

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

Vitoria Guero Korb

**SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NA
MODULAÇÃO DE PROCESSOS
INFLAMATÓRIOS: NO
TRATAMENTO DA COVID-19 E NO
POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO
DAS CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2024**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

UFCSPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitoria Guero Korb

**SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NA MODULAÇÃO DE PROCESSOS
INFLAMATÓRIOS: NO TRATAMENTO DA COVID-19 E NO POTENCIAL
IMUNOMODULATÓRIO DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Rosângela Wink

Coorientadora: Dr^a Liziane Raquel Beckenkamp

Porto Alegre

2024

Catálogo na Publicação

Korb , Vitoria Guero

SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NA MODULAÇÃO DE PROCESSOS
INFLAMATÓRIOS : NO TRATAMENTO DA COVID-19 E NO POTENCIAL
IMUNOMODULATÓRIO DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS /
Vitoria Guero Korb . -- 2024.

84 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2024.

Orientador(a): Dr^a Márcia Rosângela Wink ;
coorientador(a): Dr^a Liziane Raquel Beckenkamp.

1. Sistema Purinérgico. 2. COVID-19. 3. Tratamento
farmacológico . 4. Células Estromais Mesenquimais . 5.
Inosina . I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação e o título à minha mãe, Suzana Maria Guero Korb, que sempre foi e sempre será meu porto seguro e maior motivadora nesta jornada acadêmica. Dedico, em especial, esta dissertação ao meu pai, Oscar Francisco Korb, de quem nos despedimos ao longo deste período do mestrado, e que deixará eternas saudades. Vocês são minha eterna motivação para continuar estudando, pois precisamos da ciência para que despedidas prematuras não precisem acontecer e, ao redor do mundo, todos tenham a chance de manter vivas as pessoas que amamos. Dona Suzana e senhor Oscar, obrigada pela vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu noivo, Luis Augusto Ferrão Avancini, pelo apoio incondicional e amor infindável durante todo o curso dessa jornada.

Agradeço à minha orientadora, professora Dra. Márcia Rosângela Wink, e à minha coorientadora, Dra. Liziane Raquel Beckenkamp, pela oportunidade, pelas reuniões, e acolhimento desde o início, principalmente por todos os aprendizados e correções que foram essenciais durante este trabalho e formação acadêmica.

Agradeço às minhas colegas de laboratório Priscila, Liliana, Thais, Eloisa, Juliana, Isabele e Alícia, assim como à minha aluna orientada, Gabriela, pela ajuda, cooperação, parceria e risadas ao longo dos experimentos, erros e acertos.

Agradeço à minha família Guero; Ingrid, Graciema, Izabel, Roque, Lorenzo e Helano, à família Korb; Walkiria e Marlena Korb, à extensa e incrível família Silvestro, e aos amigos, Carlos, Kiane, Joseane, Gabriel, Leonardo, Jocemara e Paulo pelo apoio nos momentos mais difíceis que já enfrentei.

Deixo também esta dissertação in memoriam de alguns familiares que infelizmente não estão mais presentes, mas que não serão esquecidos. Meu avô, Albino Guero, o qual me inspirou desde muito pequena a manter-me curiosa, a questionar os meus arredores e a nunca ter vergonha de aprender algo novo.

Deixo, em especial, a lembrança *in memoriam* da incrível médica Bruna Silvestro, do querido Vilso Silvestro e da talentosa Mariza Korb, que sempre estarão no meu coração.

"The scientist is not a person who gives the right answers, he's one who asks the right questions."

Claude Lévi-Strauss

RESUMO

Este estudo revela perspectivas promissoras para futuras aplicações clínicas das células estromais mesenquimais (MSC) em terapias celulares. Ao aprofundarmos a compreensão da sinalização purinérgica e seus potenciais alvos farmacológicos, particularmente em doenças que desequilibram a resposta imune, como a COVID-19, estabelecemos bases sólidas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. A identificação de moduladores eficazes, como aqueles direcionados aos receptores P2Y₁₂ e P2X₇, aponta para caminhos promissores na prevenção de eventos adversos, alívio de sintomas e redução da inflamação generalizada. Ao explorar a influência da inosina em diferentes condições celulares, percebemos que, além de estar presente na resposta inflamatória da COVID-19, ela também desempenha um potencial papel em funções celulares, como a migração e a proliferação das MSC. Essas descobertas não apenas enriquecem nosso entendimento dos mecanismos intrínsecos envolvidos, mas também destacam a relevância de abordagens específicas para maximizar o potencial terapêutico das MSC. Este estudo, portanto, lança luz sobre possíveis aplicações clínicas das MSC, abrindo portas para estratégias mais eficazes e direcionadas no cenário das terapias celulares.

Palavras-chave: MSCs, Inflamação, COVID-19, sistema purinérgico, Inosina.

ABSTRACT

This study reveals promising perspectives for future clinical applications of mesenchymal stromal cells (MSC) in cellular therapies. By deepening our understanding of purinergic signaling and its potential pharmacological targets, particularly in diseases that disrupt the immune response, such as COVID-19, we establish a solid foundation for the development of new therapeutic strategies. The identification of effective modulators, such as those targeting P2Y₁₂ and P2X₇ receptors, points to promising pathways for preventing adverse events, relieving symptoms, and reducing widespread inflammation. By exploring the influence of inosine under different cellular conditions, we observe that, in addition to being present in the inflammatory response of COVID-19, it also plays a potential role in cellular functions, such as MSC migration and proliferation. These findings not only enhance our understanding of the intrinsic mechanisms involved but also highlight the relevance of specific approaches to maximize the therapeutic potential of MSCs. Therefore, this study sheds light on possible clinical applications of MSCs, opening doors to more effective and targeted strategies in the realm of cellular therapies.

Key words: MSCs, inflammation, COVID-19, purinergic system, Inosine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – A cascata de sinalização purinérgica.....	16
Figura 02 – Patologias e síndromes relacionadas ao sistema purinérgico.....	18
Figura 03 – Isolamento e aplicabilidade clínica das MSCs.....	21
Figura 04 – Características das MSCs.....	22
Figura 05 – Visão geral da degradação e formação da Inosina.....	26
Figura 06 – Liberação e degradação da Inosina nas células.....	28
Figura 07 – Caracterização das MSCs por citometria de fluxo.....	57
Figura 08 – Caracterização das MSCs por ensaio de diferenciação.....	58
Figura 09 – Histograma das citometrias das ADSCs	60
Figura 10 – Histograma das citometrias das PDs	60
Figura 11 – Histograma das citometrias das TCUs	61
Figura 12 – Citometrias do antiporpo ADA.....	61
Figura 13 – Citometrias do anticorpo CD26.....	62
Figura 14 – Citometrias do anticorpo PNP.....	62
Figura 15 – Ensaio de adesão das MSCs.....	64
Figura 16 – Ensaio de proliferação das MSCs.....	65
Figura 17 – Ensaio de migração das MSCs.....	67

LISTA DE ABREVIACÕES

ADO	Adenosina
P1	Receptores acoplados à proteína G responsivos a adenosina
P2X	Receptores canais iônicos responsivos a ATP
P2Y	Receptores acoplados à proteína G responsivos a purinas e pirimidinas
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
INO	Inosina
HIPO	Hipoxantina
E-NPPs	Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
ENTPs	Ectonucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases
CD73	Ecto-5'-nucleotidase
ADA	Adenosina deaminase
CNTs	Transportadores de nucleosídeos concentrativos
ENTs	Transportadores de nucleosídeos equilibrativos
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
NF-kb	Fator nuclear-kb
AKT	Quinase de proteína B
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
MSCs	Células Estromais Mesenquimais
ADSC	Células Estromais Mesenquimais de Tecido Adiposo
PD	Células Estromais Mesenquimais de Polpa de Dente
TCU	Células Estromais Mesenquimais de Tecido de Cordão Umbilical
IMP	Ácido inosínico
ENTs	Equilibrative nucleoside transporters
PNP	Enzima purine nucleoside fosforilase
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase
XO	Xantina Oxidase
PDE	Enzima Fosfodiesterase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 SISTEMA PURINÉRGICO	15
2.2 SISTEMA PURINÉRGICO NA PATOFISIOLOGIA DE DOENÇAS.....	17
2.2.1 SISTEMA PURINÉRGICO NO QUADRO INFLAMATÓRIO DA COVID-19	19
2.3 SISTEMA PURINÉRGICO NA FUNÇÃO DAS MSCs.....	20
2.3.1 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS	20
2.3.2 SISTEMA PURINÉRGICO E A INOSINA	24
2.3.3 INOSINA NO CONTEXTO INFLAMATÓRIO.....	30
3. HIPÓTESE.....	31
4. JUSTIFICATIVA.....	31
5. OBJETIVO.....	32
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO I.....	33
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO II.....	33
6. CAPÍTULO I – ARTIGO DE REVISÃO	34
7. CAPÍTULO II – A INOSINA NAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE DIFERENTES TECIDOS	52
7.1 METODOLOGIA	53
7.1.1 COMITÊ DE ÉTICA	53
7.1.2 MATERIAIS E MÉTODOS	53
7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
7.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MSC DE DIFERENTES TECIDOS DE EXTRAÇÃO.....	56
7.2.2 EXPRESSÃO PROTEICA DAS ENZIMAS ADA, CD26 E PNP DAS CÉLULAS DE TECIDO ADSC, TCU E PD.....	59
7.2.3 EFEITO DA INO NA CAPACIDADE DE ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR DE DIFERENTES TECIDOS DE EXTRAÇÃO.....	63
7.2.4 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INOSINA AFETAM A CAPACIDADE MIGRATÓRIA NAS MSCS PROVENIENTES DE DIFERENTES TECIDOS DE EXTRAÇÃO.....	66
7.2.5 INOSINA NA CAPACIDADE MULTIPOTENTE DAS	

MSCS.....	68
7.2.6 INOSINA NA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA.....	68
7.2.7 INOSINA NA DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA E OSTEOGÊNICA.....	69
7.2.8 INOSINA NO CONTEXTO INFLAMATÓRIO.....	70
8. CONCLUSÃO.....	71
9. PERSPECTIVAS	72
10.REFERÊNCIAS.....	73
11.ANEXOS.....	82

1. INTRODUÇÃO

Esta dissertação busca proporcionar uma compreensão abrangente do sistema purinérgico em sua influência na modulação da inflamação e no impacto subsequente sobre as células mesenquimais estromais. Ao explorar a liberação e degradação de nucleotídeos e nucleosídeos, examinaremos como esse complexo sistema pode desencadear respostas inflamatórias e, por sua vez, pontencialmente afetar as MSC e suas funções celulares. Organizada em dois capítulos distintos, a dissertação inicia-se com uma análise crítica do artigo de revisão “A Systematic Review of the Role of Purinergic Signalling Pathway in the Treatment of COVID-19”, abordando aspectos fundamentais do sistema purinérgico na regulação inflamatória. O segundo capítulo concentra-se no potencial de modulação da função celular da inosina nas MSC de diferentes fontes de origem, ampliando ainda mais nossa compreensão das interações complexas entre o sistema purinérgico, imunológico e de da atividade celular.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SISTEMA PURINÉRGICO

Por décadas purinas e pirimidinas, também conhecidas como nucleotídeos e nucleosídeos, têm sido reconhecidas como elementos fundamentais da bioenergética, sendo vitais para a homeostasia do corpo humano. Entretanto sabe-se hoje que tais moléculas também participam de outras funções fisiológicas. Foram descrita inicialmente em 1929 por Albert Szent-Gyorgyi e Alan Drury, em um trabalho onde comprovaram que a injeção intravenosa de adenina em cobaias perturbava o ritmo cardíaco através da funcionalidade da adenosina na sinalização extracelular (DRURY; SZENT-GYÖRGYI, 1929). Gradativamente o papel dos nucleotídeos foi reconhecido também por sua participação na neurotransmissão. Em uma publicação em 1972, por Geoffrey Burnstock, onde cunhou a hipótese da neurotransmissão através da sinalização purinérgica, descrevendo a adenosina trifosfato (ATP) como o neurotransmissor não adrenérgico e não colinérgico (BURNSTOCK, 1972).

No entanto, essa hipótese obteve resistência na sua aceitação pela comunidade acadêmica até meados da década de 1990, quando os subtipos de receptores para purinas e pirimidinas foram clonados e caracterizados. Nesta família de receptores inclui-se quatro subtipos do receptor P1 (A1, A2a, A2b e A3) responsivos a adenosina (ADO), sete subtipos de receptores de canal iônico P2X⁽¹⁻⁷⁾ (responsivos a ATP) e oito subtipos do receptor acoplado à proteína G, os P2Y⁽¹⁻¹³⁾ (responsivos a nucleotídeos de purinas e pirimidinas) (BURNSTOCK, 2017).

Desde então, diversos estudos demonstraram que os nucleotídeos extracelulares como o ATP, adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e ADO agem na sinalização celular através desta ampla e refinada gama de receptores. Ademais, o sistema purinérgico inclui os processos celulares autócrinos e parácrinos de liberação, degradação e recaptação destes nucleotídeos e nucleosídeos no ambiente extra e intracelular (**FIGURA 1**).

Estas moléculas podem ser liberadas por meio de diversos canais de proteínas, como conexinas e panexinas, ou por processos de lise e morte celular. Após, a concentração desses nucleotídeos é cuidadosamente regulada por enzimas responsáveis por sua degradação, tais como as ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDases), ectonucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases (E-

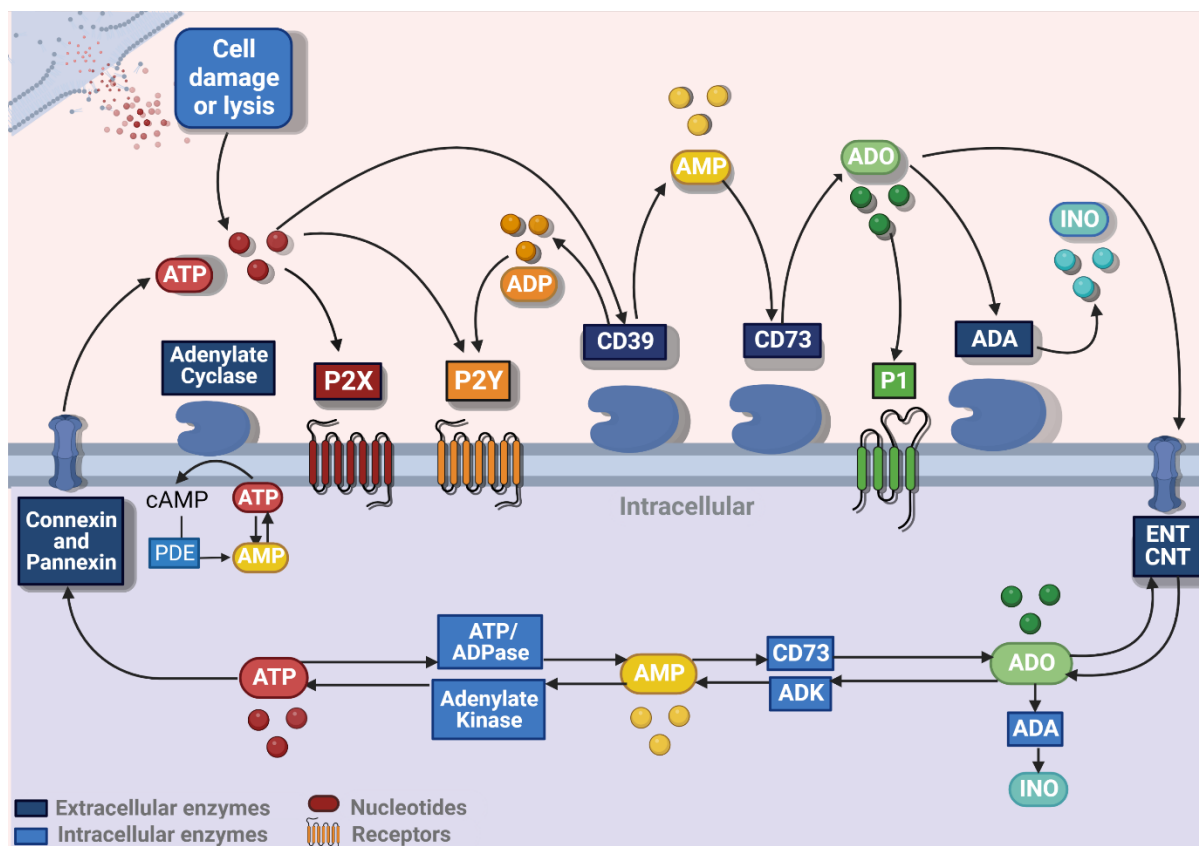


Figura 1 - A cascata de sinalização purinérgica. A liberação de ATP no espaço extracelular leva à ativação dos receptores P2X e P2Y e é hidrolisada por CD39 para ADP, que também ativa os receptores P2Y. O CD39 também hidrolisa o ADP para AMP, que é subsequentemente hidrolisado para adenosina (ADO) pela CD73. A ADO ativa os receptores P1 e pode retornar ao espaço intracelular por meio do ENT/CNT ou ser hidrolisada pela adenosina desaminase (ADA) em inosina (INO). Uma vez que a ADO está dentro do espaço celular, ela pode ser convertida em inosina (INO) pela ADA intracelular ou transformada em AMP pela Adenilato Quinase (ADK), formando ATP pela ADK que pode ser liberado no espaço extracelular por conexinas e panexinas. O ATP intracelular também pode ser hidrolisado em AMP pela ATP/ADPase intracelular e, em seguida, novamente em ADO pela CD73, sendo liberado novamente no espaço extracelular pelo CNT e ENT (Retirado de Korb et al., 2023).

NPPs), ecto-5'-nucleotidase (CD73), fosfatases alcalinas e adenosina deaminase (ADA). Além dos receptores e enzimas, as células possuem transportadores de nucleosídeos concentrativos (CNTs 1-3) ou equilibrativos (ENTs 1-4), que auxiliam na regulação do transporte de nucleosídeos, como a ADO e inosina (INO), entre os espaços intracelulares e extracelulares (GIULIANI; SARTI; DI VIRGILIO, 2019).

Como resultado, essas substâncias desempenham um papel na regulação de várias vias de sinalização intracelular, incluindo a quinase dependente de cAMP (PKA), o fator nuclear- κ B (NF- κ B) e o CREB. Além disso, os receptores P1 têm a

capacidade de modular canais de potássio e cálcio, influenciar a atividade da fosfolipase C e afetar outras vias, como a quinase ativada por mitógenos, a quinase de proteína B (AKT), a fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K), a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), p38 e a quinase c-Jun N-terminal (JNK) (GALGARO et al., 2021).

2.2 SISTEMA PURINÉRGICO NA PATOFISIOLOGIA DE DOENÇAS

Os nucleotídeos e nucleosídeos de purina desempenham um papel importante em mecanismos imunes, de vasodilatação, angiogênese e proliferação celular que podem afetar direta e indiretamente o curso de doenças e infecções, muitas vezes podendo inclusive ter efeitos distintos. Enquanto o ATP exerce principalmente uma função pró-inflamatória, a ADO possui um importante papel imunossupressor, o que torna o sistema purinérgico uma ótima alternativa terapêutica para diversas doenças devido a sua ampla capacidade anti-inflamatória (BOISON; YEGUTKIN, 2019; LINDEN; KOCH-NOLTE; DAHL, 2019).

De fato, não somente os receptores celulares, como também as enzimas deste sistema, já foram apontadas no envolvimento de diversas patologias. No sistema nervoso central, o sistema purinérgico vem sendo investigado pela sua possível participação em doenças psíquicas e neurológicas como Alzheimer, Parkinson, doença de Huntington, Esclerose múltipla, esquizofrenia, desordem bipolar, depressão, ansiedade, autismo e epilepsia. O envolvimento deste sistema nestas doenças dá-se principalmente pelos receptores P2X7, P2X4, P2Y1 e A2A. Os mecanismos dessas patologias ainda não foram totalmente esclarecidos, mas é sabido que receptores como P2X7, P2X4 e P2Y1 podem desempenhar um papel significativo na modulação inflamatória destas condições. Por outro lado, os receptores P1, especialmente o receptor A2A, surgem como promissores alvos terapêuticos para potencial tratamento dessas condições devido à sua ativação e impacto nos processos neuronais (BURNSTOCK, 2017; HUANG *et al.*, 2021).

Os receptores purinérgicos desempenham papéis essenciais em vários sistemas fisiológicos, incluindo circulação sanguínea, rins, pulmões e coração. No sistema circulatório, eles ajudam a controlar o fluxo sanguíneo, agregação plaquetária e resposta imune, podendo contribuir para inflamação renal. Nos pulmões, a ativação desses receptores gera mensageiros secundários e distúrbios no metabolismo das

purinas, que podem desencadear patologias pulmonares inflamatórias. No coração, receptores purinérgicos respondem a ATP e ADO, influenciando contratilidade, frequência cardíaca e fluxo coronariano, além de desempenharem papéis na resposta inflamatória e regulação imunológica cardíaca (BURNSTOCK, 2018).

Esses receptores desempenham também um papel significativo em diversas patologias afetando diferentes órgãos e tecidos. No rim, contribuem para condições como doença renal policística, nefrite, hipertensão e lesão nefrotóxica, principalmente através da ativação dos receptores P2X e P2Y. Nos vasos sanguíneos, estão associados a problemas como hipertensão, aterosclerose e trombose, com possível envolvimento dos receptores P2X, P2Y, A2A e A3. Já nos pulmões, influenciam em condições como fibrose, síndrome do desconforto respiratório agudo e doença pulmonar crônica, destacando-se os receptores P1 e P2X7. No coração, desempenham um papel significativo em patologias como insuficiência cardíaca, fibrose cardíaca, miocardiopatia, hipertrofia cardíaca e lesão de isquemia/reperfusão cardíaca, sendo afetados pelos receptores P2X, P2Y, A1 e A2B. Apesar do entendimento geral dessas associações, é imperativo ressaltar que mais pesquisas são necessárias para uma compreensão aprofundada de seus mecanismos específicos nas diversas patologias (**FIGURA 2**) (BURNSTOCK, 2017; HUANG *et al.*, 2021).

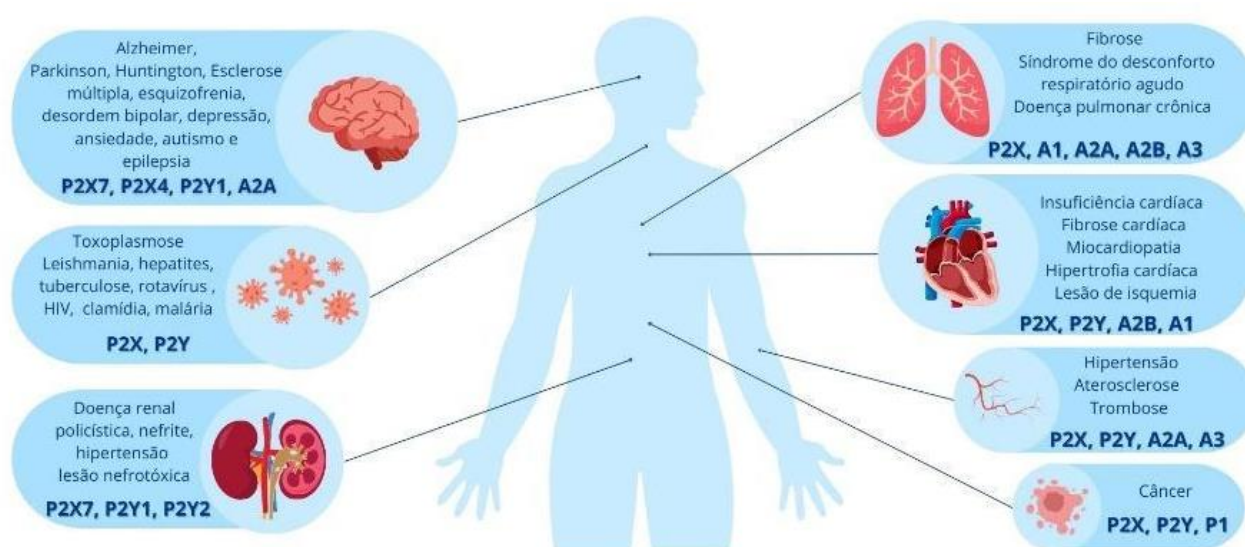


FIGURA 2. Patologias e síndromes relacionadas ao sistema purinérgico e seus respectivos receptores associados. Fonte: autoria própria

Uma das funções que ganharam destaque nos últimos anos é o envolvimento desta via de sinalização no sistema imune e câncer (BURNSTOCK; DI VIRGILIO, 2013; LEDDEROSE *et al.*, 2016a, 2016b; LEE; YILMAZ, 2018). Também estão presentes em diversas patologias infecciosas devido ao alto poder imunomodulatório do sistema purinérgico. São exemplos: toxoplasmose pela ativação dos receptores P2 (MOREIRA-SOUZA; COUTINHO-SILVA, 2021), sepsis pela alta de ATP extracelular (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2011), leishmaniose com a ativação de receptores P2Y (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2011), hepatites virais pela ativação de receptores P2X7 (TAYLOR; HAN, 2010), tuberculose pelo receptor P2X7 (SANTOS *et al.*, 2013), rotavírus pelo receptor P2Y1 (MORALES-SOTO; GULBRANSEN, 2021), HIV pelo receptor P2X1 (HAZLETON; BERMAN; EUGENIN, 2012), clamídia pelo P2X7 (DARVILLE *et al.*, 2007), malária pelos receptores P2Y (GUPTA *et al.*, 2022)(**FIGURA 2**). Devido a todas estas capacidades fisiológicas e patológicas do sistema purinérgico, seu envolvimento na infecção e quadro inflamatório da COVID-19 também foi apontada e estudada, sendo demonstrado possível envolvimento em diversos pontos importantes durante a progressão da doença.

2.2.1 SISTEMA PURINÉRGICO NO QUADRO INFLAMATÓRIO DA COVID-19

Nos últimos anos o sistema purinérgico também foi muito investigado na patofisiologia da COVID-19, uma das doenças virais de maior impacto das últimas décadas (DA SILVA *et al.*, 2022a). Devido à sua alta taxa de expressão de receptores em células imunes, é notável a capacidade desse sistema em transmitir sinais e modular a resposta imunológica. Consequentemente, devido a alta demanda por uma terapia funcional contra a alarmante COVID-19, fármacos capazes de modular enzimas e receptores da via purinérgica se tornaram potenciais candidatos, passando efetivamente por diversos testes *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos em diversas partes do mundo.

