UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

BEATRIZ ARAUJO OLIVEIRA

Ação dos oxisteróis na diferenciação osteogênica e adipogênica de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo

São Paulo
2019

BEATRIZ ARAUJO OLIVEIRA

Ação dos oxisteróis na diferenciação osteogênica e adipogênica de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

São Paulo
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Beatriz Araujo
Ação dos oxisteróis na diferenciação osteogênica e adipogênica de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo / Beatriz Araujo Oliveira. -- São Paulo, 2019.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.
Orientador: Sérgio Paulo Bydlowski.

Descritores: 1.Oxisteróis 2.Colesterol 3.Diferenciação celular 4.Células-tronco

USP/FM/DBD-437/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

À minha família...

Minha maior fonte de inspiração e persistência e a Deus por fazer sempre infinitamente mais do que pedimos e pensamos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus por cuidar de forma tão especial da minha vida preparando as oportunidades e pessoas certas para estarem ao meu lado. Agradeço por ter conduzido meu caminho até aqui, me abençoado com a possibilidade de viver a experiência do mestrado e ter me sustentado durante todo este processo.

Em segundo lugar agradeço ao melhor presente de Deus para minha vida, minha família. Sou grata ao meu pai Aurino, minha mãe Josinete e a irmã mais linda do mundo Deborah por todo o apoio e paciência. Agradeço por sonharem e orarem comigo, por terem visto em mim capacidades que nem eu mesma via e me impulsionarem a seguir em frente. Obrigada por terem escutado todos os meus ensaios para apresentações, por se esforçarem para ler todos os meus textos (acho que aprendemos bastante sobre células-tronco juntos). Agradeço por terem chorado e comemorado comigo a cada etapa superada, sem o apoio de vocês eu não estaria aqui, esta conquista é fruto do nosso esforço. Amo vocês.

Ao Dr. Sérgio por me receber em seu laboratório e por todas as orientações preciosas que tornaram a conclusão deste projeto possível. Agradeço em especial à minha orientadora Dra. Débora Levy por ter investido tempo e esforços no meu desenvolvimento durante estes anos, agradeço por todos os conselhos profissionais, pessoais, pela paciência e a parceria desenvolvida durante este período.

As minhas primeiras companheiras de cultura Thatiana Correa e Jéssica Liliane, agradeço por estarem comigo nos momentos iniciais, por tudo que me ensinaram, por toda a força, risadas, compreensão e por tornarem meus dias mais leves na sala de cultura.

As mamães lindas que tive o prazer de conhecer, Ritinha e Mari e aos príncipes lindos que vocês tiveram agradeço por todos os momentos de descontração no laboratório.

Agradeço também as duas japonesas queridas que cuidaram tão bem de mim durante estes anos, Linah e Naná, muito obrigada por tudo que me ensinaram, pela comidinha, conversas, carinho e pelas risadas.

À Gi e a Dani pela companhia nos almoços e por todas conversas agradáveis. Ao Hebert e Dra. Lisley por toda disposição em ajudar.

Aos amigos especiais e aos melhores revisores que tive o prazer de conhecer e conviver nesta fase final, Priscila, Fábio, Cadiele e Leonardo agradeço pelas orações, compreensão, companhia, conselhos, por revisarem meus textos e por toda ajuda e parceria durante esta última etapa.

A todos do Lim 31, Sr. Joel, Rosângela, Denise, Cleide, Luciana e Adriana, agradeço por toda ajuda oferecida. Agradeço Ao Dr. Cesar Isaac e Silvana do Lim-04 pela parceria e disponibilização das células utilizadas no estudo. Ao Dr. Alessandro Rodrigues da Universidade Federal de São Paulo pela disponibilização dos oxisteróis utilizados.

Ao apoio financeiro fornecido pela CAPES, INCT e CNPq.

