, devido suas importantes implicações, devem ser futuramente confirmados e avaliados em maior número de amostras biológicas de cordão umbilical.

A substituição de aproximadamente 0,3% dos resíduos de citosina pela 5-AZA é suficiente para inativar mais de 95% da atividade das metiltransferases (Creusot *et al.* 1982) que, devido à ligação covalente com o carbono 6 deste fármaco, eventualmente acabam formando ligações cruzadas com proteínas associadas ao DNA e RNA, provocando alterações no padrão de cromatina e do transcriptoma (Jackson-Grusby *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2018; Nowicka *et al.*, 2020; Klaric *et al.*, 2021). Nesse contexto, o aumento do processo autofágico caracterizado pelo o

acúmulo de LC3B-II nas MSC(CB), pode estar relacionado à regulação/reparo de danos circunstanciais causados pela ação da 5-AZA ao DNA e RNA.

Uma hipótese para os resultados obtidos, é que o pré-condicionamento das MSC(CB) com 5-AZA possa ativar moléculas sensores de estresse citoplasmático e/ou nuclear, tais como BH3-*only* e o complexo MRN (MRE11, RAD50 e NBS1), que ativam a via de sinalização de ATR. Essa última, estimula a transcrição de genes relacionados a autofagia (Liu *et al.*, 2018; Lee, Eckers e Kimple, 2020; Mirza-Aghazadeh-Attari *et al.*, 2021).

As taxas de LC3B-II marcam a presença de autogafossomos maduros recém-formados, indicando, que, componentes citosólicos e/ou nucleares causadores de estresse celular podem ter sido isolados (Wurzer *et al.*, 2015; Ceccariglia *et al.*, 2019; Papandreou & Tavernarakis, 2020), o que não implicou, necessariamente, na reciclagem desse material dentro do autogafossomo (finalização do fluxo autofágico) nas células tratadas com 5-AZA. Vale ressaltar que a viabilidade das MSC(CB) tratadas com todas as concentrações de 5-AZA (1, 2.5 e 5µM) permaneceu igual ao grupo controle, indicando que o fármaco induziu modulações do processo autofágico basal mas não provocou apoptose celular.

As MSCs exercem suas funções imunomoduladoras e regenerativas por via parácrina, secretando centenas de moléculas solúveis bioativas, e pelo contato direto célula-célula (Loibl *et al.*, 2014; Kehl *et al.*, 2019; Jimenez-Puerta *et al.*, 2020; Dabrowska *et al.*, 2021). Portanto, neste estudo caracterizamos também o secretoma das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA.

O pré-condicionamento das MSC(CB) com 5-AZA levou à alterações estatisticamente significativas na secreção de certas moléculas, marcada pelo aumento de CCL2, CHI3L-1, CD105, CD147 e VCAM-1, uPA, VEGF, TIMP-4 e artemina, e diminuição de LIF. Também modulou positivamente ou negativamente a secreção de diversas outras moléculas, no entanto, as diferenças não foram significativas pelas análises estatísticas. Nesta série experimental, avaliamos amostras de MSCs isoladas de apenas dois cordões umbilicais, o que pode limitar as análises estatísticas devido ao número amostral pequeno e a variabilidade biológica intrínseca. Dessa forma, decidimos discutir adicionalmente a relevância dessas moléculas que foram moduladas. Posteriormente, um número maior de amostras de MSC(CB) deverá ser avaliado para validação desses resultados.

Diferentes quimiocinas e moléculas de adesão foram secretadas em maiores quantidades, tais como CCL2, CCL7, CXCL1, CXCL4, CXCL5, ICAM-1 e VCAM-1. Juntas, elas promovem o recrutamento de praticamente todos os tipos de células da imunidade inata e adaptativa, por exemplo, neutrófilos, monócitos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, células NK e linfócitos (Lin & Du, 2018; Ford *et al.*, 2019). Além de participarem dos processos de inflamação, também mobilizam células-tronco hematopoiéticas, progenitores endoteliais, fibroblastos e demais células residentes, coordenando a migração, diferenciação e angiogênese para a resolução da lesão tecidual (Cuenca *et al.*, 2018; Orticelli *et al.*, 2021). Vários estudos correlacionam o papel dessas moléculas à imunomodulação exercida pelas MSC(CB) (Kyurkchiev *et al.*, 2014).

A 5-AZA também estimulou a secreção de diversos tipos de citocinas e alguns receptores solúveis pelas MSC(CB), tais como CHI3-L1, M-CSF e MIF, que constantemente são associadas à inflamação. M-CSF e MIF atuam na regulação da sobrevivência e manutenção de progenitores da linhagem monocítica, estimulam a imunidade inata por meio de CD44, CD74 e CD116, ativando vias que culminam na síntese de proteínas pró-inflamatórias e eliminação de patógenos bacterianos (Farr, Ghosh e Moonah, 2020; Mun, Park e Park-Min, 2020). Entretanto, pouco se sabe sobre a função de CHI3-L1, que também parece estar envolvida nos processos de inflamação, por apresentar afinidade com CD44, induzindo não só a proliferação de células estromais como do sistema imune (Zhao *et al.*, 2020).

A secreção de IL-6 e IL-8 não sofreu alteração devido ao condicionamento com 5-AZA, pois já estavam sendo secretadas basalmente em grandes quantidades pelas MSC(CB). Essas citocinas desempenham importantes papéis na defesa do organismo, regulando a migração de neutrófilos durante respostas inflamatórias agudas, aumentando atividade fagocítica em macrófagos e induzindo a diferenciação de células B em plasmócitos produtores de imunoglobulinas (Rose-John, Winthrop e Calabrese, 2017; Dorronsoro *et al.*, 2020; Bernhard *et al.*, 2021). Além disso, a IL-6 participa da homeostase das próprias MSC(CB) e estimulam o crescimento de células endoteliais, favorecendo a angiogênese (Huang *et al.*, 2016; Dorronsoro *et al.*, 2020).

Em contrapartida, a 5-AZA levou ao aumento da secreção de moléculas imunossupressoras, tais como a anfiregulina, GDF-15, IL-11, IL-24 e TGF- $\beta$ . GDF-15 desempenha um papel anti-inflamatório e citoprotetor, pelo qual, seus mecanismos de ação ainda não são bem compreendidos (Wischhusen, Melero e Fridman, 2020).

Contudo, a depleção dessa molécula leva à exacerbação da inflamação no contexto de sepse (Abulizi *et al.*, 2017), e sabe-se que o GDF-15 é relevante no controle da inflamação relacionada ao diabetes mellitus tipo 2 e às desordens cardiometabólicas (Wang *et al.*, 2021). Já a IL-11 realiza uma ampla gama de funções biológicas associadas aos processos de diferenciação em populações celulares da medula óssea, enquanto a IL-24 desempenha inibição seletiva do crescimento de tumores. Porém, o que ambas têm em comum, é uma leve atividade supressora sobre células inflamatórias (Persaud *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016).

A secreção de PGE-2 por MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA foi mais que dobrada. Contudo, houve um elevado erro padrão devido a grande variação de resultados em dois dos três doadores. O próximo passo será testar a concentração desta molécula novamente no secretoma das MSC(CB)+5AZA, usando diluições menores do meio condicionado (sobrenadante da cultura celular) e maior número de replicatas biológicas.

A produção de PGE-2 é mediada pela enzima COX-2, que é induzida por meio de estímulos pró-inflamatórios. A PGE-2 secretada pelas MSCs no microambiente promove a diferenciação de monócitos em macrófagos M2 produtores de IL-10 (Qiu *et al.*, 2017). A secreção de PGE-2 também pode atuar de maneira autócrina nas MSCs, ativando os receptores de PGE-2, denominados EP2/3, cujos efeitos são a melhora da proliferação, autorrenovação e migração celular pela ativação das vias de sinalização FAK e ERK1/2 (Lee *et al.*, 2016; Lu *et al.* 2017).

A anfiregulina basicamente potencializa a síntese de TGF- $\beta$ 1 por células T reguladoras, portanto, aumentando a capacidade supressora dessas células (Zaiss, Minutti e Knipper, 2019). Tal como a anfiregulina, TGF- $\beta$ 1 também está em maior abundância no secretoma das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA. O TGF- $\beta$ 1, por sua vez, é uma citocina imunomoduladora clássica constitutivamente expressa pelas MSCs (Weiss *et al.*, 2019), imprescindível para indução de células Tregs, responsáveis pela manutenção da tolerância imunológica periférica (Fu *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2015).

Por outro lado, CD40L (potente molécula coestimuladora classicamente encontrada em células T), IL-27 e IL-32 (outras interleucinas pró-inflamatórias) foram secretadas em menor quantidade nas MSC(CB) tratadas com a 5-AZA. De modo geral, o pré-condicionamento elevou a secreção de cinco moléculas anti-inflamatórias (anfiregulina, GDF-15, IL-11, IL-24 e TGF- $\beta$ ) e reduziu a expressão de duas (HGF e

LIF). O balanço da secreção de proteínas pró- e anti-inflamatórias pode ter resultado, em partes, no efeito imunomodulador que se elevou à medida que a proporção de MSC:PBMCs foi maior. Em conjunto, esses resultados sugerem que o pré-condicionamento com 5-AZA promoveu aumento da capacidade imunossupressora das MSC(CB).

Outras proteínas com funções biológicas diversas, também foram encontradas em maior quantidade no meio condicionado das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA, comparadas ao meio das células controles, dentre elas: activina A, angiogenina, artemina, CD105 (endoglina), CD147 (basigina), cistatina C, FGF-2, GDNF, PDGF-AA, PIGF, plasminogênio, prolactina, osteopontina, serpina F1, TIMP4, uPA/uPAR e VEGF. As moléculas angiogenina, CD105, CD147, plasminogênio e uPA/uPAR atuam como mediadores indiretos de processos que culminam no remodelamento de matriz extracelular durante a angiogênese e na hemostase intravascular. Elas levam à sinalização pelos receptores de TGF- $\beta$ , Act e BMP, promovendo a biossíntese de MMPs e a conversão de plasminogênio em plasmina ativa. Essas enzimas degradam, de forma controlada, a laminina, colágeno, fibrina e fibronectina, “abrindo caminho” para a neovascularização (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Sanz-Rodriguez *et al.*, 2004; Tello-Montoliu, Patel e Lip, 2006; Iacono *et al.*, 2007; Mahmood, Mihalciu e Rabanni, 2018).

Dentre os fatores pró-angiogênicos que atuam diretamente sobre a angiogênese, regulados positivamente nas MSC(CB) pelo pré-condicionamento com 5-AZA, estão o FGF-2, GDNF, PIGF, prolactina e VEGF. O VEGF e FGF-2 são capazes de estimular a migração, proliferação e reestruturação do citoesqueleto dos endoteliócitos formando vasos (Kaga *et al.*, 2012; Reuwer *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2016; Laddha, Gaikwad e Kulkarni, 2021). Dentre estes fatores pró-angiogênicos, vale ressaltar o VEGF, cujo aumento no meio condicionado das MSC(CB) pré-condicionamento com 5-AZA foi estatisticamente significativo, comparado à condição controle. O VEGF é amplamente conhecido como o regulador-chave da angiogênese, justamente porque existe uma série de moléculas que levam à sua secreção diferencial, tais como activina A, artemina, CD147, CHI3-L1, IL-11, M-CSF, MIF, PDGF, osteopontina e TGF- $\beta$ , que curiosamente, estavam aumentadas no meio condicionado das MSC(CB)+5AZA (Shikada *et al.*, 2005; Curry *et al.*, 2008; Kaga *et al.*, 2012; Gupta, Zhou e Chellaiah, 2013; Elshabrawy *et al.*, 2018; Perveen *et al.*, 2019; De Oliveira *et al.*, 2020; Jun, Yulai e Zhong, 2020).



O perfil pró-angiogênico do secretoma das MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA corroborou os resultados obtidos nos ensaios de migração e formação de vasos utilizando o meio condicionado das MSC(CB) e células endoteliais (HUVECs). Nesses ensaios, o meio condicionado das células tratadas com 5-AZA induziu maior migração nas HUVECs e formação de estruturas tubulares mais robustas – comparado às HUVECs que receberam meio condicionado de MSC(CB) controles.

Podemos especular que embora este fármaco potencialize as propriedades pró-angiogênicas das MSC(CB), estas possivelmente tentaram equilibrar esses estímulos pró-angiogênicos pela diminuição da IL-32 e pela regulação positiva de cistatina C, CXCL4 e IL-24 (moléculas anti-angiogênicas). Vale ressaltar que a cistatina C é um potente regulador da autofagia (Korolenko *et al.*, 2019), e sua secreção aumentada pós-tratamento com 5-AZA pode ter agido autocrinamente, repercutindo no fluxo autofágico nas MSC(CB).

Outra questão que deve ser ponderada é, que, apesar de determinadas moléculas serem secretadas em baixos níveis relativos pelas MSC(CB), por exemplo o TGF- $\beta$ , estas podem provocar alterações biológicas importantes nas células-alvo que expressam os receptores para estas moléculas. Logo, pequenas alterações no secretoma das MSC(CB) desencadeadas pelo pré-condicionamento *in vitro* das células podem, aditivamente, culminar em respostas funcionais relevantes.

Em resumo, sugerimos que MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA sejam uma alternativa terapêutica promissora para condições clínicas com comprometimento de integridade vascular, com comprometimento de áreas dérmicas extensas seja por queimaduras, lesões isquêmicas e/ou relacionadas à inflamação crônica. Nestas condições, MSC(CB) pré-condicionadas podem promover mais eficientemente o reparo tecidual pela neoangiogênese e pelo estímulo da proliferação de células residentes (fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, epiteliais e células progenitoras dos tecidos) pelas dezenas de moléculas bioativas (citocinas, fatores de crescimento, fatores pró-angiogênicos e citoprotetores) secretadas por elas no tecido lesado.

O segundo fármaco usado para pré-condicionamento das MSC(CB) neste estudo foi o imunossupressor tacrolimo (FK506). O fármaco não alterou as características fundamentais das MSC(CB) e não reduziu a viabilidade celular nas três concentrações avaliadas (1, 5 e 10 $\mu$ g/mL). Além disso, o pré-condicionamento das

MSCs impactou moderadamente a cinética de crescimento células na concentração de 10µg/mL.