De fato, alguns artigos já mostraram uma diminuição dos níveis plasmáticos de ADO e declínio acentuado da expressão de CD73 em linfócitos de pacientes graves de COVID-19 quando comparado com controles (ELSAGHIR *et al.*, 2023), além da diminuição de expressão de adenosina deaminase nos níveis plasmáticos, sendo esta diminuição associada a gravidade do quadro infeccioso (RUD *et al.*, 2023). Além dos níveis elevados de ADO, linfócitos de pacientes de COVID-19 demonstraram também uma capacidade reduzida de hidrólise de ATP e diminuição na expressão dos

receptores P1, havendo inclusive uma diminuição na resposta inflamatória do Sars-Cov-2 com a adição de ADO em experimentos *in vitro* (PIETROBON *et al*, 2022). Tais achados corroboram com a hipótese de que o sistema purinérgico e sua modulação podem contribuir para o quadro inflamatório da COVID-19, levando potencialmente à inclusão desse sistema no planejamento estratégico de futuras abordagens terapêuticas.

Durante o período pandêmico houve a necessidade de redirecionamento dos esforços, investimentos e conhecimento da comunidade científica para atenuar os impactos globais da infecção pelo vírus Sars-Cov-2. O reposicionamento de fármacos tornou-se uma ferramenta útil na busca de tratamentos rápidos e eficazes, abrangendo diversos medicamentos para uma ampla variedade de alvos terapêuticos, incluindo o sistema purinérgico.

Com o objetivo de compilar estas informações, o primeiro tópico desta dissertação aborda uma revisão sistemática que explora o papel da sinalização purinérgica no tratamento da COVID-19, demonstrando não apenas o possível papel dos nucleotídeos extracelulares, enzimas e receptores na patofisiologia da doença, mas também trazendo *insights* significativos sobre suas implicações nas funções celulares, na capacidade de regeneração tecidual e no papel imunomodulatório, o qual será abordado no segundo capítulo.

2.3 SISTEMA PURINÉRGICO COMO POSSÍVEL MECANISMO NA FUNÇÃO DAS MSCs

2.3.1 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

Células Estromais Mesenquimais (MSCs) são células com capacidade multipotente de diferenciação em tecidos mesodérmicos e grande potencial de aplicação clínica. Foram primeiramente isoladas em 1960 por Friedenstein a partir da medula óssea de camundongos, tendo inicialmente demonstrado a capacidade de regeneração e diferenciação em outros tipos celulares de diferentes funções fisiológicas como osteócitos, condrócitos e adipócitos (FRIEDENSTEIN; PIATETZKY-SHAPIRO; PETRAKOVA, 1966).

Estas células podem ser encontradas em vários tipos de tecido do corpo humano e são facilmente extraídas de tecidos geralmente descartados após procedimentos cirúrgicos, como polpa dentária, tecido adiposo e tecido de cordão umbilical (**FIGURA 3**). Outras origens incluem derme, sangue de cordão umbilical, medula óssea, córnea, entre outros (CASAGRANDE PAIM; ROSANGELA WINK, 2022; GALGARO *et al.*, 2023; NAASANI *et al.*, 2017).

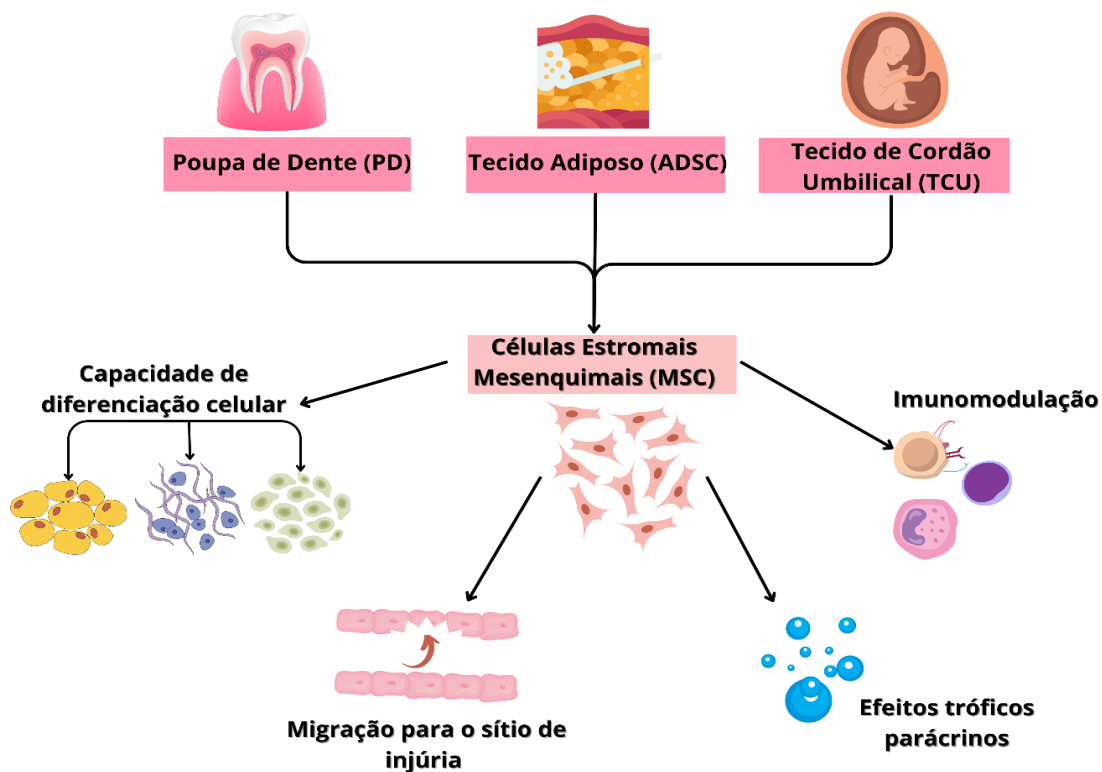


FIGURA 3. ISOLAMENTO E APLICABILIDADE CLÍNICA DAS MSCs. As células estromais mesenquimais (MSCs) são oriundas de tecidos mesodérmicos que podem ser extraídas de tecidos pós cirúrgicos de descarte hospitalar, tal como de poupa de dente, tecido adiposo e tecido de cordão umbilical. MSCs têm alto potencial de aplicabilidade clínica devido a sua capacidade de diferenciação celular, migração para o sítio de injúria, secreção de efeitos tróficos e capacidade imunomodulatória. (Fonte: autoria própria).

Para que uma célula seja confirmada como MSC é necessário que apresente características específicas, como a capacidade de adesão em superfícies plásticas como frasco de cultura, marcadores de membrana negativos (CD14, CD34 e CD45), marcadores de membrana positivos (CD73, CD90 e CD105) e capacidade de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos (**FIGURA 4**) (DOMINICI *et al.*, 2006).

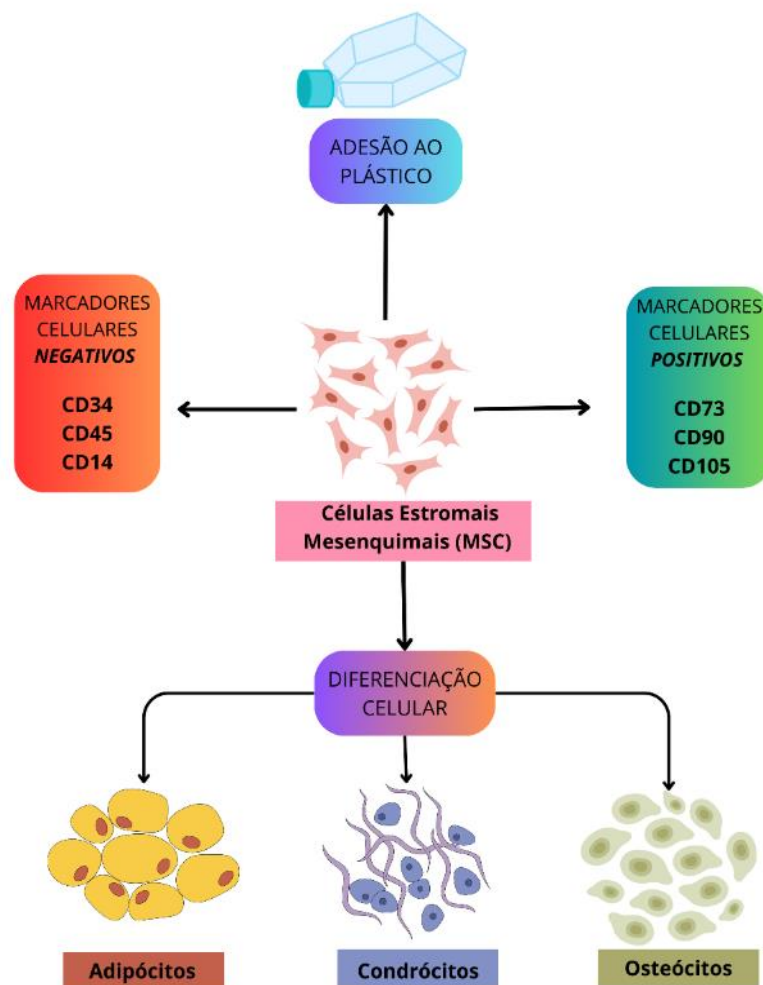


Figura 4. CARACTERÍSTICAS DAS MSCs. Para serem confirmadas com MSCs as células precisam apresentar adesão ao plástico, capacidade de diferenciação celular em adipócitos, condrócitos e osteócitos. Também precisam apresentar os marcadores positivos CD73, CD90 e CD105 e negativos CD34, CD14 e CD45. (Fonte: Autoria própria)

É importante ressaltar que a CD73 não é apenas um marcador para caracterização das MSC, mas também desempenha um papel funcional por meio de sua ação enzimática, sendo responsável pela formação de ADO no ambiente extra e intracelular. Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa destacam a participação da ADO nas principais funções celulares das MSCs, como potencial imunomodulatório, migratório e de diferenciação, bem como seu envolvimento em diversas doenças através da via adenosinérgica (GALGARO *et al.*, 2021). Adicionalmente, temos evidências de que o tecido de origem das MSCs pode influenciar na expressão e função dos componentes da sinalização purinérgica, como na capacidade de hidrólise dos nucleotídeos, apresentando inclusive diferentes expressões dos receptores purinérgicos, afetando sua capacidade imunomodulatória (GALGARO *et al.*, 2023; NAASANI *et al.*, 2017).

As MSCs têm sido objeto de uma ampla gama de estudos clínicos em todo o mundo, abordando uma diversidade de propósitos terapêuticos. O registro de mais de 1000 estudos clínicos na base de dados online ClinicalTrials.gov é uma demonstração da crescente aplicabilidade dessas células na medicina regenerativa em terapias celulares (GALGARO *et al.*, 2021). Seu potencial clínico destaca-se pela capacidade de autorrenovação, diferenciação celular, de migração para sítios de injúria celular e secreção de fatores bioativos que levam às modulações parácrina e imunológica (**FIGURA 3**) (BECKENKAMP *et al.*, 2020; PAIM; WINK, 2022).

Uma alternativa para os mecanismos de ação de proposta na literatura é a capacidade de reduzir respostas inflamatórias e prevenir danos teciduais em patologias inflamatórias, como a COVID-19. Esses benefícios foram observados através da administração venosa de vesículas extracelulares de MSCs, podendo inclusive ser combinada com tratamentos farmacológicos como Tocilizumabe (SCHULTZ; BERTONI; WINK, 2023). Parte dos efeitos positivos na utilização desta terapia celular pode ser creditada a um componente presente nas MSCs, o RNA circular (circRNA), que demonstrou contribuir para a reparação tecidual, angiogênese e proliferação celular, além de inibir genes associados à morte celular e fatores da cascata de coagulação (PAIM & WINK, 2022).

Entre outras possibilidades clínicas, destaca-se a aplicação de associação de MSCs com scaffolds na medicina regenerativa, utilizando biomateriais (NAASANI *et al.*, 2023), biofilmes (VEDOVATTO *et al.*, 2020), biovidro (RODRIGUES *et al.*, 2019), ferro para dispositivos cardíacos (WERMUTH *et al.*, 2021), entre outros materiais. Estes estudos indicam que as MSCs possuem uma alta capacidade de aplicação na medicina regenerativa.

Um dos mecanismos de ação das MSCs na aplicabilidade clínica está associado, em parte, à sua capacidade de produzir ADO no meio extracelular, um componente crucial na sinalização purinérgica que regula funções celulares e respostas imunes (GALGARO *et al.*, 2021). Apesar dos avanços na consideração da via adenosinérgica como alvo terapêutico em várias patologias, seu papel nas funções terapêuticas das MSCs ainda não foi totalmente explorado.

Portanto, a investigação dos mecanismos envolvendo os nucleotídeos extracelulares, como a ADO, e o impacto dos produtos de sua degradação, como a INO, é de suma importância para o estabelecimento de terapias celulares com MSCs. Ainda, considerando que MSCs de diferentes origens possuem diferentes

capacidades de hidrólise dos nucleotídeos (GALGARO *et al.*, 2023), a escolha do tecido de origem dessas células poderá influenciar no potencial regenerativo e, conseqüentemente, no sucesso da aplicabilidade clínica. Apesar da importância potencial, a compreensão detalhada dos efeitos da ADO e de produtos da sua composição, como a INO, na regulação da inflamação permanece limitada, tornando-a uma área promissora para investigações mais aprofundadas.

2.3.2 SISTEMA PURINÉRGICO E A INOSINA

Dentro da vasta gama de moléculas envolvidas na sinalização purinérgica, a INO, um componente pouco explorado, poderia desempenhar um papel significativo na modulação dos efeitos inflamatórios. A INO é um nucleosídeo pertencente ao grupo das purinas, apresentando uma estrutura composta por uma molécula de hipoxantina (HIPO) ligada a uma ribose (SRINIVASAN; TORRES; RIBAS DE POUPLANA, 2021) (**FIGURA 5**).

A INO, formada pela desaminação da ADO, é liberada durante o metabolismo celular, tendo uma meia-vida *in vivo* mais longa que a ADO, de aproximadamente 15 horas. Nos fluidos intersticiais, seus níveis basais, na faixa de micromolar, superam significativamente os da ADO. Durante condições como isquemia e sepse, os níveis de INO aumentam consideravelmente, chegando a superar 1 mM, persistindo por mais tempo que os da ADO (MOSER; SCHRADER; DEUSSEN, 1989; VIEGAS *et al.*, 2000). Em estados patológicos, os níveis de INO tornam-se significativamente mais elevados do que os da ADO, suscitando questões sobre o significado biológico dessas disparidades nas concentrações de nucleosídeos extracelulares em estados inflamatórios, cuja compreensão ainda não está completamente elucidada (WELIHINDA *et al.*, 2016a).

A INO presente no ambiente extracelular ainda não possui função fisiológica totalmente definida. Entretanto sabe-se que ela é capaz de ativar os receptores P1, responsáveis originalmente pela sinalização da ADO. Alguns estudos vêm comprovando a sinalização da INO através dos receptores P1, sendo eles: A1 (NASCIMENTO *et al.*, 2010), A2A (JUNQUEIRA *et al.*, 2017; WELIHINDA *et al.*, 2018), A2B (WELIHINDA *et al.*, 2016b) e A3 (JIN *et al.*, 1997; SOARES *et al.*, 2015a). Apesar de serem comumente uma única família, esses receptores atuam através do bloqueio ou liberação de AMPc, apresentando potenciais de ação com concentrações diferentes

e inclusive efeitos opostos na geração de AMPc. Os receptores A2A e A2B aumentam a sinalização por AMPc quando ativados, já os receptores A1 e A3 têm a função oposta, bloqueando a produção de AMPc quando ativados (GALGARO *et al.*, 2021).

Além disso, estes receptores possuem afinidades diferentes para ADO, sendo respectivamente de maior afinidade a menor afinidade: A1 (1-10 nM), A2A (30 nM), A3 (100 nM) e A2B (1000 nM) (BOREA *et al.*, 2018) (**FIGURA 6**). Em relação à INO, observa-se que o receptor A1 apresenta maior afinidade, sendo ativado a partir de concentrações de 95 μ M de INO. Os receptores A2B, A3 e A2A também apresentam afinidade pela INO, embora essa afinidade seja mais baixa, sendo ativados por valores de PKi acima de 300 μ M, em ordem decrescente de afinidade (VALADA *et al.*, 2023).

Também já foi descrito o efeito da INO através de receptores A3, os quais foram ativados com concentrações de 50 e 100 μ M em células C32 de melanoma (SOARES *et al.*, 2015b). Já em um outro estudo em células CHO- K1 (Chinese Hamster Ovary type K1) a INO foi capaz de ativar os receptores A2A resultando na produção de AMP cíclico (cAMP) e principalmente na fosforilação das quinases reguladas por sinal extracelular-1 e -2 (ERK1/2), sendo a INO mais eficiente na ativação desta via. Curiosamente, a ADO apresentou a função contrária, ativando majoritariamente a produção de AMPc pelo receptor A2A, demonstrando as diferenças farmacológicas entre esses dois agonistas e possivelmente diferenças em outros mecanismos celulares ainda não elucidados (WELIHINDA *et al.*, 2016).

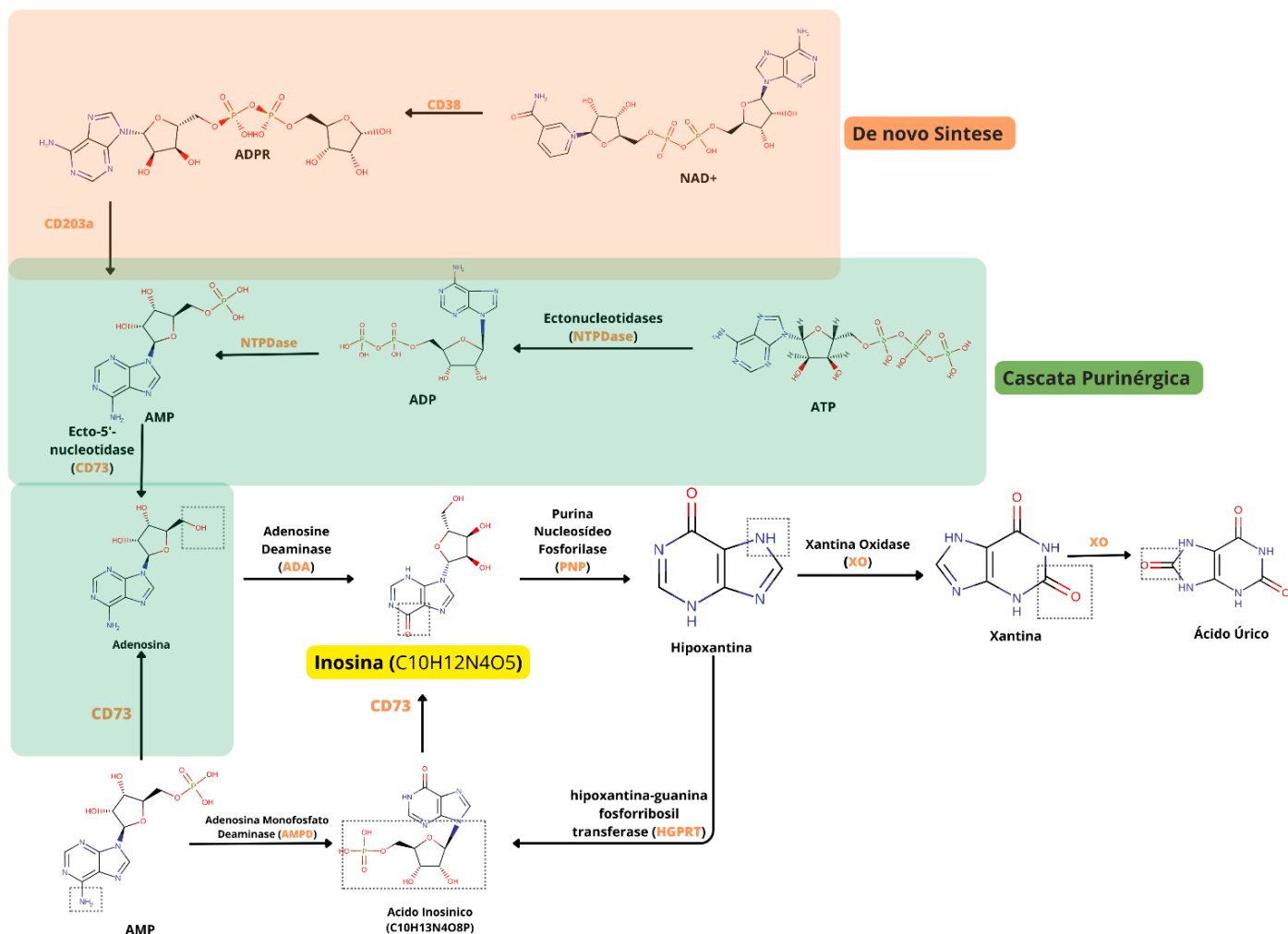


FIGURA 5. Visão geral da degradação e formação de nucleosídeos da cascata purinérgica.

A formação do **AMP** pode se dar através de duas vias distintas conhecidas como a cascata purinérgica e a síntese De Novo. Na síntese De Novo, o **NAD⁺** oxidado é convertido em **ADPR** pela enzima **CD38**, e então, o **ADPR** é degradado em **AMP** pela ação da enzima **CD203a**. A outra via, a cascata purinérgica, envolve a degradação do **ATP** pelas ectonucleotidasas (**NTPDases**). O **AMP** gerado por ambas as vias é subsequente convertido em adenosina (**ADO**) pela enzima Ecto-5'-nucleotidase (**CD73**). A adenosina, por sua vez, pode ser degradada em inosina (**INO**) através da ação da Adenosina Deaminase (**ADA**). A **INO** também pode ser produzida através da hidrólise do ácido inosínico (**IMP**) pela enzima **CD73**. A **INO**, por sua vez, é metabolizada em hipoxantina pela Purina Nucleosídeo Fosforilase (**PNP**). A hipoxantina pode então seguir dois caminhos: o primeiro envolve a ação da enzima Xantina Oxidase (**XO**), que degrada a hipoxantina em xantina e subsequentemente em ácido úrico. O segundo caminho compreende a reciclagem da hipoxantina através da ação da enzima Hipoxantina-guanina-fosforribosil transferase (**HGPRT**), resultando na formação de ácido inosínico (**IMP**). (Fonte: autoria própria)

Na cascata purinérgica, a INO pode ser formada a partir de dois caminhos diferentes; a partir da degradação do ATP até ADO pelas enzimas Ectonucleotidases de 1 a 7 (NTPDases 1-7) e posteriormente até INO pela ação da enzima Adenosina Deaminase (ADA); ou a partir da enzima CD73 pela desfosforilação do ácido inosínico (IMP) (**FIGURA 6**) no meio intracelular (SCHULTZ; BERTONI; WINK, 2022).

Além da sua formação, a INO pode ser transportada para o interior celular através de transportadores de membrana (ENTs) (SOARES *et al.*, 2015c), sendo posteriormente degradada a HIPO pela enzima purine nucleoside fosforilase (PNP), a qual degrada também guanosina em guanina, posteriormente podendo ser transformada também em HIPO (**FIGURA 5 e 6**). A HIPO pode então seguir sendo degradada pelas enzimas xantina oxidase (XO) até a formação de xantina e ácido úrico (GRUNEBAUM *et al.*, 2020) ou ser reciclada pela enzima Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT), formando o ácido inosínico (IMP), o qual poderá se transformar novamente em INO através da desfosforilação pela CD73 (TASCA *et al.*, 2018).

A degradação total de nucleotídeos leva a formação final de ácido úrico ou formação de IMP como mostrado nas **FIGURAS 5 e 6**. A enzima PNP também é responsável pela formação de guanina, a qual pode ser transformada em HIPO através da enzima Guanase (ALONSO-ANDRÉS *et al.*, 2018) ou transformada em xantina pela enzima Guanina desaminase (GIULIANI *et al.*, 2016), como na **FIGURA 6**.

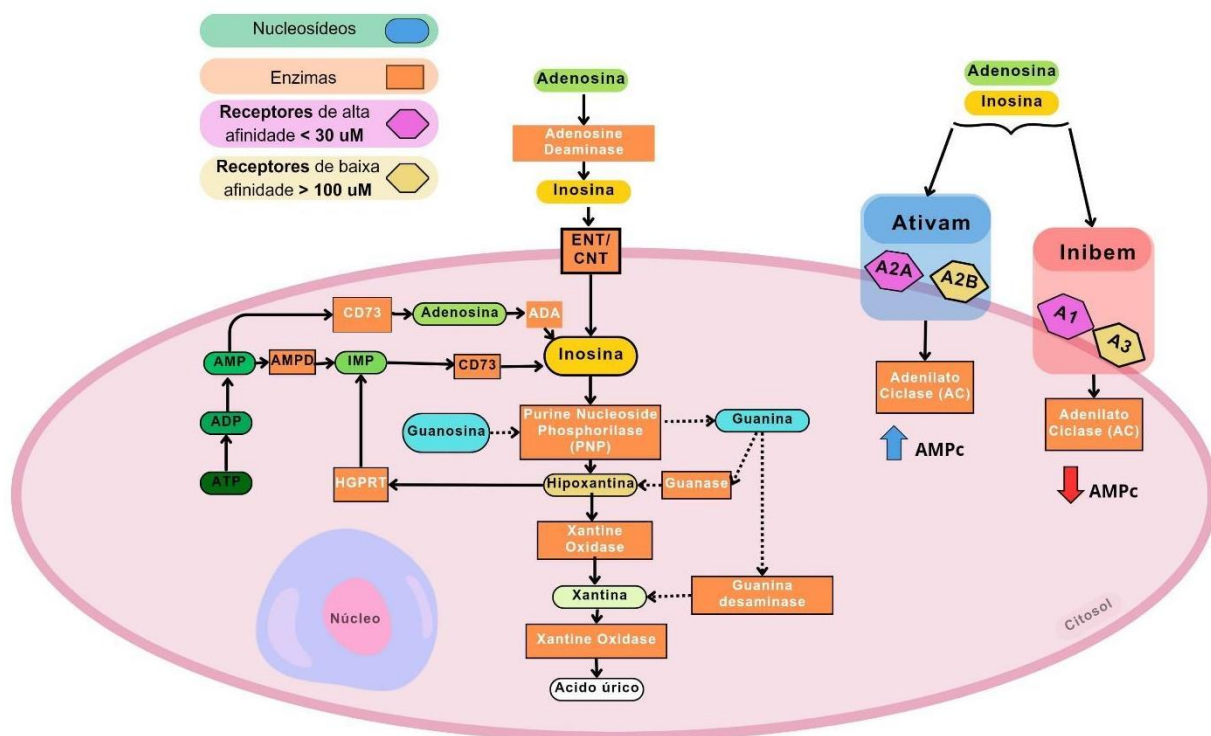


Figura 6. A liberação de INO começa pela degradação de adenosina em INO pela enzima Adenosina desaminase (**ADA**) intra e extracelular. A Inosina formada no meio extracelular pode entrar para a célula pela ação dos transportadores **CNT** e **ENT** ou agir nos receptores da família P1. Estes receptores podem tanto ser de alta afinidade (**A1** e **A2A**) ou baixa afinidade (**A2B** e **A3**), possuindo a capacidade de ativarem (**A2A** e **A2B**) a enzima adenilato ciclase (**AC**) aumentando a concentração do mensageiro secundário **AMPc**, ou de inibirem (**A1** e **A3**) a **AC**, reduzindo a quantidade de **AMPc** no citosol. Dentro da célula a INO formada ou transportada pode passar pela catalização da Purina Nucleosídeo Fosforilase (**PNP**) formando Hipoxantina. A **PNP** pode também hidrolisar a guanosina em guanina, a qual será transformada em hipoxantina pela enzima guanase. A hipoxantina intracelular pode então ser degradada a ácido Inosínico (**IMP**) pela enzima Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (**HGPRT**). Este **IMP** formado tanto pela **HGPRT** quanto pela do **AMP** em **IMP** pela enzima Adenosina Monofosfato Deaminase (**AMPD**) poderá ser então transformado novamente a INO pela **CD73** ou ser finalmente degradado a xantina e ácido úrico pela Xantina Oxidase. (Fonte: autoria própria)

Nas células MSCs os receptores P1, aos quais a INO é responsiva, exercem influência na capacidade multipotente destas células. No contexto da osteogênese, a atividade da CD73 e a sinalização da ADO, sobretudo através do receptor A2B, promovem o comprometimento osteogênico. Na diferenciação condrogênica, é o receptor A2A que exerce influência predominante na estimulação deste processo de diferenciação. Por sua vez, a diferenciação das MSCs na linhagem adipogênica está principalmente associada ao receptor A1. Resumidamente, os receptores P1

desempenham um papel crucial na diferenciação das MSCs, também apresentando um papel positivo na proliferação das MSCs através da ativação dos receptores A1 e A2A. Ademais, também mostram um efeito inibitório sobre as células do sistema imunológico, suprimindo a proliferação, maturação, citotoxicidade e secreção de citocinas pró-inflamatórias por meio da ativação dos receptores P1 (GALGARO *et al.*, 2021).