Epígrafe

Porém, como dizem as Escrituras Sagradas: “O que ninguém nunca viu nem ouviu, e o que jamais alguém pensou que podia acontecer, foi isso o que Deus preparou para aqueles que o amam. ***I Coríntios 2:9***

Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês ", diz o Senhor, " planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar dano, planos de dar-lhes esperança e um futuro. ***Jeremias 29:11***

Sumário

Lista de siglas e abreviações

Lista de tabelas e figuras

Resumo

Abstract

1.INTRODUÇÃO **1**

1.1 CÉLULA-TRONCO (CT) **1**
1.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMS) **3**
1.2.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSO (CTMTAS) 4
1.3 DIFERENCIAÇÃO CELULAR **5**
1.3.1 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA 6
1.3.2 FATORES IMPORTANTES PARA A DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA 8
1.3.3 INDUTORES DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA *IN VITRO* 10
1.3.4 DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA 11
1.3.5 FATORES IMPORTANTES PARA A DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA 12
1.3.6 INDUTORES DE DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA *IN VITRO* 14
1.4. OXISTERÓIS **14**
1.4.1 TRANSPORTE DOS OXISTERÓIS 16
1.4.2 REGULAÇÃO DOS OXISTERÓIS 16
1.4.3 OXISTERÓIS E DISTÚRBIOS DO TECIDO ÓSSEO 18

2. OBJETIVO **20**

3. MATERIAIS E MÉTODOS **21**

3.1 CULTURA CELULAR **21**
3.2 IMUNOFENOTIPAGEM **21**
3.3 INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA **22**
3.3.1 CONFIRMAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA 23
3.4 INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA **24**
3.4.1 CONFIRMAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA 25
3.5 DETERMINAÇÃO DO IC_{50} (HALF MAXIMAL INHIBITORY CONCENTRATION) **25**
3.5.1 DIFERENCIAÇÃO CELULAR PELO USO DE OXISTERÓIS 26
3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$) POR TMRE (TETRAMETHYLRHODAMINE, ETHYL ESTER) **27**
3.7 ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR OXISTERÓIS **28**
3.7.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL 28
3.7.2 TRATAMENTO COM DNASE 29
3.7.3 SÍNTESE DO CDNA 29

3.7.4 Avaliação dos genes envolvidos na diferenciação celular 29
3.8 Imunofluorescência indireta para detecção das proteínas envolvidas nas vias Hedgehog e Wnt/b-catenina 30
3.9 Análise estatística 31

4. RESULTADOS 32

4.1 Caracterização das CTMTAs 32
4.2 Padronização dos meios de diferenciação 32
4.3 Citotoxicidade dos oxisteróis nas CTMTAs 34
4.4 Indução da diferenciação adipogênica de CTMTAs tratadas com oxisteróis 35
4.4.1 Tratamento com oxisteróis e DMEM *high glucose* 35
4.4.2 Tratamento com oxisteróis e meio de diferenciação adipogênico 38
4.5 Indução da diferenciação osteogênica de CTMTAs tratadas com oxisteróis 40
4.5.1 Tratamento com oxisteróis e meio basal DMEM *low glucose* 41
4.5.2 Tratamento com oxisteróis e meio de diferenciação osteogênico 44
4.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial após indução da diferenciação 48
4.7 Análise da expressão de genes envolvidos na diferenciação celular 54
4.7.1 Avaliação da expressão do gene *RUNX2* 54
4.7.2 Avaliação da expressão do gene *ALPL* 56
4.7.3 Avaliação da expressão do gene BGLAP 58
4.7.4 Avaliação da expressão do gene *PPARγ* 59
4.7.5 Avaliação da expressão do gene *C/EBPA* 62
4.8 Estudo da via SHh durante a indução da diferenciação pelo uso de oxisteróis 65
4.8.1 Proteína Smo 65
4.8.2 Proteína SHh 67
4.8.3 Proteína Gli-3 70
4.8.4 Proteína b-catenina 72