Segundo Tsuji & colaboradores (2015), a exposição de MSC(AT) e MSC(M) com FK506 à 1µg/mL durante sete dias levou a uma redução significativa da razão de viabilidade relativa ao controle (MSCs cultivadas na ausência do fármaco), enquanto nossos resultados revelaram uma viabilidade igual ao controle numa dose dez vezes superior. Os autores observaram também uma redução da capacidade proliferativa de aproximadamente 50% nas MSC(AT) e 20% nas MSC(M) (Tsuji *et al.*, 2015). Contudo, deve-se considerar que o presente estudo utilizou uma estratégia diferente para avaliar os efeitos diretos do FK506 sobre as células. Parte dessa divergência entre nossos resultados e os dados publicados pelos autores supracitados também pode ser explicada pela fonte das MSCs usadas em nossa pesquisa, uma vez que são derivadas do cordão umbilical e apresentaram boa taxa de proliferação e viabilidade, após 72 horas de cultivo.

A análise do perfil autofágico pós-condicionamento com tacrolimo revelou comportamentos particulares das MSC(CB) de cada doador em relação à expressão de LC3B-I e LC3B-II. As razões LC3B-II/LC3B-I das MSC(CB) tratadas com FK506 variaram entre todos os doadores (#1, #2 e #3). Quando comparadas aos seus respectivos controles, essa razão foi maior nas MSC(CB) #1, menor nas MSC(CB) #2 e aproximadamente igual nas MSC(CB) #3. A expressão de LC3B-II mais proeminente nas MSC(CB)+FK506 do doador #2, sugere um aumento maior do processo autofágico nestas células do que nas MSC(CB)+FK506 dos demais doadores.

Esse cenário mostrou-se mais uniforme nas análises de fluxo autofágico, onde a relação LC3B-II/LC3B-I (com CQ/sem CQ) nos grupos MSC(CB)+FK506 foi semelhante em todos os doadores (>1,0). Isto é, LC3B-II acumulou-se após o bloqueio da etapa final da autofagia pela CQ, indicando indiretamente, maior formação de autofagossomos nas MSC(CB) nos doadores #1, #2 e #3. Além disso, observamos que a expressão de p62 está aumentada nesse grupo em relação ao controle (nas células de todos os doadores). Vale ressaltar que proteína p62 acumula-se quando ocorre a interrupção do processo de degradação dos componentes fagolisossomais (junto ao material a ser reciclado) na etapa final da autofagia. E quanto maior a razão de p62, maior é a reciclagem desse material (substrato).

Na comparação controle versus pré-condicionamento, as MSC(CB) controles dos doadores #1 e #3 apresentaram razões LC3B-II/LC3B-I (com CQ/sem CQ)

superiores (>1,0) às células tratadas com FK506. Entretanto, a razão LC3B-II/LC3B-I foi mais alta quando as MSC(CB) do doador #2 foram tratadas com FK506. Contudo, a CQ pode ter alterado a dinâmica de expressão de LC3B-II no grupo controle, como explicado anteriormente. Tal fenômeno que não ocorreu com a p62 – já que o acúmulo da mesma não estava tão pronunciado nos controles quanto nas MSC(CB)+FK506. Portanto, entende-se que reciclagem dos substratos já ocorria em maior escala no grupo tratado com FK506.

Os resultados mostraram que FK506 modulou diferencialmente o processo autofágico nas MSC(CB) dos três doadores, pois, todas as células tratadas tiveram o fluxo autofágico estimulado após o condicionamento com FK506. Tal achado salienta a necessidade de se investigar detalhadamente os processos moleculares desencadeados nas MSC(CB) pelo tratamento com este fármaco, num maior número de amostras. Em resumo, podemos sugerir que o aumento do fluxo autofágico causado pelo tacrolimo teve um impacto positivo na manutenção da viabilidade celular.

Xu & colegas (2018) demonstraram que o FK506 (0,5nM por 30min) exerce um efeito citoprotetor via autofagia em células endoteliais derivadas do cordão umbilical humano sob estresse induzido por LDL oxidada (Xu *et al.*, 2018). Contudo, ainda não são encontradas análises na literatura científica que corroborem nosso presente estudo com MSCs. Outro estudo mostrou que o FK506 (5µg/mL por 48h) restaurou as características morfofuncionais de podócitos submetidos à danos induzidos por puromicina, através do aumento da expressão de RNAm de LC3B-I e do número de autofagossomos (Yang *et al.*, 2020).

O pré-condicionamento com tacrolimo modulou a secreção de dezenas de fatores solúveis relacionados aos mais variados processos biológicos nas MSC(CB). Diversas quimiocinas e moléculas de adesão (CCL2, CCL7, CXCL1, CXCL5 e VCAM-1) sofreram redução, e outras, tais como ICAM-1 e CXCL16, foram não detectáveis pós-condicionamento com este fármaco. As moléculas CD147, CXCL12, IL-6 e IL-8, importantes nos processos de quimiotaxia e migração celular permaneceram constitutivamente secretadas pelas MSC(CB) após o pré-condicionamento com tacrolimo (Heidemann *et al.*, 2003; Jovanović & Vićovac, 2009; Lv *et al.*, 2018; Shi, Riese e Shen, 2020).

Algumas moléculas imunossupressoras (HGF, IL-11, IL-24, IL-1R4 e LIF) não foram detectadas no sobrenadante das MSC(CB) pré-condicionadas com tacrolimo.

Somente a anfiregulina e TGF- $\beta$  apresentaram-se positivamente regulados, sugerindo que a imunossupressão exercida pelas MSC(CB) pré-condicionadas com tacrolimo – durante o ensaio funcional realizado neste estudo, tenha sido parcialmente mediada por estas moléculas (Yuan *et al.*, 2015; Sanjabi, Oh e Li, 2017; Batlle & Massagué, 2019; Melderis *et al.*, 2019). Portanto, mostramos que o pré-condicionamento com FK506 maximizou o potencial imunossupressor/anti-proliferativo das MSC(CB), e as propriedades imunossupressoras das MSC(CB)+FK506 podem envolver outros mecanismos não avaliados neste estudo, como a expressão de FasL, HLA-G e PD-L1, que promovem a imunossupressão via contato célula-célula (Guo & Wang, 2015; Gaber *et al.*, 2018, Rocha *et al.*, 2020).

Ademais, as MSC(CB) pré-condicionadas com FK506 apresentaram diminuição da secreção de alguns fatores pró-inflamatórios, tais como CHI3-L1, fator D do complemento, GM-CSF, IL-17A, IL-32 e abolição da secreção de CD40L, IL-22, IL-27, M-CSF e MIF. Desse modo, podemos especular que as células pré-condicionadas com tacrolimo tornam-se menos imunogênicas.

Vale destacar que houve regulação negativa concomitante da secreção as moléculas pró-inflamatórias IL-17A e IL-22 nas células tratadas com tacrolimo. Acredita-se que este fenômeno tenha ocorrido pelas interações cooperativas dessas citocinas nas próprias MSC(CB). Alguns estudos verificaram a co-dependência de IL-22 e IL-17A no balanço do eixo Th1/Th17, onde tais moléculas favorecem a prevalência de determinado subtipo linfocitário. Isso se dá porque uma citocina regula a expressão/secreção da outra, dependendo do contexto imunológico, determinando um padrão de resposta nessas populações (Lindahl & Olsson, 2021),

A secreção de diversos fatores pró-angiogênicos pelas MSC(CB) pré-condicionadas com tacrolimo foi afetada negativamente. Houve redução da secreção de activina A, angiopoietina 1, CD105, FGF-19, Fator III da coagulação, GM-CSF, HB-EGF, M-CSF, MMP-9, PIGF, PK-1, osteopontina e uPA. No entanto, algumas moléculas importantes para a angiogênese, tais como a anfiregulina, artemina, endogлина 1, FGF2, GDNF, PDGF, plasminogênio, uPAR e o VEGF, foram reguladas positivamente. As proteínas presentes no secretoma das MSC(CB)+FK506 não aumentaram significativamente a migração de endoteliócitos, tampouco promoveram a geração de estruturas semelhantes a capilares sanguíneos (neoangiogênese) nos ensaios funcionais, quando comparadas às condições controle.

Ainda que secreção das anti-angiogênicas serpina E1, cistatina C, CD26, IL-24, e TIMP4 tenha sido reduzida, o aumento da secreção de endostatina e trombospondina 1 e 2 podem ter influenciado negativamente no desempenho do meio condicionado das MSC(CB) tratadas com FK506 nos ensaios funcionais de migração e neoangiogênese. Juntas, estas moléculas interagem com vários componentes da matriz extracelular, indisponibilizando moléculas de adesão, impedindo a difusão de novos capilares e induzindo apoptose em células endoteliais (Li & Finley, 2019; Halper, 2021; Huang, Li e Yan, 2021).

A combinação de MSC(CB) em seu estado natural com tratamento com FK506 tem sido usada em alguns modelos experimentais de enxertos alogênicos, visando seus efeitos sinérgicos. Chen & coautores (2021) testaram a combinação de aplicação única de MSC(M) com a administração diária de FK506 (5mg/kg) em camundongos submetidos à transplante de coração, até o dia da rejeição. Os autores observaram que o grupo tratado com MSC(M)+FK506 exibiu uma sobrevida maior associada à redução sérica de IFN- $\gamma$  e de leucócitos (Chen *et al.*, 2021). Um estudo mais antigo (2008) utilizou um modelo suíno de infarto do miocárdio, fazendo essa mesma associação de MSCs alogênicas com FK506 por 12 dias. Verificaram que o transplante de MSCs alogênicas pode ser seguro com o uso concomitante de FK506, havendo inibição da resposta humoral contra as células transplantadas (Poncelet *et al.*, 2008). Esses estudos reforçam nossa hipótese de que o pré-condicionamento com FK506 possa, talvez, reduzir a imunogenicidade de MSC(CB) alogênicas.

Em resumo, o pré-condicionamento de MSC(CB) com tacrolimo gerou células potencializadas para realizar a supressão de resposta imunológicas exacerbadas, porém com menor efeito pró-angiogênico. Os mecanismos pelos quais o FK506 otimiza as propriedades imunossupressoras/imunomoduladoras das MSC(CB) ainda não estão claros, mas uma possibilidade a ser investigada é a ocorrência de “*drug delivery*”. Estudos têm relatado esse endereçamento de moléculas externas captadas pelas MSCs e liberadas *in situ* via VEs (Babajani *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2021), o que poderia ser benéfico para os tratamentos em que os fármacos não alcançam direta- e eficientemente o local de interesse (Wu *et al.*, 2019).

Com base nos resultados obtidos, sugerimos que as MSC(CB) pré-condicionadas com 5-AZA sejam ferramentas terapêuticas para úlceras isquêmicas de pele relacionadas a doenças inflamatórias crônicas ou distúrbios inflamatórios órgão-específicos, na quais a regeneração tecidual, neoangiogênese e

vasculogênese são imprescindíveis. Para tais cenários clínicos pode-se empregar aplicações locais e/ou tópicas das células pré-condicionadas, associadas ou não a biocurativos no caso de úlceras de pele. Já o pré-condicionamento com FK506 pode ser útil no tratamento de doenças inflamatórias e/ou autoimunes sistêmicas em atividade. Nesses tipos de desordens, administrações intravenosas (infusões) regulares, com alta concentração de MSC(CB) pré-condicionadas com FK506 poderiam ser usadas.

## 7. CONCLUSÃO

Os pré-condicionamentos de MSC(CB) com 5-azacitidina ou tacrolimo não alteram as características biológicas das células, mantendo o imunofenótipo, a viabilidade celular e a capacidade de diferenciação multipotencial. A 5-azacitidina potencializou as propriedades pró-angiogênicas das MSC(CB), enquanto o tacrolimo maximizou a capacidade imunossupressora destas células. Portanto, estas abordagens de pré-condicionamento de MSC(CB) devem ser testadas em modelos pré-clínicos para avaliar a estabilidade, enxertia, funções regenerativa e/ou imunossupressora *in vivo*, respaldando a eficácia terapêutica das células pré-condicionadas para futuras aplicações clínicas.