Além disso, diversas patologias também demonstram o envolvimento da expressão e aumento de atividade da ADA, o qual resulta em acúmulo de INO, tal como artrite reumatoide, estando relacionada à gravidade do enrijecimento e dor nesta patologia (EL-SAID *et al.*, 2022; SACCOL *et al.*, 2019). Seu aumento também foi detectado em casos de tuberculose abdominal (ZHOU *et al.*, 2022) e Doença de Still do adulto de início tardio (AOSD) (Doença inflamatória sistêmica de etiologia desconhecida) (XU *et al.*, 2022), podendo inclusive ser utilizada como ferramenta de diagnóstico de ambas as patologias. Adicionalmente, defeitos herdados na expressão da ADA causam um subtipo de imunodeficiência combinada grave (SCID) (KOHN *et al.*, 2019), presente em diversos tipos de câncer (ZHULAI *et al.*, 2022), e correlacionada à presença de episódios epiléticos em casos de glioma (HUANG *et al.*, 2015). Recentemente, em amostras de sangue de pacientes moderados de COVID-19, o agravamento do quadro foi correlacionada a uma elevação na expressão da ADA em plaquetas (DA SILVA *et al.*, 2022).

Portanto, pode-se inferir que a INO poderia também ser capaz de modular muitas destas funções celulares e mecanismos patológicos. De fato, um dos poucos estudos sobre a INO em células não hematopoiéticas mostrou que, em fibroblastos, tanto a INO quanto o tratamento *in vitro* com a enzima ADA levaram à diminuição da proliferação destas células, agindo através do receptor A3 (HERMAN-DE-SOUSA *et al.*, 2020).

Ademais, nucleotídeos, nucleosídeos, enzimas e receptores purinérgicos podem apresentar variações na expressão em MSC de diferentes origens. Essas diferenças na expressão podem estar relacionadas às características específicas das MSC provenientes de diferentes tecidos, tornando o comportamento dessas células altamente dependente da sua origem e do microambiente tecidual circundante. Essas variações podem ter implicações significativas na resposta fisiológica e nas aplicações terapêuticas das MSC em diferentes contextos clínicos e de pesquisa (GALGARO *et al.*, 2023; NAASANI *et al.*, 2017).

2.3.3 INOSINA NO CONTEXTO INFLAMATÓRIO

Como mencionado no CAPÍTULO I, plaquetas de pacientes com COVID-19 mostram maior atividade da ADA, o que poderia levar a concentrações sanguíneas mais elevadas de INO. Outras patologias também apresentam esse padrão, como a diabetes e a obesidade (YANG; LI; TAO, 2022). Outras doenças infecciosas, como: pneumonia viral e bacteriana, infecção por HIV, tuberculose extrapulmonar, pleurisia tuberculosa, peritonite, meningite, mononucleose infecciosa, febre tifoide e sarcoidose ativa crônica também estão associadas a uma alta atividade de ADA (SRIMADH BHAGAVATHAM; POTIKURI; SIVARAMAKRISHNAN, 2022).

De fato, a INO parece ter uma influência no ambiente inflamatório tal como infecções e hipóxia. Em alguns estudos a INO mostrou um efeito de redução nas espécies reativas de oxigênio (ROS) em MSC tratadas com meios enriquecidos com INO (CAMPOS-MALDONADO *et al.*, 2022), demonstrando também promoção do crescimento de axônios no trato corticoespinal após acidente vascular cerebral e lesão focal no cérebro, aprimorando o resultado funcional após lesão cerebral traumática (DACHIR *et al.*, 2014). Ademais, adipócitos humanos cultivados liberaram hipoxantina, com um aumento em sua secreção sob condições de hipóxia, indicando um possível uso da INO durante este processo (NAGAO *et al.*, 2018).

Um fato importante é de que as células T efetoras têm a capacidade de empregar a INO como um substrato alternativo para manter o crescimento e a função celular na ausência de glicose *in vitro*, fornecendo substratos essenciais para as vias metabólicas centrais e a produção de ATP. Adicionalmente, a suplementação com INO potencializa a eficácia antitumoral tanto do bloqueio de checkpoints imunológicos quanto da transferência adotiva de células T em tumores sólidos com deficiência na metabolização da INO. Isso reflete na habilidade da INO em mitigar as restrições metabólicas impostas pelo tumor às células T (WANG *et al.*, 2020), além de demonstrar capacidade de suprimir a liberação de citocinas inflamatórias por estas células (SHINOHARA; TSUKIMOTO, 2018).

3. HIPÓTESE

Diante da relevância da sinalização purinérgica na fisiologia do sistema imunológico e do reconhecido papel das MSCs como moduladoras do sistema imune, surge a indagação sobre a capacidade da INO de exercer uma ação imunomodulatória comparável à da adenosina e se estados inflamatórios, como a COVID-19, possam influenciar no equilíbrio do sistema purinérgico e consequentemente na potencialidade destas células. Esta pesquisa fundamenta-se na possibilidade de a INO, de maneira semelhante à ADO, modular diversas funções das MSCs. Este estudo visa aprofundar nosso entendimento sobre o potencial imunomodulatório da INO nas MSCs, contribuindo assim para elucidar seus efeitos e abrir novas perspectivas na compreensão das interações entre a sinalização purinérgica e as MSCs no contexto do sistema imunológico.

4. JUSTIFICATIVA

O estudo da INO nas MSCs é crucial devido a seu potencial na influência da regulação das vias de sinalização adenosinérgica, o que pode diretamente impactar na capacidade de diferenciação e imunomodulação dessas células. Apesar dos avanços na compreensão da influência da ADO nas MSCs, o conhecimento sobre a INO ainda é limitado. Esta lacuna é significativa pois a INO pode, através dos receptores P1, desempenhar um papel vital na migração, proliferação e direcionamento das MSCs para destinos específicos de diferenciação, como a formação de tecido ósseo, cartilaginoso ou adiposo. Uma compreensão mais profunda desses efeitos é crucial para o desenvolvimento de terapias celulares e regenerativas.

Desvendar os mecanismos pelos quais a INO pode afetar o destino e a funcionalidade das MSCs pode otimizar a diferenciação dessas células ou regular o sistema imune em aplicações clínicas, oferecendo novas perspectivas para o tratamento de distúrbios relacionados aos tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo, bem como doenças autoimunes e inflamatórias com um foco mais preciso nas terapias celulares. O entendimento do impacto da INO presente nos microambientes teciduais ou liberado pelas MSCs pode ser, portanto, uma peça essencial para melhorar a saúde e a qualidade de vida através de terapias celulares.

5. OBJETIVO

Revisar os tratamentos utilizados para COVID-19 cujo racional terapêutico utilizado foi a sinalização purinérgica, bem como investigar o papel da INO na influência da capacidade de imunomodulação, adesão, migração e proliferação nas MSCs de diferentes tecidos de extração.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO 1

1. Explorar a interconexão entre o sistema purinérgico, a presença da INO e seu impacto em contextos inflamatórios, como na COVID-19;
2. Definir quais fármacos utilizados no tratamento da COVID-19 tem mecanismo de ação através do sistema purinérgico;
3. Elucidar quais fármacos que utilizam a via purinérgica são mais eficientes e mais promissores no tratamento da COVID-19;

5.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO 2

1. Cultivar e expandir culturas primárias de MSCs de tecido adiposo, cordão umbilical e polpa de dente;
2. Caracterizar as células MSC expandidas através de ensaios de diferenciação e expressão imunofenotípica de marcadores de membrana específicos para células MSC;
3. Caracterizar a expressão imunofenotípica de marcadores de membrana para as enzimas ADA, CD26 e PNP nas MSC;
4. Analisar o efeito de migração pelo método de scratch e análise estatística com tratamento com diferentes concentrações de INO;
5. Analisar o efeito na proliferação celular em MSC com o tratamento de diferentes concentrações de INO;
6. Analisar a adesão em células MSC após o tratamento com diferentes concentrações de INO;

6. CAPÍTULO 1.

SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA: UMA ABORDAGEM FARMACOLÓGICA NA MODULAÇÃO E TRATAMENTO DE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS, COM ENFOQUE NA COVID-19

O artigo de revisão intitulado “A Systematic Review of the Role of Purinergic Signalling Pathway in the Treatment of COVID-19” foi publicado em 26 abril de 2023 na revista International Journal of Molecular Sciences, de fator de impacto 5.6, e obteve duas citações até o momento. Este artigo teve como objetivo aprofundar o entendimento do sistema purinérgico e seu potencial farmacológico, com ênfase nos estados inflamatórios do corpo humano, como aqueles observados na COVID-19. Embora a pandemia de COVID-19 não tenha sido o foco central desta dissertação, é importante destacar que a união de esforços da comunidade acadêmica desempenhou um papel crucial na resposta à pandemia. Este estudo foi conduzido com a intenção de fornecer uma contribuição significativa à comunidade durante esse período histórico e emergencial, refletindo o compromisso da comunidade acadêmica em abordar desafios críticos de saúde global na atualidade para atender as necessidades da população.



Review

A Systematic Review of the Role of Purinergic Signalling Pathway in the Treatment of COVID-19

Vitoria Guero Korb ^{1,†}, Iago Carvalho Schultz ^{1,†}, Liziane Raquel Beckenkamp ¹ and Márcia Rosângela Wink ^{1,2,*}

¹ Laboratório de Biologia Celular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre 90050-170, RS, Brazil

² Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmento Leite, 245, Sala 304 Centro, Porto Alegre 90050-170, RS, Brazil

* Correspondence: mwink@ufcspa.edu.br or marciawink@yahoo.com.br; Tel.: +55-5133038762

† These authors share the first authorship.

Abstract: The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has become a global health concern. Three years since its origin, despite the approval of vaccines and specific treatments against this new coronavirus, there are still high rates of infection, hospitalization, and mortality in some countries. COVID-19 is characterised by a high inflammatory state and coagulation disturbances that may be linked to purinergic signalling molecules such as adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine (ADO), and purinergic receptors (P1 and P2). These nucleotides/nucleosides play important roles in cellular processes, such as immunomodulation, blood clot formation, and vasodilation, which are affected during SARS-CoV-2 infection. Therefore, drugs targeting this purinergic pathway, currently used for other pathologies, are being evaluated in preclinical and clinical trials for COVID-19. In this review, we focus on the potential of these drugs to control the release, degradation, and reuptake of these extracellular nucleotides and nucleosides to treat COVID-19. Drugs targeting the P1 receptors could have therapeutic efficacy due to their capacity to modulate the cytokine storm and the immune response. Those acting in P2X7, which is linked to NLRP3 inflammasome activation, are also valuable candidates as they can reduce the release of pro-inflammatory cytokines. However, according to the available preclinical and clinical data, the most promising medications to be used for COVID-19 treatment are those that modulate platelets behaviour and blood coagulation factors, mainly through the P2Y12 receptor.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; purinergic signalling; purinergic receptors



Citation: Korb, V.G.; Schultz, I.C.; Beckenkamp, L.R.; Wink, M.R. A Systematic Review of the Role of Purinergic Signalling Pathway in the Treatment of COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 7865. <https://doi.org/10.3390/ijms24097865>

Academic Editors: Rashid Giniatullin and Ronald Sluyter

Received: 9 January 2023

Revised: 27 March 2023

Accepted: 20 April 2023

Published: 26 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In December 2019, a new single-stranded RNA virus from the Coronaviridae family emerged. It was named severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and is the aetiological pathogen of coronavirus disease 2019 (COVID-19). Due to non-existent immunity at the time, the new virus quickly spread worldwide, progressing to a pandemic, as declared by the World Health Organization on 11 March 2020 [1]. Since 2021, vaccines and medications against the original form of SARS-CoV-2 have been approved, although their distribution has not been equal among countries. On the one hand, the United States has approved multiple vaccines and medications such as tocilizumab, remdesivir, and baricitinib. On the other hand, in low-income countries, vaccination protocols have been affected by the lack of the immunisation products, resulting in higher mortality rates.

SARS-CoV-2 enters a person through the upper respiratory tract. Infection of the host cell mainly occurs by the viral spike protein binding to the receptor-binding domain (RBD) of membrane-bound angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). People infected with SARS-CoV-2 can develop asymptomatic, mild, moderate or severe forms of COVID-19.

These last two stages manifest as an intense systemic inflammation characterised by the excessive release of pro-inflammatory molecules. These high levels cause tissue damage and dysregulate the coagulation cascade in multiple organs, leading to acute respiratory distress syndrome (ARDS), organ failure, and possibly the death of the infected patient [2,3].

One of the main players of the systemic inflammation manifested in COVID-19 is adenosine triphosphate (ATP). This pro-inflammatory component of the purinergic system is released during tissue damage and modulates other pathways, including cytokine release through the P2X7 receptor and the NLRP3 inflammasome activation [4]. Adenosine diphosphate (ADP), a product of ATP metabolism, can also exacerbate the disease by activating purine receptors on platelets, leading to thrombus formation [5].

These nucleotides and nucleosides are recognised by cells via the P2 and P1 purinergic receptors, which contain different subunits and have distinct affinities for these molecules, leading to different cellular effects [6]. The P2 receptors are divided into P2X1–P2X7, which respond exclusively to ATP, P2Y1–P2Y13 (which have affinity for both ATP and ADP), and pyrimidines (UTP and UDP). The P1 receptors—A1, A2A, A2B and A3—are responsive mainly to ADO, although they may also respond to INO [7]. On the other hand, concentrative nucleoside transporters (CNT1–CNT3) and equilibrative nucleoside transporters (ENT1–ENT4) help to regulate the transport of ADO between intracellular and extracellular spaces [8]. In the intracellular space, ADO can be converted into INO by cytoplasmic ADA or transformed into AMP by adenosine kinase (ADK), which results in the formation of ATP by adenylate kinase. This intracellular ATP can be released to extracellular space by transporter channels, catabolised to cyclic AMP (cAMP) by adenylate cyclase and phosphodiesterase (PDE), or degraded to ADO by ATP/ADPase and CD73 [8] (Figure 1).

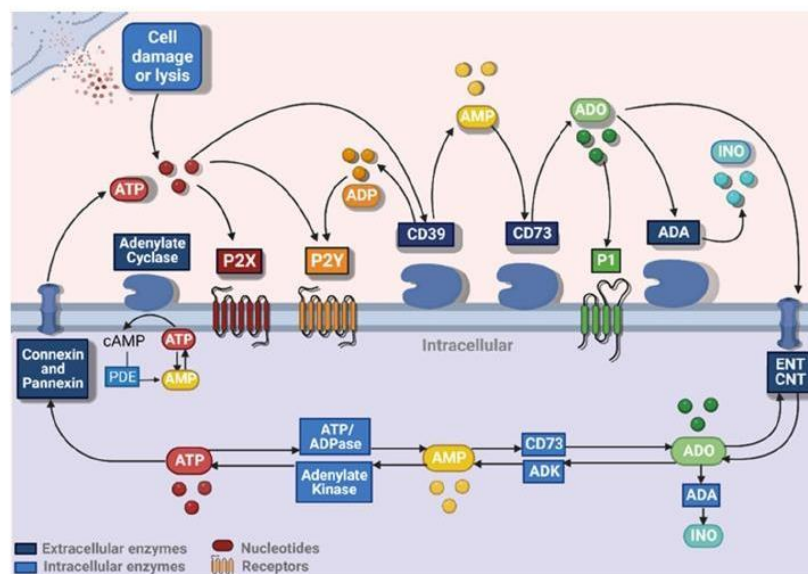


Figure 1. The purinergic signalling cascade. The release of ATP in the extracellular space leads to the activation of P2X and P2Y receptors and it is hydrolyzed by CD39 to ADP, which also activates P2Y receptors. The CD39 also hydrolyzes ADP to AMP, which is sequentially hydrolyzed to adenosine (ADO) by the CD73. ADO activates the P1 receptors and can return to the intracellular space by the ENT/CNT or be hydrolyzed by adenosine desaminase (ADA) into inosine (INO). Once the ADO is inside the cellular space, it can be converted to inosine (INO) by intracellular ADA or can be transformed into AMP by the Adenylate Kinase forming ATP by Adenylate cyclase (AC), which can be released into extracellular space by connexins and pannexins. The intracellular ATP can also be hydrolyzed to AMP by the intracellular ATP/ADPase and then again into ADO by CD73, being released again in the extracellular space by the CNT and ENT. Figure constructed using Biorender.

Many research groups, including ours, have hypothesised that purinergic signalling affects the course of COVID-19 infection by affecting blood flow, coagulation, and immunomodulation [9]. Some studies have indicated that the P1 and P2 receptors [10], pannexins [11], and CD39 and CD73 activity [12] influence the pathogenesis of COVID-19. As is the case with other infectious events, this disease causes damage to the host's tissue due to the viral infection per se or because of exacerbated inflammation. With this injury, the levels of ATP in the extracellular space increase, consequently attracting more immune cells to the infection site and perpetuating the purinergic signalling cascade through the activation of its associated receptors and enzymes. Thus, the use of agonists and antagonists to these receptors and enzymes has been intensively evaluated for COVID-19 treatment.

Based on this background, in this review, we address the main preclinical and clinical scientific findings to date on pharmacological approaches targeting the purinergic signalling pathway as a rational alternative for COVID-19 treatment and its complications, such as blood coagulation, inflammation, vasodilation, and immunological processes, which are strongly affected during infection.

2. Methods

As shown in Figure 2, we searched the PubMed and Scopus databases in addition to clinicaltrials.gov with the keywords 'COVID-19' AND 'purinergic'. We used 'purinergic' as a keyword to collect all published papers about the specific subject. Variations such as 'purinergic signalling', 'purinergic system', or 'purinergic pathway' are used by researchers throughout the literature. The inclusion criteria were: (1) COVID-19 is the main subject of study, and (2) analysis of the purinergic signalling components as a target for therapy instead of prognosis. The exclusion criteria were: (1) reviews, comments or hypotheses; (2) duplicate papers; and (3) no experiments to test the hypotheses.

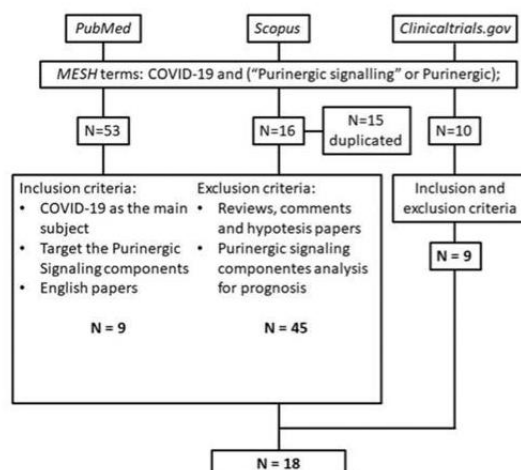


Figure 2. Visual abstract of methodology showing the database, keyword, inclusion and exclusion criteria, and final results from the systematic review.

3. Results and Discussion

Our search yielded 53 papers from PubMed, 16 papers from Scopus (although 15 were duplicates of papers in PubMed, result in 1 paper), and 10 clinical trials from clinicaltrials.gov (Figure 2). Of these 54 papers, only eight experimentally targeted purinergic signalling components for COVID-19 treatment (Table 1). The remaining 45 papers are reviews, commentaries, perspectives, and suggestions, and did not involve experiments to prove the hypotheses; hence, we excluded them. Note that we searched clinicaltrials.gov by using the same keywords as we used to search the PubMed and Scopus databases. We

found 10 clinical trials, but only 9 of these met the inclusion criteria. Table 2 provides the details of these trials.

Table 1. Articles results from the systematic review from the Scopus and PubMed database as described in the Methods section.

PMID	Title	Year of Publication	Purinergic Signalling Target	Drug	Purpose	Results
36268115	Effects of Purinergic Receptor Deletion or Pharmacologic Modulation on Pulmonary Inflammation in Mice [13]	2022	P2Y14R, P2X7R, 2Y14R and A3AR	P2Y14R, P2X7R genetic deletion and modulation with 2Y14R antagonists, A3AR agonists	Treatment	The extent of these responses was diminished by genetic deletion (P2Y14R, P2X7R) or pharmacologic modulation (P2Y14R antagonists, A3AR agonists) of purinergic receptors
35790489	Istradefylline, an adenosine A2a receptor antagonist, inhibits the CWHID4+ T-cell hypersecretion of IL-17A and IL-8 in humans [14]	2022	A2A	A2A antagonist (istradefylline)	Treatment	Attenuation of IL-8 and IL-17A release
35754396	Alterations in CD39/CD73 axis of T cells associated with COVID-19 severity [15]	2022	CD39 and CD73	Adenosine	Prognosis and Treatment	PBMC from severe COVID-19 patients treated with adenosine reduced the NF- κ B activation in both CD3+ T cells and CD14+ monocytes. Lower levels of IL-1 β and IL-17a were found in the culture supernatant of PBMC treated with adenosine, despite no changes in IL-10 and TNF- α production
35623041	Signalling via dopamine and adenosine receptors modulate viral peptide-specific and T-cell IL-8 response in COVID-19 [14]	2022	A2A	A2A antagonist (istradefylline)	Treatment	Attenuation of IL-8 release
35315874	Effect of Antiplatelet Therapy on Survival and Organ Support-Free Days in Critically Ill Patients with COVID-19: A Randomized Clinical Trial [13]	2022	P2Y12	Clopidogrel, prasugrel and ticagrelor;	Treatment	Among critically ill patients with COVID-19, treatment with an antiplatelet agent, compared with no antiplatelet agent, had a low likelihood of providing improvement in the number of organ support-free days within 21 days
35040887	Effect of P2Y12 Inhibitors on Survival Free of Organ Support Among Non-Critically Ill Hospitalized Patients with COVID-19: A Randomized Clinical Trial [16]	2022	P2Y12	Ticagrelor	Treatment	Among non-critically ill patients hospitalized for COVID-19, the use of a P2Y12 inhibitor in addition to a therapeutic dose of heparin, compared with a therapeutic dose of heparin only, did not result in increased odds of improvement in organ support-free days within 21 days during hospitalization.

Table 1. Cont.

PMID	Title	Year of Publication	Purinergic Signalling Target	Drug	Purpose	Results
34867791	Follow Your Nose: A Key Clue to Understanding and Treating COVID-19 [17]	2021	ATP	Dexamethasone and spironolactone	Treatment and Pathophysiology	Mineralocorticoid Receptor blockade can inhibit the release of ATP
33249452	New Horizons: Does Mineralocorticoid Receptor Activation by Cortisol Cause ATP Release and COVID-19 Complications? [18]	2021	Mineralocorticoid receptor, ATP and P2X3	Dexamethasone	Treatment	COVID-19 cough symptom is caused by the activation of purinergic receptors in the lungs following ATP release from virus-infected type II alveolar cells. This raises the question as to when treatment with dexamethasone and spironolactone should be started

Table 2. Results from the systematic review from the Clinical Trials.gov database as described in the Methods section.

Purinergic Element	Pharmacological Mechanism	Medication	Original Therapeutic Use	Clinical Application on COVID-19	Clinical Trial
P2Y12	Antagonist	Clopidogrel	Antiplatelet	Antiplatelet	NCT04333407 (N = 320) NCT02735707 (N = 10.000)
				Antithrombotic and antiplatelet	NCT04368377 (N = 5) NCT04505774 (N = 3.000) NCT04409834 (N = 390) NCT02735707 (N = 10.000)
					Antiplatelet
	Antagonist	Prasugrel		Antithrombotic and antiplatelet	NCT04505774 (N = 3.000)
				Inhibitor	Ticagrelor
	A2A	Agonist		Regadenoson	Vasodilator used in radionuclide myocardial perfusion imaging
A1, A2A, A2B	Antagonist	Theophylline	Treat airflow obstruction associated with chronic lung diseases	NCT04789499 (N = 62)	
PDE3A *, PDE4A *, PDE5A *					
A1, A2A, A2B, A3				Agonist	Adenosine
A1, A2A, A2B, A3	Antagonist	Caffeine	Stimulant, and prevents and treats pulmonary complications of premature birth	NCT05594615 (N = 24)	
PDE enzymes *					
A2A	Potentiator	Midazolam	Benzodiazepine with rapid onset that is used in seizures, anesthesia, and anxiety disorders		

* Biological targets that also are triggered by the respective drugs.