5. DISCUSSÃO 75

6. CONCLUSÕES 86

7. REFERÊNCIAS 87

ANEXOS

Lista de siglas e abreviações

7-KC	7-cetocolesteol
ALPL	*Alkaline phosphatase*
ANOVA	*Analysis of variance*
ATV	Associação de tripsina e versene
BAT	*Brown adipose tissue*
BGLAP	*Bone gamma-carboxyglutamate* protein
BMP	*Bone morphogenetic protein*
BSA	*Bovine sérum albumin*
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
C/EBPδ	*CCAAT/enhancer-binding proteins*δ
C/EBPα	*CCAAT/enhancer-binding proteins*α
C/EBPβ	*CCAAT/enhancer-binding proteins*β
CBFβ	*Core binding factor β*
CD11β	Cluster of differentiation 11β
CD14	Cluster of differentiation 14
CD19	Cluster of differentiation 19
CD34	Cluster of differentiation 34
CD45	Cluster of differentiation 45
CD73	Cluster of differentiation 73
CD79α	Cluster of differentiation 79α
CD90	Cluster of differentiation 90
CD105	Cluster of differentiation 105
cDNA	DNA complementar
Col	Colesterol
COL1A1	Colágeno 1A1
CRYAB	Cristalina -αB
CT	Célula-tronco
CTA	Célula-tronco adulta

Lista de siglas e abreviações

CTE	Célula-tronco embrionária
CTH	Célula-tronco hematopoiética
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CTMTA	Célula-tronco mesenquimal derivada de tecido adiposo
Dermo-1	*Dermis-Expressed Protein 1*
DKK-1	*Dickkopf-1*
DMEM low glucose	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DPBS	*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*
Dsh	*Dishevelled*
ERK	*Extracellular signal-regulated kinases*
FITC	*Fluorescein isothiocyanate*
Fz	*Freezled*
GC/MS	*Gas chromatography/ mass spectometry*
Gli	*Glioma-associated oncogene family zync finger*
GSK-3β	*Glycogen synthase kinase 3β*
GUSB	*Human GUSB (beta glucoronidase)*
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Hh	*Hedgehog*
HLA	*Human leukocyte antigen*
IBMX	Isobutil-metilxantina
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration
IDA4	Inibidor de ligação ao DNA
Ihh	*Indian Hedgehog*

Lista de siglas e abreviações

Insig	*Insulin-induced gene 1 protein*
ISCT	*International Society for Cellular Therapy*
KSR	*Knockout serum replacement*
LDL	*Low density lipoprotein*
LIM-31	Laboratório de Investigação Médica 31
LPL	*Lipoprotein lipase*
LRP	*Low-density lipoprotein receptor-related protein*
LXR	*Liver x receptor*
LXRα	*Liver x receptor* α
LXRβ	*Liver x receptor* β
MAPK	*Mitogen activated protein kinases*
MCS	*Membrane contact sites*
OCN	Osteocalcina
ON	Osteonectina
ORP	*OSBP-related proteins*
OSBP	*Oxysterol-binding proteins*
OTP	Osteopontina
oxLDL	*Oxidized low-density lipoprotein*
P/S	Penicilina/estreptomicina
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PE	*Phycoeritin*
PGC-1α	*Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator -1 alpha*
PI	Iodeto de propídio
PPARγ	*Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ*
PPARγ-Cla	*PPARγ co-activator 1α*
PRDM16	*PR domain containing 16*
Ptch	*Patched*
RNA	Ácido ribonucleico

Lista de siglas e abreviações

RNase	Ribonuclease
Rpm	Rotações por minuto
RUNX2	*Runt related transcription factor*
RXR	*Retinoid X Receptor*
SCAP	*Sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein*
SFB	Soro fetal bovino
SHh	*Sonic Hedgehog*
Smo	*Smoothened*
SORT1	Sortilina1
SPARC	*Secreted Protein Acidic and Cysteine Rich*
SPP1	*Secreted Phosphoprotein 1*
SREBP	*Sterol regulatory element binding proteins*
SVF	*Stroma vascular fraction*
Triol	Colestane-3β,5α,6β-triol
TRME	Tetramethylrhodamine, ethyl ester
Twist-1	*Twist related protein 1*
UCP-1	*Uncoupling protein 1-*
VDR	Receptor de vitamina D
WAT	*White adipose tissue*
Wnt	*Wingless Int-1*
ΔΨm	Potencial de membrana mitocondrial