## 8. REFERÊNCIAS

- A, Hoffmann; T, Floerkemeier; C, Melzer; R, Hass. Comparison of in vitro-cultivation of human mesenchymal stroma/stem cells derived from bone marrow and umbilical cord. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 2565–2581, 2017. DOI: 10.1002/TERM.2153. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27125777/>. Acesso em: 24 ago. 2021.
- A, Najji; M, Eitoku; B, Favier; F, Deschaseaux; N, Rouas-Freiss; N, Suganuma. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, [S. l.], v. 76, n. 17, p. 3323–3348, 2019. DOI: 10.1007/S00018-019-03125-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31055643/>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- A, Nowicka et al. Comparative analysis of epigenetic inhibitors reveals different degrees of interference with transcriptional gene silencing and induction of DNA damage. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 68–84, 2020. DOI: 10.1111/TPJ.14612. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31733119/>.
- A, Shadmani; M, Razmkhah; MH, Jalalpoor; SY, Lari; M, Eghtedari. Autologous Activated Omental versus Allogeneic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Corneal Alkaline Injury: An Experimental Study. *Journal of current ophthalmology*, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 136–142, 2021. DOI: 10.4103/JOCO.JOCO\_246\_20. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34409223/>. Acesso em: 26 ago. 2021.
- ABILDGAARD, Marie H.; BRYNJÓLFSDÓTTIR, Sólveig H.; FRANKEL, Lisa B. The Autophagy–RNA Interplay: Degradation and Beyond. *Trends in Biochemical Sciences*, [S. l.], v. 45, n. 10, p. 845–857, 2020. DOI: 10.1016/J.TIBS.2020.07.007. Disponível em: <https://www.cell.com/article/S0968000420301924/fulltext>. Acesso em: 31 ago. 2021.
- ABULIZI, Palida; LOGANATHAN, Neruja; ZHAO, Duo; MELE, Tina; ZHANG, Yixin; ZWIEP, Terry; LIU, Kexiang; ZHENG, Xiufen. Growth Differentiation Factor-15 Deficiency Augments Inflammatory Response and Exacerbates Septic Heart and Renal Injury Induced by Lipopolysaccharide. *Scientific Reports* 2017 7:1, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-00902-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-00902-5>. Acesso em: 27 ago. 2021.
- Acesso em: 26 ago. 2021.
- AGRAWAL, Khushboo; DAS, Viswanath; VYAS, Pankhuri; HAJDÚCH, Marián. Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs – A comprehensive review from discovery to clinic. *Pharmacology & Therapeutics*, [S. l.], v. 188, p. 45–79, 2018. DOI: 10.1016/J.PHARMTHERA.2018.02.006.
- AJ, Poncelet; Y, Nizet; J, Vercruysse; AL, Hiel; A, Saliez; P, Gianello. Inhibition of humoral response to allogeneic porcine mesenchymal stem cell with 12 days of tacrolimus. *Transplantation*, [S. l.], v. 86, n. 11, p. 1586–1595, 2008. DOI: 10.1097/TP.0B013E31818BD96F. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19077894/>. Acesso em: 5 set. 2021.
- ALMALKI, Sami G.; AGRAWAL, Devendra K. Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* 2016 7:1, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–12, 2016. DOI: 10.1186/S13287-016-0393-1. Disponível em: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-016-0393-1>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- AMIN, Shaimaa Nasr; SHARAWY, Nivin; EL TABLAWY, Nashwa; ELBERRY, Dalia Azmy; YOUSSEF, Mira Farouk; ABDELHADY, Ebtahal Gamal; RASHED, Laila Ahmed; HASSAN, Sherif Sabry. Melatonin-Pretreated Mesenchymal Stem Cells Improved Cognition in a Diabetic Murine Model. *Frontiers in Physiology*, [S. l.], v. 0, p. 243, 2021. DOI: 10.3389/FPHYS.2021.628107.
- ANDREEVA, E. R.; UDARTSEVA, O. O.; ZHIDKOVA, O. V.; BURAVKOV, S. V.; EZDAKOVA, M. I.; BURAVKOVA, L. B. IFN-gamma priming of adipose-derived stromal cells at “physiological” hypoxia and under acute hypoxic stress. *Journal of Cellular Physiology*, [S. l.], 2017. DOI: 10.1002/jcp.26046.



AOKI, Kazunari et al. Identification of CXCL12-abundant reticular cells in human adult bone marrow. *British Journal of Haematology*, [S. l.], v. 193, n. 3, p. 659–668, 2021. DOI: 10.1111/BJH.17396. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bjh.17396>. Acesso em: 28 ago. 2021.

ARANGO-RODRIGUEZ, Martha L.; EZQUER, Fernando; EZQUER, Marcelo; CONGET, Paulette. Could cancer and infection be adverse effects of mesenchymal stromal cell therapy? *World Journal of Stem Cells*, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 408, 2015. DOI: 10.4252/WJSC.V7.I2.408. Disponível em: </pmc/articles/PMC4369496/>. Acesso em: 29 ago. 2021.

ARUTYUNYAN, Irina; ELCHANINOV, Andrey; MAKAROV, Andrey; FATKHUDDINOV, Timur. Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. *Stem Cells International*, [S. l.], v. 2016, 2016. DOI: 10.1155/2016/6901286. Disponível em: </pmc/articles/PMC5019943/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

BABAJANI, Amirhesam; SOLTANI, Pegah; JAMSHIDI, Elham; FARJOO, Mohammad Hadi; NIKNEJAD, Hassan. Recent Advances on Drug-Loaded Mesenchymal Stem Cells With Anti-neoplastic Agents for Targeted Treatment of Cancer. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, [S. l.], v. 8, 2020. DOI: 10.3389/FBIOE.2020.00748. Disponível em: </pmc/articles/PMC7390947/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

BAER, Patrick C.; OVERATH, Jürgen M.; URBSCHAT, Anja; SCHUBERT, Ralf; KOCH, Benjamin; BOHN, Asanke A.; GEIGER, Helmut. Effect of Different Preconditioning Regimens on the Expression Profile of Murine Adipose-Derived Stromal/Stem Cells. *International journal of molecular sciences*, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 1719, 2018. DOI: 10.3390/ijms19061719. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/6/1719>. Acesso em: 16 dez. 2018.

BATLLE, Eduard; MASSAGUÉ, Joan. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 924–940, 2019. DOI: 10.1016/J.IMMUNI.2019.03.024.

BEREBICHEZ-FRIDMAN, Roberto; MONTERO-OLVERA, Pablo R. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, [S. l.], v. 18, n. 3, p. e264, 2018. DOI: 10.18295/SQUMJ.2018.18.03.002. Disponível em: </pmc/articles/PMC6307657/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

BERNHARD, Stefan et al. Interleukin 8 Elicits Rapid Physiological Changes in Neutrophils That Are Altered by Inflammatory Conditions. *Journal of Innate Immunity*, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 225–241, 2021. DOI: 10.1159/000514885. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/514885>. Acesso em: 30 ago. 2021.

BL, Yen; HL, Hwa; PJ, Hsu; PM, Chen; LT, Wang; SS, Jiang; KJ, Liu; HK, Sytwu; ML, Yen. HLA-G Expression in Human Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Is Related to Unique Methylation Pattern in the Proximal Promoter as well as Gene Body DNA. *International journal of molecular sciences*, [S. l.], v. 21, n. 14, p. 1–14, 2020. DOI: 10.3390/IJMS21145075. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32708387/>. Acesso em: 29 ago. 2021.

BRODSKÁ, Barbora; OTEVŘELOVÁ, Petra; HOLOUBEK, Aleš. Decitabine-induced apoptosis is derived by Puma and Noxa induction in chronic myeloid leukemia cell line as well as in PBL and is potentiated by SAHA. *Molecular and Cellular Biochemistry*, [S. l.], 2011. DOI: 10.1007/s11010-010-0683-3.

BURNHAM, Andre J.; FOPPIANI, Elisabetta Manuela; HORWITZ, Edwin M. Key Metabolic Pathways in MSC-Mediated Immunomodulation: Implications for the Prophylaxis and Treatment of Graft Versus Host Disease. *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 0, p. 3224, 2020. DOI: 10.3389/FIMMU.2020.609277.

CALLONI, R. et al. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. *Stem Cells Dev*, v. 22, n. 9, p. 1455-76, May 2013. ISSN 1557-8534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23336433> > Acesso em: 24 ago. 2021. DOI: 10.1089/scd.2012.0637.

CAO, Jiahui et al. Polarized actin and VE-cadherin dynamics regulate junctional remodelling and cell migration during sprouting angiogenesis. *Nature Communications* 2017 8:1, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–20,

2017. DOI: 10.1038/s41467-017-02373-8. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-017-02373-8>. Acesso em: 28 ago. 2021.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 641–50, 1991. DOI: 10.1002/jor.1100090504. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jor.1100090504>. Acesso em: 16 dez. 2018.

CAPLAN, Arnold I.; BRUDER, Scott P. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century *Trends in Molecular Medicine*, 2001. DOI: 10.1016/S1471-4914(01)02016-0.

CARMELIET, Peter; JAIN, Rakesh K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, [S. l.], v. 473, n. 7347, p. 298, 2011. DOI: 10.1038/NATURE10144. Disponível em: </pmc/articles/PMC4049445/>. Acesso em: 28 ago. 2021.

CATHERY, William; FAULKNER, Ashton; MASELLI, Davide; MADEDDU, Paolo. Concise Review: The Regenerative Journey of Pericytes Toward Clinical Translation. *STEM CELLS*, [S. l.], v. 36, n. 9, p. 1295–1310, 2018. DOI: 10.1002/STEM.2846. Disponível em: <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/stem.2846>. Acesso em: 28 ago. 2021.

CECCARIGLIA, Sabrina; CARGNONI, Anna; SILINI, Antonietta Rosa; PAROLINI, Ornella. Autophagy: a potential key contributor to the therapeutic action of mesenchymal stem cells. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1630223>, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 28–37, 2019. DOI: 10.1080/15548627.2019.1630223. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15548627.2019.1630223>. Acesso em: 26 ago. 2021.

CHEN, Ruey-Hwa; CHEN, Yu-Hsuan; HUANG, Tzu-Yu. Ubiquitin-mediated regulation of autophagy. *Journal of Biomedical Science* 2019 26:1, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1186/S12929-019-0569-Y. Disponível em: <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-019-0569-y>. Acesso em: 31 ago. 2021.

CHEN, Yingyu et al. Combination of mesenchymal stem cells and FK506 prolongs heart allograft survival by inhibiting TBK1/IRF3-regulated-IFN- $\gamma$  production. *Immunology Letters*, [S. l.], v. 238, p. 21–28, 2021. DOI: 10.1016/J.IMLET.2021.06.007.

CHENG, Rui-Juan; XIONG, An-Ji; LI, Yan-Hong; PAN, Shu-Yue; ZHANG, Qiu-Ping; ZHAO, Yi; LIU, Yi; MARION, Tony N. Mesenchymal Stem Cells: Allogeneic MSC May Be Immunosuppressive but Autologous MSC Are Dysfunctional in Lupus Patients. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, [S. l.], v. 0, p. 285, 2019. DOI: 10.3389/FCCELL.2019.00285.

CHEUNG, Tik Shing; GALLEU, Antonio; VON BONIN, Malte; BORNHÄUSER, Martin; DAZZI, Francesco. Apoptotic mesenchymal stromal cells induce prostaglandin E2 in monocytes: Implications for the monitoring of mesenchymal stromal cell activity *Haematologica* Ferrata Storti Foundation, 2019. DOI: 10.3324/haematol.2018.214767.

COMINAL, Juçara Gastaldi et al. Bone Marrow Soluble Mediator Signatures of Patients With Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Frontiers in Oncology*, [S. l.], v. 0, p. 1655, 2021. DOI: 10.3389/FONC.2021.665037.

CORLISS, Bruce A.; AZIMI, Mohammad S.; MUNSON, Jennifer M.; PEIRCE, Shayn M.; MURFEE, Walter L. Macrophages: An Inflammatory Link Between Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Microcirculation*, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 95–121, 2016. DOI: 10.1111/micc.12259. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/micc.12259>. Acesso em: 5 jul. 2020.

COURTNEY, Jo-Maree; SUTHERLAND, Brad A. Harnessing the stem cell properties of pericytes to repair the brain. *Neural Regeneration Research*, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 1021, 2020. DOI: 10.4103/1673-5374.270301. Disponível em: </pmc/articles/PMC7034260/>. Acesso em: 28 ago. 2021.

CR, Harrell; R, Sadikot; J, Pascual; C, Fellabaum; MG, Jankovic; N, Jovicic; V, Djonov; N, Arsenijevic; V, Volarevic. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy of Inflammatory Lung Diseases: Current Understanding and Future Perspectives. *Stem cells international*, [S. l.], v. 2019, 2019. DOI:

10.1155/2019/4236973. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31191672/>. Acesso em: 23 jun. 2020.

CREUSOT, F.; ACS, G.; CHRISTMAN, J. K. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Journal of Biological Chemistry*, [S. l.], v. 257, n. 4, p. 2041–2048, 1982. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6173384/>. Acesso em: 5 set. 2021.

CRIPPA, Stefania; SANTI, Ludovica; BERTI, Margherita; DE PONTI, Giada; BERNARDO, Maria Ester. Role of ex vivo Expanded Mesenchymal Stromal Cells in Determining Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, [S. l.], v. 0, p. 821, 2021. DOI: 10.3389/FCELL.2021.663316.

CUESTA-GOMEZ, Nerea; GRAHAM, Gerard J.; CAMPBELL, John D. M. Chemokines and their receptors: predictors of the therapeutic potential of mesenchymal stromal cells. *Journal of Translational Medicine* 2021 19:1, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1186/S12967-021-02822-5. Disponível em: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-021-02822-5>. Acesso em: 29 ago. 2021.

CURRY, Jennifer M.; EUBANK, Tim D.; ROBERTS, Ryan D.; WANG, Yijie; PORE, Nabendu; MAITY, Amit; MARSH, Clay B. M-CSF Signals through the MAPK/ERK Pathway via Sp1 to Induce VEGF Production and Induces Angiogenesis In Vivo. *PLOS ONE*, [S. l.], v. 3, n. 10, p. e3405, 2008. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0003405. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0003405>. Acesso em: 27 ago. 2021.

DABROWSKA, Sylwia; ANDRZEJEWSKA, Anna; JANOWSKI, Miroslaw; LUKOMSKA, Barbara. Immunomodulatory and Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles: Therapeutic Outlook for Inflammatory and Degenerative Diseases. *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 0, p. 3809, 2021. DOI: 10.3389/FIMMU.2020.591065.

DAI, Wenda; DONG, Jian; FANG, Taolin; UEMURA, Toshimasa. Stimulation of osteogenic activity in mesenchymal stem cells by FK506. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, [S. l.], 2008. DOI: 10.1002/jbm.a.31685.

DAS, Partha M.; SINGAL, Rakesh. DNA methylation and cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, [S. l.], v. 22, n. 22, p. 4632–42, 2004. DOI: 10.1200/JCO.2004.07.151. Disponível em: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2004.07.151>. Acesso em: 16 dez. 2018.

DAVIES, Lindsay C.; HELDRING, Nina; KADRI, Nadir; LE BLANC, Katarina. Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. *Stem Cells*, [S. l.], 2017. DOI: 10.1002/stem.2509.

DE CASTRO, Ligia Lins; LOPES-PACHECO, Miquéias; WEISS, Daniel Jay; CRUZ, Fernanda Ferreira; ROCCO, Patricia Rieken Macêdo. Current understanding of the immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells. *Journal of Molecular Medicine* 2019 97:5, [S. l.], v. 97, n. 5, p. 605–618, 2019. DOI: 10.1007/S00109-019-01776-Y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-019-01776-y>. Acesso em: 28 ago. 2021.

DE WITTE, Samantha F. H.; FRANQUESA, Marcella; BAAN, Carla C.; HOOGDUIJN, Martin J. Toward development of imesenchymal stem cells for immunomodulatory therapy *Frontiers in Immunology*, 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00648.