We focus on highlighting the influence of the purinergic signaling cascade on the immune system and blood coagulation cascades, as both areas are a major concern due to their deregulation during SARS-CoV-2 infection. This imbalance in the immune system

is, for the most part, linked to a cytokine storm, which is an exacerbated release of pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6), IL-1 β , and others. This inflammatory explosion shapes immune cell behaviour and activates platelets and other proteins responsible for blood coagulation, resulting in dysregulation of events and immune thrombosis formation. Blood coagulation is directly linked to the activation and aggregation of platelets, resulting in the formation of blood clots, a low platelet count, higher D-dimer levels, elevated prothrombin activity time (TAP), and activated partial thromboplastin time (PTT) [19]. These clinical alterations can persist for 44–155 days after the onset of COVID-19 symptoms [20]. Hence, in 2021, the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) recommended using low molecular-weight heparin to treat patients with moderate and severe COVID-19 [21]. Indeed, clinical trials have shown the benefits of treating patients with COVID-19 with anticoagulants. Higher doses of anticoagulants were associated with lower mortality in hospitalised patients with COVID-19 [22], and there was a dose-dependent delay in death due to COVID-19 [23]. These drugs are used to treat pathologies such as myocardial infarction, stroke, and arterial occlusive diseases [24,25].

Given the dysregulation of these events in patients with COVID-19, it is rational to target these purinergic receptors and enzymes. There has been preclinical and clinical research targeting the P2X3, P2X7, P2Y12, P2Y14, A2A, and A3A receptors, and the enzymes CD39 and CD73 (Table 1).

3.1. P2 Receptors in COVID-19

3.1.1. P2Y Receptors

P2Y12

Based on our search, the P2Y12 receptor stands out as the most promising target for pharmacological modulation of COVID-19 to minimise one of the major culprits of this disease, namely, dysregulation of blood coagulation. Considering the positive results of anticoagulants, researchers began to evaluate the use of P2Y12 antagonists to manage patients with COVID-19. These antithrombotic agents, including clopidogrel, prasugrel, cangrelor, and ticagrelor, have antiplatelet and vasodilatory actions.

The mechanism of action of those drugs involves P2Y12 receptor blockade on platelets, the main players in blood coagulation. Blood coagulation is initiated by cellular signalling of GpIb-IX-V, resulting in the secretion of agonists such as ADP. This nucleotide binds to P2Y1 and P2Y12 receptors, activating thromboxane A2 (TxA2) formation and cyclooxygenases (COXs), and thus triggering inflammatory processes and platelet activation and aggregation [26]. Therefore, P2Y12 receptor blockade attenuates the action of ADP on the formation of platelet aggregates, minimising the interaction with other platelet molecules, such as collagen and thrombin, among others [24].

Clopidogrel is a prodrug that is activated by metabolism to 2-oxo-clopidogrel and later the active thiol metabolite. After activation, clopidogrel irreversibly binds to the P2Y12 receptor on platelets and exerts a therapeutic effect lasting for 5–10 days, based on how long the platelet survives. Thus, this drug has the advantage of being long acting [25,27]. Prasugrel is also a prodrug; it is activated by specific cytochrome P450s (CYPs) [25]. Prasugrel begins working after 30 min, much faster than clopidogrel. This quicker bioavailability and platelet reactivation reduce the risk of extensive bleeding in patients [28]. Cangrelor and ticagrelor are ATP analogues with structural modifications to allow specific binding to the P2Y12 receptor. Cangrelor undergoes non-hepatic metabolism, while ticagrelor is metabolised in the liver by CYP3A4 [25,29]. These drugs have different administration routes: via a nasogastric tube for oral tablets for ticagrelor and intravenously for cangrelor. Cangrelor has a faster action and functional recovery of platelets, around 60–90 min, thus reducing the risk of major bleeding [25,30].

Table 2 lists clinical trials with P2Y12 antagonists that have been conducted in patients infected with SARS-CoV-2. Among them, clopidogrel stands out with five clinical trials investigating antithrombotic and antiplatelet actions (NCT04518735, NCT04368377,

NCT04409834, NCT04505774 and NCT04333407) and evaluation of antiplatelet therapy in COVID-19 pneumonia (NCT02735707).

NCT04409834 (COVID-PACT) evaluated the efficacy and safety of a prophylactic dose of anticoagulation and antiplatelet therapies. The study concluded that compared with placebo treatment, clopidogrel and four heparin variations may reduce all-cause mortality. However, these treatments have an uncertain influence on the necessity for additional respiratory support, COVID-19-related mortality, and quality of life [31]. Moreover, the trial showed that a full dose of an anticoagulant, except clopidogrel, reduced thrombotic complications in critically ill patients. There was an increase in bleeding in haemodynamically stable patients, but with no fatal outcomes [32].

NCT04368377 (PIC-19) analysed the prophylactic use of tirofiban, acetylsalicylic acid, clopidogrel, and fondaparinux. There was an improvement in peripheral oxygenation and a decrease in the need for mechanical respiratory support, with no adverse events reported [33]. In contrast, NCT04505774 (ACTIV-4A) showed that compared with heparin alone, clopidogrel together with heparin was not correlated with improvements in organ support-free days, up to 21 days, during hospitalisation [16].

NCT04333407 established the first endpoint of preventing cardiac complications of COVID-19, but it was terminated due to difficulty in recruiting eligible participants.

NCT04445623 is a phase III double-blind trial comparing the use of placebo with prasugrel in patients with COVID-19. The primary endpoint is to compare the efficiency index of pulmonary gas exchange. The partial pressure of oxygen arterial oxygen (PaO_2) divides by the fraction of inspired oxygen (FiO_2) known as $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ratio ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) or ROX index [34], and it was detected 7 days after treatment. The current status of this trial is unknown, and no results have been posted on clinicaltrials.gov. As mentioned for clopidogrel, NCT04505774 evaluated prasugrel together with heparin, but there was no improvement in organ support-free days [35].

A case report evaluating cangrelor and ticagrelor showed better results when compared with clopidogrel, mainly due to the reversibility of the antiplatelet effect [36]. Clopidogrel, cangrelor, and ticagrelor were analysed for COVID-19 treatment in NCT04518735, a retrospective study that enrolled 1707 participants. However, there are no publicly available results. NCT02735707 (the REMAP-CAP trial) enrolled more than 10,000 participants and compared several drugs for treatment of community-acquired pneumonia, including COVID-19. Among the multiple arms of the study, medications including clopidogrel, prasugrel, and ticagrelor were analysed. These medications did not improve the number of organ support-free days up to 21 days [37]. In vitro studies have shown that ticagrelor reduced the risk of secondary pulmonary infections and sepsis, possibly due to the influence on the immune system by decreasing IL-6 as well as neutrophil infiltration into the lungs [38].

Glucocorticoids have anti-inflammatory and immunosuppressive effects that can help reduce the severity of the cytokine storm, which is a key driver of severe COVID-19. Recently, omics-driven studies have shown the potential pleiotropic actions of synthetic glucocorticoids [38]. In addition, dexamethasone use in hospitalized COVID-19 patients without intensive respiratory support (IRS) did not show significant benefit and may even have potential harm, meaning that glucocorticoid therapy, such as dexamethasone, should be reserved for patients with severe or critical COVID-19 who require IRS [39]. Unlike glucocorticoids, P2Y₁₂ receptor antagonists are more targeted and therefore they may have fewer off-target effects.

Taken together, there has been relatively little evidence that pharmacological modulation of the P2Y₁₂ receptor reduces the severity of SARS-CoV-2 infection. Although the drugs are safe and have shown positive results in reducing prothrombotic complications and mortality, larger studies with more patients are needed to definitively determine their potential to treat COVID-19.

P2Y14

Although there are no records of clinical trials that have targeted P2Y14 to treat COVID-19, *in vitro* studies have shown that pharmacological modulation of the P2Y14 and A3 receptors as well as the deletion of the P2Y14R and P2X7R genes reduce cytokine levels and neutrophilia in a mouse model [37]. Both platelets and neutrophils are highly activated in COVID-19; neutrophil activation and neutrophil extracellular trap (NET) formation causes more thrombotic complications than platelet activation [40]. NET infiltration has a crucial role in infection due to the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1], and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [GM-CSF]), resulting in severe tissue damage, thrombus formation, vascular leakage, and potential necrosis. In SARS-CoV-2 infection, there is an increase in the levels of neutrophils and NET markers in patients with severe COVID-19 and those who die. These findings indicate a correlation between NETs and COVID-19 severity [41]. P2Y14 receptor antagonism may reduce neutrophil recruitment, minimising lung infiltration and the attenuating cytokine storm at the primary site of infection [42]. It is also worth mentioning that P2Y14 is an important proinflammatory receptor in other pathologies, such as ischaemic acute kidney injury [43], eosinophilic airway inflammation [44], and even glucose and oxygen deprivation in brain microvascular endothelial cells [45]. It also appears to have a great influence in diabetes, obesity, and even stem cell senescence [46–48]. Hence, therapies targeted to the P2Y14 receptor alongside pharmacological management of NET formation might represent a future approach to treat COVID-19.

3.1.2. P2X Receptors

P2X receptors have been considered in the pathophysiology and pharmacological treatment of COVID-19. Unlike the P2Y12 receptor, there are no approved medications that directly act on P2X receptors. Our systematic review identified two preclinical studies that analysed P2X receptors. (Table 1).

P2X3 Receptor

Edwards et al. [17,18] showed the indirect effect of dexamethasone on the P2X3 receptor. Dexamethasone is a mineralocorticoid receptor inhibitor that suppresses cortisol secretion, thus preventing ATP release and subsequent P2X3 receptor activation. Activation of this purinergic receptor is linked to cough symptoms during COVID-19 and attenuation of this signalling cascade may result in reduction of this symptom [17,18]. While there is no clinical trial registered at clinicaltrials.gov testing this treatment alternative, a randomised clinical trial evaluating the P2X3 antagonist sivopixant in refractory chronic cough, not related to COVID-19, reported a symptom reduction [49]. Thus, this treatment alternative could also be investigated in COVID-19 with the aim of reducing symptoms and improving health-related quality of life among patients.

P2X7 Receptor

The role of the P2X7 receptor has been studied in the pathophysiology of many diseases, including COVID-19 [50]. Found in different cells and tissues, the P2X7 receptor has an important pro-inflammatory influence on immune cells and it facilitates the cytokine storm in COVID-19, which can persist for months even after recovery [50,51]. Recently, García-Villalba et al. [52] showed that the soluble P2X7 receptor concentration increases in blood plasma of patients with COVID-19, and this increase is positively correlated with disease severity and C-reactive protein levels, suggesting that this receptor could be a prognosis biomarker.

P2X7 receptor activation may lead to an influx of Ca²⁺ that stimulates the NLRP3 inflammasome, which is responsible for enhancing the release of pro-inflammatory cytokines, such as 1L-1 β and IL-18, as well as caspase-1 activation that cleaves these cytokines into their mature and biologically active forms [51]. Other cytokines released through P2X7 receptor activation include IL-6, TNF- α , CCL2, IL-8, CCL3, and CXCL2 (Figure 3) [53,54].

Thus, researchers have suggested that P2X7 receptor activation can worsen COVID-19 [53], and the use of antagonists for this receptor could represent a strategy to attenuate the effects of its activation [50]. In this view, researchers have demonstrated that P2X7 receptor blockade or P2X7R gene deletion has direct effects on reducing the inflammatory state during the infectious process in an animal model [13].

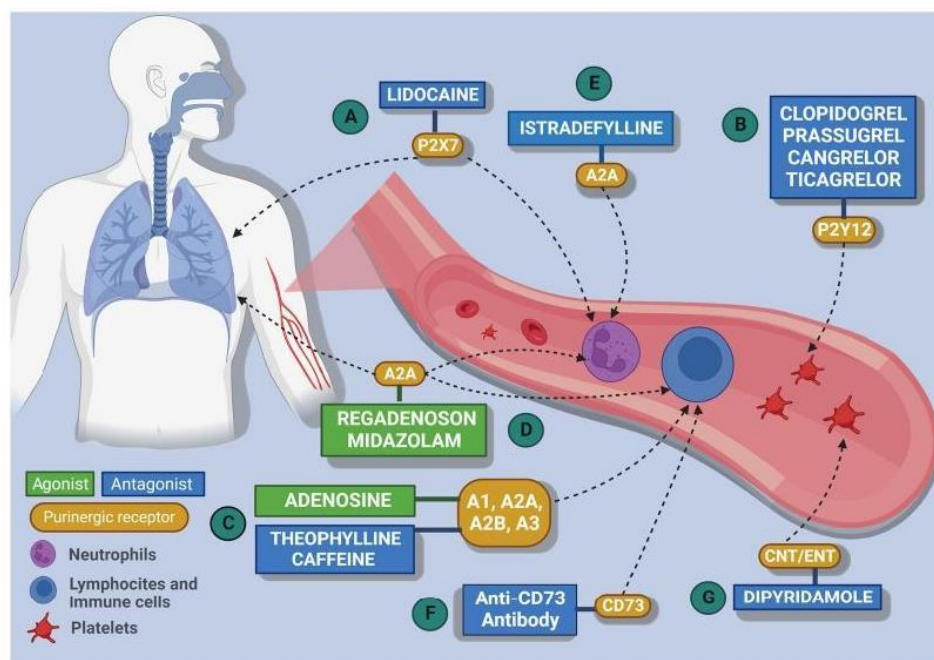


Figure 3. Schematic representation of the main targets of the drugs found in the systematic review. A. Receptor. The P2X7 antagonist, lidocaine act in the pulmonary environment, neutrophils, and immune cells. B. The P2Y antagonist (Clopidogrel, Prasugrel, Cangrelor, and Ticagrelor) act in the coagulation cascade by the P2Y12 receptors in platelets. C. Adenosine (ADO) is the main agonist of the A1, A2A, A2B, and A3 receptors, and, in contrast, theophylline and caffeine acts as an antagonist of these same receptors in immune cells. D. Regadenoson acts in the A2A receptor as an antagonist in immune cells and in the lung, where midazolam only acts as a potentiator of A2A receptor. E. Istradefylline acts as an antagonist in A2A receptors in neutrophils F. Anti-CD73 act as an enzymatic inhibitor in immune cells G. Dipyridamole acts as an antagonist of CNT and ENT transporters mostly in the platelets, culminating in the excess of ADO, which acts as an agonist in the P1 receptors (A1, A2A, A2B, A3) in the platelets, leading to vasodilation and antiplatelet aggregation effects. Figure constructed using Biorender.

Considering the importance of the P2X7 receptor in inflammation, we searched for medications that act on this receptor. We found that lidocaine shows partial modulation of the P2X7 receptor beyond its primary mechanism of action. There have been two clinical trials registered at clinicaltrials.gov that have evaluated the use of lidocaine for COVID-19 treatment. NCT04609865 (LidoCovid) is a phase III randomised clinical trial aiming to evaluate the effect of intravenous lidocaine 2% on gas exchange and inflammation in patients with ARDS related or not related to COVID-19 [55]. The other phase I randomised clinical trial, NCT04979923, will evaluate the efficacy of lidocaine nebulisation in cough suppression and amelioration of hypoxia in comparison with two other medications, salbutamol and beclomethasone. Although there are no results from these clinical trials, there is a case report from a 71-year-old man with COVID-19 and severe respiratory distress who received lidocaine intravenously. This treatment improved his inflammatory condition. As lidocaine was the only medication he received, this attenuation could be linked to

modulation of the P2X7 receptor, reinforcing the potential of targeting this purinergic element directly or indirectly [56].

There are other medications with indirect effects on the P2X family of receptors. For example, ivermectin indirectly modulates the P2X4 receptor. However, the use of this medication as a prophylactic or therapeutic alternative for COVID-19 is controversial. Indeed, large randomised clinical trials and detailed reviews have already shown that this anti-helminthic medication has no benefit in the COVID-19 context [57–61].

3.2. P1 Receptors in COVID-19

In recent years, the P1 receptors have been extensively investigated as targets for drug development, mainly due to their immunosuppressive potential when activated by their main agonist ADO. These G protein-coupled receptors are divided into four isoforms—A1, A2A, A2B, and A3—each one with different affinities to ADO. The A1 and A2A receptors have high affinity to ADO (from 10 nm to 1 μ m), while the A2B and A3 receptors have a low affinity to ADO (>10 μ m). Once activated, it may inhibit (A1 and A3) or stimulate (A2A and A2B) adenylate cyclase (AC), leading to changes in cyclic AMP (cAMP) levels [8] (Figure 1).

The A1, A2A, A2B and A3 Receptors

Our search resulted in three preclinical and four clinical trials using therapies targeting P1 receptors. Among P1 receptors, the A2A receptor has been the most investigated as a therapeutic target for COVID-19. Indeed, this receptor is widely expressed in the pulmonary epithelium and modulates resident macrophages. It also prevents adherence and activation of neutrophils to the pulmonary epithelium [62,63]. The A2A receptor has a high affinity to ADO and stimulates AC, consequently increasing the intracellular cAMP levels and leading to complementary activation of anti-inflammatory mechanism. This mechanism is involved in the suppression of cytokine production and oxidising molecules, modulating neutrophils, macrophages, lymphocytes, and platelet aggregation [63]. Therefore, molecules acting on the A2A receptor may be a good alternative treatment for COVID-19.

Tokano et al. [14] analysed the modulation of the A2A receptor with istradefylline in two preclinical studies (Table 1). Istradefylline is a selective A2A receptor antagonist indicated as an adjunct to levodopa and carbidopa for the treatment of Parkinson's disease. In a recent study, the authors evaluated the effects of this drug on PBMCs. They showed suppression of IL-17A and IL-8 production and attenuation of consequent neutrophilic inflammation. As mentioned above, neutrophil activation and NET formation have a very strong influence on inflammation and severity in COVID-19. Therefore, targeting the A2A receptor with an antagonist could provide effective pharmacological modulation of COVID-19.

Another medication acting through the A2A receptor and evaluated as a treatment for COVID-19 is regadenoson. This molecule is a partial agonist of P1 receptors with affinity for the A2A receptor. It dilates coronary vessels and has been used as a diagnostic tool for cardiac pathologies [25]. This medication increases blood-flow in vessels and the myocardium and mimics the effects of ADO. NCT04606069 is currently recruiting participants to evaluate regadenoson in COVID-19; the results are expected in 2023.

In clinical practice, ADO is used to convert paroxysmal supraventricular tachycardia to sinus rhythm [25]. Because ADO acts on all four P1 receptors, it is not clear which receptors are responsible for this effect. For example, A1 receptor activation is related to monocyte phagocytosis, dendritic cell chemotaxis, and mucus promotion, increasing inflammation. In contrast, the A3 receptor has been touted to inhibit degranulation in eosinophils and neutrophils [64].

From this view, even with controversial results, clinical trials evaluating ADO in COVID-19 have been initiated and registered at clinicaltrials.gov (Table 2). NCT04588441 (the ARTIC trial) aims to measure the efficacy of aerosolised inhaled ADO against lung inflammation in patients with ARDS caused by COVID-19. This trial is not yet recruiting participants, and, therefore, no results have been released. On the other hand, a case-control

study with the same treatment protocol was conducted in Italy. It showed that SARS-CoV-2-positive patients who received aerosolised ADO had an improved PaO₂/FIO₂ ratio, a reduced hospitalisation time and decreased SARS-CoV-2-positive days after diagnosis [65].

Moreover, as a possible role of the ADO receptors in COVID-19, cAMP regulation could be involved in the development of hyposmia and hypogeusia [66]. Lower cAMP levels are correlated with worsening of hyposmia and hypogeusia [67]. So, it seems that cAMP levels dictate the direction of the prognosis, because low levels worsen and high levels improve the ability to taste and smell [68].

Theophylline is a medication that can regulate cAMP concentration [69] and could increase the levels of this secondary messenger through ADO receptors and lead to olfactory neuroepithelium recovery in patients with COVID-19 [70]. To investigate this hypothesis, NCT04789499 evaluated the efficacy of theophylline in patients with symptoms of hyposmia and hypogeusia after SARS-CoV-2 infection. Even though 59% of the patients reported at least a slight improvement in their senses of smell and taste, there were no significant differences between the groups [71]. Another study had similar results in the recovery of smell and taste, in which patients treated with theophylline reported an improvement in smell compared with the placebo group [72]. Beyond the effects on hyposmia and hypogeusia, another pilot study showed that the administration of pentoxifylline and theophylline increased the efficiency of pulmonary gas exchange (PaO₂/FiO₂) and decrease C-reactive protein levels and mortality compared with the control group [73].

In addition to theophylline, other methylxanthines such as caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) are natural compounds that act as P1 receptor antagonists. In silico analysis indicated that theophylline is a potential inhibitor of SARS-CoV-2 replication [74]. So, a molecule with a similar structure to caffeine could also have some beneficial effects on the pathology of COVID-19 by diminishing the cytokine storm and protecting the lungs from exacerbated inflammation [64]. Indeed, preclinical research has already demonstrated the potential of caffeine to inhibit the entry of SARS-CoV-2 into host cells by blocking the spike protein–ACE2 interaction [75]. Moreover, caffeine has been shown to improve oxygenation through relaxation in the pulmonary vascular muscles in chronic lung disease in premature cases, and improve lung function in asthma patients and patients with exercise-induced bronchoconstriction [64]. Clinical trials have been designed to prove the benefits of caffeine: there are 22 registered at clinicaltrials.gov with different outcome measures, from behavioural changes to molecular effects. NCT05594615 is a phase I trial that will evaluate drug–drug interaction between EDP-235 (SARS-CoV-2 antiviral), midazolam, caffeine, and rosuvastatin in healthy subjects. This trial will hopefully clarify whether caffeine can decrease the systemic inflammation manifested in COVID-19.

3.3. Purinergic Enzymes in COVID-19

Considering the importance of the ectoenzymes CD39 and CD73 in controlling extracellular nucleotides and nucleosides, several researchers have shown the correlation of their expression and function with COVID-19 development and severity [9,15,76,77]. Some metabolites derived from nucleotide metabolism are increased in blood samples of patients with COVID-19. Higher ADO levels are positively correlated with higher platelet counts [9]. Moreover, platelets from patients with COVID-19 show greater ATP, ADP, and AMP hydrolysis, and higher ADA activity, which could lead to higher INO blood concentrations [15]. Interestingly, the increase in INO is negatively correlated with lower white blood cell (WBC) and platelet counts, suggesting that high ADO levels could reduce WBC counts [9]. Therefore, the use of P2Y₁₂ inhibitors could attenuate platelet activation and aggregation, reducing thrombus formation and the negative effects of the excessive nucleotide metabolism.

3.3.1. CD39 and CD73

Although we did not include prognosis papers in this review, most of the papers we found from our search evaluated the prognostic value of CD39 and CD73 in COVID-19

(Table 1). For example, Da Silva et al. [15] analysed blood samples from patients with moderate and severe COVID-19, and confirmed the increased expression of both in total leucocytes based on the nucleotide hydrolysis activity. Indeed, Dorneles et al. [77] observed higher expression of CD73 (encoded by NT5E) and CD39 (encoded by ENTPD1) in T cells; the levels correlated with lower concentrations of ATP in blood plasma. However, another study observed lower expression of NT5E in the cytotoxic lymphocyte population of CD8 and natural killer T cells from patients with COVID-19, which secreted higher amounts of pro-inflammatory cytokines [12].

When searching clinicaltrials.gov, we did not find any clinical trials evaluating the modulation of CD39. However, two trials have been registered to evaluate monoclonal antibodies against CD73 in COVID-19, aiming to minimise ADO production [78]. NCT04516564, a phase I, randomised, double-blind, placebo-controlled trial is evaluating the safety, tolerability, pharmacokinetics, and immunogenicity of AK119 (monoclonal anti-CD73) in 29 healthy subjects. No results have been posted. The other phase I, non-randomised and open-label trial (NCT04464395) is testing mupadolimab (CPI-006), an anti-CD73 monoclonal antibody, in hospitalised patients with mild and moderate COVID-19. In this trial, the researchers have measured the efficacy, duration of COVID-19-related symptoms, hospitalisation time, rate of medical interventions during hospitalization, and changes in anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin levels. The status of this study is listed as completed, but the results have not yet been released. Although there are no results yet, if anti-CD73 proves to be safe and tolerable, its use in patients with COVID-19 can be analysed in future clinical trials.

Due the multiple functions that CD73 has in inflammation, it is unclear what benefits CD73 inhibition would provide for COVID-19 treatment. Indeed, no publication has presented a clear explanation for this hypothesis. The only possible function we could assume so far is the modulation of cytotoxic lymphocytes described by Dorneles et al. [77], which could diminish the cytokine storm and inflammatory process of COVID-19. Even then, CD73 inhibition could cause the opposite effect because this enzyme is mainly anti-inflammatory (via the production of ADO). Therefore, more *in vitro*, *in vivo*, and clinical trials are needed to understand the real application of CD73 in COVID-19.

3.3.2. PDEs and ADA

Researchers have also observed the pharmacological potential of modulating the intracellular enzymes of purinergic signalling. Zlamal et al. [79] showed that upregulation of intracellular cAMP levels could prevent the worsening of the prognosis and disease progression by attenuating immunoglobulin G-induced formation of procoagulant platelets. Targeting this pathway could minimise blood coagulation dysregulation. For example, dipyridamole is an inhibitor of nucleoside transporters, of PDE4A, PDE5A and PDE10A, and ADA, increasing the intracellular cAMP levels [80]. So, clinical trials using dipyridamole for COVID-19 treatment have been initiated. NCT04391179 and NCT04410328 have shown positive results based on the reduction of some inflammatory markers [81]. Therefore, targeting intracellular PDEs may be a good therapeutic choice for COVID-19 to avoid coagulation dysregulation because it prevents platelet aggregation and clot formation.

4. Conclusions

Purinergic signalling is directly linked to several physiological and pathological processes, such as inflammation, blood coagulation, and cellular signalling, which are affected in moderate and severe COVID-19. Although there is a limited amount of preclinical and clinical data evaluating the mechanism of action of medications targeting the purinergic system directly, there have been numerous indirect benefits for patients with COVID-19. These benefits indicate that there could be an advantage to using them mainly as a complementary treatment for COVID-19. We highlight the following:

- P2Y12 modulators such as cangrelor and ticagrelor could be the most promising medications due to their mechanism of action and reversible platelet blocking action, avoiding haemorrhagic events with excessive bleeding.
- P2Y14 is involved in neutrophil recruitment in COVID-19, and targeting this receptor may attenuate blood clot formation by minimising NET formation. However, no medication has been approved so far.
- Targeting the P2X3 receptor could relieve cough symptoms and perhaps improve quality of life.
- The P2X7 receptor is a promising target for inflammation reduction. Because this receptor is linked to NLRP3 inflammasome activation, blocking this element would reduce the release of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 and IL-18.
- Targeting the ectoenzymes CD39 and CD73 does not seem to represent the best COVID-19 treatment strategy. If the CD39 enzyme is blocked and inactivated, ATP released by dying cells could concentrate in the extracellular space and chemoattract immune cells to the infection site, causing a loop of cytokine release resulting in tissue damage. On the other hand, blocking the enzyme CD73 would prevent the production of ADO, which could result in clinical improvements via activation of P1 receptors. However, using these enzymes in the same way as for prognostic biomarkers seems to be a good choice because measuring their expression and the levels of nucleotides can indicate the extent of tissue damage and the course of the disease.
- Targeting PDE and ADA intracellular enzymes could be an alternative treatment to avoid coagulation dysregulation and clot formation.
- Modulation of the A2A receptor with istradefylline and regadenoson represents a possible COVID-19 treatment because this receptor modulates neutrophils and the inflammatory process.
- The use of methylxanthines such as theophylline and caffeine could also be a good strategy in COVID-19 treatment due to their potential to help smell and taste recovery and to improve blood oxygen saturation.