Lista de tabelas

Tabela 1 Protocolos utilizados para diferenciação osteogênica das CTMTAs **23**

Tabela 2. Protocolos utilizados para diferenciação adipogênica das CTMTAs **24**

Tabela 3. Concentração de oxisteróis utilizada no tratamento das CTMTAs para análises moleculares.....**28**

Tabela 4. Primers utilizados para análise de diferenciação celular.....**30**

Tabela 5. Anticorpos utilizados para imunofluorescência indireta.....**31**

Tabela 6. Caracterização imunofenotípica das CTMTAs.....**32**

Lista de figuras

Figura 1. Diferenciação osteogênica e adipogênica de CTMs *in vitro* através da ativação de genes osteogênicos (*ALPL – Alkaline phosphatase e RUNX2 – Runt related transcription factor*) e adipogênicos (*PPARγ – peroxisome proliferator-activated receptor γ e C/EBPα – CCAAT/enhancer-binding protein α*) pela sinalização de Wnt/-βcatenina.....**11**

Figura 2. Formação dos oxisteróis.....**18**

Figura 3. Organograma do processo de diferenciação pelo uso de oxisteróis..**27**

Figura 4. Padronização do meio de diferenciação osteogênico e coloração com corante vermelho de Alizarina. **A:** CTMTAs tratadas durante 21 dias com meio de diferenciação descrito por Mambelli *et al*., (2009). **B:** CTMTAs tratadas durante 21 dias com meio de diferenciação descrito por Zuk *et al.,* (2002); barra de calibração = 200 μm.....**33**

Figura 5. Padronização do meio de diferenciação adipogênico e coloração com corante *Oil Red O*. **A:** CTMTAs controle cultivadas durante 14 dias com DMEM *low glucose*; barra de calibração = 200 μm. **B:** CTMTAs tratadas durante 14 dias com meio de diferenciação adipogênico modificado; barra de calibração = 50 μm.....**34**

Figura 6. Análise da citotoxicidade dos oxisteróis após 24 h de tratamento. Ensaio realizado por Hoechst 33342 com Iodeto de Propídio. Análise realizado por Curve fit no GraphPad Prism.....**35**

Figura 7. CTMTAs coradas com o corante *Oil Red O* após 14 dias de tratamento com DMEM *high glucose* e oxisteróis. **A:** Controle, DMEM *high glucose*. **B-C:** Col (3 e 5 μM). **D-E:** 7-KC (3 e 5 μM). **F-G:** Triol (3 e 5 μM); barra de calibração = 100 μm.....**37**

Figura 8. CTMTAs coradas com o corante *Oil Red O* após 14 dias de tratamento com meio de diferenciação adipogênico e diferentes concentrações de Col. **A:** Controle, meio adipogênico. **B:** 3 μM. **C:** 5 μM. **D:** 10 μM. **E:** 15 μM. **F:** 20 μM; barra de calibração = 50 μm.....**39**

Figura 9. CTMTAs coradas com o corante *Oil Red O* após 14 dias de tratamento com meio de diferenciação adipogênico e oxisteróis 7-KC e Triol. **A:** Controle, meio adipogênico. **B-C:** 7-KC (3 μM e 5 μM). **D-E:** Triol (3 μM e 5 μM); barra de calibração = 50 μm **40**

Figura 10. CTMTAs coradas com o corante vermelho de alizarina após 21 dias de tratamento com meio de cultivo DMEM *low glucose* e diferentes concentrações de Col. **A:** Controle, DMEM *low glucose*. **B:** 3 μM. **C:** 5 μM. **D:** 10 μM. **E:** 15 μM. **F:** 20 μM. **G:** 30 μM; barra de calibração = 200 μm.....**42**

Figura 11. CTMTAs coradas com o corante vermelho de alizarina após 21 dias de tratamento com meio de cultivo DMEM *low glucose* e diferentes concentrações de 7-KC. **A:** Controle, DMEM *low glucose*. **B:** 3 μM. **C:** 5 μM. **D:** 10 μM. **E:** 15 μM. **F:** 20 μM; barra de calibração = 200 μm.....**43**