DENG, Shuwen; LIU, Jia; WU, Xiaomei; LU, Wei. Golgi Apparatus: A Potential Therapeutic Target for Autophagy-Associated Neurological Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, [S. l.], v. 0, p. 901, 2020. DOI: 10.3389/FCELL.2020.564975.

DI PIETRO, Luisa A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *Journal of Leukocyte Biology*, [S. l.], 2016. DOI: 10.1189/jlb.4MR0316-102R.

DM, Zaiss; CM, Minutti; JA, Knipper. Immune- and non-immune-mediated roles of regulatory T-cells during wound healing. *Immunology*, [S. l.], v. 157, n. 3, p. 190–197, 2019. DOI: 10.1111/IMM.13057. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30866049/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, [S. l.], 2006. DOI: 10.1080/14653240600855905.

DORRONSORO, Akaitz; FERNÁNDEZ-RUEDA, Jon; FECHTER, Karoline; FERRIN, Izaskun; SALCEDO, Juan Manuel; JAKOBSSON, Emma; TRIGUEROS, César. Human Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Immunoregulation: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *Bone Marrow Research*, [S. l.], 2013. DOI: 10.1155/2013/203643.

DORRONSORO, Akaitz; LANG, Valérie; FERRIN, Izaskun; FERNÁNDEZ-RUEDA, Jon; ZABALETA, Lorea; PÉREZ-RUIZ, Estibaliz; SEPÚLVEDA, Pilar; TRIGUEROS, César. Intracellular role of IL-6 in mesenchymal stromal cell immunosuppression and proliferation. *Scientific Reports* 2020 10:1, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-78864-4. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-78864-4>. Acesso em: 26 ago. 2021.

DYSHLOVOY, Sergey A. Blue-Print Autophagy in 2020: A Critical Review. *Marine Drugs*, [S. l.], v. 18, n. 9, 2020. DOI: 10.3390/MD18090482. Disponível em: </pmc/articles/PMC7551687/>. Acesso em: 29 ago. 2021.

ELLOUK-ACHARD, Sophie; MARTIN, Chantal; DUC, Huynh Thien; DUTERTRE-CATELLA, Hélène; THEVENIN, Marc; WARNET, Jean Michel; CLAUDE, Jean Roger. FK506 (Tacrolimus) decreases the cytotoxicity of cyclosporin A in rat hepatocytes in primary culture: Implication of CYP3A induction. *Archives of Toxicology*, [S. l.], 1998. DOI: 10.1007/s002040050499.

ERVOLINO DE OLIVEIRA, Carine et al. Activin A triggers angiogenesis via regulation of VEGFA and its overexpression is associated with poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology*, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 364–376, 2020. DOI: 10.3892/IJO.2020.5058. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2020.5058/abstract>. Acesso em: 27 ago. 2021.

EZQUER, Fernando E.; EZQUER, Marcelo E.; VICENCIO, Jose M.; CALLIGARIS, Sebastián D. Two complementary strategies to improve cell engraftment in mesenchymal stem cell-based therapy: Increasing transplanted cell resistance and increasing tissue receptivity. *Cell Adhesion & Migration*, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 110, 2017. DOI: 10.1080/19336918.2016.1197480. Disponível em: </pmc/articles/PMC5308221/>. Acesso em: 29 ago. 2021.

F, BURON; H, PERRIN; C, MALCUS; O, HÉQUET; O, THAUNAT; MN, KHOLOPP-SARDA; FT, MOULIN; E, MORELON. Human mesenchymal stem cells and immunosuppressive drug interactions in allogeneic responses: an in vitro study using human cells. *Transplantation proceedings*, [S. l.], v. 41, n. 8, p. 3347–3352, 2009. DOI: 10.1016/J.TRANSProceed.2009.08.030. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19857747/>. Acesso em: 5 set. 2021.

FAJARDO-ORDUÑA, Guadalupe R.; MAYANI, Héctor; MONTESINOS, Juan J. Hematopoietic Support Capacity of Mesenchymal Stem Cells: Biology and Clinical Potential *Archives of Medical Research Elsevier Inc*, 2015. DOI: 10.1016/j.arcmed.2015.10.001.

FARR, Laura; GHOSH, Swagata; MOONAH, Shannon. Role of MIF Cytokine/CD74 Receptor Pathway in Protecting Against Injury and Promoting Repair. *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 11, p. 1273, 2020. DOI: 10.3389/FIMMU.2020.01273. Disponível em: </pmc/articles/PMC7325688/>. Acesso em: 26 ago. 2021.

FAYYAD-KAZAN, Mohammad; FAYYAD-KAZAN, Hussein; LAGNEAUX, Laurence; NAJAR, Mehdi. The potential of mesenchymal stromal cells in immunotherapy. *Immunotherapy*, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 839–42, 2016. DOI: 10.2217/imt-2016-0037. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/imt-2016-0037>. Acesso em: 16 dez. 2018.

FERREIRA, Paulo Michel Pinheiro; SOUSA, Rayran Walter Ramos De; FERREIRA, José Roberto de Oliveira; MILITÃO, Gardenia Carmen Gadelha; BEZERRA, Daniel Pereira. Chloroquine and

hydroxychloroquine in antitumor therapies based on autophagy-related mechanisms. *Pharmacological Research*, [S. l.], v. 168, p. 105582, 2021. DOI: 10.1016/J.PHRS.2021.105582.

FORD, Jill; HUGHSON, Angela; LIM, Kihong; BARDINA, Susana V.; LU, Wuyuan; CHARO, Israel F.; LIM, Jean K.; FOWELL, Deborah J. CCL7 Is a Negative Regulator of Cutaneous Inflammation Following *Leishmania major* Infection. *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 0, n. JAN, p. 3063, 2019. DOI: 10.3389/FIMMU.2018.03063.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. *Cell Proliferation*, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 393–403, 1970. DOI: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x.

FUKUNAGA, J. et al. Expression of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in rat osteoporosis induced by immunosuppressant FK506. *Bone*, [S. l.], 2004. DOI: 10.1016/j.bone.2003.05.003.

FUKUSHIMA, Atsuki et al. Therapeutic effects of 0.1% tacrolimus eye drops for refractory allergic ocular diseases with proliferative lesion or corneal involvement. *British Journal of Ophthalmology*, [S. l.], 2014. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2013-304453.

FUNES, Samanta C.; RIOS, Mariana; FERNÁNDEZ-FIERRO, Ayleen; COVIÁN, Camila; BUENO, Susan M.; RIEDEL, Claudia A.; MACKERN-OBERTI, Juan Pablo; KALERGIS, Alexis M. Naturally Derived Heme-Oxygenase 1 Inducers and Their Therapeutic Application to Immune-Mediated Diseases. *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 0, p. 1467, 2020. DOI: 10.3389/FIMMU.2020.01467.

G, QIU et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells modulate CD14 ++ CD16 + expression on monocytes from sepsis patients in vitro via prostaglandin E2. *Stem cell research & therapy*, [S. l.], v. 8, n. 1, 2017. DOI: 10.1186/S13287-017-0546-X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28446249/>. Acesso em: 30 ago. 2021.

GABER, Timo et al. CTLA-4 Mediates Inhibitory Function of Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, [S. l.], v. 19, n. 8, 2018. DOI: 10.3390/IJMS19082312. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6121442/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30446249/). Acesso em: 27 ago. 2021.

GALGARO, Bruna C.; BECKENKAMP, Liziane R.; NUNNENKAMP, Martha van den M.; KORB, Vitória G.; NAASANI, Liliana I. S.; ROSZEK, Katarzyna; WINK, Márcia R. The adenosinergic pathway in mesenchymal stem cell fate and functions. *Medicinal Research Reviews*, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 2316–2349, 2021. DOI: 10.1002/MED.21796. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/med.21796>. Acesso em: 30 ago. 2021.

GIRDLESTONE, John; PIDO-LOPEZ, Jeffrey; SRIVASTAVA, Saket; CHAI, Jianguo; LEAVER, Neil; GALLEU, Antonio; LOMBARDI, Giovanna; NAVARRETE, Cristina V. Enhancement of the immunoregulatory potency of mesenchymal stromal cells by treatment with immunosuppressive drugs. *Cytotherapy*, [S. l.], v. 17, n. 9, p. 1188–1199, 2015. DOI: 10.1016/J.JCYT.2015.05.009. Disponível em: <http://www.isct-cytotherapy.org/article/S146532491500924X/fulltext>. Acesso em: 5 set. 2021.

GIRI, Jayeeta; GALIPEAU, Jacques. Mesenchymal stromal cell therapeutic potency is dependent upon viability, route of delivery, and immune match. *Blood Advances*, [S. l.], v. 4, n. 9, p. 1987–1997, 2020. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020001711. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32384543/>. Acesso em: 6 jul. 2020.

GUERRERO-ESTEO, Mercedes; SÁNCHEZ-ELSNER, Tilman; LETAMENDIA, Ainhoa; BERNABÉU, Carmelo. Extracellular and Cytoplasmic Domains of Endoglin Interact with the Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors I and II \*. *Journal of Biological Chemistry*, [S. l.], v. 277, n. 32, p. 29197–29209, 2002. DOI: 10.1074/JBC.M111991200. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925820703315/fulltext>. Acesso em: 27 ago. 2021.

GUO, Yanxia; WANG, Adele Y. Novel Immune Check-Point Regulators in Tolerance Maintenance. *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 0, n. AUG, p. 421, 2015. DOI: 10.3389/FIMMU.2015.00421.

GUPTA, Aditi; ZHOU, Cindy Q.; CHELLAIAH, Meenakshi A. Osteopontin and MMP9: Associations with VEGF Expression/Secretion and Angiogenesis in PC3 Prostate Cancer Cells. *Cancers*, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 617, 2013. DOI: 10.3390/CANCERS5020617. Disponível em: /pmc/articles/PMC3730333/. Acesso em: 27 ago. 2021.

HA, Dong Ho; PATHAK, Shiva; YONG, Chul Soon; KIM, Jong Oh; JEONG, Jee Heon; PARK, Jun Beom. Potential differentiation ability of gingiva originated human mesenchymal stem cell in the presence of tacrolimus. *Scientific Reports*, [S. l.], v. 6, 2016. b. DOI: 10.1038/srep34910.

HA, Dong-Ho; YONG, Chul Soon; KIM, Jong Oh; JEONG, Jee-Heon; PARK, Jun-Beom. Effects of tacrolimus on morphology, proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells derived from gingiva tissue. *Molecular medicine reports*, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 69–76, 2016. a. DOI: 10.3892/mmr.2016.5217. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2016.5217>. Acesso em: 16 dez. 2018.

HA, Elshabrawy et al. IL-11 facilitates a novel connection between RA joint fibroblasts and endothelial cells. *Angiogenesis*, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 215–228, 2018. DOI: 10.1007/S10456-017-9589-Y. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29327326/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

HALPER, Jaroslava. Structural Proteins | Major Proteins of the Extracellular Matrix. *Encyclopedia of Biological Chemistry III*, [S. l.], p. 611–624, 2021. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.21353-8.

HE, Xuemei et al. Spontaneous apoptosis of cells in therapeutic stem cell preparation exert immunomodulatory effects through release of phosphatidylserine. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021 6:1, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–14, 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00688-z. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00688-z>. Acesso em: 31 ago. 2021.

HM, Lazarus; SE, Haynesworth; SL, Gerson; NS, Rosenthal; AI, Caplan. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone marrow transplantation*, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 557–564, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8528172/>. Acesso em: 29 ago. 2021.

HO, Jasmine; WALSH, Claire; YUE, Dominic; DARDIK, Alan; CHEEMA, Umber. Current Advancements and Strategies in Tissue Engineering for Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in Wound Care*, [S. l.], 2017. DOI: 10.1089/wound.2016.0723.

HOOGDUIJN, Martin J.; CROP, Meindert J.; KOREVAAR, Sander S.; PEETERS, Annemiek M. A.; EIJKEN, Marco; MAAT, Lex P. W. M.; BALK, Aggie H. M. M.; WEIMAR, Willem; BAAN, Carla C. Susceptibility of human mesenchymal stem cells to tacrolimus, mycophenolic acid, and rapamycin. *Transplantation*, [S. l.], 2008. DOI: 10.1097/TP.0b013e31818aa536.

HORWITZ, Edwin M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S.; KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, [S. l.], 2005. DOI: 10.1080/14653240500319234.

HT, Pham et al. Tryptophan and Kynurenine Enhances the Stemness and Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells In Vitro and In Vivo. *Materials (Basel, Switzerland)*, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–15, 2021. DOI: 10.3390/MA14010208. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33406724/>. Acesso em: 30 ago. 2021.

HU, Chenxia; ZHAO, Lingfei; WU, Daxian; LI, Lanjuan. Modulating autophagy in mesenchymal stem cells effectively protects against hypoxia- or ischemia-induced injury. *Stem Cell Research & Therapy* 2019 10:1, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–13, 2019. DOI: 10.1186/S13287-019-1225-X. Disponível em: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-019-1225-x>. Acesso em: 29 ago. 2021.

HU, Jun; FENG, Yulai; ZHOU, Zhong. Artemin expression in chondrosarcoma and its effect on proliferation and migration of endothelial cells. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 62–67, 2020. DOI: 10.3872/J.ISSN.1007-385X.2020.01.010.

HUANG, Yu-Han; YANG, Hung-Yu; HUANG, Shiu-Wen; OU, George; HSU, Ya-Fen; HSU, Ming-Jen. Interleukin-6 Induces Vascular Endothelial Growth Factor-C Expression via Src-FAK-STAT3 Signaling in Lymphatic Endothelial Cells. *PLOS ONE*, [S. l.], v. 11, n. 7, p. e0158839, 2016. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0158839. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0158839>. Acesso em: 26 ago. 2021.

IACONO, Kathryn T.; BROWN, Amy L.; GREENE, Mark I.; SAOUAF, Sandra J. CD147 Immunoglobulin Superfamily Receptor Function and Role in Pathology. *Experimental and molecular pathology*, [S. l.], v. 83, n. 3, p. 283, 2007. DOI: 10.1016/J.YEXMP.2007.08.014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17391739/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

J, Cuenca et al. The Reparative Abilities of Menstrual Stem Cells Modulate the Wound Matrix Signals and Improve Cutaneous Regeneration. *Frontiers in physiology*, [S. l.], v. 9, n. MAY, 2018. DOI: 10.3389/FPHYS.2018.00464. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29867527/>. Acesso em: 26 ago. 2021.