Larger and well-designed studies are required to definitively assess whether medications targeting the purinergic system should serve as first-line or complementary treatment for COVID-19. Preclinical studies are necessary to confirm whether their mechanisms of action remain the same as the one originally approved, and clinical studies are crucial to evaluate their efficacy and safety in patients with COVID-19.

Author Contributions: Conceptualization, V.G.K. and I.C.S.; Review of literature V.G.K. and I.C.S.; Writing—Original Draft Preparation, V.G.K. and I.C.S.; Writing—Review and Editing, V.G.K., I.C.S., M.R.W. and L.R.B.; Supervision M.R.W. and L.R.B.; Project Administration M.R.W. and L.R.B.; Funding Acquisition, M.R.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by CNPq MS-SCTIE-Decit/CNPq n° 12/2018 (441575/2018-8), MS-SCTIE-DECIT-DGITIS-CGCIS/CNPq n° 26/2020 (442586/2020-5), and CAPES (COMBATE-COVID 1694577P) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) 07/2021-PROGRAMA PESQUISADOR GAÚCHO-PqG (21/2551-0001947-6).

Acknowledgments: V.G.K. is a recipient of a Masters scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil (CAPES). I.C.S. is a recipient of a PhD scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brazil (CAPES). M.R.W. is a recipient of level 1 productivity research fellowship from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kocyigit, B.F.; Akyol, A. The Relationship between COVID-19 and Fibromyalgia Syndrome: Prevalence, Pandemic Effects, Symptom Mechanisms, and COVID-19 Vaccines. *Clin. Rheumatol.* **2022**, *41*, 3245–3252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gandhi, R.T.; Lynch, J.B.; del Rio, C. Mild or Moderate Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 1757–1766. [[CrossRef](#)]
3. Berlin, D.A.; Gulick, R.M.; Martinez, F.J. Severe COVID-19. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2451–2460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Rodrigues, T.S.; de Sá, K.S.G.; Ishimoto, A.Y.; Becerra, A.; Oliveira, S.; Almeida, L.; Gonçalves, A.V.; Perucello, D.B.; Andrade, W.A.; Castro, R.; et al. Inflammasomes Are Activated in Response to SARS-CoV-2 Infection and Are Associated with COVID-19 Severity in Patients. *J. Exp. Med.* **2021**, *218*, e20201707. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Gorog, D.A.; Storey, R.F.; Gurbel, P.A.; Tantry, U.S.; Berger, J.S.; Chan, M.Y.; Duerschmied, D.; Smyth, S.S.; Parker, W.A.E.; Ajjan, R.A.; et al. Current and Novel Biomarkers of Thrombotic Risk in COVID-19: A Consensus Statement from the International COVID-19 Thrombosis Biomarkers Colloquium. *Nat. Rev. Cardiol.* **2022**, *19*, 475–495. [\[CrossRef\]](#)
6. Zimmermann, H. Extracellular ATP and Other Nucleotides—Ubiquitous Triggers of Intercellular Messenger Release. *Purinergic Signal.* **2016**, *12*, 25–57. [\[CrossRef\]](#)
7. Giuliani, A.L.; Sarti, A.C.; di Virgilio, F. Extracellular Nucleotides and Nucleosides as Signalling Molecules. *Immunol. Lett.* **2019**, *205*, 16–24. [\[CrossRef\]](#)
8. Galgaro, B.C.; Beckenkamp, L.R.; Nunnenkamp, M.; Korb, V.G.; Naasani, L.I.S.; Roszek, K.; Wink, M.R. The Adenosinergic Pathway in Mesenchymal Stem Cell Fate and Functions. *Med. Res. Rev.* **2021**, *41*, 2316–2349. [\[CrossRef\]](#)
9. Schultz, I.C.; Bertoni, A.P.S.; Wink, M.R. Purinergic Signaling Elements Are Correlated with Coagulation Players in Peripheral Blood and Leukocyte Samples from COVID-19 Patients. *J. Mol. Med.* **2022**, *100*, 569–584. [\[CrossRef\]](#)
10. Franciosi, M.L.M.; Lima, M.D.M.; Schetinger, M.R.C.; Cardoso, A.M. Possible Role of Purinergic Signaling in COVID-19. *Mol. Cell. Biochem.* **2021**, *476*, 2891–2898. [\[CrossRef\]](#)
11. Luu, R.; Valdebenito, S.; Scemes, E.; Cibelli, A.; Spray, D.C.; Rovegno, M.; Tichauer, J.; Cottignies-Calamarte, A.; Rosenberg, A.; Capron, C.; et al. Pannexin-1 Channel Opening Is Critical for COVID-19 Pathogenesis. *iScience* **2021**, *24*, 103478. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Ahmadi, P.; Hartjen, P.; Kohsar, M.; Kummer, S.; Schmiedel, S.; Bockmann, J.-H.; Fathi, A.; Huber, S.; Haag, F.; zur Wiesch, J.S. Defining the CD39/CD73 Axis in SARS-CoV-2 Infection: The CD73⁺ Phenotype Identifies Polyfunctional Cytotoxic Lymphocytes. *Cells* **2020**, *9*, 1750. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Whitehead, G.S.; Karcz, T.P.; Tosh, D.K.; Jung, Y.-H.; Wen, Z.; Campbell, R.G.; Gopinath, V.; Gao, Z.-G.; Jacobson, K.A.; Cook, D.N. Effects of Purinergic Receptor Deletion or Pharmacologic Modulation on Pulmonary Inflammation in Mice. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2022**, *5*, 973–984. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Tokano, M.; Takagi, R.; Kawano, M.; Maesaki, S.; Tarumoto, N.; Matsushita, S. Signaling via dopamine and adenosine receptors modulate viral peptide-specific and T-cell IL-8 response in COVID-19. *Immunol. Med.* **2022**, *45*, 162–167. [\[CrossRef\]](#)
15. da Silva, G.B.; Manica, D.; da Silva, A.P.; Kosvoski, G.C.; Hanauer, M.; Assmann, C.E.; Simões, J.L.B.; Pillat, M.M.; de Lara, J.D.; Marafon, F.; et al. High Levels of Extracellular ATP Lead to Different Inflammatory Responses in COVID-19 Patients according to the Severity. *J. Mol. Med.* **2022**, *100*, 645–663. [\[CrossRef\]](#)
16. Berger, J.S.; Kornblith, L.Z.; Gong, M.N.; Reynolds, H.R.; Cushman, M.; Cheng, Y.; McVerry, B.J.; Kim, K.S.; Lopes, R.D.; Atassi, B.; et al. Effect of P2Y12 Inhibitors on Survival Free of Organ Support among Non-Critically Ill Hospitalized Patients with COVID-19. *JAMA* **2022**, *327*, 227. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Edwards, C.; Klekot, O.; Halugan, L.; Korchev, Y. Follow Your Nose: A Key Clue to Understanding and Treating COVID-19. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*. [\[CrossRef\]](#)
18. Edwards, C. New Horizons: Does Mineralocorticoid Receptor Activation by Cortisol Cause ATP Release and COVID-19 Complications? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2021**, *106*, 622–635. [\[CrossRef\]](#)
19. Mina, A.; van Besien, K.; Platanias, L.C. Hematological Manifestations of COVID-19. *Leuk. Lymphoma* **2020**, *61*, 2790–2798. [\[CrossRef\]](#)
20. Townsend, L.; Fogarty, H.; Dyer, A.; Martin-Loeches, I.; Bannan, C.; Nadarajan, P.; Bergin, C.; O'Farrelly, C.; Conlon, N.; Bourke, N.M.; et al. Prolonged Elevation of D-dimer Levels in Convalescent COVID-19 Patients Is Independent of the Acute Phase Response. *J. Thromb. Haemost.* **2021**, *19*, 1064–1070. [\[CrossRef\]](#)
21. Schulman, S.; Sholzberg, M.; Spyropoulos, A.C.; Zarychanski, R.; Resnick, H.E.; Bradbury, C.A.; Broxmeyer, L.; Connors, J.M.; Falanga, A.; Iba, T.; et al. ISTH Guidelines for Antithrombotic Treatment in COVID-19. *J. Thromb. Haemost.* **2022**, *20*, 2214–2225. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Ionescu, F.; Jaiyesimi, I.; Petrescu, I.; Lawler, P.R.; Castillo, E.; Munoz-Maldonado, Y.; Imam, Z.; Narasimhan, M.; Abbas, A.E.; Konde, A.; et al. Association of Anticoagulation Dose and Survival in Hospitalized COVID-19 Patients: A Retrospective Propensity Score-weighted Analysis. *Eur. J. Haematol.* **2021**, *106*, 165–174. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Ionescu, F.; Grasso-Knight, G.; Castillo, E.; Naeem, E.; Petrescu, I.; Imam, Z.; Patel, V.K.; Narasimhan, M.; Nair, G.B. Therapeutic Anticoagulation Delays Death in COVID-19 Patients: Cross-Sectional Analysis of a Prospective Cohort. *TH Open* **2020**, *04*, e263–e270. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. de Andrade Falcão, F.J.; Carvalho, L.; Chan, M.; Alves, C.M.R.; Carvalho, A.C.C.; Caixeta, A.M. P2Y12 Platelet Receptors: Importance in Percutaneous Coronary Intervention. *Arq. Bras. Cardiol.* **2013**, *101*, 277–282. [\[CrossRef\]](#)
25. MICROMEDEX Drug References: IBM Corporation. 2023. Available online: www.micromedexsolutions.com (accessed on 18 August 2021).
26. Afonso, A.; Marques, G.; Gonçalves, A.; Barroso, P.; Gonzalez, A.; Rodrigues, H.; Ferreira, M.J. A Terapêutica Antitrombótica: Atual e Em Desenvolvimento. *Angiol. E Cir. Vasc.* **2016**, *12*, 170–179. [\[CrossRef\]](#)
27. Schilling, U.; Dingemans, J.; Ufer, M. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Approved and Investigational P2Y12 Receptor Antagonists. *Clin. Pharm.* **2020**, *59*, 545–566. [\[CrossRef\]](#)

28. Mousa, S.A.; Jeske, W.P.; Fareed, J. Antiplatelet Therapy Prasugrel: A Novel Platelet ADP P2Y₁₂ Receptor Antagonist. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **2010**, *16*, 170–176. [\[CrossRef\]](#)
29. Liu, S.; Hou, L.; Li, C.; Zhao, Y.; Yao, X.; Zhang, X.; Tian, X. Contributions of UDP-Glucuronosyltransferases to Human Hepatic and Intestinal Metabolism of Ticagrelor and Inhibition of UGTs and Cytochrome P450 Enzymes by Ticagrelor and Its Glucuronidated Metabolite. *Front. Pharm.* **2021**, *12*, 761814. [\[CrossRef\]](#)
30. Ferreiro, J.L.; Ueno, M.; Angiolillo, D.J. Cangrelor: A Review on Its Mechanism of Action and Clinical Development. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* **2009**, *7*, 1195–1201. [\[CrossRef\]](#)
31. Flumignan, R.L.; Civile, V.T.; de Sá Tinôco, J.D.; Pascoal, P.I.; Areias, L.L.; Matar, C.F.; Tendal, B.; Trevisani, V.F.; Atallah, Á.N.; Nakano, L.C. Anticoagulants for People Hospitalised with COVID-19. *Cochrane. Database Syst. Rev.* **2022**, 2022. [\[CrossRef\]](#)
32. Bohula, E.A.; Berg, D.D.; Lopes, M.S.; Connors, J.M.; Babar, I.; Barnett, C.F.; Chaudhry, S.-P.; Chopra, A.; Ginete, W.; Jeong, M.H.; et al. Anticoagulation and Antiplatelet Therapy for Prevention of Venous and Arterial Thrombotic Events in Critically Ill Patients with COVID-19: COVID-PACT. *Circulation* **2022**, *146*, 1344–1356. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Viecca, M.; Radovanovic, D.; Forleo, G.B.; Santus, P. Enhanced Platelet Inhibition Treatment Improves Hypoxemia in Patients with Severe COVID-19 and Hypercoagulability. A Case Control, Proof of Concept Study. *Pharmacol. Res.* **2020**, *158*, 104950. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Sharma, S.; Danckers, M.; Sanghavi, D.; Chakraborty, R.K. High Flow Nasal Cannula. 5 February 2023; In *StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023.
35. Choudhary, R.; Kaushik, A.; Sharma, J.B. COVID-19 Pandemic and Stent Thrombosis in a Post Percutaneous Coronary Intervention Patient—a Case Report Highlighting the Selection of P2Y₁₂ Inhibitor. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* **2020**, *10*, 898–901. [\[CrossRef\]](#)
36. Florescu, S.; Stanciu, D.; Zaharia, M.; Kosa, A.; Codreanu, D.; Kidwai, A.; Masood, S.; Kaye, C.; Coutts, A.; MacKay, L.; et al. Effect of Antiplatelet Therapy on Survival and Organ Support-Free Days in Critically Ill Patients with COVID-19. *JAMA* **2022**, *327*, 1247. [\[CrossRef\]](#)
37. Omarjee, L.; Meilhac, O.; Perrot, F.; Janin, A.; Mahe, G. Can Ticagrelor Be Used to Prevent Sepsis-Induced Coagulopathy in COVID-19? *Clin. Immunol.* **2020**, *216*, 108468. [\[CrossRef\]](#)
38. Spick, M.; Campbell, A.; Baricevic-Jones, I.; von Gerichten, J.; Lewis, H.-M.; Frampas, C.F.; Longman, K.; Stewart, A.; Dunn-Walters, D.; Skene, D.J.; et al. Multi-Omics Reveals Mechanisms of Partial Modulation of COVID-19 Dysregulation by Glucocorticoid Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12079. [\[CrossRef\]](#)
39. Crothers, K.; DeFaccio, R.; Tate, J.; Alba, P.R.; Goetz, M.B.; Jones, B.; King, J.T.; Marconi, V.; Ohl, M.E.; Rentsch, C.T.; et al. Dexamethasone in Hospitalised COVID-19 Patients Not on Intensive Respiratory Support. *Eur. Respir. J.* **2022**, *60*, 2102532. [\[CrossRef\]](#)
40. Petito, E.; Falcinelli, E.; Paliani, U.; Cesari, E.; Vaudo, G.; Sebastiano, M.; Cerotto, V.; Guglielmini, G.; Gori, F.; Malvestiti, M.; et al. Association of Neutrophil Activation, More than Platelet Activation, with Thrombotic Complications in Coronavirus Disease 2019. *J. Infect. Dis.* **2021**, *223*, 933–944. [\[CrossRef\]](#)
41. Cesta, M.C.; Zippoli, M.; Marsiglia, C.; Gavioli, E.M.; Cremonesi, G.; Khan, A.; Mantelli, F.; Allegritti, M.; Balk, R. Neutrophil Activation and Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in COVID-19 ARDS and Immunothrombosis. *Eur. J. Immunol.* **2023**, *53*, 2250010. [\[CrossRef\]](#)
42. Petiz, L.L.; Glaser, T.; Scharfstein, J.; Ratajczak, M.Z.; Ulrich, H. P2Y₁₄ Receptor as a Target for Neutrophilia Attenuation in Severe COVID-19 Cases: From Hematopoietic Stem Cell Recruitment and Chemotaxis to Thrombo-inflammation. *Stem. Cell. Rev. Rep.* **2021**, *17*, 241–252. [\[CrossRef\]](#)
43. Battistone, M.A.; Mendelsohn, A.C.; Spallanzani, R.G.; Allegritti, A.S.; Liberman, R.N.; Sesma, J.; Kalim, S.; Wall, S.M.; Bonventre, J.V.; Lazarowski, E.R.; et al. Proinflammatory P2Y₁₄ Receptor Inhibition Protects against Ischemic Acute Kidney Injury in Mice. *J. Clin. Invest.* **2020**, *130*, 3734–3749. [\[CrossRef\]](#)
44. Karcz, T.P.; Whitehead, G.S.; Nakano, K.; Nakano, H.; Grimm, S.A.; Williams, J.G.; Deterding, L.J.; Jacobson, K.A.; Cook, D.N. UDP-Glucose and P2Y₁₄ Receptor Amplify Allergen-Induced Airway Eosinophilia. *J. Clin. Invest.* **2021**, *131*, e140709. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Li, F.; Li, W.; Li, X.; Li, F.; Zhang, L.; Wang, B.; Huang, G.; Guo, X.; Wan, L.; Liu, Y.; et al. Geniposide Attenuates Inflammatory Response by Suppressing P2Y₁₄ Receptor and Downstream ERK1/2 Signaling Pathway in Oxygen and Glucose Deprivation-Induced Brain Microvascular Endothelial Cells. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *185*, 77–86. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Jain, S.; Jacobson, K.A. Adipocyte Purinergic Receptors Activated by Uracil Nucleotides as Obesity and Type 2 Diabetes Targets. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2022**, *63*, 102190. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Meister, J.; Le Duc, D.; Ricken, A.; Burkhardt, R.; Thiery, J.; Pfannkuche, H.; Polte, T.; Grosse, J.; Schöneberg, T.; Schulz, A. The G Protein-Coupled Receptor P2Y₁₄ Influences Insulin Release and Smooth Muscle Function in Mice. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 23353–23366. [\[CrossRef\]](#)
48. Cho, J.; Yusuf, R.; Kook, S.; Attar, E.; Lee, D.; Park, B.; Cheng, T.; Scadden, D.T.; Lee, B.C. Purinergic P2Y₁₄ Receptor Modulates Stress-Induced Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Senescence. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124*, 3159–3171. [\[CrossRef\]](#)
49. Niimi, A.; Saito, J.; Kamei, T.; Shinkai, M.; Ishihara, H.; Machida, M.; Miyazaki, S. Randomised Trial of the P2X₃ Receptor Antagonist Sivopixant for Refractory Chronic Cough. *Eur. Respir. J.* **2022**, *59*, 2100725. [\[CrossRef\]](#)

50. Ribeiro, D.E.; Oliveira-Giacomelli, Á.; Glaser, T.; Arnaud-Sampaio, V.F.; Andrejew, R.; Dieckmann, L.; Baranova, J.; Lameu, C.; Ratajczak, M.Z.; Ulrich, H. Hyperactivation of P2X7 Receptors as a Culprit of COVID-19 Neuropathology. *Mol. Psychiatry* **2021**, *26*, 1044–1059. [\[CrossRef\]](#)
51. Phetsouphanh, C.; Darley, D.R.; Wilson, D.B.; Howe, A.; Munier, C.M.L.; Patel, S.K.; Juno, J.A.; Burrell, L.M.; Kent, S.J.; Dore, G.J.; et al. Immunological Dysfunction Persists for 8 Months Following Initial Mild-to-Moderate SARS-CoV-2 Infection. *Nat. Immunol.* **2022**, *23*, 210–216. [\[CrossRef\]](#)
52. García-Villalba, J.; Hurtado-Navarro, L.; Peñín-Franch, A.; Molina-López, C.; Martínez-Alarcón, L.; Angosto-Bazarrá, D.; Baroja-Mazo, A.; Pelegrin, P. Soluble P2X7 Receptor Is Elevated in the Plasma of COVID-19 Patients and Correlates with Disease Severity. *Front. Immunol.* **2022**, *13*. [\[CrossRef\]](#)
53. di Virgilio, F.; Tang, Y.; Sarti, A.C.; Rossato, M. A Rationale for Targeting the P2X7 Receptor in Coronavirus Disease 19. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 4990–4994. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Kelley, N.; Jeltama, D.; Duan, Y.; He, Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3328. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Muller, M.; Lefebvre, F.; Harlay, M.-L.; Gladys, L.; Becker, G.; Muller, C.; Aberkane, O.; Tawk, M.; Julians, M.; Romoli, A.; et al. Impact of Intravenous Lidocaine on Clinical Outcomes of Patients with ARDS during COVID-19 Pandemia (LidoCovid): A Structured Summary of a Study Protocol for a Randomised Controlled Trial. *Trials* **2021**, *22*, 131. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Rylova, A.; Chowdhury, S.; Amirfarzan, H.; Leissner, K.; Schumann, R. Intravenous Lidocaine Infusion in a Case of Severe COVID-19 Infection. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* **2021**, *37*, 481. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Kory, P.; Meduri, G.U.; Varon, J.; Iglesias, J.; Marik, P.E. Review of the Emerging Evidence Demonstrating the Efficacy of Ivermectin in the Prophylaxis and Treatment of COVID-19. *Am. J. Ther.* **2021**, *28*, e299–e318. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Bryant, A.; Lawrie, T.A.; Dowswell, T.; Fordham, E.J.; Mitchell, S.; Hill, S.R.; Tham, T.C. Ivermectin for Prevention and Treatment of COVID-19 Infection: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Trial Sequential Analysis to Inform Clinical Guidelines. *Am. J. Ther.* **2021**, *28*, e434–e460. [\[CrossRef\]](#)
59. Shafiee, A.; Athar, M.M.T.; Gargari, O.K.; Jafarabady, K.; Siahvoshi, S.; Mozhgani, S.-H. Ivermectin under Scrutiny: A Systematic Review and Meta-Analysis of Efficacy and Possible Sources of Controversies in COVID-19 Patients. *Virol. J.* **2022**, *19*, 102. [\[CrossRef\]](#)
60. Reis, G.; Silva, E.A.S.M.; Silva, D.C.M.; Thabane, L.; Milagres, A.C.; Ferreira, T.S.; dos Santos, C.V.Q.; Campos, V.H.S.; Nogueira, A.M.R.; de Almeida, A.P.F.G.; et al. Effect of Early Treatment with Ivermectin among Patients with COVID-19. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 1721–1731. [\[CrossRef\]](#)
61. Chaccour, C.; Casellas, A.; Blanco-Di Matteo, A.; Pineda, I.; Fernandez-Montero, A.; Ruiz-Castillo, P.; Richardson, M.-A.; Rodríguez-Mateos, M.; Jordán-Iborra, C.; Brew, J.; et al. The Effect of Early Treatment with Ivermectin on Viral Load, Symptoms and Humoral Response in Patients with Non-Severe COVID-19: A Pilot, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial. *EclinicalMedicine* **2021**, *32*, 100720. [\[CrossRef\]](#)
62. Effendi, W.I.; Nagano, T.; Kobayashi, K.; Nishimura, Y. Focusing on Adenosine Receptors as a Potential Targeted Therapy in Human Diseases. *Cells* **2020**, *9*, 785. [\[CrossRef\]](#)
63. DiNicolantonio, J.J.; Barroso-Aranda, J. Harnessing Adenosine A2A Receptors as a Strategy for Suppressing the Lung Inflammation and Thrombotic Complications of COVID-19: Potential of Pentoxifylline and Dipyridamole. *Med. Hypotheses* **2020**, *143*, 110051. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Romero-Martínez, B.S.; Montaña, L.M.; Solís-Chagoyán, H.; Sommer, B.; Ramírez-Salinas, G.L.; Pérez-Figueroa, G.E.; Flores-Soto, E. Possible Beneficial Actions of Caffeine in SARS-CoV-2. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5460. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Caracciolo, M.; Correale, P.; Mangano, C.; Foti, G.; Falcone, C.; Macheda, S.; Cuzzola, M.; Conte, M.; Falzea, A.C.; Iuliano, E.; et al. Efficacy and Effect of Inhaled Adenosine Treatment in Hospitalized COVID-19 Patients. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 613070. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Henkin, R.I. How Does COVID-19 Infection Affect Smell? *Am. J. Otolaryngol.* **2021**, *42*, 102912. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Henkin, R.I.; Velicu, I. CAMP and CGMP in Nasal Mucus Related to Severity of Smell Loss in Patients with Smell Dysfunction. *Clin. Investig. Med.* **2008**, *31*, 78. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Henkin, R.I.; Velicu, I.; Papathanassiou, A. CAMP and CGMP in Human Parotid Saliva: Relationships to Taste and Smell Dysfunction, Gender, and Age. *Am. J. Med. Sci.* **2007**, *334*, 431–440. [\[CrossRef\]](#)
69. Henkin, R.I.; Schultz, M.; Minnick-Poppe, L. Intranasal Theophylline Treatment of Hyposmia and Hypogeusia. *Arch. Otolaryngol. Head Neck. Surg.* **2012**, *138*, 1064. [\[CrossRef\]](#)
70. Neta, F.I.; Fernandes, A.C.L.; Vale, A.J.M.; Pinheiro, F.I.; Cobucci, R.N.; de Azevedo, E.P.; Guzen, F.P. Pathophysiology and Possible Treatments for Olfactory-Gustatory Disorders in Patients Affected by COVID-19. *Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov.* **2021**, *2*, 100035. [\[CrossRef\]](#)
71. Gupta, S.; Lee, J.J.; Perrin, A.; Khan, A.; Smith, H.J.; Farrell, N.; Kallogjeri, D.; Piccirillo, J.F. Efficacy and Safety of Saline Nasal Irrigation Plus Theophylline for Treatment of COVID-19–Related Olfactory Dysfunction. *JAMA Otolaryngol.-Head Neck Surg.* **2022**, *148*, 830. [\[CrossRef\]](#)
72. Lee, J.J.; Peterson, A.M.; Kallogjeri, D.; Jiramongkolchai, P.; Kukuljan, S.; Schneider, J.S.; Klatt-Cromwell, C.N.; Drescher, A.J.; Brunworth, J.D.; Piccirillo, J.F. Smell Changes and Efficacy of Nasal Theophylline (SCENT) Irrigation: A Randomized Controlled Trial for Treatment of Post-Viral Olfactory Dysfunction. *Am. J. Otolaryngol.* **2022**, *43*, 103299. [\[CrossRef\]](#)

73. Wall, G.C.; Smith, H.L.; Trump, M.W.; Mohr, J.D.; DuMontier, S.P.; Sabates, B.L.; Ganapathiraju, I.; Kable, T.J. Pentoxifylline or Theophylline Use in Hospitalized COVID-19 Patients Requiring Oxygen Support. *Clin. Respir. J.* **2021**, *15*, 843–846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Rolta, R.; Salaria, D.; Sharma, B.; Awofisayo, O.; Fadare, O.A.; Sharma, S.; Patel, C.N.; Kumar, V.; Sourirajan, A.; Baumler, D.J.; et al. Methylxanthines as Potential Inhibitor of SARS-CoV-2: An In Silico Approach. *Curr. Pharmacol. Rep.* **2022**, *8*, 149–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Wu, C.-S.; Chiang, H.-M.; Chen, Y.; Chen, C.-Y.; Chen, H.-F.; Su, W.-C.; Wang, W.-J.; Chou, Y.-C.; Chang, W.-C.; Wang, S.-C.; et al. Prospects of Coffee Leaf against SARS-CoV-2 Infection. *Int. J. Biol. Sci.* **2022**, *18*, 4677–4689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Díaz-García, E.; García-Tovar, S.; Alfaro, E.; Zamarrón, E.; Mangas, A.; Galera, R.; Ruíz-Hernández, J.J.; Solé-Violán, J.; Rodríguez-Gallego, C.; Van-Den-Rym, A.; et al. Role of CD39 in COVID-19 Severity: Dysregulation of Purinergic Signaling and Thromboinflammation. *Front. Immunol.* **2022**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Dorneles, G.P.; Teixeira, P.C.; da Silva, I.M.; Schipper, L.L.; Filho, P.C.S.; Junior, L.C.R.; Bonorino, C.; Peres, A.; Fonseca, S.G.; Monteiro, M.C.; et al. Alterations in CD39/CD73 Axis of T Cells Associated with COVID-19 Severity. *J. Cell. Physiol.* **2022**, *237*, 3394–3407. [[CrossRef](#)]
78. Kreuzberger, N.; Hirsch, C.; Chai, K.L.; Tomlinson, E.; Khosravi, Z.; Popp, M.; Neidhardt, M.; Piechotta, V.; Salomon, S.; Valk, S.J.; et al. SARS-CoV-2-Neutralising Monoclonal Antibodies for Treatment of COVID-19. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2021**, 2021. [[CrossRef](#)]
79. Zlamal, J.; Althaus, K.; Jaffal, H.; Häberle, H.; Pelzl, L.; Singh, A.; Witzemann, A.; Weich, K.; Bitzer, M.; Malek, N.; et al. Upregulation of CAMP Prevents Antibody-Mediated Thrombus Formation in COVID-19. *Blood Adv.* **2022**, *6*, 248–258. [[CrossRef](#)]
80. Gresele, P.; Momi, S.; Falcinelli, E. Anti-Platelet Therapy: Phosphodiesterase Inhibitors. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *72*, 634–646. [[CrossRef](#)]
81. Macatangay, B.J.C.; Jackson, E.K.; Abebe, K.Z.; Comer, D.; Cyktor, J.; Klammar-Blain, C.; Borowski, L.; Gillespie, D.G.; Mel-lors, J.W.; Rinaldo, C.R.; et al. A Randomized, Placebo-Controlled, Pilot Clinical Trial of Dipyridamole to Decrease Human Immunodeficiency Virus–Associated Chronic Inflammation. *J. Infect. Dis.* **2020**, *221*, 1598–1606. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

7. CAPÍTULO II. POTENCIAL IMUNOMODULATÓRIO E DE MODULAÇÃO DE FUNÇÕES CELULARES DA INOSINA EM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS (MSCs) DE DIFERENTES TECIDOS DE EXTRAÇÃO

Esse capítulo apresenta dados em preparação para futuro artigo científico, onde serão investigados o potencial de formação de INO por MSCs obtidas de diferentes tecidos humanos, bem como a correlação com a expressão gênica e proteicas das enzimas purinérgicas, avaliando seu possível efeito na capacidade de proliferação, adesão, migração e potencial na imunomodulação das MSCs.