Lista de figuras

Figura 12. CTMTAs coradas com o corante vermelho de alizarina após 21 dias de tratamento com meio de cultivo DMEM *low glucose* e diferentes concentrações de Triol. **A:** Controle, DMEM *low glucose*. **B:** 3 μM. **C:** 5 μM. **D:** 10 μM. **E:** 15 μM; barra de calibração = 200 μm.....**44**

Figura 13. CTMTAs coradas com o corante vermelho de alizarina após 21 dias de tratamento com meio de diferenciação osteogênico e diferentes concentrações de Col. **A:** Controle, meio de diferenciação osteogênico. **B:** 3 μM. **C:** 5 μM. **D:** 10 μM. **E:** 15 μM. **F:** 20 μM. **G:** 30 μM; barra de calibração = 200 μm.....**46**

Figura 14. CTMTAs coradas com o corante vermelho de alizarina após 21 dias de tratamento com meio de diferenciação osteogênico e diferentes concentrações de 7-KC. **A:** Controle, meio de diferenciação osteogênico. **B:** 3 μM. **C:** 5 μM. **D:** 10 μM. **E:** 15 μM. **F:** 20 μM; barra de calibração = 200 μm.....**47**

Figura 15. CTMTAs coradas com o corante vermelho de alizarina após 21 dias de tratamento com meio de diferenciação osteogênico e diferentes concentrações de Triol. **A:** Controle, meio de diferenciação osteogênico. **B:** 3 μM. **C:** 5 μM. **D:** 10 μM. **E:** 15 μM. **F:** 20 μM; barra de calibração = 200 μm.....**48**

Figura 16. Análise do potencial de membrana mitocondrial nas CTMTAs após 21 dias de tratamento com meio de diferenciação osteogênico e oxisteróis. **A:** Col. **B:** 7-KC. **C:** Triol. Estes dados são representados pela intensidade de fluorescência do TMRE acumulado nas mitocôndrias ativas. A análise foi determinada usando o software *Cell Scoring MetaExpress da Molecular Devices*. Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos. Análise estatística representativa de 3 linhagens diferentes em duplicata por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com análise secundária de *Bonferroni*, diferença estatística em relação aos poços controle tratados com meio DMEM *low glucose* **50**

Figura 17. Análise do potencial de membrana mitocondrial nas CTMTAs após 14 dias de tratamento com meio de diferenciação adipogênico e oxisteróis. **A:** Col. **B:** 7-KC. **C:** Triol. Estes dados são representados pela intensidade de fluorescência do TMRE acumulado nas mitocôndrias ativas. A análise foi determinada usando o software *Cell Scoring MetaExpress da Molecular Devices*. Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos. Análise estatística representativa de 3 linhagens diferentes em duplicata por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com análise secundária de Bonferroni, diferença estatística em relação aos poços controle tratados com meio DMEM *low glucose* **51**

Figura 18. CTMTAs coradas por TMRE após 21 dias de tratamento. **A:** Controle, DMEM *low glucose*. **B:** Meio osteogênico. **C:** Col associado ao meio osteogênico. **D:** 7-KC associado ao meio osteogênico. **E:** Triol associado ao meio osteogênico.....**52**

Figura 19. CTMTAs coradas por TMRE após 14 dias de tratamento. **A:** Controle, DMEM *high glucose*. **B:** Meio adipogênico. **C:** Col associado ao meio adipogênico. **D:** 7-KC associado ao meio adipogênico. **E:** Triol associado ao meio adipogênico.....**53**

Lista de figuras

Figura 20. Expressão de *RUNX2* nas CTMTAs em diferentes períodos durante a indução da diferenciação osteogênica. A análise foi determinada usando termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Análise estatística de 3 linhagens em duplicata foi realizada por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Dunnett*. Como calibrador foram utilizadas as amostras tratadas com meio DMEM *low glucose*, diferença estatística em relação a estas amostras. * ρ<0.05; ** ρ<0.01; *** ρ<0.0001.....**56**