J, Heidemann et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *The Journal of biological chemistry*, [S. l.], v. 278, n. 10, p. 8508–8515, 2003. DOI: 10.1074/JBC.M208231200. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12496258/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

J, Lai; S, Jiang; L, Shuai; Y, Zhang; R, Xia; Q, Chen; L, Bai. Comparison of the biological and functional characteristics of mesenchymal stem cells from intrahepatic and identical bone marrow. *Stem cell research*, [S. l.], v. 55, p. 102477, 2021. DOI: 10.1016/J.SCR.2021.102477. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34343826/>. Acesso em: 26 ago. 2021.

J, Liang et al. Safety analysis in patients with autoimmune disease receiving allogeneic mesenchymal stem cells infusion: a long-term retrospective study. *Stem cell research & therapy*, [S. l.], v. 9, n. 1, 2018. DOI: 10.1186/S13287-018-1053-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30428931/>. Acesso em: 30 ago. 2021.

J, Zhang; X, Yu; Y, Yu; Y, Gong. MicroRNA expression analysis during FK506-induced osteogenic differentiation in rat bone marrow stromal cells. *Molecular medicine reports*, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 581–590, 2017. DOI: 10.3892/MMR.2017.6655. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28560399/>. Acesso em: 29 ago. 2021.

JIANG, Dongsheng et al. Suppression of Neutrophil-Mediated Tissue Damage—A Novel Skill of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, [S. l.], v. 34, n. 9, p. 2393–2406, 2016. DOI: 10.1002/stem.2417.

JIANG, Yuanxu; XIA, Mingzhu; HUANG, Qiang; DING, Dengfeng; LI, Yali; ZHANG, Zhongjun; ZHANG, Xueping. Protective effect of dexmedetomidine against organ dysfunction in a two-hit model of hemorrhage/ resuscitation and endotoxemia in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, [S. l.], v. 52, n. 3, 2019. DOI: 10.1590/1414-431x20187905. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2019000300604&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2019000300604&lng=en&nrm=iso&tlng=en). Acesso em: 10 jul. 2020.

JIMENEZ-PUERTA, Gonzalo José; MARCHAL, Juan Antonio; LÓPEZ-RUIZ, Elena; GÁLVEZ-MARTÍN, Patricia. Role of Mesenchymal Stromal Cells as Therapeutic Agents: Potential Mechanisms of Action and Implications in Their Clinical Use. *Journal of Clinical Medicine* 2020, Vol. 9, Page 445, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 445, 2020. DOI: 10.3390/JCM9020445. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/2/445/htm>. Acesso em: 31 ago. 2021.

JIN, Liyuan; DENG, Zihui; ZHANG, Jinying; YANG, Chen; LIU, Jiejie; HAN, Weidong; YE, Ping; SI, Yiling; CHEN, Guanghui. Mesenchymal stem cells promote type 2 macrophage polarization to ameliorate the myocardial injury caused by diabetic cardiomyopathy. *Journal of Translational Medicine* 2019 17:1, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–14, 2019. DOI: 10.1186/S12967-019-1999-8. Disponível em: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-019-1999-8>. Acesso em: 30 ago. 2021.

JOVANOVIĆ, M.; VIĆOVAC, L. Interleukin-6 Stimulates Cell Migration, Invasion and Integrin Expression in HTR-8/SVneo Cell Line. *Placenta*, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 320–328, 2009. DOI: 10.1016/J.PLACENTA.2009.01.013.

JY, Hsieh; HW, Wang; SJ, Chang; KH, Liao; IH, Lee; WS, Lin; CH, Wu; WY, Lin; SM, Cheng. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. *PloS one*, [S. l.], v. 8, n. 8, 2013. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0072604. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23991127/>. Acesso em: 5 set. 2021.

K, Dimopoulos; K, Grønbaek. Epigenetic therapy in hematological cancers. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, [S. l.], v. 127, n. 5, p. 316–328, 2019. DOI: 10.1111/APM.12906. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30859683/>. Acesso em: 26 ago. 2021.

K, Kornicka; J, Szłapka-Kosarzewska; A, Śmieszek; K, Marycz. 5-Azacytydine and resveratrol reverse senescence and ageing of adipose stem cells via modulation of mitochondrial dynamics and autophagy. *Journal of cellular and molecular medicine*, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 237–259, 2019. DOI: 10.1111/JCMM.13914. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30370650/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

K, Le Blanc; I, Rasmuson; B, Sundberg; C, Götherström; M, Hassan; M, Uzunel; O, Ringdén. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet (London, England)*, [S. l.], v. 363, n. 9419, p. 1439–1441, 2004. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16104-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15121408/>. Acesso em: 29 ago. 2021.

KAUNDAL, Urvashi; BAGAI, Upma; RAKHA, Aruna. Immunomodulatory plasticity of mesenchymal stem cells: a potential key to successful solid organ transplantation. *Journal of Translational Medicine* 2018 16:1, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–16, 2018. DOI: 10.1186/S12967-018-1403-0. Disponível em: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-018-1403-0>. Acesso em: 30 ago. 2021.

KAWABATA, Tsuyoshi; YOSHIMORI, Tamotsu. Autophagosome biogenesis and human health. *Cell Discovery* 2020 6:1, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1038/s41421-020-0166-y. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41421-020-0166-y>. Acesso em: 29 ago. 2021.

KEAN, Thomas J.; LIN, Paul; CAPLAN, Arnold I.; DENNIS, James E. MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. *Stem Cells International*, [S. l.], v. 2013, p. 13, 2013. DOI: 10.1155/2013/732742. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24375386/>. Acesso em: 29 ago. 2021.

KEHL, Debora; GENERALI, Melanie; MALLONE, Anna; HELLER, Manfred; ULDRY, Anne Christine; CHENG, Phil; GANTENBEIN, Benjamin; HOERSTRUP, Simon P.; WEBER, Benedikt. Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cell secretomes: a systematic comparison of the angiogenic potential. *npj Regenerative Medicine*, [S. l.], v. 4, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41536-019-0070-y. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31016031/>. Acesso em: 4 jul. 2020.

KERKELÄ, Erja et al. Adenosinergic immunosuppression by human mesenchymal stromal cells requires co-operation with T cells. *Stem Cells*, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 781–790, 2016. DOI: 10.1002/stem.2280.

KHANDIA, Rekha et al. A Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy. *Cells* 2019, Vol. 8, Page 674, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 674, 2019. DOI: 10.3390/CELLS8070674. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/7/674/htm>. Acesso em: 29 ago. 2021.

KHOSRAVI, Maryam; BIDMESHKIPOUR, Ali; COHEN, José L.; MORAVEJ, Ali; HOJJAT-ASSARI, Suzzan; NASERIAN, Sina; KARIMI, Mohammad Hossein. Induction of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells by mesenchymal stem cells is associated with modulation of ubiquitination factors and TSDR



demethylation. *Stem Cell Research & Therapy* 2018 9:1, [S. I.], v. 9, n. 1, p. 1–18, 2018. DOI: 10.1186/S13287-018-0991-1. Disponível em: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-018-0991-1>. Acesso em: 30 ago. 2021.

KLARIC, Julie A.; GLASS, David J.; PERR, Eli L.; REUVEN, Arianna D.; TOWNE, Mason J.; LOVETT, Susan T. DNA damage-signaling, homologous recombination and genetic mutation induced by 5-azacytidine and DNA-protein crosslinks in *Escherichia coli*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, [S. I.], v. 822, p. 111742, 2021. DOI: 10.1016/J.MRFMMM.2021.111742.

KLIMCZAK, Aleksandra; KOZLOWSKA, Urszula. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. *Stem Cells International*, [S. I.], v. 2016, p. 1–11, 2016. DOI: 10.1155/2016/4285215. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/sci/2016/4285215/>. Acesso em: 16 dez. 2018.

KO, Jung Hwa; KIM, Hyeon Ji; JEONG, Hyun Jeong; LEE, Hyun Ju; OH, Joo Youn. Mesenchymal Stem and Stromal Cells Harness Macrophage-Derived Amphiregulin to Maintain Tissue Homeostasis. *Cell Reports*, [S. I.], v. 30, n. 11, p. 3806- 3820.e6, 2020. DOI: 10.1016/J.CELREP.2020.02.062.

KOÇER, Günnur; NASIRCILAR ÜLKER, Seher; ŞENTÜRK, Ümit Kemal. The contribution of carbon monoxide to vascular tonus. *Microcirculation*, [S. I.], v. 25, n. 7, 2018. DOI: 10.1111/micc.12495.

KOH, Benson; SULAIMAN, Nadiah; FAUZI, Mh Busra; LAW, Jia Xian; NG, Min Hwei; IDRUS, Ruszymah Bt Hj; YAZID, Muhammad Dain. Three dimensional microcarrier system in mesenchymal stem cell culture: a systematic review. *Cell & Bioscience* 2020 10:1, [S. I.], v. 10, n. 1, p. 1–16, 2020. DOI: 10.1186/S13578-020-00438-8. Disponível em: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-020-00438-8>. Acesso em: 29 ago. 2021.

KONG, Poren; XIE, Xiaoyun; LI, Fang; LIU, Yang; LU, Yingli. Placenta mesenchymal stem cell accelerates wound healing by enhancing angiogenesis in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [S. I.], 2013. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.07.088.

KORNICKA, Katarzyna; MARYCZ, Krzysztof; MAREZDZIAK, Monika; TOMASZEWSKI, Krzysztof A.; NICPOŃ, Jakub. 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*, [S. I.], 2017. DOI: 10.1111/jcmm.12972.

KOROLENKO, T. A. et al. The regulatory role of cystatin C in autophagy and neurodegeneration. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*, [S. I.], v. 23, n. 4, p. 390–397, 2019. DOI: 10.18699/VJ19.507.  
KUNTIN, David; GENEVER, Paul. Mesenchymal stem cells from biology to therapy. *Emerging Topics in Life Sciences*, [S. I.], 2021. DOI: 10.1042/ETLS20200303. Disponível em: </emergtoplifesci/article/doi/10.1042/ETLS20200303/229484/Mesenchymal-stem-cells-from-biology-to-therapy>. Acesso em: 5 set. 2021.

KYURKCHIEV, Dobroslav. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, [S. I.], v. 6, n. 5, p. 552, 2014. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i5.552. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25426252/>. Acesso em: 23 jun. 2020.

KYURKCHIEV, Dobroslav. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, [S. I.], 2014. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i5.552.

L, Bai; D, Li; J, Li; Z, Luo; S, Yu; S, Cao; L, Shen; Z, Zuo; X, Ma. Bioactive molecules derived from umbilical cord mesenchymal stem cells. *Acta histochemica*, [S. I.], v. 118, n. 8, p. 761–769, 2016. a. DOI: 10.1016/J.ACTHIS.2016.09.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27692875/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

L, Jackson-Grusby; PW, Laird; SN, Magge; BJ, Moeller; R, Jaenisch. Mutagenicity of 5-aza-2'-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [S. I.], v. 94, n. 9, p. 4681–4685, 1997. DOI:

10.1073/PNAS.94.9.4681. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9114051/>. Acesso em: 26 ago. 2021.

L, Liu; CW, Wong; M, Han; HP, Farhoodi; G, Liu; Y, Liu; W, Liao; W, Zhao. Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells to treat rheumatoid arthritis. *EBioMedicine*, [S. l.], v. 47, p. 563–577, 2019. DOI: 10.1016/J.EBIOM.2019.08.073. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31501076/>. Acesso em: 28 ago. 2021.

L, Persaud et al. Mechanism of Action and Applications of Interleukin 24 in Immunotherapy. *International journal of molecular sciences*, [S. l.], v. 17, n. 6, 2016. b. DOI: 10.3390/IJMS17060869. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27271601/>. Acesso em: 26 ago. 2021.

LADDHA, Ankit P.; GAIKWAD, Anil B.; KULKARNI, Yogesh A. Receptors | Structural and Functional Insights of VEGF and Its Receptors. *Encyclopedia of Biological Chemistry III*, [S. l.], p. 286–293, 2021. DOI: 10.1016/B978-0-12-819460-7.00131-6.

LE BLANC, Katarina; MOUGIAKAKOS, Dimitrios. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system *Nature Reviews Immunology*, 2012. DOI: 10.1038/nri3209.

LE BLANC, Katarina; RINGDÉN, Olle. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2005. DOI: 10.1016/j.bbmt.2005.01.005.

LEE, Byung-Chul et al. PGE2 maintains self-renewal of human adult stem cells via EP2-mediated autocrine signaling and its production is regulated by cell-to-cell contact. *Scientific Reports* 2016 6:1, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016. DOI: 10.1038/srep26298. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep26298>. Acesso em: 30 ago. 2021.

LEE, Seunghee et al. DNA methyltransferase inhibition accelerates the immunomodulation and migration of human mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, [S. l.], v. 5, p. 8020, 2015. DOI: 10.1038/srep08020.

LEE, Yong-Syu; ECKERS, Jaimee C.; KIMPLE, Randall J. Autophagy in head and neck cancer therapy. *Improving the Therapeutic Ratio in Head and Neck Cancer*, [S. l.], p. 281–300, 2020. DOI: 10.1016/B978-0-12-817868-3.00013-5.

LEYENDECKER, Alessandro; PINHEIRO, Carla Cristina Gomes; AMANO, Mariane Tami; BUENO, Daniela Franco. The use of human mesenchymal stem cells as therapeutic agents for the in vivo treatment of immune-related diseases: A systematic review. *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 9, n. SEP, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02056.

LI, Ding; FINLEY, Stacey D. Exploring the Extracellular Regulation of the Tumor Angiogenic Interaction Network Using a Systems Biology Model. *Frontiers in Physiology*, [S. l.], v. 0, p. 823, 2019. DOI: 10.3389/FPHYS.2019.00823.

LI, Dong; HAN, Yan; ZHUANG, Yong; FU, Jinqiu; LIU, Huan; SHI, Qing; JU, Xiuli. Overexpression of COX-2 but not indoleamine 2,3-dioxygenase-1 enhances the immunosuppressive ability of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Medicine*, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 1309–1316, 2015. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2137.