7.1 METODOLOGIA

7.1.1 COMITÊ DE ÉTICA

As extrações das células estromais mesenquimais de tecido adiposo foram feitas no Laboratório de Biologia Celular no projeto aprovado pelo comitê de ética, PARECER Nº 3.734.612 (**ANEXO 1**) do projeto Pesquisa Isolamento de células a partir de material de descarte humano para estudos em medicina (UFCSPA). As células de tecido de polpa de dente decíduo e tecido de cordão umbilical foram obtidas por uma parceria com a empresa HEMOCORD, sendo os projetos aprovados pelo comitê de ética, PARECER Nº 4.671.107 (Unisinos) e PARECER Nº 3.824.230 (Instituto de Cardiologia do RS) (**ANEXOS 2 e 3**).

7.1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1.2.1 EXTRAÇÕES DAS MSCS

As células de polpa de dente (PD) e de tecido de cordão umbilical (TCU) foram fornecidas em parceria com a empresa Hemocord (site disponível em: <https://hemocord.com.br/>), que realizou as extrações de células humanas e parte das caracterizações.

As amostras de células de tecido adiposo (ADSCs) foram extraídas do tecido de pacientes submetidos a cirurgia de abdominoplastia no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. O material foi tratado com colagenase tipo I (250 U/mg, 1 mg/mL) a 37 °C por 30 minutos com agitação, conforme descrito anteriormente por nosso grupo de pesquisa (NAASANI *et al*, 2022).

A reação enzimática foi interrompida com DMEM Low Glicose, contendo 10% de FBS (soro fetal bovino) e 1% de penicilina/estreptomicina. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 600 × g por 10 minutos e o sobrenadante foi removido. O pellet resultante foi suspenso em uma solução de lise de eritrócitos (150 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃ e 1 mM EDTA) com agitação mecânica por 15 minutos à temperatura ambiente, centrifugada, plaqueadas em placas de 6 poços e cultivadas até atingir alta confluência.

7.1.2.2 CARACTERIZAÇÕES DAS MSCS

Parte das caracterizações foram feitas em parceria com a empresa HEMOCORD. Foi analisada por citometria de fluxo a positividade populacional das células pelos marcadores CD73+, CD90+ e CD105+. Foram também analisadas pela capacidade de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos.

7.1.2.3 CULTURA CELULAR

As células foram mantidas em frascos de cultura com meio *Dulbecco modification of Minimum Essential Media* (DMEM) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos em estufa úmida com 5% de CO₂ à temperatura de 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada 48-72 horas, sendo as células tripsinizadas com *Trypsin* EDTA (0,2 EDTA/0,25g tripsina) sempre que atingida uma confluência de 90%.

7.1.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA E GRÁFICOS

Os gráficos e análises estatísticas foram realizados no programa GraphPad Prism 8.0.2, com dados expressos como a média $\pm$ erro padrão. Para citometria, adesão, migração e proliferação os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA de uma via, enquanto para a análise de migração foi utilizada ANOVA de duas vias, seguida por teste post hoc de Tukey. Diferenças entre os valores médios foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

7.1.2.5 CONCENTRAÇÕES DE INOSINA

Foram escolhidas diferentes concentrações de INO com base na média dos valores de afinidade conhecida destes receptores a INO (VALADA et al., 2023), sendo as células testadas para os valores de 0 uM (Controle), 10 uM, 50 uM, 100 uM e 200 uM em ensaios de migração, adesão e proliferação.

7.1.2.6 CITOMETRIA DE FLUXO

As citometrias foram realizadas após a tripsinização, contagem e separação de 3×10^5 células por tubo. Foram então fixadas com

Paraformaldeído 4% por 30 minutos sendo homogeneizadas a cada 10 minutos. Foram então incubados cada poço individualmente com os anticorpos PNP (PA5-79839 Invitrogen), ADA (MA2607 Invitrogen) e CD26 (MA5-33006 Invitrogen) na concentração de 2 ug/mL por no mínimo 12 horas, sendo depois incubadas com os anticorpos secundários de Anti-Rabbit Alexa 488 para os tubos controle e anticorpo PNP, e anticorpo secundário Anti-Mouse Alexa 488 para as enzimas ADA e CD26 por 1 hora. As células foram analisadas no citômetro FACSCalibur BD e plotadas nos gráficos pelo software Flowing Software versão 2.5.1.

7.1.2.7 ENSAIO DE MIGRAÇÃO

Foram plaqueadas 20 mil células por poço de cada um dos três tipos celulares em placas de 24 poços, sendo o meio de incubação trocado a cada 2 dias até atingir pelo menos 90% da confluência. O meio de incubação foi trocado para o meio com 2% de SFB 24 horas antes do experimento para evitar a proliferação celular. Retirado o meio, foi adicionado PBS 1X e realizado o risco verticalmente, posteriormente foi retirado o PBS e adicionados os meios de incubação a 2% SFB, com as respectivas concentrações de: controle (0 uM), INO 10 uM, INO 50 uM, INO 100 uM e INO 200 uM. As fotos foram realizadas nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas no equipamento EVOS e posteriormente foi feita a análise das imagens pelo programa ImageJ.

7.1.2.8 ENSAIO DE ADESÃO CELULAR

Foram plaqueadas 20 mil células por poço em placas de 96 poços com meio de incubação nas concentrações de 0 uM, 10 uM, 50 uM, 100 uM e 200 uM por uma hora. Posteriormente o meio de incubação foi retirado e lavado com PBS 1X, sendo as células fixadas com paraformaldeído a 4% e incubadas por 10 minutos. O fixador foi retirado, as células lavadas com PBS1X e então foram adicionados 100 uL de Cristal violeta a 0,5 % diluído em metanol 20% e incubado por 10 minutos. Após esta incubação as células foram lavadas novamente com PBS 1X e adicionados 100 uL por poço de ácido acético 10%. Posteriormente, foi realizada a leitura da placa por densidade óptica em 570 nm no espectrofotômetro SpectraMax M2e (Molecular Devices)(BECKENKAMP *et al.*, 2019).

7.1.2.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Foram plaqueadas 10 mil células por poço em placas de 24 poços. Após a adesão celular (24 horas) foram adicionados os meios de incubação com as concentrações de INO: controle (0 uM), INO 10 uM, INO 50 uM, INO 100 uM e INO 200 uM. Os meios foram trocados a cada 48 horas até atingir o tempo de 6 dias de tratamento. Subsequentemente, cada poço foi tripsinizado e as células contadas com azul de tripan em câmara de Neubauer. As contagens celulares foram então analisadas pelo software GraphPad Prism 8.0.2.

7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As informações apresentadas neste trabalho permanecem em fase de desenvolvimento, haja visto a necessidade de ampliação do tamanho amostral e finalização de experimentos como RT-PCR. Nesse contexto, prevê-se que tais dados em processo de desenvolvimento culminarão no desfecho do primeiro capítulo da tese de doutorado.

7.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MSC DE DIFERENTES TECIDOS DE EXTRAÇÃO

Inicialmente, realizou-se a caracterização das MSCs, uma vez que um dos focos deste estudo é a comparação destas células extraídas de diferentes tipos de tecido. As análises de imunofenotipagem, através de citometria de fluxo, confirmou a caracterização das células utilizadas nesse estudo como MSCs, pela positividade populacional pelos marcadores CD90+, CD73+ e CD105+ (**FIGURA 7**).

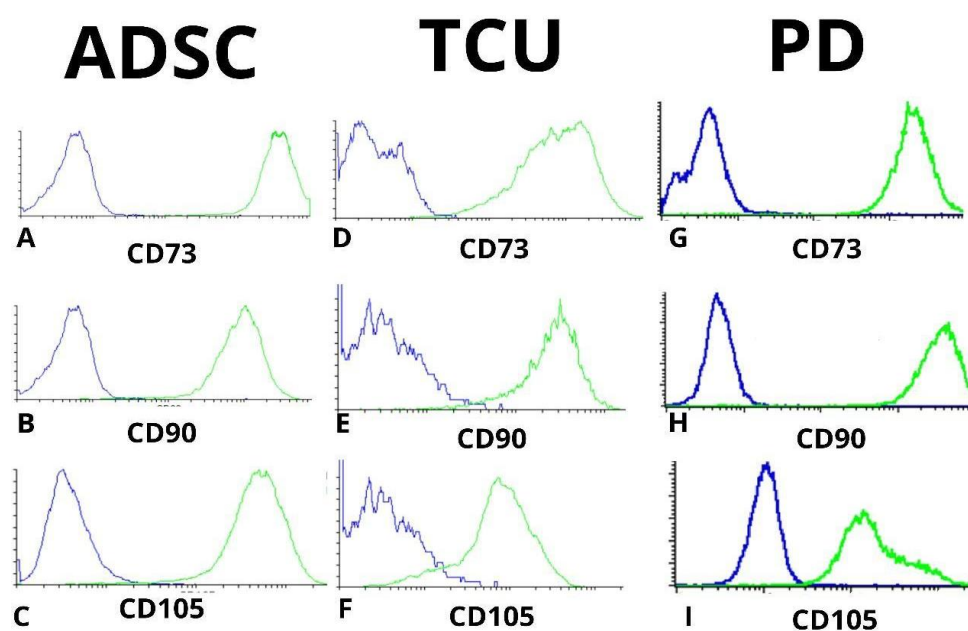


FIGURA 7. Caracterização por ensaio de citometria de fluxo com os marcados positivos para Células Estromais Mesenquimais (MSC) CD73+, CD90+ e CD73+ para as células extraídas de tecido adiposo (ADSC) (A, B e C), de tecido de cordão umbilical (TCU) (D, E e F) e de Polpa de Dente (PD) (F, G e H).

Posteriormente, confirmou-se a capacidade multipotente de diferenciação celular para tecidos mesodérmicos, demonstrando que as MSCs dos diferentes tecidos podiam se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos (**FIGURA 8**). Concluiu-se então que as células ADSC, PD e TCU são de fato MSCs.

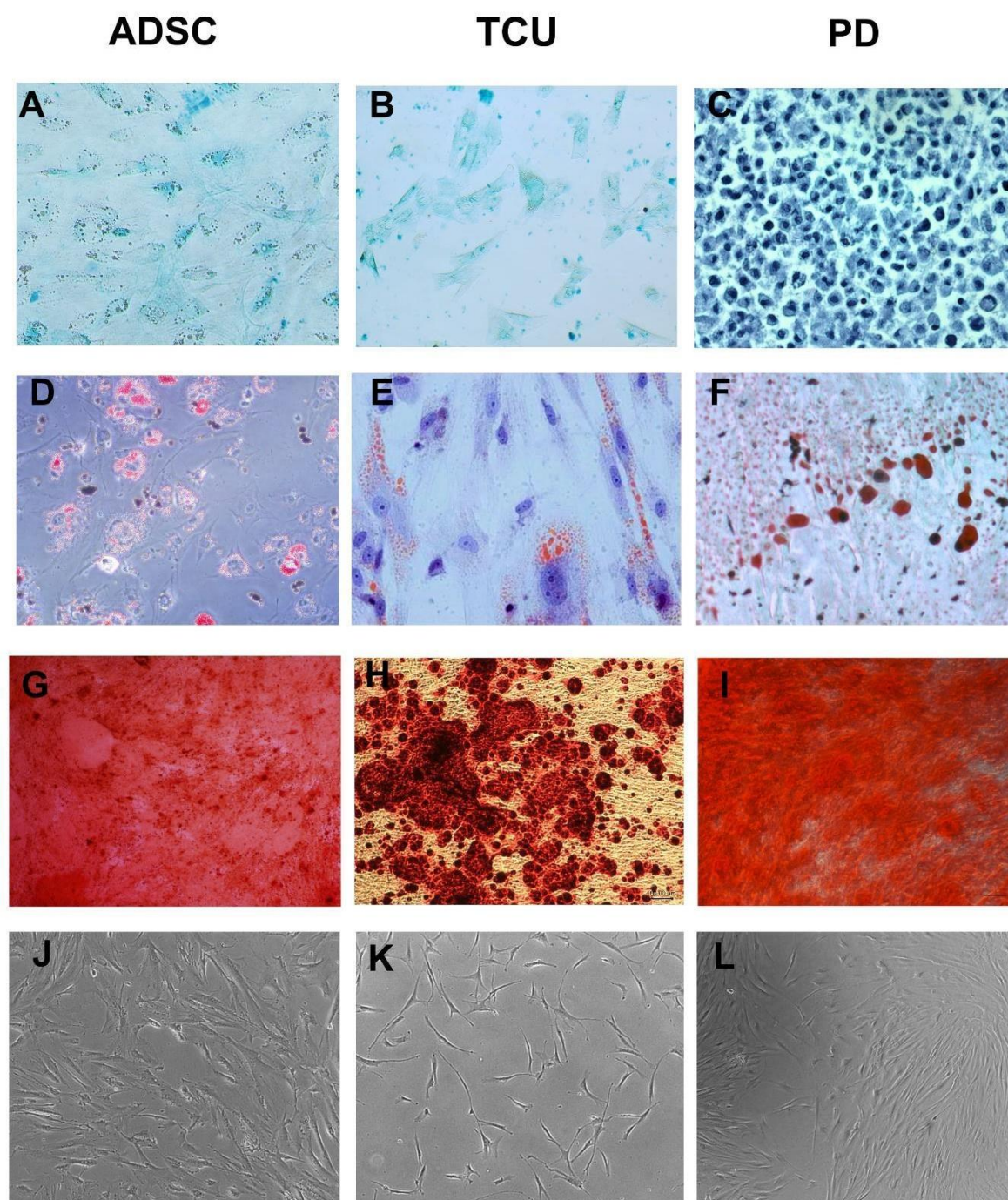


FIGURA 8. As células extraídas do tecido adiposo (ADSC) em aumento de 10x (J) e diferenciadas em condrócitos (A), adipócitos (D) e osteócitos (G). As células de Tecido de Cordão Umbilical (TCU) em aumento de 10x (K) e diferenciadas em condrócitos (B), adipócitos (E) e osteócitos (H). As células de Polpa de Dente (PD) em aumento de 10x (L), diferenciadas em condrócitos (C), adipócitos (F) e osteócitos (I).

7.2.2 EXPRESSÃO PROTEICA DAS ENZIMAS ADA, CD26 E PNP DAS CÉLULAS DE TECIDO ADSC, TCU E PD

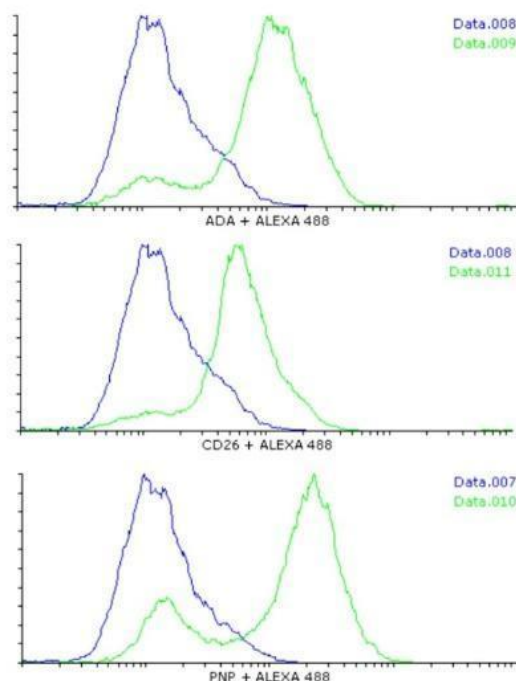
Sabe-se que a INO é gerada pela enzima ADA, a qual é ancorada à proteína CD26, envolvida na regulação da atividade enzimática e depuração de níveis excessivos de ADO (GALGARO et al., 2021). Para que pudéssemos investigar a ação da INO nestas células foi necessário antes verificar a presença destas enzimas e proteínas nestas populações celulares. Desse modo, foi realizado citometria de fluxo com anticorpos para as enzimas ADA, CD26 e PNP, esta última enzima responsável pela degradação da INO em hipoxantina no meio intracelular (**FIGURAS 9-14**).

A partir dos resultados obtidos até o momento, observou-se que as MSCs apresentaram alta taxa de expressão proteica das enzimas ADA, CD26 e PNP em quase todos os três tipos celulares analisados por citometria de fluxo. O tecido PD (Polpa de Dente) foi o que apresentou a maior porcentagem de células positivas (% positive population). As citometrias foram feitas com um N amostral de 2 tecidos distintos, exceto na enzima PNP nas ADSC, a qual possui apenas um N amostral.

Nas ADSCs, a média da porcentagem de população positiva para ADA foi de $68,33 \pm 1,91$. Para CD26 a média foi de $32,92 \pm 28,23$. Como para esta célula só foi obtido um N amostral para a enzima PNP, não foi possível calcular o desvio padrão, ficando a média final de porcentagem de população positiva em 73,09%. Nas células de TCU, a média da porcentagem de população positiva para a ADA foi de $86,94 \pm 3,44$. Para CD26 a média foi de $81,65 \pm 5,73$. Para a PNP, $79,61 \pm 1,00$. Nas células PD a média foi de $86,78 \pm 8,33$ para a ADA, $88,77 \pm 1,62$ para CD26 e $93,68 \pm 0,08$ para PNP (**FIGURA 9 - 14**).

Nas análises da Média de Intensidade de Fluorescência (MFI), houve maior variabilidade dentro do N amostral de cada tipo celular. Para as ADSC, o MFI para ADA foi de $167,35 \pm 56,37$. Para CD26 a média foi de $138,77 \pm 71,56$. Já no único N amostral para PNP a média foi de 218,70. Nas células de TCU, o MFI para ADA ficou em $307,29 \pm 200,55$; $207,60 \pm 146,66$ para CD26 e $246,22 \pm 75,51$ para PNP. Já nas PD, o MFI para ADA foi de $131,01 \pm 30,55$; $115,58 \pm 16,85$ para CD26 e $259,47 \pm 39,30$ para PNP (**FIGURA 9 - 14**).

ADSC3



ADSC1

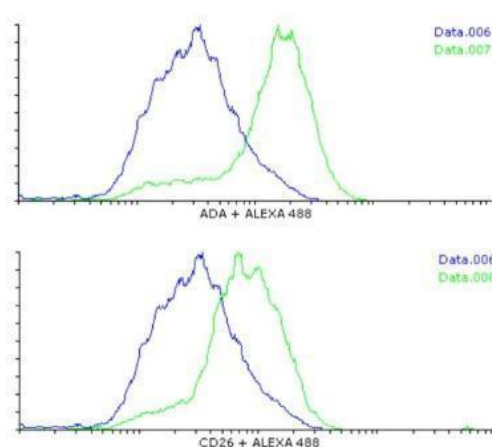
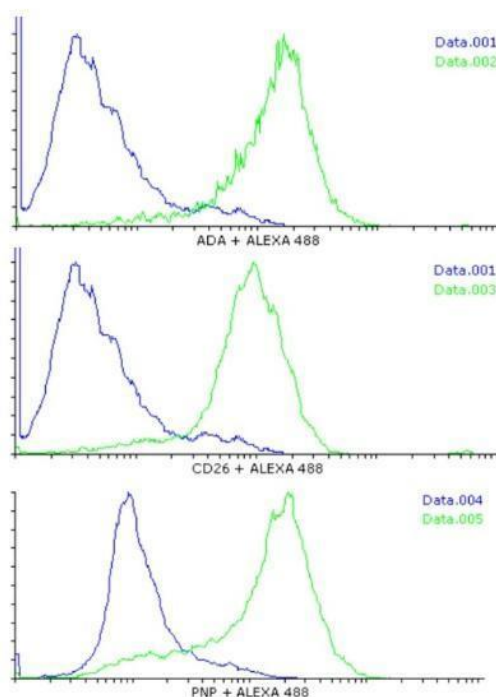


FIGURA 9. Histograma das citometrias realizadas para as enzimas ADA, CD26 e PNP com o anticorpo secundário Alexa 488 nas ADSC (n amostral = 2 para ADA e CD26) (n amostral = 1 para PNP).

TCU3



TCU2

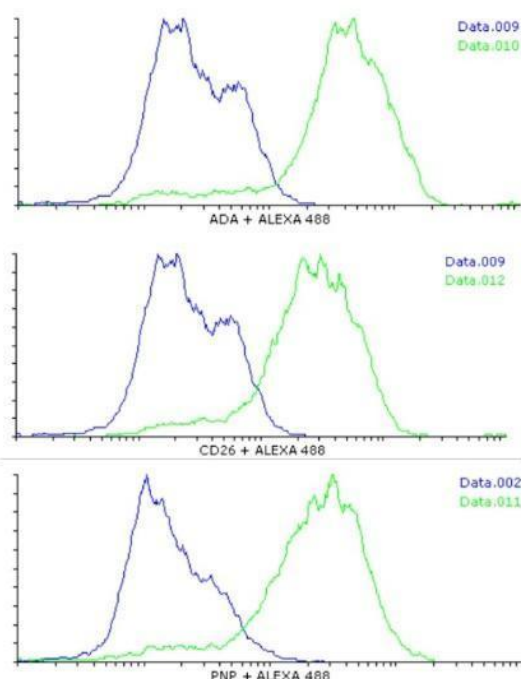


FIGURA 10. Histograma das citometrias realizadas para as enzimas ADA, CD26 e PNP com o anticorpo secundário Alexa 488 nas células de TCU (n amostral = 2 para ADA, CD26 e PNP).

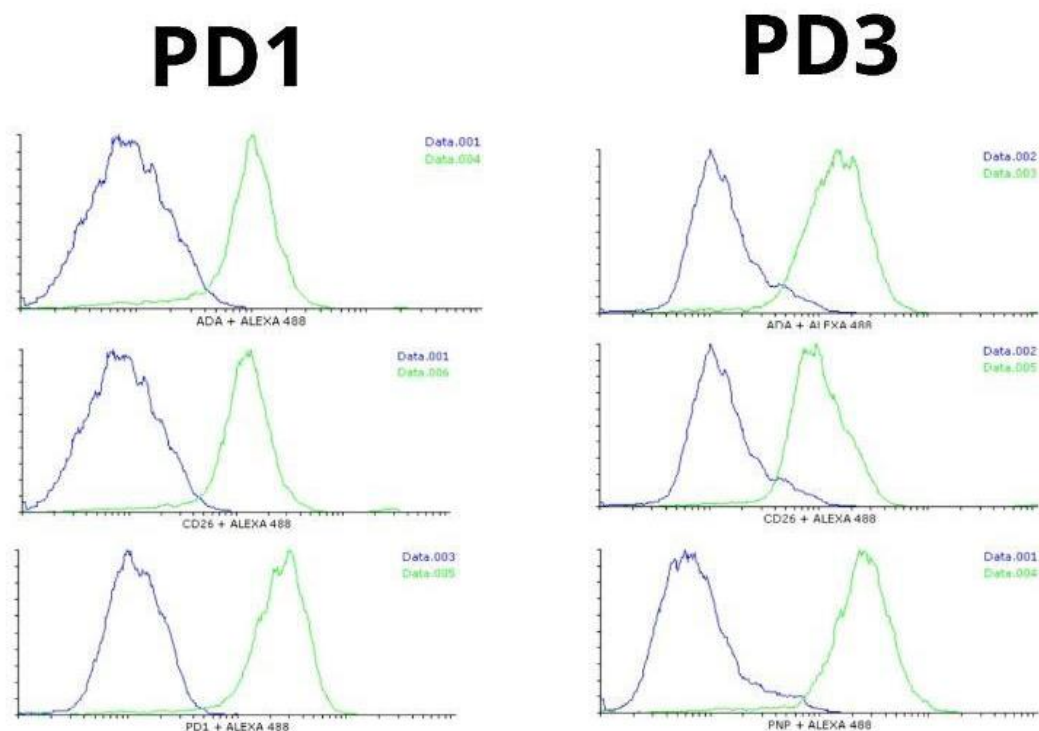


FIGURA 11. Histograma das citometrias realizadas para as enzimas ADA, CD26 e PNP com o anticorpo secundário Alexa 488 nas PD (n amostral = 2 para ADA, CD26 e PNP).