Figura 21. Expressão de *ALPL* nas CTMTAs em diferentes períodos durante a indução da diferenciação osteogênica. A análise foi determinada usando termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Análise estatística de 3 linhagens em duplicata foi realizada por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Dunnett*. Como calibrador foram utilizadas as amostras tratadas com meio DMEM *low glucose*, diferença estatística em relação a estas amostras. * ρ<0.05; ** ρ<0.01; *** ρ<0.0001.....**57**

Figura 22. Expressão de *BGLAP* nas CTMTAs em diferentes períodos durante a indução da diferenciação osteogênica. A análise foi determinada usando termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Análise estatística de 3 linhagens em duplicata foi realizada por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Dunnett*. Como calibrador foram utilizadas as amostras tratadas com meio DMEM *low glucose*, diferença estatística em relação a estas amostras. * ρ<0.05; ** ρ<0.01; *** ρ<0.0001.....**59**

Figura 23. Expressão de *PPARγ* nas CTMTAs em diferentes períodos durante a indução da diferenciação osteogênica. A análise foi determinada usando termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Análise estatística de 3 linhagens em duplicata foi realizada por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Dunnett*. Como calibrador foram utilizadas as amostras tratadas com meio DMEM *low glucose*, diferença estatística em relação a estas amostras. * ρ<0.05; ** ρ<0.01; *** ρ<0.0001.....**60**

Figura 24. Comparação da expressão de *PPARγ* nas CTMTAs induzidas a diferenciação osteogênica e adipogênica durante 21 dias. Concentrações utilizadas durante a diferenciação osteogênica: Col 10 μM; 7-KC 10 μM; Triol 5 μM. Concentrações utilizadas durante a diferenciação adipogênica: Col 5 μM; 7-KC 5 μM; Triol 3 μM. A análise foi determinada usando termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Análise estatística foi realizada por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Dunnett*. Como calibrador foram utilizadas amostras tratadas durante 21 dias com meio DMEM *low glucose*. Diferença estatística com relação ao controle adipogênico. *ρ<0.05; *** ρ<0.0001.....**62**

Figura 25. Expressão de *C/EBPα* nas CTMTAs em diferentes períodos durante a indução da diferenciação osteogênica. A análise foi determinada usando termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Análise estatística de 3 linhagens em duplicata foi realizada por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Dunnett*. Como calibrador foram utilizadas as amostras tratadas com meio DMEM *low glucose*, diferença estatística em relação a estas amostras. * ρ<0.05; ** ρ<0.01; *** ρ<0.0001.....**63**

Lista de figuras

Figura 26. Comparação da expressão de *C/EBPα* nas CTMTAs induzidas a diferenciação osteogênica e adipogênica durante 21 dias. Concentrações utilizadas durante a diferenciação osteogênica: Col 10 μM; 7-KC 10 μM; Triol 5 μM. Concentrações utilizadas durante a diferenciação adipogênica: Col 5 μM; 7-KC 5 μM; Triol 3 μM. A análise foi determinada usando termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Análise estatística foi realizada por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Dunnett*. Como calibrador foram utilizadas amostras tratadas durante 21 dias com meio DMEM *low glucose*. Diferença estatística com relação ao controle adipogênico. *** ρ<0.0001.....**64**

Figura 27. Avaliação da proteína Smo durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** Média da intensidade de fluorescência da expressão de Smo na membrana/citoplasma mensurado por imunofluorescência após diferentes tratamentos. **B:** Porcentagem de CTMTAs positivas para Smo na membrana/citoplasma. **C:** Média da intensidade de fluorescência da expressão de Smo no núcleo mensurado por imunofluorescência após diferentes tratamentos. **D:** Porcentagem de CTMTAs positivas para Smo no núcleo. Análise estatística realizada por *One-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Bonferroni* **66**

Figura 28. Avaliação da proteína Smo durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** DMEM *low glucose*. **B:** Meio osteogênico. **C:** Meio adipogênico. **D:** Col. **E:** 7-KC. **F:** Triol. Imagens representativas da intensidade de fluorescência pela expressão de Smo obtidas por *High Content ImageXpress*.....**67**