LI, Wen; LI, Kai; GAO, Jing; YANG, Zhuo. Autophagy is required for human umbilical cord mesenchymal stem cells to improve spatial working memory in APP/PS1 transgenic mouse model. *Stem Cell Research & Therapy* 2018 9:1, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–16, 2018. DOI: 10.1186/S13287-017-0756-2. Disponível em: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-017-0756-2>. Acesso em: 31 ago. 2021.

LI, Yu Hua; XU, Ying; WU, Hua Mei; YANG, Jing; YANG, Li Hong; YUE-MENG, Wan. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Hepatitis B Virus Related Acute-on-Chronic Liver Failure Treated with Plasma Exchange and Entecavir: a 24-Month Prospective Study. *Stem Cell Reviews and Reports*, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 645–653, 2016. DOI: 10.1007/s12015-016-9683-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27687792/>. Acesso em: 23 jun. 2020.

LIN, Liangyu; DU, Liming. The role of secreted factors in stem cells-mediated immune regulation. *Cellular Immunology*, [S. l.], v. 326, p. 24–32, 2018. DOI: 10.1016/J.CELLIMM.2017.07.010.

LINDAHL, Hannes; OLSSON, Tomas. Interleukin-22 Influences the Th1/Th17 Axis. *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 0, p. 86, 2021. DOI: 10.3389/FIMMU.2021.618110.

LIU, Mingdong et al. ATR/Chk1 signaling induces autophagy through sumoylated RhoB-mediated lysosomal translocation of TSC2 after DNA damage. *Nature Communications* 2018 9:1, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–14, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-06556-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-06556-9>. Acesso em: 26 ago. 2021.

LOIBL, Markus; BINDER, Andreas; HERRMANN, Marietta; DUTTENHOEFER, Fabian; RICHARDS, R. Geoff; NERLICH, Michael; ALINI, Mauro; VERRIER, Sophie. Direct cell-cell contact between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells induces a pericyte-like phenotype in vitro. *BioMed Research International*, [S. l.], v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/395781.

LUK, Franka; CARRERAS-PLANELLA, Laura; KOREVAAR, Sander S.; DE WITTE, Samantha F. H.; BORRÀS, Francesc E.; BETJES, Michiel G. H.; BAAN, Carla C.; HOOGDUIJN, Martin J.; FRANQUESA, Marcella. Inflammatory Conditions Dictate the Effect of Mesenchymal Stem or Stromal Cells on B Cell Function. *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 0, n. AUG, p. 1042, 2017. DOI: 10.3389/FIMMU.2017.01042.

LYKO, Frank; BROWN, Robert. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies *Journal of the National Cancer Institute*, 2005. DOI: 10.1093/jnci/dji311.

MAACHA, Selma; SIDAHMED, Heba; JACOB, Shana; GENTILCORE, Giusy; CALZONE, Rita; GRIVEL, Jean Charles; CUGNO, Chiara. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stromal Cells in Angiogenesis. *Stem Cells International*, [S. l.], v. 2020, 2020. DOI: 10.1155/2020/4356359.

MAGALHAES, Otavio A.; MARINHO, Diane R.; KWITKO, Sergio. Topical 0.03% tacrolimus preventing rejection in high-risk corneal transplantation: A cohort study. *British Journal of Ophthalmology*, [S. l.], 2013. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2013-303639.

MAHMOOD, Niaz; MIHALCIOIU, Catalin; RABBANI, Shafaat A. Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Frontiers in Oncology*, [S. l.], v. 0, n. FEB, p. 24, 2018. DOI: 10.3389/FONC.2018.00024.

MANCHEÑO-CORVO, Pablo et al. Adipose Mesenchymal Stromal Cell Function Is Not Affected by Methotrexate and Azathioprine. *BioResearch Open Access*, [S. l.], 2013. DOI: 10.1089/biores.2013.0040.

MARKOV, Alexander et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a valuable source for the treatment of immune-mediated disorders. *Stem Cell Research & Therapy* 2021 12:1, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–30, 2021. DOI: 10.1186/S13287-021-02265-1. Disponível em: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-021-02265-1>. Acesso em: 30 ago. 2021.

MCCAULEY, J.; FARKUS, Z.; PRASAD, S. J.; PLUMMER, H. A.; MURRAY, S. A. Cyclosporine and FK 506 induced inhibition of renal epithelial cell proliferation. *Transplantation proceedings*, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 2829–30, 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1721290>. Acesso em: 16 dez. 2018.

ME, Papandreou; N, Tavernarakis. Nucleophagy mediators and mechanisms. *Progress in molecular biology and translational science*, [S. l.], v. 172, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1016/BS.PMBTS.2020.01.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32620238/>. Acesso em: 26 ago. 2021.

MEHTA, Kosha J. Role of iron and iron-related proteins in mesenchymal stem cells: Cellular and clinical aspects. *Journal of Cellular Physiology*, [S. l.], v. 236, n. 10, p. 7266–7289, 2021. DOI:

10.1002/JCP.30383. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.30383>. Acesso em: 30 ago. 2021.

MELDERIS, Simon; WARKOTSCH, Matthias; HAGENSTEIN, Julia; HERRNSTADT, Georg; TIEGS, Gisa; STEINMETZ, Oliver. THU0229 Amphiregulin attenuates lupus nephritis via suppression of pro-inflammatory t-cell functions in an animal model of SLE. *Annals of the Rheumatic Diseases*, [S. l.], v. 78, n. Suppl 2, p. 392–393, 2019. DOI: 10.1136/ANNRHEUMDIS-2019-EULAR.2264. Disponível em: [https://ard.bmj.com/content/78/Suppl\\_2/392.2](https://ard.bmj.com/content/78/Suppl_2/392.2). Acesso em: 27 ago. 2021.

MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI, Mohammad et al. DNA damage response and breast cancer development: Possible therapeutic applications of ATR, ATM, PARP, BRCA1 inhibition. *DNA Repair*, [S. l.], v. 98, p. 103032, 2021. DOI: 10.1016/J.DNAREP.2020.103032.

MOHAMMADALIPOUR, Amina; DUMBALI, Sandeep P.; WENZEL, Pamela L. Mitochondrial Transfer and Regulators of Mesenchymal Stromal Cell Function and Therapeutic Efficacy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, [S. l.], v. 0, p. 1519, 2020. DOI: 10.3389/FCCELL.2020.603292.

MOTOYOSHI, K. Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). *Nippon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*, [S. l.], v. 53 Su Pt 2, p. 726–727, 2016. DOI: 10.1016/B978-0-444-53717-1.01010-6.

MÜLLER, Antonia; FLOREK, Mareike. 5-Azacytidine/Azacitidine. *Recent Results in Cancer Research*, [S. l.], v. 184, p. 159–170, 2010. DOI: 10.1007/978-3-642-01222-8\_11. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-01222-8\\_11](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-01222-8_11). Acesso em: 25 ago. 2021.

MUN, Se Hwan; PARK, Peter Sang Uk; PARK-MIN, Kyung-Hyun. The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. *Experimental & Molecular Medicine* 2020 52:8, [S. l.], v. 52, n. 8, p. 1239–1254, 2020. DOI: 10.1038/s12276-020-0484-z. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s12276-020-0484-z>. Acesso em: 26 ago. 2021. Murine Model. *Frontiers in Physiology*, [S. l.], v. 0, p. 243, 2021. DOI: 10.3389/FPHYS.2021.628107.

MUTHU, Sathish; JEYARAMAN, Madhan; JAIN, Rashmi; GULATI, Arun; JEYARAMAN, Naveen; PRAJWAL, Gollahalli Shivashankar; MISHRA, Prabhu Chandra. Accentuating the sources of mesenchymal stem cells as cellular therapy for osteoarthritis knees—a panoramic review. *Stem Cell Investigation*, [S. l.], v. 8, n. 0, p. 13–13, 2021. DOI: 10.21037/SCI-2020-055. Disponível em: <https://sci.amegroups.com/article/view/71189/html>. Acesso em: 24 ago. 2021.

NAJAR, Mehdi; KRAYEM, Mohammad; MERIMI, Makram; BURNY, Arsène; MEULEMAN, Nathalie; BRON, Dominique; RAICEVIC, Gordana; LAGNEAUX, Laurence. Insights into inflammatory priming of mesenchymal stromal cells: functional biological impacts *Inflammation Research*, 2018. DOI: 10.1007/s00011-018-1131-1.

NAJAR, Mehdi; KRAYEM, Mohammad; MEULEMAN, Nathalie; BRON, Dominique; LAGNEAUX, Laurence. Mesenchymal Stromal Cells and Toll-Like Receptor Priming: A Critical Review. *Immune Network*, [S. l.], 2017. DOI: 10.4110/in.2017.17.2.89.

NAJI, Abderrahim; EITOKU, Masamitsu; FAVIER, Benoit; DESCHASEAUX, Frédéric; ROUAS-FREISS, Nathalie; SUGANUMA, Narufumi. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications *Cellular and Molecular Life Sciences* Birkhauser Verlag AG, , 2019. DOI: 10.1007/s00018-019-03125-1.

NAVADA, Shyamala C.; STEINMANN, Juliane; LÜBBERT, Michael; SILVERMAN, Lewis R. Clinical development of demethylating agents in hematology. *The Journal of Clinical Investigation*, [S. l.], v. 124, n. 1, p. 40–46, 2014. DOI: 10.1172/JCI69739. Disponível em: <http://www.jci.org>. Acesso em: 25 ago. 2021.

NORONHA, Nádia de Cássia; MIZUKAMI, Amanda; CALIÁRI-OLIVEIRA, Carolina; COMINAL, Juçara Gastaldi; ROCHA, José Lucas M.; COVAS, Dimas Tadeu; SWIECH, Kamilla; MALMEGRIM, Kelen C. R. Correction to: Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Research & Therapy*, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 132, 2019. DOI: 10.1186/s13287-019-1259-0. Disponível em: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-019-1259-0>. Acesso em: 30 jun. 2019.

O, Yuan et al. Exosomes Derived from Human Primed Mesenchymal Stem Cells Induce Mitosis and Potentiate Growth Factor Secretion. *Stem cells and development*, [S. I.], v. 28, n. 6, p. 398–409, 2019. DOI: 10.1089/SCD.2018.0200. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30638129/>. Acesso em: 31 ago. 2021.

OMORI, K.; KIDA, T.; HORI, M.; OZAKI, H.; MURATA, T. Multiple roles of the PGE2-EP receptor signal in vascular permeability. *British Journal of Pharmacology*, [S. I.], v. 171, n. 21, p. 4879–4889, 2014. DOI: 10.1111/bph.12815.

PERVEEN, Shahana et al. MIF inhibition enhances pulmonary angiogenesis and lung development in congenital diaphragmatic hernia. *Pediatric Research* 2019 85:5, [S. I.], v. 85, n. 5, p. 711–718, 2019. DOI: 10.1038/s41390-019-0335-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41390-019-0335-6>. Acesso em: 27 ago. 2021.

PETIBONE, Dayton M.; MAJEED, Waqar; CASCIANO, Daniel A. Autophagy function and its relationship to pathology, clinical applications, drug metabolism and toxicity. *Journal of Applied Toxicology*, [S. I.], v. 37, n. 1, p. 23–37, 2017. DOI: 10.1002/JAT.3393. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jat.3393>. Acesso em: 29 ago. 2021.

PITTINGER, Mark F.; DISCHER, Dennis E.; PÉAULT, Bruno M.; PHINNEY, Donald G.; HARE, Joshua M.; CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progressnpj Regenerative MedicineNature Research, , 2019. DOI: 10.1038/s41536-019-0083-6.

PLOSKER, G. L. Tacrolimus: A further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs*, [S. I.], 2000. DOI: 10.2165/00003495-200059020-00021.

PUGSLEY, Haley R. Assessing autophagic flux by measuring LC3, p62, and LAMP1 co-localization using multispectral imaging flow cytometry. *Journal of Visualized Experiments*, [S. I.], v. 2017, n. 125, 2017. DOI: 10.3791/55637.

Q, Vu; K, Xie; M, Eckert; W, Zhao; SC, Cramer. Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke. *Neurology*, [S. I.], v. 82, n. 14, p. 1277–1286, 2014. DOI: 10.1212/WNL.0000000000000278. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24610327/>. Acesso em: 28 ago. 2021.

QIAN, Xiaoli; AN, Nan; REN, Yifan; YANG, Chenxin; ZHANG, Xiaoling; LI, Lisha. Immunosuppressive Effects of Mesenchymal Stem Cells-derived Exosomes. *Stem Cell Reviews and Reports* 2020 17:2, [S. I.], v. 17, n. 2, p. 411–427, 2020. DOI: 10.1007/s12015-020-10040-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12015-020-10040-7>. Acesso em: 28 ago. 2021.

R, Xu; W, Chen; Z, Zhang; Y, Qiu; Y, Wang; B, Zhang; W, Lu. Integrated data analysis identifies potential inducers and pathways during the endothelial differentiation of bone-marrow stromal cells by DNA methyltransferase inhibitor, 5-aza-2'-deoxycytidine. *Gene*, [S. I.], v. 657, p. 9–18, 2018. DOI: 10.1016/J.GENE.2018.03.010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29514045/>. Acesso em: 29 ago. 2021.

RAD POUR, Soudabeh et al. Exhaustion of CD4+ T-cells mediated by the Kynurenine Pathway in Melanoma. *Scientific Reports* 2019 9:1, [S. I.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-48635-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-48635-x>. Acesso em: 30 ago. 2021.

RASTALDO, Raffaella; VITALE, Emanuela; GIACHINO, Claudia. Dual Role of Autophagy in Regulation of Mesenchymal Stem Cell Senescence. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, [S. I.], v. 0, p. 276, 2020. DOI: 10.3389/FCCELL.2020.00276.

REUWER, Anne Q. et al. Functional consequences of prolactin signalling in endothelial cells: a potential link with angiogenesis in pathophysiology? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, [S. I.], v. 16, n.

9, p. 2035, 2012. DOI: 10.1111/J.1582-4934.2011.01499.X. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3822974/](http://pmc/articles/PMC3822974/). Acesso em: 27 ago. 2021.