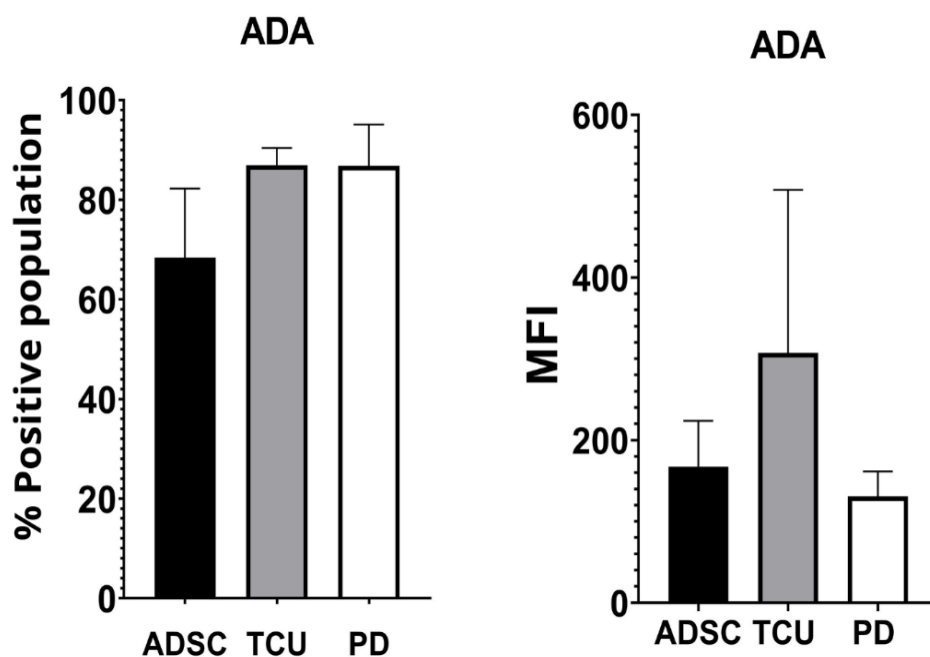


FIGURA 12. Expressão da porcentagem populacional e da média (MFI) para a enzima ADA nas MSC de tecido adiposo (ADSC), tecido de cordão umbilical (TCU) e de polpa de dente (PD). O teste estatístico utilizado foi o Two-way ANOVA com Tukey Post Hoc.

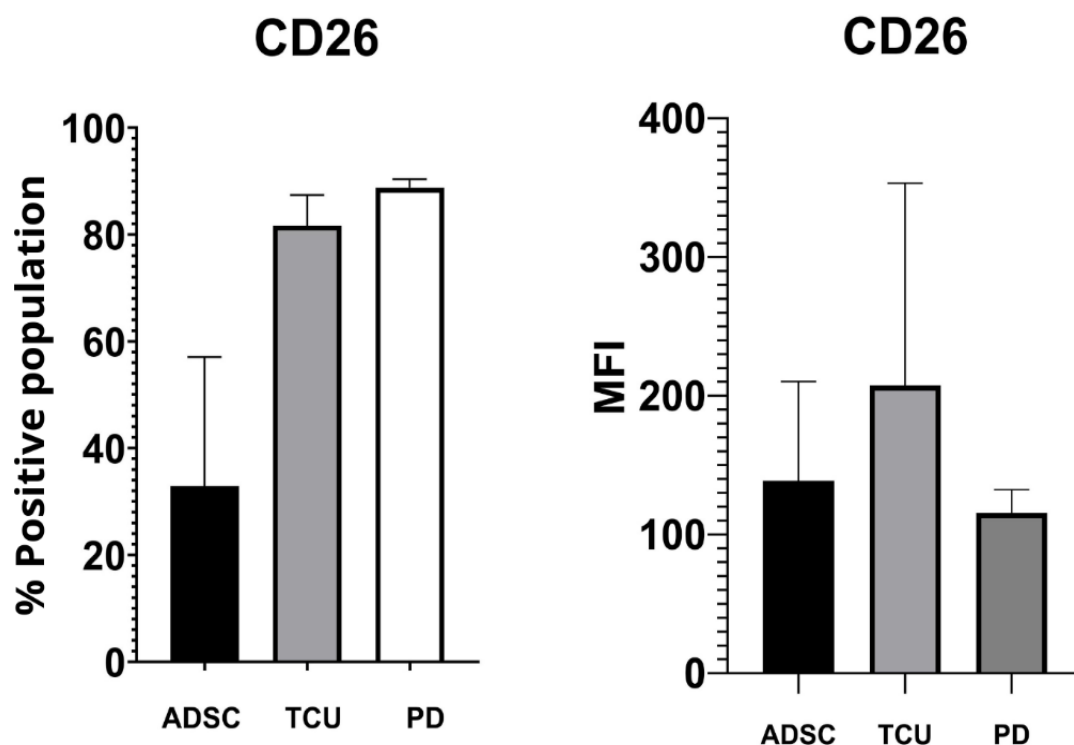


FIGURA 13. Expressão da porcentagem populacional visível e da média de intensidade de fluorescência média (MFI) para a enzima CD26 nas MSC de tecido adiposo (ADSC), tecido de cordão umbilical (TCU) e de polpa de dente (PD). O teste estatístico utilizado foi o Two-way ANOVA com Tukey Post Hoc.

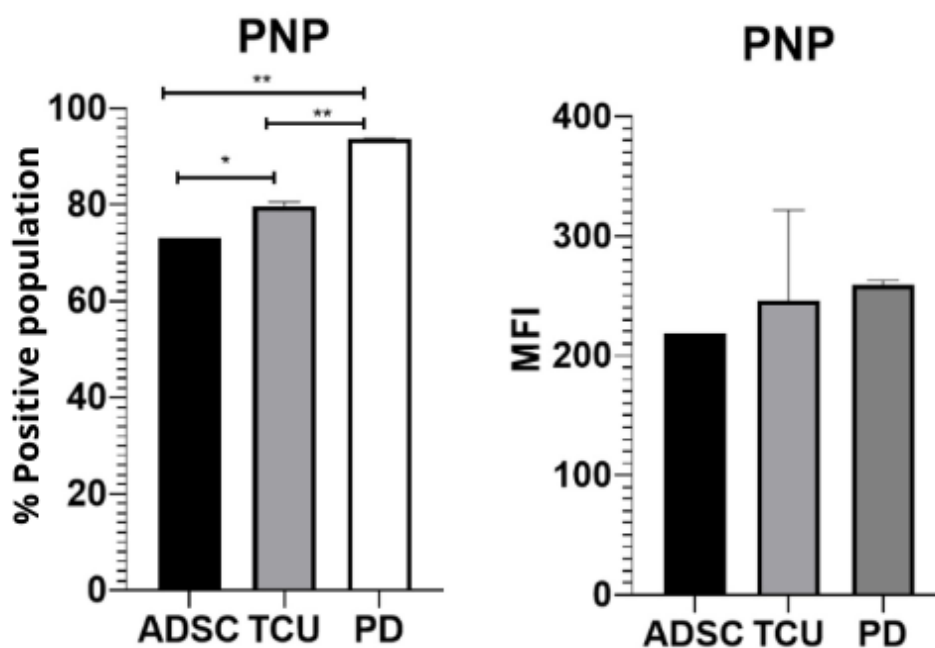


FIGURA 14. Expressão da porcentagem de população positiva e da média de intensidade de fluorescência média (MFI) para a enzima PNP nas MSC de tecido adiposo (ADSC), tecido de cordão umbilical (TCU) e de polpa de dente (PD). O teste estatístico utilizado foi o Two-way ANOVA com Tukey Post Hoc.

O MFI obtido das enzimas ADA e CD26 nas MSCs a partir de ADSC e PD apresentaram valores de média menores quando comparado às MSCs de TCU (**FIGURA 13 e 12**). Porém, para a expressão da enzima PNP, o tecido PD apresentou o maior valor de média encontrado, havendo diferença estatística na média da porcentagem de visibilidade populacional, quando comparado aos tecidos TCU e ADSC analisados (**FIGURA 14**).

De forma contrastante, as ADSC apresentaram a menor média na porcentagem da visibilidade populacional na análise de todas as enzimas quando comparadas aos tecidos PD e TCU. Entretanto, ADSC apresentou uma média maior de MFI das enzimas ADA e CD26 quando comparadas com a PD. Porém a ADSC obteve uma média menor comparada às células de TCU. É importante destacar que os dados apresentados estão em processo de conclusão, e, portanto, o tamanho da amostra está sujeito a aumentar. Esse incremento potencial pode ter impacto significativo nos resultados estatísticos, sendo fundamental considerar as futuras adições ao conjunto de dados para uma análise mais abrangente e confiável.

Tais resultados condizem com a diferença de expressão de mRNA analisados comparando ADSC e mesenquimais de Cordão Umbilical (UC-MSC) que se equipara às células de TCU mostradas em um estudo recente, no qual Galgaro et al mostraram que as ADSC apresentam menor expressão da enzima ADA quando comparadas com a UC, onde os níveis da expressão de CD26 foram equivalentes (GALGARO *et al.*, 2023).

7.2.3 EFEITO DA INO NA CAPACIDADE DE ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR DE DIFERENTES TECIDOS DE EXTRAÇÃO

Com a confirmação da presença e expressão das enzimas nestes tecidos, o próximo passo foi então testar o efeito da INO na capacidade de adesão e proliferativa das MSCs. Foram comparadas a capacidade de adesão das células ADSC, TCU e PD nas concentrações de 0 uM (Controle), 10, 50, 100 e 200 uM de INO durante uma hora, sendo analisadas conforme metodologia descrita acima. Os testes foram feitos com uma única amostra de cada tipo celular, com um N amostral de 2 realizados em dias diferentes para cada tipo celular.

No ensaio de adesão, o tratamento das células TCU nas concentrações de 10 e 50 uM levaram a um aumento significativo da capacidade de adesão das células em

comparação às células não tratadas. Por outro lado, nas células PD, as concentrações de 100 e 200 μM de INO tiveram o efeito contrário, diminuindo significativamente a capacidade de adesão celular em comparação às células controle. Nas células ADSC, apesar de um pequeno aumento na capacidade de adesão, não foi observada diferença estatística entre as diferentes concentrações de INO (**FIGURA 15**).

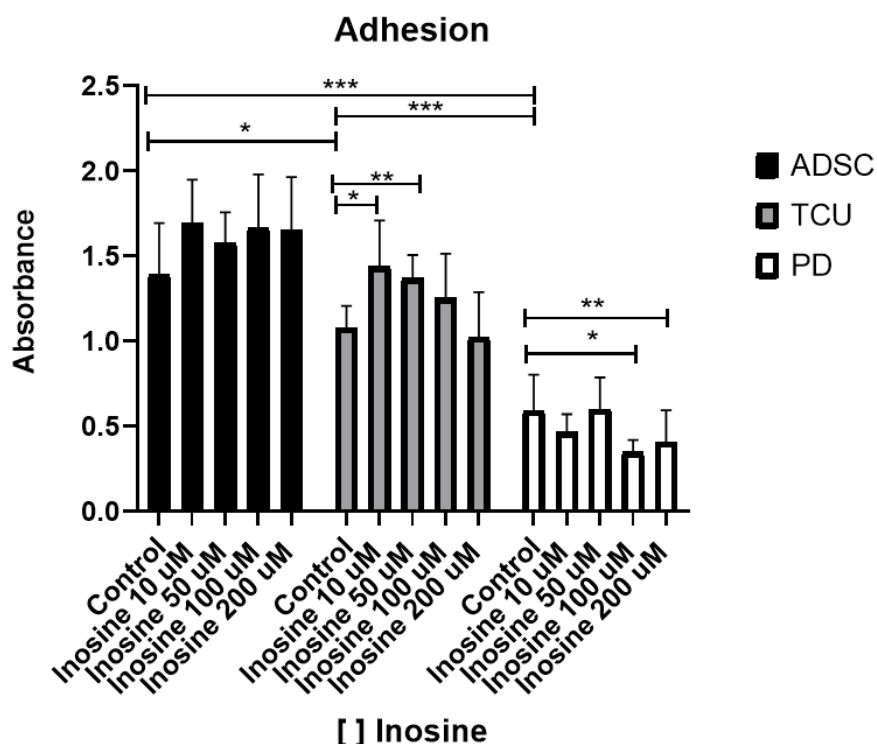


FIGURA 15. Ensaios de adesão realizados em uma amostra de cada tecido, em duas replicatas, realizados em dias distintos. O teste estatístico utilizado foi o Two-way ANOVA com Tukey Post Hoc.

Outro resultado interessante foi a grande diferença na capacidade inerente de adesão celular apresentada pelas células analisadas. Comparando os grupos controles de cada célula é possível notar que a ADSC possui uma capacidade de adesão muito maior quando comparada às células de TCU e PD, respectivamente. As células TCU também possuem melhor capacidade de adesão quando comparadas às PD, indicando diferenças intrínsecas entre as distintas fontes teciduais.

No ensaio de proliferação celular o tratamento com diferentes concentrações de INO não mostrou diferença significativa na capacidade proliferativa de nenhum dos três tipos celulares (**FIGURA 16**). Comparando com a literatura, em um estudo com fibroblastos, o tratamento das células com a INO e com a enzima ADA levaram à diminuição da proliferação destas células (HERMAN-DE-SOUSA *et al.*, 2020).

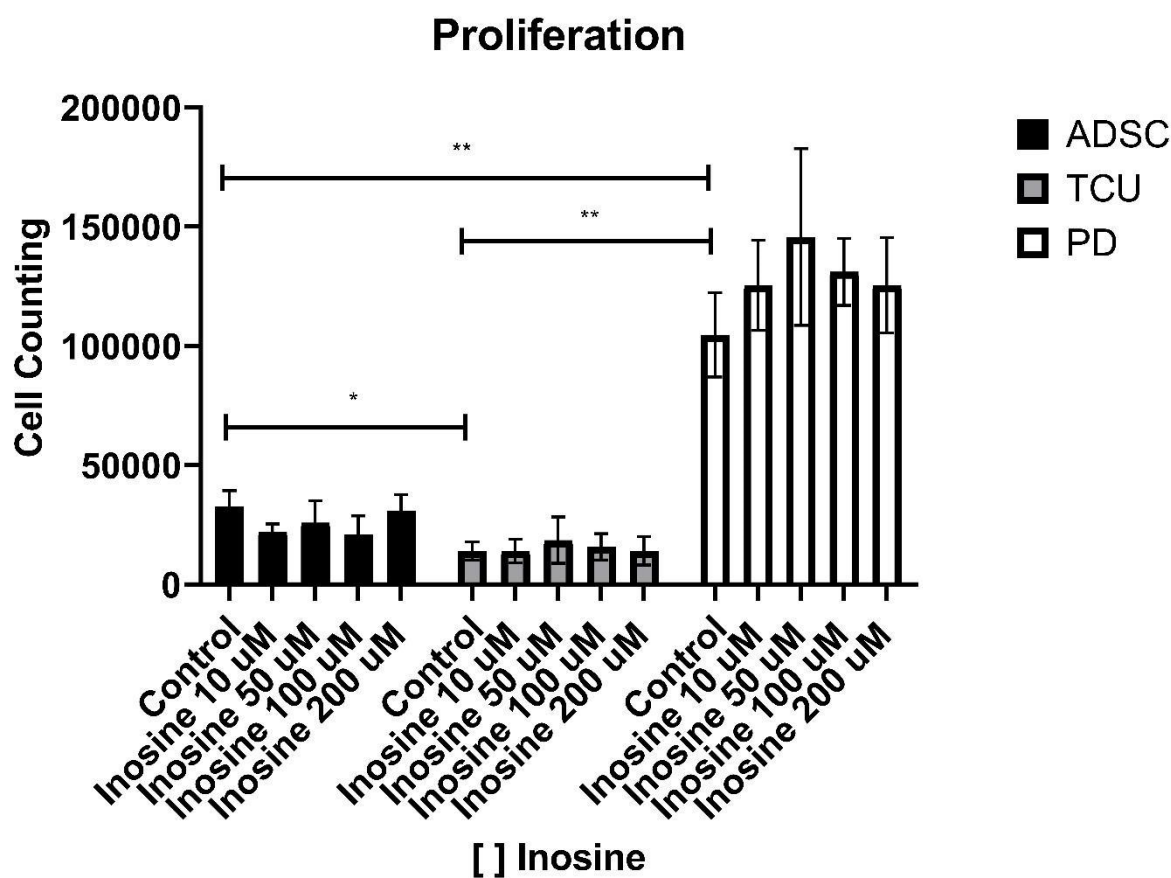


FIGURA 16. Ensaio de proliferação realizado em uma amostra de cada tecido, com um N amostral de 1 ensaio realizado. O teste estatístico utilizado foi o Two-way ANOVA com Tukey Post Hoc.

Assim como no ensaio de adesão, os testes realizados nesta dissertação indicam que as diferentes células mostraram diferenças intrínsecas na capacidade proliferativa destas células a partir de diferentes tecidos. As células PD apresentaram maior capacidade proliferativa quando comparadas aos controles com as células TCU e ADSC, respectivamente. Essa diferença estatística também foi notada na comparação das células ADSC e TCU, onde a ADSC apresentou uma maior proliferação.

7.2.4 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INOSINA AFETAM A CAPACIDADE MIGRATÓRIA NAS MSCS PROVENIENTES DE DIFERENTES TECIDOS DE EXTRAÇÃO

Apesar da INO não afetar a capacidade proliferativa nas MSC, os ensaios de migração mostraram uma diminuição na capacidade migratória destas células no tempo de 24h. Nas células ADSC, o efeito migratório foi reduzido a partir das concentrações de 50 uM, afetando também a concentração de 100 uM no mesmo nível de significância (**FIGURA 17**). Na concentração de 200 uM houve uma diminuição significativa ainda maior na migração das ADSC em 24 horas de experimento. Nas MSCs TCU e PD (**FIGURA 17**), apesar de visualmente haver uma diminuição na migração gradativa conforme o aumento de INO, não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento em 24 horas de experimento.

Mesmo com escassez de estudos sobre a INO nas MSCs, observou-se o efeito de potencial regenerativo em outra pesquisa, a qual utilizou peixe-zebra. Nesse estudo, a depleção de receptores de ADO, como A1, A2A e A2B, e de enzimas desaminases, como a ADA, teve um impacto significativo no processo de reparo, influenciando a migração celular. A interferência na atividade da ADA apresentou efeitos sinérgicos em concentrações baixas. Esses resultados corroboram com a participação da sinalização de INO no processo de reparo, indicando que a sinalização dependente de nucleotídeos desempenha um papel crucial nas respostas migratórias imediatas após uma lesão tubular (GESSLER *et al.*, 2022). Desse modo, podemos inferir que a INO tem o potencial de interferir nesse processo, sendo necessário o teste com antagonistas dos receptores P1 e da enzima ADA, além de testar a migração com maiores concentrações de INO.

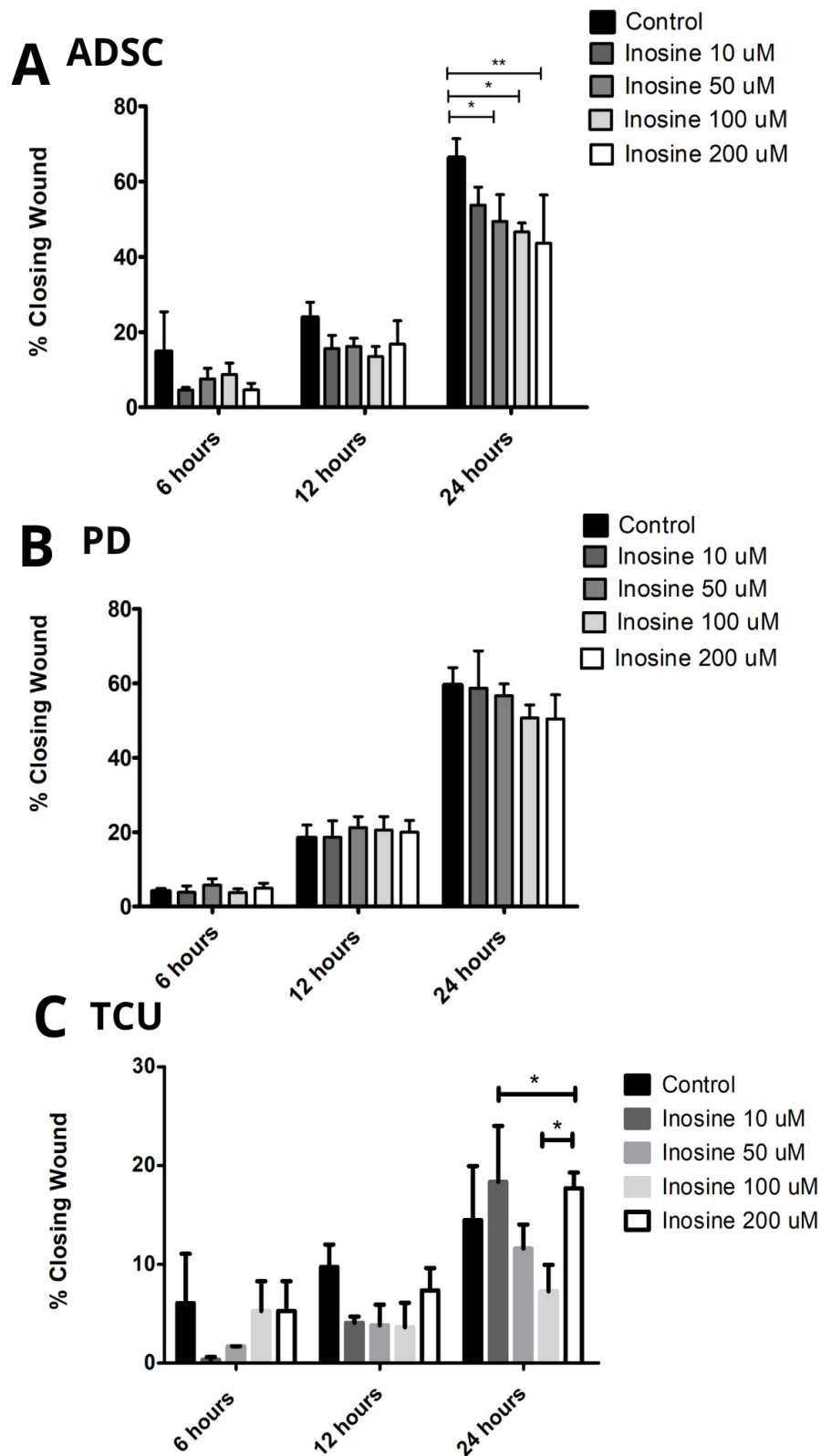


FIGURA 17. ENSAIO DE MIGRAÇÃO. A. Migração nas ADSCs feito com apenas uma amostra do tecido com um N amostral de uma análise. **B.** Ensaio de migração na PD feito com apenas uma amostra do tecido com um N amostral de uma análise. **C 19.** Ensaio de migração na TCU feito com apenas uma amostra do tecido com um N amostral de uma análise. O teste estatístico utilizado foi o Two-way ANOVA com Tukey Post Hoc.

7.2.5 INOSINA NA CAPACIDADE MULTIPOTENTE DAS MSCS

Embora ainda não tenham sido conduzidos experimentos para explorar detalhadamente as interações entre as MSCs e a INO, é crucial destacar que a influência dessa molécula na diferenciação celular é uma das áreas mais estudadas no contexto de potencial de regeneração celular das MSC. No presente relato, abordarei as descobertas e perspectivas presentes na literatura científica até o momento, proporcionando uma visão abrangente sobre o papel potencialmente crucial da INO nas MSCs na capacidade de diferenciação celular.

7.2.6 INOSINA NA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

A capacidade de diferenciação adipogênica das MSCs é uma das principais características da multipotência destas células, na qual a INO apresenta uma grande influência nos mecanismos envolvidos na construção do tecido adiposo, tornando-se um foco de estudo em condições patológicas relacionadas ao aumento de peso. Em alguns estudos foi observado um aumento na atividade da ADA sérica em pacientes obesos e diabéticos, mostrando uma possível influência da INO em outras condições patofisiológicas relacionadas à homeostase do tecido adiposo (YANG; LI; TAO, 2022).

Esta influência já foi comprovada por diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, tal como: na incubação de adipócitos de ratos ou adipócitos isolados com altas concentrações de teofilina (capítulo 1), inibidora dos receptores P1, resulta em diminuição da atividade da lipoproteína lipase (LPL), enquanto a adição de ADO aumenta a forma intracelular da LPL. Notavelmente, o aumento causado pela adenosina é atribuído à INO, gerada pela quebra da ADO endógena pela ADA (BOURDEAUX *et al.*, 1982).

A INO liberada por adipócitos marrons (células de gordura especializadas que possuem mitocôndrias abundantes com funcionalidade na termogênese) durante a apoptose desempenha um papel crucial na ativação fisiológica do tecido adiposo marrom. Em um estudo com camundongos, os adipócitos marrons tiveram a ativação através dos receptores P1 pela INO, estimulando a expressão do programa termogênico por meio da sinalização de cAMP e proteínas como PKA, p38, SIK2, CRTC3 e CREB. O transportador ENT1 regula os níveis de INO extracelular e sua deficiência promove a diferenciação de adipócitos brancos em adipócitos marrons. Neste estudo, ao aumentar as concentrações de INO *in vivo* por injeção e por inibição da ENT1, foi observado um aumento no gasto de energia, protegendo contra a obesidade induzida por dieta. Esses efeitos positivos da INO também foram

observados em adipócitos humanos, enfatizando seu potencial terapêutico na regulação do metabolismo e na resistência à obesidade (NIEMANN *et al.*, 2022).

Apesar disso, outros artigos também citam a possível participação da INO em vias metabólicas durante o estresse celular ativando o receptor A1, inibindo a lipólise, reduzindo os níveis circulantes de ácidos graxos livres e promovendo o acúmulo desses ácidos graxos nos tecidos (MERIÑO *et al.*, 2017). Entretanto, o tratamento *in vivo* com ervas naturais como *Mori Folium* e *Curcumae Rhizoma*, fitoterápicos capazes de inibir a atividade da ADA (TURK *et al.*, 2023) podem ajudar a ressaltar o papel da INO na capacidade adipogênica das MSC. O tratamento com *Mori folium* em camundongos mostrou uma diminuição na progressão da obesidade (KIM *et al.*, 2023). Em MSC de ratos, o tratamento com *Curcumae Rhizoma* mostrou aumento na capacidade de osteogênese e diminuição da capacidade adipogênica (YANG *et al.*, 2012).

7.2.7 INOSINA NA DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA E OSTEOGÊNICA

Ainda relatando os efeitos da *Curcumae Rhizoma* nas MSCs, outros estudos mostraram que, além de diminuir a adipogênese (YANG *et al.*, 2012), a *Curcumae Rhizoma* foi capaz de aumentar a capacidade de diferenciação osteogênica (KHEZRI *et al.*, 2021; SAMIEI *et al.*, 2021).

Além disso, o tratamento de condrócitos com a enzima ADA resultou em um aumento na mortalidade dessas células e um aumento nos marcadores de diferenciação em osteoclastos, que são células encarregadas da degradação da matriz óssea. Esse efeito foi contrabalançado pelo tratamento com EHNA, um inibidor seletivo da ADA. Além disso, a exposição à ADA resultou em um aumento na expressão dos receptores A1 e A3, que desempenham um papel crucial na inibição da produção de AMPc (BHAGAVATHAM *et al.*, 2021). Portanto, podemos inferir que uma hipótese possível seria a existência de um mecanismo de feedback negativo, onde o aumento do substrato leva a um aumento na expressão desses receptores, visando bloquear a ação do aumento de INO no meio extracelular.

Ademais, em patologias importantes que afetam a condrogênese, como a artrite reumatoide (RA), a ADA estimula a produção de citocinas inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), o fator de crescimento transformador beta (TGF β) e o interferon gama (IFN γ), podendo resultar em uma inflamação sistêmica. Além disso, a ADA leva ao impedimento de MSCs na diferenciação em osteoblastos,

além da redução da mineralização óssea (SRIMADH BHAGAVATHAM; POTIKURI; SIVARAMAKRISHNAN, 2022).

7.2.8 INOSINA NO CONTEXTO INFLAMATÓRIO

Em estudos recentes do nosso grupo de pesquisa, foi mostrado que MSC ADSC apresentam uma menor expressão da ADA quando comparada com células MSC de derme e de cordão umbilical. Apesar da menor expressão de ADA, as células ADSC apresentaram a maior atividade de hidrólise da ADO e consequente maior acúmulo da INO extracelular (GALGARO *et al.*, 2023).

Especificamente, observou-se nestes experimentos que as MSCs reagem de maneira diferenciada diante das concentrações variadas de INO. Um aspecto intrigante dos experimentos realizados nesta dissertação é a influência da INO na adesão celular. Concentrações mais baixas de INO foram associadas a uma diminuição na adesão nas células TCU, enquanto, de maneira contrastante, nas células PD apenas concentrações mais elevadas conduziram a uma redução significativa na adesão. Essa disparidade de respostas ressalta a complexidade da interação entre a INO e os diferentes tipos celulares, apontando para a necessidade de uma investigação mais aprofundada para elucidar os mecanismos subjacentes a essas variações.

De fato, para que possamos confirmar estas hipóteses, se faz necessário a repetição destes experimentos em condições anormais e de irregularidade celular, como de hipóxia, além da análise da expressão genômica das enzimas (CD73, ADA, PNP, HGPRT, ENT e CNT) e receptores destas células (A1, A2A, A2B, A3, P2X e P2Y).

8. CONCLUSÃO

No capítulo I foi abordada a sinalização purinérgica, envolvendo enzimas e receptores específicos, e apresentando potenciais alvos farmacológicos promissores no contexto da COVID-19. Podemos concluir até o momento que moduladores como cangrelor e ticagrelor, direcionados ao receptor P2Y₁₂, mostram-se promissores para evitar eventos hemorrágicos, enquanto o receptor P2X₃ é considerado um alvo promissor para aliviar sintomas de tosse. O receptor P2X₇ emerge como uma promissora opção para reduzir a inflamação, associada à ativação do inflamassoma NLRP3. Efeitos específicos em enzimas, como CD39 e CD73, destacam-se como considerações críticas, havendo a necessidade de equilíbrio para evitar impactos adversos na resposta imunológica. Enquanto isso, a modulação do receptor A2A com substâncias como istradefilina e regadenoson apresenta potencial para influenciar positivamente os neutrófilos e o processo inflamatório.

Até o momento, os resultados observados indicam uma influência significativa da INO em diversos tipos celulares, revelando respostas distintas em relação às diferentes concentrações da substância. Considerando-se o envolvimento do sistema purinérgico na modulação de respostas inflamatórias, como a COVID-19, os efeitos observados da INO nas experimentações de migração celular e sua potencial influência na proliferação celular nas MSC de diferentes tecidos, faz-se necessário repeti-los em condições “desafiadoras” às células, tal como hipóxia e sob a presença de moléculas que induzem a inflamação, para então se analisar as expressões genômica dessas enzimas e receptores, de forma a proporcionar uma compreensão mais aprofundada do papel da INO nesse contexto.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, podemos observar que as células derivadas dos diferentes tecidos apresentaram características distintas, tais como: capacidade proliferativa, capacidade de migração, tamanho celular e capacidade de adesão. Além disso, também apresentaram características distintas na viabilidade celular após o congelamento e na resistência à diminuição de nutrientes no meio de cultivo, no qual as células de Polpa de Dente (PD) apresentaram maior vantagem em comparação com tecido adiposo (ADSC) e tecido de cordão umbilical (TCU).

Apesar de tais características ainda precisarem ser confirmadas e analisadas em ensaios pré-clínicos de terapias celulares, são de alta importância para o desenvolvimento e aplicação de futuras terapias. As características apresentadas

pelas MSCs extraídas de polpa dentária são vantajosas quando se considera a produção em larga escala. Isso porque essas células são facilmente isoladas de dentes de leite e dentes extraídos em ambulatorios odontológicos, sendo desse modo um meio muito mais acessível e abrangível à população geral. Outro fato importante das PDs é que, diferentemente das ADSCs e TCUs, onde a disponibilidade de tecidos para extração está limitada a certas condições fisiológicas e financeiras, as PDs podem ser isoladas de pacientes de diferentes idades e condições de saúde, podendo servir para futuros estudos comparativos de uma infinidade de parâmetros. Desse modo, torna-se fundamental a continuidade e implementação de extrações de PD para este estudo, bem como o desenvolvimento de futuros projetos de pesquisa sobre MSCs nos quais suas propriedades terapêuticas devem ser testadas e comparadas com células isoladas dos outros tecidos humanos disponíveis para coleta nos hospitais.

9. PERSPECTIVA

- Analisar e comparar a expressão gênica e proteica das enzimas CD73, adenosina desaminase (ADA) e Pirimidina-nucleosídeo fosforilase (PNP) nas MSCs derivadas de diferentes tecidos humanos;
- Quantificar a liberação de inosina e hipoxantina em células MSCs por HPLC;
- Analisar a expressão gênica dos receptores P1 nas diferentes MSCs;
- Analisar o efeito de migração, proliferação celular e adesão em células MSC após o tratamento com diferentes concentrações de inosina em condições inflamatórias e/ou de hipóxia.
- Analisar o efeito imunomodulatório da inosina e hipoxantina nas MSCs através do co-cultivo com linhagem de linfócitos;
- Analisar o efeito do tratamento de MSCs na ausência de CD73, ADA e PNP em modelo de inflamação *in vivo*.

10. REFERÊNCIAS

ALONSO-ANDRÉS, P. *et al.* Purine-related metabolites and their converting enzymes are altered in frontal, parietal and temporal cortex at early stages of Alzheimer's disease pathology. **Brain Pathology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 933–946, 2018.

BECKENKAMP, L. R. *et al.* Characterization of soluble CD39 (SolCD39/NTPDase1) from PiggyBac nonviral system as a tool to control the nucleotides level. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 476, n. 11, p. 1637–1651, 2019.

BECKENKAMP, L. R. *et al.* Immortalization of Mesenchymal Stromal Cells by TERT Affects Adenosine Metabolism and Impairs their Immunosuppressive Capacity. **Stem Cell Reviews and Reports**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 776–791, 2020.

BHAGAVATHAM, S. K. S. *et al.* Adenosine deaminase modulates metabolic remodeling and orchestrates joint destruction in rheumatoid arthritis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 15129, 2021.

BOISON, D.; YEGUTKIN, G. G. Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 582–596, 2019.

BOREA, P. A. *et al.* Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 1591–1625, 2018.

BURNSTOCK, G. Purine and purinergic receptors. **Brain and Neuroscience Advances**, [s. l.], v. 2, p. 239821281881749, 2018.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacological reviews**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 509–581, 1972.

BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 8, 2017.

BURNSTOCK, G.; DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling and cancer. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 491–540, 2013.

CAMPOS-MALDONADO, F. *et al.* Fructose promotes more than glucose the adipocytic differentiation of pig mesenchymal stem cells. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 12, 2022.

CASAGRANDE PAIM, T.; ROSANGELA WINK, M. The versatility of mesenchymal stem cells: From regenerative medicine to COVID, what is next?. **BIOCELL**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 913–922, 2022.

DA SILVA, G. B. *et al.* High levels of extracellular ATP lead to different inflammatory responses in COVID-19 patients according to the severity. **Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 100, n. 4, p. 645–663, 2022a.

DACHIR, S. *et al.* Inosine improves functional recovery after experimental traumatic brain injury. **Brain Research**, [s. l.], v. 1555, p. 78–88, 2014.

DARVILLE, T. *et al.* Effect of the Purinergic Receptor P2X7 on *Chlamydia* Infection in Cervical Epithelial Cells and Vaginally Infected Mice. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 179, n. 6, p. 3707–3714, 2007.

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

DRURY, A. N.; SZENT-GYÖRGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart¹. **The Journal of Physiology**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 213–237, 1929.

EL-SAID, K. S. *et al.* Quercetin mitigates rheumatoid arthritis by inhibiting adenosine deaminase in rats. **Molecular Medicine**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 24, 2022.

ELSAGHIR, Alaa *et al.* Elevated CD39⁺ T-Regulatory Cells and Reduced Levels of Adenosine Indicate a Role for Tolerogenic Signals in the Progression from Moderate to Severe COVID-19. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 24, p. 17614, 2023.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Development**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 381–390, 1966.

GALGARO, B. C. *et al.* Adenosine metabolism by mesenchymal stromal cells isolated from different human tissues. **Human Cell**, [s. l.], 2023.

GALGARO, B. C. *et al.* The adenosinergic pathway in mesenchymal stem cell fate and functions. **Medicinal Research Reviews**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 2316–2349, 2021.

GESSLER, S. *et al.* Control of Directed Cell Migration after Tubular Cell Injury by Nucleotide Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 14, p. 7870, 2022.

GIULIANI, P. *et al.* Development of a new HPLC method using fluorescence detection without derivatization for determining purine nucleoside phosphorylase activity in human plasma. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 1009–1010, p. 114–121, 2016.

GIULIANI, A. L.; SARTI, A. C.; DI VIRGILIO, F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 205, p. 16–24, 2019.

GRUNEBAUM, E. *et al.* Partial Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency Helps Determine Minimal Activity Required for Immune and Neurological Development. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, 2020.

GUPTA, S. *et al.* Antimalarial and *Plasmodium falciparum* serpentine receptor 12 targeting effect of FDA approved purinergic receptor antagonist. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], p. 1–14, 2022.

HAZLETON, J. E.; BERMAN, J. W.; EUGENIN, E. A. Purinergic Receptors Are Required for HIV-1 Infection of Primary Human Macrophages. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 188, n. 9, p. 4488–4495, 2012.

HERMAN-DE-SOUSA, C. *et al.* Opposing Effects of Adenosine and Inosine in Human Subcutaneous Fibroblasts May Be Regulated by Third Party ADA Cell Providers. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 651, 2020.

HUANG, J. *et al.* Adenosine deaminase and adenosine kinase expression in human glioma and their correlation with glioma-associated epilepsy. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 6509–6516, 2015.

HUANG, Z. *et al.* From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 162, 2021.

JIN, X. *et al.* Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 100, n. 11, p. 2849–2857, 1997.

JUNQUEIRA, S. C. *et al.* Inosine, an Endogenous Purine Nucleoside, Suppresses Immune Responses and Protects Mice from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: a Role for A2A Adenosine Receptor. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 3271–3285, 2017.

KHEZRI, K. *et al.* Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells via Curcumin-Containing Nanoscaffolds. **Stem Cells International**, [s. l.], v. 2021, p. 1–9, 2021.

KIM, D.-S. *et al.* Combined Treatment of Mori folium and Mori Cortex Radicis Ameliorate Obesity in Mice via UCP-1 in Brown Adipocytes. **Nutrients**, [s. l.], v. 15, n. 17, p. 3713, 2023.

KOHN, D. B. *et al.* Consensus approach for the management of severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 143, n. 3, p. 852–863, 2019.

KORB, V. G. *et al.* A Systematic Review of the Role of Purinergic Signalling Pathway in the Treatment of COVID-19. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 7865, 2023.

LEDDEROSE, C. *et al.* Mitochondrial Dysfunction, Depleted Purinergic Signaling, and Defective T Cell Vigilance and Immune Defense. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 213, n. 3, p. 456–464, 2016a.

LEDDEROSE, C. *et al.* Purinergic Signaling and the Immune Response in Sepsis: A Review. **Clinical therapeutics**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 1054–1065, 2016b.

LEE, J.; YILMAZ, Ö. Unfolding Role of a Danger Molecule Adenosine Signaling in Modulation of Microbial Infection and Host Cell Response. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 199, 2018.

LINDEN, J.; KOCH-NOLTE, F.; DAHL, G. Purine Release, Metabolism, and Signaling in the Inflammatory Response. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 325–347, 2019.

MARQUES-DA-SILVA, C. *et al.* Infection with *Leishmania amazonensis* upregulates purinergic receptor expression and induces host-cell susceptibility to UTP-mediated apoptosis. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 1410–1428, 2011.

MERIÑO, M. *et al.* Rol de los receptores de adenosina en la interacción adipocito-macrófago durante la obesidad. **Endocrinología, Diabetes y Nutrición**, [s. l.], v. 64, n. 6, p. 317–327, 2017.

MORALES-SOTO, W.; GULBRANSEN, B. D. A novel mechanism of rotavirus infection involving purinergic signaling. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 169–171, 2021.

MOREIRA-SOUZA, A. C. A.; COUTINHO-SILVA, R. The Complexity of Purinergic Signaling During Toxoplasma Infection. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 205–212, 2021.

MOSER, G. H.; SCHRADER, J.; DEUSSEN, A. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, [s. l.], v. 256, n. 4, p. C799–C806, 1989.

NAASANI, L. I. S. *et al.* Bioscaffold developed with decellularized human amniotic membrane seeded with mesenchymal stromal cells: assessment of efficacy and safety

profiles in a second-degree burn preclinical model. **Biofabrication**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 015012, 2023. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1758-5090/ac9ff4>.

NAASANI, L. I. S. *et al.* Extracellular Nucleotide Hydrolysis in Dermal and Limbal Mesenchymal Stem Cells: A Source of Adenosine Production. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 118, n. 8, p. 2430–2442, 2017.

NAGAO, H. *et al.* Hypoxanthine Secretion from Human Adipose Tissue and its Increase in Hypoxia. **Obesity**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 1168–1178, 2018.

NASCIMENTO, F. P. *et al.* Inosine Reduces Pain-Related Behavior in Mice: Involvement of Adenosine A₁ and A_{2A} Receptor Subtypes and Protein Kinase C Pathways. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 334, n. 2, p. 590–598, 2010.

NIEMANN, B. *et al.* Apoptotic brown adipocytes enhance energy expenditure via extracellular inosine. **Nature**, [s. l.], v. 609, n. 7926, p. 361–368, 2022.

PIETROBON, Anna Julia *et al.* Dysfunctional purinergic signaling correlates with disease severity in COVID-19 patients. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 1012027, 2022.

RODRIGUES, C. *et al.* Bioglass 45S5: Structural characterization of short range order and analysis of biocompatibility with adipose-derived mesenchymal stromal cells in vitro and in vivo. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 103, p. 109781, 2019.

RUD, Jonathan *et al.* Decreased circulating CD73 and adenosine deaminase are associated with disease severity in hospitalized patients with COVID-19. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 37, p. 03946320231185703, 2023.

SACCOL, R. da S. P. *et al.* Effect of quercetin on E-NTPDase / E-ADA/ activities and cytokine secretion of complete Freund adjuvant-induced arthritic rats. **Cell Biochemistry and Function**, [s. l.], v. 37, n. 7, p. 474–485, 2019.

SAMIEI, M. *et al.* Early Osteogenic Differentiation Stimulation of Dental Pulp Stem Cells by Calcitriol and Curcumin. **Stem Cells International**, [s. l.], v. 2021, p. 1–7, 2021.

SANTOS, A. A. *et al.* Implication of purinergic P2X7 receptor in M. tuberculosis infection and host interaction mechanisms: A mouse model study. **Immunobiology**, [s. l.], v. 218, n. 8, p. 1104–1112, 2013.

SCHULTZ, I. C.; BERTONI, A. P. S.; WINK, M. R. MSC-Exosomes Carrying miRNA – Could they Enhance Tocilizumab Activity in Neuropathology of COVID-19?. **Stem Cell Reviews and Reports**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 279–283, 2023.

SCHULTZ, I. C.; BERTONI, A. P. S.; WINK, M. R. Purinergic signaling elements are correlated with coagulation players in peripheral blood and leukocyte samples from COVID-19 patients. **Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 100, n. 4, p. 569–584, 2022.

SHINOHARA, Y.; TSUKIMOTO, M. Guanine and inosine nucleotides/nucleosides suppress murine T cell activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 498, n. 4, p. 764–768, 2018.

SOARES, A. S. *et al.* Inosine Strongly Enhances Proliferation of Human C32 Melanoma Cells through PLC - PKC - MEK- ERK and PI3K Pathways. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [s. l.], v. 116, n. 1, p. 25–36, 2015a.

SRIMADH BHAGAVATHAM, S. K.; POTIKURI, D.; SIVARAMAKRISHNAN, V. Adenosine deaminase and cytokines associated with infectious diseases as risk factors for inflammatory arthritis and methotrexate as a potential prophylactic agent. **Medical Hypotheses**, [s. l.], v. 159, p. 110751, 2022.

SRINIVASAN, S.; TORRES, A. G.; RIBAS DE POUPLANA, L. Inosine in Biology and Disease. **Genes**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 600, 2021.

TASCA, C. I. *et al.* Neuromodulatory Effects of Guanine-Based Purines in Health and Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 12, 2018.

TAYLOR, J. M.; HAN, Z. Purinergic Receptor Functionality Is Necessary for Infection of Human Hepatocytes by Hepatitis Delta Virus and Hepatitis B Virus. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 12, p. e15784, 2010.

TURK, A. *et al.* Adenosine Deaminase Inhibitory Activity of Medicinal Plants: Boost the Production of Cordycepin in *Cordyceps militaris*. **Antioxidants**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1260, 2023.

VALADA, P. *et al.* The impact of inosine on hippocampal synaptic transmission and plasticity involves the release of adenosine through equilibrative nucleoside transporters rather than the direct activation of adenosine receptors. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 451–461, 2023.

VEDOVATTO, S. *et al.* Development of chitosan, gelatin and liposome film and analysis of its biocompatibility in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 160, p. 750–757, 2020.

VIEGAS, T. X. *et al.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Peldesine (BCX-34), a Purine Nucleoside Phosphorylase Inhibitor, following Single and Multiple Oral Doses in Healthy Volunteers. **The Journal of Clinical Pharmacology**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 410–420, 2000.

WANG, T. *et al.* Inosine is an alternative carbon source for CD8⁺-T-cell function under glucose restriction. **Nature Metabolism**, [s. l.], v. 2, n. 7, p. 635–647, 2020.

WELIHINDA, A. A. *et al.* Enhancement of inosine-mediated A_{2A} R signaling through positive allosteric modulation. **Cellular Signalling**, [s. l.], v. 42, p. 227–235, 2018.

WELIHINDA, A. A. *et al.* The adenosine metabolite inosine is a functional agonist of the adenosine A_{2A} receptor with a unique signaling bias. **Cellular Signalling**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 552–560, 2016.

WERMUTH, D. P. *et al.* Mechanical properties, in vitro and in vivo biocompatibility analysis of pure iron porous implant produced by metal injection molding: A new eco-friendly feedstock from natural rubber (*Hevea brasiliensis*). **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 131, p. 112532, 2021.

XU, Z. *et al.* Increased serum adenosine deaminase activity in patients with adult-onset Still's disease. **BMC Immunology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 4, 2022.

YANG, H. *et al.* Curcumin increases rat mesenchymal stem cell osteoblast differentiation but inhibits adipocyte differentiation. **Pharmacognosy Magazine**, [s. l.], v. 8, n. 31, p. 202, 2012.

YANG, K.; LI, J.; TAO, L. Purine metabolism in the development of osteoporosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 155, p. 113784, 2022.

ZHOU, R. *et al.* Diagnostic performance of adenosine deaminase for abdominal tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Public Health**, [s. l.], v. 10, 2022.

ZHULAI, G. *et al.* Adenosine-Metabolizing Enzymes, Adenosine Kinase and Adenosine Deaminase, in Cancer. **Biomolecules**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 418, 2022.

11. ANEXOS

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Isolamento de células a partir de material de descarte humano para estudos em medicina regenerativa

Pesquisador: Marcia Rosangela Wink

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 98290318.5.0000.5335

Instituição Proponente: ISCMPA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.734.612

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa a ser realizado em parceria com o Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e as Unidades de Obstetrícia, Oftalmologia e Cirurgia Plástica da Santa Casa de Porto Alegre, utilizando material de descarte hospitalar como lipoaspirado, pele, limbo esclero-corneal, membrana amniótica e cordão umbilical, serão extraídos diferentes tipos celulares humanos (queratinócitos, melanócitos, células estromais mesenquimais e células endoteliais) para o desenvolvimento de novas terapias celulares para medicina regenerativa, como a aplicação de células estromais mesenquimais em sítios lesionados e também para a verificação da biocompatibilidade de materiais propostos para uso clínico, tais como filmes de quitosana e colágeno, stents cardíacos de ferro e geopolímeros.

Objetivo da Pesquisa:

Já referido em parecer anteriormente emitido.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já referido em parecer anteriormente emitido

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Já referido em parecer anteriormente emitido

Endereço: R. Profª Annes Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação de protocolos de criopreservação de células estromais mesenquimais

Pesquisador: Karolyn Sassi Ogliari

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43694921.0.0000.5344

Instituição Proponente: HEMO CORD CLINICA MEDICA LTDA

Patrocinador Principal: HEMO CORD CLINICA MEDICA LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.671.107

Apresentação do Projeto:

Células estromais mesenquimais (MSC) são células multipotentes que possuem capacidade de auto renovação, adesão ao plástico e de diferenciar-se em células da linhagem mesodérmica. Nas últimas décadas, as MSC vêm também sendo muito estudadas no que diz respeito a potencial aplicação na terapia celular voltada à medicina regenerativa. Estas células secretam uma variedade de citocinas e fatores de crescimento, que possuem efeitos anti-apoptóticos, próangiogênicos e anti-fibróticos, além de apresentar papel imunomodulador. As MSCs podem ser extraídas de uma grande variedade de tecidos, como tecido adiposo, sangue e tecido de cordão umbilical, medula óssea e dente decíduo (polpa dentária). Este último tem se destacado por ser proveniente de uma coleta minimamente invasiva e por ser um material que é descartado, sendo, portanto, uma promissora fonte de MSCs. Muitos métodos de isolamento e criopreservação das MSCs da polpa do dente (DPSC) têm sido descritos na literatura. No entanto, não há um consenso de qual a melhor forma de isolar e criopreservar estas células, para a manutenção da quantidade e qualidade das MSCs. Portanto, o objetivo deste estudo é analisar comparativamente dois protocolos de criopreservação das DPSC – criopreservação das DPSC previamente isoladas ou da polpa dentária íntegra – com células isoladas frescas. Todos os grupos experimentais serão avaliados quanto a características citológicas e funcionais. As DPSCs dos diferentes grupos serão avaliadas quanto a viabilidade celular por azul de Trypan e quanto a preservação da capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica. O potencial proliferativo

Endereço: Av. Unisinos, 950

Bairro: Cristo Rei

CEP: 93.022-000

UF: RS

Município: SAO LEOPOLDO

Telefone: (51)3591-1198

Fax: (51)3590-8118

E-mail: cep@unisinos.br



INSTITUTO DE CARDIOLOGIA
DO RS / FUNDAÇÃO
UNIVERSITÁRIA DE
CARDIOLOGIA/ IC/FUC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação de diferentes protocolos de processamento e criopreservação sobre a funcionalidade de células estromais mesenquimais oriundas de cordão umbilical

Pesquisador: Natalia Motta Leguisamo Meirelles

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

A critério do CEP

Versão: 3

CAAE: 19448719.9.0000.5333

Instituição Proponente: Instituto de Cardiologia do RS / Fundação Universitária de Cardiologia

Patrocinador Principal: HEMO CORD CLINICA MEDICA LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.824.230

Apresentação do Projeto:

Conforme os pesquisadores: "Trata-se de um estudo experimental pré-clínico, descritivo, a ser desenvolvido no Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular (LCMC), do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/Fundação Universitária de Cardiologia (ICFUC) em Porto Alegre/RS, em colaboração com o Hemocord - Banco de Células Tronco em São Leopoldo/RS".

"Com o advento de novas tecnologias e produtos inovadores, células em diferentes estados de maturação e diferenciação estão sendo estudadas e aplicadas em terapias para o tratamento de doenças e condições incapacitantes. Como exemplos, podemos citar algumas células adultas oriundas do sangue periférico, como os linfócitos e as células dendríticas, e também as células-tronco, incluindo as células tronco hematopoiéticas (CTHs), as células-tronco do músculo esquelético e as células estromais mesenquimais (CEMs)."

"Atualmente, são classificadas como CEMs, pois são um subconjunto heterogêneo de células pós-natais, com capacidade de auto renovação e multipotência, podendo se diferenciar em células das linhagens mesodérmica (osteócitos, condrócitos e adipócitos) e ectodérmica (células semelhantes a neurônios)."

Endereço: Av. Princesa Isabel, nº 370 - Centro Cultural Rubem Rodrigues - Ramal: 4136 e Av. Princesa Isabel, nº 395
Bairro: Santana **CEP:** 90.620-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3230-3600 **Fax:** (51)3223-2746 **E-mail:** cep.icfuc@cardiologia.org.br