ROCHA, José Lucas Martins; DE OLIVEIRA, Waldir César Ferreira; NORONHA, Nádia Cássia; DOS SANTOS, Natalia Cristine Dias; COVAS, Dimas Tadeu; PIKANÇO-CASTRO, Virgínia; SWIECH, Kamilla; MALMEGRIM, Kelen Cristina Ribeiro. Mesenchymal Stromal Cells in Viral Infections: Implications for COVID-19. *Stem Cell Reviews and Reports* 2020 17:1, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 71–93, 2020. DOI: 10.1007/S12015-020-10032-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12015-020-10032-7>. Acesso em: 31 ago. 2021.

ROSE-JOHN, Stefan; WINTHROP, Kevin; CALABRESE, Leonard. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *NATURE REVIEWS | RHEUMATOLOGY*, [S. l.], v. 13, p. 399, 2017. DOI: 10.1038/nrrheum.2017.83. Disponível em: [www.nature.com/nrrheum](http://www.nature.com/nrrheum). Acesso em: 26 ago. 2021.

S, Fu; N, Zhang; AC, Yopp; D, Chen; M, Mao; D, Chen; H, Zhang; Y, Ding; JS, Bromberg. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, [S. l.], v. 4, n. 10, p. 1614–1627, 2004. DOI: 10.1111/J.1600-6143.2004.00566.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15367216/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

S, Huang; N, Li; D, Yan. Delayed treatment with Endostatin displays a protective role against pulmonary hypertension by targeting VEGF pathway. *Minerva medica*, [S. l.], 2021. DOI: 10.23736/S0026-4806.21.07145-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33913657/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

SAH, Shyam Kishor; AGRAHARI, Gaurav; KIM, Tae-Yoon. Insights into superoxide dismutase 3 in regulating biological and functional properties of mesenchymal stem cells. *Cell & Bioscience* 2020 10:1, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1186/S13578-020-00386-3. Disponível em: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-020-00386-3>. Acesso em: 30 ago. 2021.

SANGIORGI, Bruno et al. DSP30 enhances the immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells and protects their suppressive potential from lipopolysaccharide effects: A potential role of adenosine. *Cytherapy*, [S. l.], 2016. DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.04.004.

SANJABI, Shomyseh; OH, Soyoung A.; LI, Ming O. Regulation of the Immune Response by TGF-β: From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, [S. l.], v. 9, n. 6, p. a022236, 2017. DOI: 10.1101/CSHPERSPECT.A022236. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/content/9/6/a022236.full>. Acesso em: 27 ago. 2021.

SANZ-RODRIGUEZ, Francisco; GUERRERO-ESTEO, Mercedes; BOTELLA, Luisa-Maria; BANVILLE, Denis; VARY, Calvin P. H.; BERNABÉU, Carmelo. Endoglin Regulates Cytoskeletal Organization through Binding to ZRP-1, a Member of the Lim Family of Proteins \*. *Journal of Biological Chemistry*, [S. l.], v. 279, n. 31, p. 32858–32868, 2004. DOI: 10.1074/JBC.M400843200. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925820775873/fulltext>. Acesso em: 27 ago. 2021.

SCARFE, Lauren et al. Preclinical imaging methods for assessing the safety and efficacy of regenerative medicine therapies. *npj Regenerative Medicine* 2017 2:1, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 1–13, 2017. DOI: 10.1038/s41536-017-0029-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41536-017-0029-9>. Acesso em: 30 ago. 2021.

SCHNEIDER, Natália et al. Dexamethasone and azathioprine promote cytoskeletal changes and affect mesenchymal stem cell migratory behavior. *PLoS ONE*, [S. l.], 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0120538.

SHI, Yi; RIESE, David J. II; SHEN, Jianzhong. The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis in Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, [S. l.], v. 0, p. 1969, 2020. DOI: 10.3389/FPHAR.2020.574667.

SHI, Yufang; WANG, Yu; LI, Qing; LIU, Keli; HOU, Jianquan; SHAO, Changshun; WANG, Ying. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nature Reviews Nephrology*, 2018. DOI: 10.1038/s41581-018-0023-5.

SHIKADA, Yasunori et al. Platelet-Derived Growth Factor-AA Is an Essential and Autocrine Regulator of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Non-Small Cell Lung Carcinomas. [S. l.], 2005. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4171. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

SHOWALTER, Megan R. et al. Primed mesenchymal stem cells package exosomes with metabolites associated with immunomodulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [S. l.], v. 512, n. 4, p. 729–735, 2019. DOI: 10.1016/J.BBRC.2019.03.119.

STOLZING, A.; JONES, E.; MCGONAGLE, D.; SCUTT, A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development*, [S. l.], 2008. DOI: 10.1016/j.mad.2007.12.002.

SUBRAMANIAN, Arjunan; FONG, Chui-Yee; BISWAS, Arijit; BONGSO, Ariff. Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. *PLOS ONE*, [S. l.], v. 10, n. 6, p. e0127992, 2015. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0127992. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0127992>. Acesso em: 27 ago. 2021.

SWEENEY, Mark; FOLDES, Gabor. It Takes Two: Endothelial-Perivascular Cell Cross-Talk in Vascular Development and Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, [S. l.], v. 0, p. 154, 2018. DOI: 10.3389/FCVM.2018.00154.

SZADE, Agata; SZADE, Krzysztof; MAHDI, Mahdi; JÓZKOWICZ, Alicja. The role of heme oxygenase-1 in hematopoietic system and its microenvironment. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2021 78:10, [S. l.], v. 78, n. 10, p. 4639–4651, 2021. DOI: 10.1007/S00018-021-03803-Z. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-021-03803-z>. Acesso em: 30 ago. 2021.

T, Kaga; H, Kawano; M, Sakaguchi; T, Nakazawa; Y, Taniyama; R, Morishita. Hepatocyte growth factor stimulated angiogenesis without inflammation: differential actions between hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Vascular pharmacology*, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 3–9, 2012. DOI: 10.1016/J.VPH.2012.02.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22361334/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

T, Lin; D, Wang; J, Chen; Z, Zhang; Y, Zhao; Z, Wu; Y, Wang. IL-24 inhibits the malignancy of human glioblastoma cells via destabilization of Zeb1. *Biological chemistry*, [S. l.], v. 402, n. 7, p. 839–848, 2021. DOI: 10.1515/HSZ-2020-0373. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33894112/>. Acesso em: 26 ago. 2021.

T, Nakamura; Y, Shinohara; S, Momozaki; T, Yoshimoto; K, Noguchi. Co-stimulation with bone morphogenetic protein-9 and FK506 induces remarkable osteoblastic differentiation in rat dedifferentiated fat cells. *Biochemical and biophysical research communications*, [S. l.], v. 440, n. 2, p. 289–294, 2013. DOI: 10.1016/J.BBRC.2013.09.073. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24064349/>. Acesso em: 5 set. 2021.

T, Teklemariam; B, Purandare; L, Zhao; BM, Hantash. Inhibition of DNA methylation enhances HLA-G expression in human mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, [S. l.], v. 452, n. 3, p. 753–759, 2014. DOI: 10.1016/J.BBRC.2014.08.152. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25204503/>. Acesso em: 29 ago. 2021.

TAKEDA, Katsuyuki et al. Activation of p70S6 Kinase-1 in Mesenchymal Stem Cells Is Essential to Lung Tissue Repair. *Stem Cells Translational Medicine*, [S. l.], 2018. DOI: 10.1002/sctm.17-0200.

TAMURA, Shigeki; OHIKE, Atsuo; IBUKI, Rinta; AMIDON, Gordon L.; YAMASHITA, Shinji. Tacrolimus is a class II low-solubility high-permeability drug: The effect of P-glycoprotein efflux on regional

permeability of tacrolimus in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, [S. I.], 2002. DOI: 10.1002/jps.10041.

TELI, Prajakta; KALE, Vijayanti; VAIDYA, Anuradha. Extracellular vesicles isolated from mesenchymal stromal cells primed with neurotrophic factors and signaling modifiers as potential therapeutics for neurodegenerative diseases. *Current Research in Translational Medicine*, [S. I.], v. 69, n. 2, p. 103286, 2021. DOI: 10.1016/J.RETRAM.2021.103286.

TELLO-MONTOLIU, A.; PATEL, J. V.; LIP, G. Y. H. Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, [S. I.], v. 4, n. 9, p. 1864–1874, 2006. DOI: 10.1111/J.1538-7836.2006.01995.X. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1538-7836.2006.01995.x>. Acesso em: 27 ago. 2021.

TIAN, Xiaohu; BROOKES, Oliver; BATTAGLIA, Giuseppe. Pericytes from Mesenchymal Stem Cells as a model for the blood-brain barrier. *Scientific Reports* 2017 7:1, [S. I.], v. 7, n. 1, p. 1–7, 2017. DOI: 10.1038/srep39676. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep39676>. Acesso em: 28 ago. 2021.

TITO, Stefano De; HERVÁS, Javier H.; VLIET, Alexander R. Van; TOOZE, Sharon A. The Golgi as an Assembly Line to the Autophagosome. *Trends in Biochemical Sciences*, [S. I.], v. 45, n. 6, p. 484–496, 2020. DOI: 10.1016/J.TIBS.2020.03.010. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0968000420300876/fulltext>. Acesso em: 29 ago. 2021.

TONG, Mingming; JIANG, Yu. FK506-Binding Proteins and Their Diverse Functions. *Current Molecular Pharmacology*, [S. I.], v. 9, p. 48–65, 2016. DOI: 10.2174/1874467208666150519113541.

TRINH, Thao; BROXMEYER, Hal E. Role for Leptin and Leptin Receptors in Stem Cells During Health and Diseases. *Stem Cell Reviews and Reports* 2021 17:2, [S. I.], v. 17, n. 2, p. 511–522, 2021. DOI: 10.1007/S12015-021-10132-Y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12015-021-10132-y>. Acesso em: 28 ago. 2021.

TSUJI, Wakako et al. Effects of Immunosuppressive Drugs on Viability and Susceptibility of Adipose- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Immunology*, [S. I.], v. 0, n. MAR, p. 131, 2015. DOI: 10.3389/FIMMU.2015.00131.

ULLAH, Mujib; LIU, Daniel D.; THAKOR, Avnesh S. Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *ScienceDirect*, Elsevier Inc., 2019. DOI: 10.1016/j.isci.2019.05.004.

V, Deretic. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism. *Immunity*, [S. I.], v. 54, n. 3, p. 437–453, 2021. DOI: 10.1016/J.IMMUNI.2021.01.018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33691134/>. Acesso em: 30 ago. 2021.

V, Jossen; C, Van den Bos; R, Eibl; D, Eibl. Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges. *Applied microbiology and biotechnology*, [S. I.], v. 102, n. 9, p. 3981–3994, 2018. DOI: 10.1007/S00253-018-8912-X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29564526/>. Acesso em: 30 ago. 2021.

V, Miceli; M, Bulati; G, Iannolo; G, Zito; A, Gallo; PG, Conaldi. Therapeutic Properties of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: The Need of Cell Priming for Cell-Free Therapies in Regenerative Medicine. *International journal of molecular sciences*, [S. I.], v. 22, n. 2, p. 1–20, 2021. DOI: 10.3390/IJMS22020763. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33466583/>. Acesso em: 30 ago. 2021.

V, Orticelli et al. Human amniotic mesenchymal stromal cells support the ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem cells. *Stem cells translational medicine*, [S. I.], p. sctm.21-0130, 2021. DOI: 10.1002/SCTM.21-0130. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34327849/>. Acesso em: 26 ago. 2021.

VASANDAN, Anoop Babu; JAHNAVI, Sowmya; SHASHANK, Chandanala; PRASAD, Priya; KUMAR, Anujith; JYOTHI PRASANNA, S. Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by



altering their metabolic status via a PGE 2 -dependent mechanism. *Scientific Reports*, [S. I.], v. 6, 2016. DOI: 10.1038/srep38308.

VIRGILIO, Francesco Di; SARTI, Alba Clara; COUTINHO-SILVA, Robson. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00053.2020>, [S. I.], v. 318, n. 5, p. C832–C835, 2020. DOI: 10.1152/AJPCELL.00053.2020. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpcell.00053.2020>. Acesso em: 30 ago. 2021.

VISWANATHAN, Sowmya et al. Consensus International Council for Commonality in Blood Banking Automation–International Society for Cell & Gene Therapy statement on standard nomenclature abbreviations for the tissue of origin of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, [S. I.], v. 0, n. 0, 2021. DOI: 10.1016/J.JCYT.2021.04.009. Disponível em: <http://www.isct-cytotherapy.org/article/S1465324921006447/fulltext>. Acesso em: 28 ago. 2021.

WANG, Raorao; SHEN, Zhongyang; YANG, Liu; YIN, Mingli; ZHENG, Weiping; WU, Bin; LIU, Tao; SONG, Hongli. Protective effects of heme oxygenase-1-transduced bone marrow-derived mesenchymal stem cells on reduced-size liver transplantation: Role of autophagy regulated by the ERK/mTOR signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, [S. I.], v. 40, n. 5, p. 1537–1548, 2017. DOI: 10.3892/IJMM.2017.3121. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2017.3121/abstract>. Acesso em: 30 ago. 2021.

WANG, Xingbing; ZHU, Yunxia; XU, Bo; WANG, Jing; LIU, Xin. Identification of TLR2 and TLR4-induced microRNAs in human mesenchymal stem cells and their possible roles in regulating TLR signals. *Molecular Medicine Reports*, [S. I.], v. 13, n. 6, p. 4969–4980, 2016. DOI: 10.3892/mmr.2016.5197.

WANG, Ying; CHEN, Xiaodong; CAO, Wei; SHI, Yufang. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: Pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, , 2014. DOI: 10.1038/ni.3002.

WEISS, Daniel J.; ENGLISH, Karen; KRASNODEMBSKAYA, Anna; ISAZA-CORREA, Johana M.; HAWTHORNE, Ian J.; MAHON, Bernard P. The Necrobiology of Mesenchymal Stromal Cells Affects Therapeutic Efficacy. *Frontiers in Immunology*, [S. I.], v. 0, n. JUN, p. 1228, 2019. DOI: 10.3389/FIMMU.2019.01228.

WEISS, Daniel J.; ENGLISH, Karen; KRASNODEMBSKAYA, Anna; ISAZA-CORREA, Johana M.; HAWTHORNE, Ian J.; MAHON, Bernard P. The Necrobiology of Mesenchymal Stromal Cells Affects Therapeutic Efficacy. *Frontiers in Immunology*, [S. I.], v. 0, n. JUN, p. 1228, 2019. DOI: 10.3389/FIMMU.2019.01228.

WISCHHUSEN, Jörg; MELERO, Ignacio; FRIDMAN, Wolf Herman. Growth/Differentiation Factor-15 (GDF-15): From Biomarker to Novel Targetable Immune Checkpoint. *Frontiers in Immunology*, [S. I.], v. 0, p. 951, 2020. DOI: 10.3389/FIMMU.2020.00951.

WU, Hong Hui; ZHOU, Yi; TABATA, Yasuhiko; GAO, Jian Qing. Mesenchymal stem cell-based drug delivery strategy: from cells to biomimetic. *Journal of Controlled Release*, [S. I.], v. 294, p. 102–113, 2019. DOI: 10.1016/J.JCONREL.2018.12.019.

WURZER, Bettina; ZAFFAGNINI, Gabriele; FRACCHIOLLA, Dorotea; TURCO, Eleonora; ABERT, Christine; ROMANOV, Julia; MARTENS, Sascha. Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy. *eLife*, [S. I.], v. 4, n. September 2015, 2015. DOI: 10.7554/ELIFE.08941.

XING, Huifang; TAN, Jin; MIAO, Yuyang; LV, Yingmei; ZHANG, Qiang. Crosstalk between exosomes and autophagy: A review of molecular mechanisms and therapies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, [S. I.], v. 25, n. 5, p. 2297–2308, 2021. DOI: 10.1111/JCMM.16276. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jcmm.16276>. Acesso em: 5 set. 2021.

XQ, Yang; SY, Yu; L, Yu; L, Ge; Y, Zhang; ZH, Hao; GS, Liu. Effects of tacrolimus on autophagy protein LC3 in puromycin-damaged mouse podocytes. *The Journal of international medical research*, [S. I.], v.

48, n. 12, 2020. DOI: 10.1177/0300060520971422. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33322998/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

XS, Xu; N, Shao; XT, Duan; X, Zhang; YF, Zhang. Tacrolimus alleviates Ox-LDL damage through inducing vascular endothelial autophagy. *European review for medical and pharmacological sciences*, [S. l.], v. 22, n. 10, p. 3199–3206, 2018. DOI: 10.26355/EURREV\_201805\_15081. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29863266/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

XU, Dixon H.; ZHU, Ziwen; WAKEFIELD, Mark R.; XIAO, Huaping; BAI, Qian; FANG, Yujiang. The role of IL-11 in immunity and cancer. *Cancer Letters*, [S. l.], v. 373, n. 2, p. 156–163, 2016. DOI: 10.1016/J.CANLET.2016.01.004.

XULIN-LIN et al. Impaired Function of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Immune Thrombocytopenia Patients in Inducing Regulatory Dendritic Cell Differentiation Through the Notch-1/Jagged-1 Signaling Pathway. <https://home.liebertpub.com/scd>, [S. l.], v. 26, n. 22, p. 1648–1661, 2017. DOI: 10.1089/SCD.2017.0078. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2017.0078>. Acesso em: 30 ago. 2021.

XY, Zhu; N, Klomjit; SM, Conley; MM, Ostlie; KL, Jordan; A, Lerman; LO, Lerman. Impaired immunomodulatory capacity in adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells isolated from obese patients. *Journal of cellular and molecular medicine*, [S. l.], p. jcmm.16869, 2021. DOI: 10.1111/JCMM.16869. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34418300/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

Y, Mo; Z, Wang; J, Gao; Y, Yan; H, Ren; F, Zhang; N, Qi; Y, Chen. Comparative study of three types of mesenchymal stem cell to differentiate into pancreatic  $\beta$ -like cells in vitro. *Experimental and therapeutic medicine*, [S. l.], v. 22, n. 3, 2021. a. DOI: 10.3892/ETM.2021.10368. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34335885/>. Acesso em: 26 ago. 2021.

Y, Wang; JL, Wang; HC, Ma; ZT, Tang; HR, Ding; XL, Shi. Mesenchymal stem cells increase heme oxygenase 1-activated autophagy in treatment of acute liver failure. *Biochemical and biophysical research communications*, [S. l.], v. 508, n. 3, p. 682–689, 2019. DOI: 10.1016/J.BBRC.2018.11.146. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30528392/>. Acesso em: 30 ago. 2021.

Y, Xie; F, Chen; L, Jia; R, Chen; VW, Zhang; X, Zhong; D, Wang. Mesenchymal stem cells from different sources show distinct therapeutic effects in hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia in rats. *Journal of cellular and molecular medicine*, [S. l.], 2021. b. DOI: 10.1111/JCMM.16817. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34322990/>. Acesso em: 26 ago. 2021.

YANG, Mingjie; ZHANG, Yingmei; REN, Jun. Autophagic Regulation of Lipid Homeostasis in Cardiometabolic Syndrome. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, [S. l.], v. 0, p. 38, 2018. DOI: 10.3389/FCVM.2018.00038.

YUAN, Chun-Hui et al. Amphiregulin activates regulatory T lymphocytes and suppresses CD8 + T cell-mediated anti-tumor response in hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, [S. l.], v. 6, n. 31, p. 32138–32153, 2015. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.5171. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/article/5171/text/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

Z, Zhang et al. Clearance of apoptotic cells by mesenchymal stem cells contributes to immunosuppression via PGE2. *EBioMedicine*, [S. l.], v. 45, p. 341–350, 2019. DOI: 10.1016/J.EBIOM.2019.06.016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31248835/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

Z, Zhong; H, Gu; J, Peng; W, Wang; BH, Johnstone; KL, March; MR, Farlow; Y, Du. GDNF secreted from adipose-derived stem cells stimulates VEGF-independent angiogenesis. *Oncotarget*, [S. l.], v. 7, n. 24, p. 36829–36841, 2016. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.9208. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27167204/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

ZENG, Hanyu; ZHANG, Rong; JIN, Boquan; CHEN, Lihua. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cellular & Molecular Immunology* 2015 12:5, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 566–

571, 2015. DOI: 10.1038/cmi.2015.44. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/cmi201544>. Acesso em: 27 ago. 2021.

ZHAO, Lingfei; HU, Chenxia; ZHANG, Ping; JIANG, Hua; CHEN, Jianghua. Preconditioning strategies for improving the survival rate and paracrine ability of mesenchymal stem cells in acute kidney injury *Journal of Cellular and Molecular Medicine* Blackwell Publishing Inc, 2019. DOI: 10.1111/jcmm.14035.

ZHAO, Ting; SU, Zhongping; LI, Yingchang; ZHANG, Xiaoren; YOU, Qiang. Chitinase-3 like-protein-1 function and its role in diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1, [S. I.], v. 5, n. 1, p. 1–20, 2020. DOI: 10.1038/s41392-020-00303-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00303-7>. Acesso em: 26 ago. 2021.

ZHAO, Yong; ZHANG, Haiyang. Update on the mechanisms of homing of adipose tissue–derived stem cells. *Cytotherapy*, [S. I.], v. 18, n. 7, p. 816–827, 2016. DOI: 10.1016/J.JCYT.2016.04.008. Disponível em: <http://www.isct-cytotherapy.org/article/S146532491630367X/fulltext>. Acesso em: 29 ago. 2021.

ZHOU, Tian; YUAN, Zenan; WENG, Jianyu; PEI, Duanqing; DU, Xin; HE, Chang; LAI, Peilong. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *Journal of Hematology & Oncology* 2021 14:1, [S. I.], v. 14, n. 1, p. 1–24, 2021. DOI: 10.1186/S13045-021-01037-X. Disponível em: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-021-01037-x>. Acesso em: 28 ago. 2021.

ZHOU, Yueyuan; YAMAMOTO, Yusuke; XIAO, Zhongdang; OCHIYA, Takahiro. The Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stromal/Stem Cells Mediated via Paracrine Activity. *Journal of Clinical Medicine*, [S. I.], v. 8, n. 7, p. 1025, 2019. DOI: 10.3390/jcm8071025.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo I



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP n°. 020/2020  
kms

Ribeirão Preto, 18 de junho de 2020.

A  
Prof.ª, Dr.ª, Kelen Ribeiro Malmegrin de Farias  
Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas  
FCFRP/USP

Prezada Senhora,

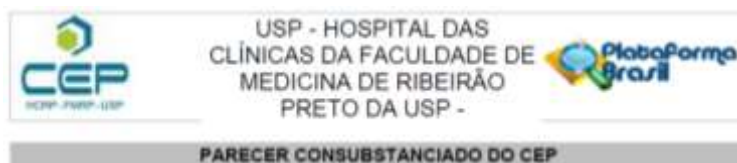
Informamos que a criação do Biorrepositório sob sua responsabilidade intitulado "BIORREPOSITÓRIO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE CORDÃO UMBILICAL" foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP em sua 198ª reunião ordinária, realizada em 18/06/2020.

De acordo com a Resolução CNS n° 441, de 12 de maio de 2011, o prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa, e pode ser autorizado por até dez anos. Lembramos que ainda, que, de acordo com a Resolução 441/11, toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado deverá ser submetida para aprovação deste CEP e que a legislação brasileira veda o patenteamento e a utilização comercial de material biológico humano armazenado em Biorrepositórios.

Atenciosamente,

  
Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado  
Coordenadora do CEP/FCFRP

## 9.2. Anexo II



### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Caracterização fenotípica e funcional de células mesenquimais estromais preconditionadas com agentes farmacológicos.

**Pesquisador:** José Lucas Martes Rocha

**Área Temática:**

**Versão:** 2

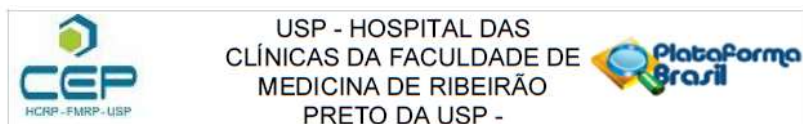
**CAAE:** 40631520.8.0000.5440

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.536.135



Continuação do Parecer: 4.536.135

Caracterizar o perfil epigenético de UC-MSC preconditionadas com tacrolimo ou 5-azacitidina;

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Riscos:** Riscos Relacionados à Coleta de Sangue: os riscos que podem ocorrer são um desconforto passageiro devido à picada da agulha no momento da coleta, e posteriormente, a formação de hematomas no local da punção com sensação dolorosa. Riscos Relacionados ao isolamento de células mesenquimais: Não oferece riscos, uma vez que as células utilizadas são relativas a um biorrepositório preestabelecido. **Benefícios:** No futuro, os resultados obtidos nessa pesquisa fornecerão dados substanciais à modalidades de priming envolvendo células MSC (com as drogas escolhidas para este projeto) e poderá se tornar uma possível forma de terapia celular personalizada

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os autores propuseram TCLE para a obtenção de sangue periférico (20 mL) de pessoas normais e solicitaram a dispensa de aplicação de TCLE para a utilização das MSC, armazenadas em biorrepositório aprovado na FCFRP-USP.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos obrigatórios constam do protocolo de pesquisa.

#### Recomendações:

Pendências tratadas adequadamente.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

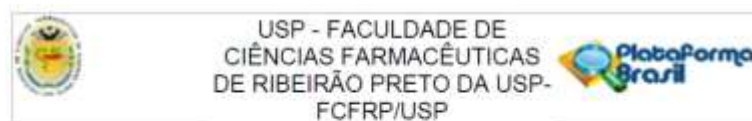
Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão 02 21/01/2021, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido TCLE Versão 02, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.049-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

### 9.3. Anexo III



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Caracterização fenotípica e funcional de células mesenquimais estromais, condicionadas com agentes farmacológicos

**Pesquisador:** José Lucas Martins Rocha

**Área Temática:**

**Versão:** 1

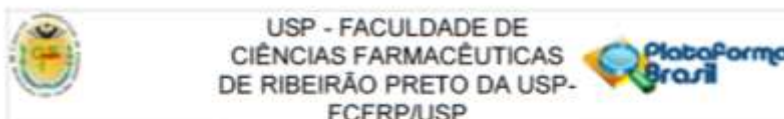
**CAAE:** 40631520.8.3001.5403

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.651.687



Continuação do Parecer: 4.651.687

diferenciação de UC-MSC pré-condicionadas com tacrolimo ou 5-azacitidina;

2. Avaliar a capacidade funcional de imunossupressão, imunomodulação e angiogênese das hUC-MSC in vitro pré-condicionadas com tacrolimo ou 5-azacitidina;

3. Caracterizar o perfil epigenético de UC-MSC pré-condicionadas com tacrolimo ou 5-azacitidina;

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos relacionados à coleta de sangue: possível desconforto passageiro devido à picada de agulha no momento da coleta e, posteriormente, formação de hematomas no local da punção com sensação dolorosa. Riscos relacionados ao isolamento de células mesenquimais: não oferece riscos uma vez que as células utilizadas são relativas a um biorepositório pre-estabelecido.

Benefícios: No futuro, os resultados obtidos nesta pesquisa fornecerão dados substanciais à modalidade de priming envolvendo células MSC (com as drogas escolhidas para este projeto) e poderá se tomar uma possível forma de terapia celular personalizada.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a declarar.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: declaração de ciência e compromisso ético dos pesquisadores, autorização da infraestrutura necessária para a realização da pesquisa, declaração de aprovação do biorepositório, termo de consentimento livre e esclarecido para o grupo de obtenção de sangue periférico em indivíduos saudáveis e solicitação de dispensa de TCLE para utilização das células mesenquimais estromais obtidas em biorepositório pre-estabelecido.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer da Instituição proponente.

O CEP da FCFRP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Diante disso, a FCFRP/USP, como instituição coparticipante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas

Endereço: Avenida do Café s/nº  
 Bairro: Monte Alegre CEP: 14.940-000  
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
 Telefone: (16)3315-4213 Fax: (16)3315-4892 E-mail: cep@fdcp.usp.br