Figura 29. Estudo da via SHh durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** Média da intensidade de fluorescência da expressão de SHh mensurado por imunofluorescência após diferentes tratamentos. **B:** Porcentagem das CTMTAs expressando SHh. Análise estatística realizada por *One-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Bonferroni*. ** ρ<0.01.....**68**

Figura 30. Avaliação da proteína SHh durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** DMEM *low glucose*. **B:** Meio osteogênico. **C:** Meio adipogênico. **D:** Col. **E:** 7-KC. **F:** Triol. Imagens representativas da intensidade de fluorescência pela expressão de SHh obtidas por *High Content ImageXpress*.....**69**

Figura 31. Avaliação da proteína Gli-3 durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** Média da intensidade de fluorescência da expressão de Gli-3 na membrana/citoplasma mensurado por imunofluorescência após diferentes tratamentos. **B:** Porcentagem de CTMTAs positivas para Gli-3 na membrana/citoplasma. **C:** Média da intensidade de fluorescência da expressão de Gli-3 no núcleo mensurado por imunofluorescência após diferentes tratamentos. **D:** Porcentagem de CTMTAs positivas para Gli-3 no núcleo. Análise estatística realizada por *One-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Bonferroni* **70**

Lista de figuras

Figura 32. Avaliação da proteína Gli-3 durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** DMEM *low glucose*. **B:** Meio osteogênico. **C:** Meio adipogênico. **D:** Col. **E:** 7-KC. **F:** Triol. Imagens representativas da intensidade de fluorescência pela expressão de Gli-3 obtidas por *High Content ImageXpress*.....**71**

Figura 33. Avaliação da proteína β-catenina durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** Média da intensidade de fluorescência da expressão de β-catenina na membrana/citoplasma mensurado por imunofluorescência após diferentes tratamentos. **B:** Porcentagem de CTMTAs positivas para β-catenina na membrana/citoplasma. **C:** Média da intensidade de fluorescência da expressão de β-catenina no núcleo mensurado por imunofluorescência após diferentes tratamentos. **D:** Porcentagem de CTMTAs positivas para β-catenina no núcleo. Análise estatística realizada por *One-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Bonferroni*. * ρ<0.05; ** ρ<0.01.....**73**

Figura 34. Avaliação da proteína β-catenina durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** DMEM *low glucose*. **B:** Meio osteogênico. **C:** Meio adipogênico. **D:** Col. **E:** 7-KC. **F:** Triol. Imagens representativas da intensidade de fluorescência pela expressão de β-catenina obtidas por *High Content ImageXpress*.....**74**

Resumo

Oliveira BA. *Ação dos oxisterói s na diferenciação osteogênica e adipogênica de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são o tipo de célula-tronco (CT) mais frequentemente utilizado para pesquisa e propósitos clínicos. São caracterizadas por sua capacidade de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens celulares. O colesterol é um componente estrutural da membrana celular que pode ser facilmente oxidado por oxidação enzimática ou não enzimática em produtos conhecidos como oxisteróis. Sabe-se que os oxisteróis exercem ação em diversos processos fisiopatológicos, dentre eles a determinação da linhagem celular durante a diferenciação de CTMs. A característica pró-osteogênica dos oxisteróis tem despertado o interesse de pesquisadores a respeito de sua ação potencial no tratamento de doenças ósseas, sendo propostos como substitutos das BMPs. Neste estudo foi avaliada a ação do colesterol, assim como dos oxisteróis 7-cetocolesterol (7-KC) e Colestane-3β,5α,6β-triol (Triol) na diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTMTAs). Os resultados sugerem que o colesterol e o 7-KC exercem uma ação pró-osteogênica e anti-adipogênica na diferenciação de CTMTAs, promovendo a expressão mais rápida de marcadores de diferenciação osteogênica inicial (*RUNX2* e *ALPL*) e inibição dos marcadores de diferenciação adipogênica (*PPARγ* e *C/EBPα*). Estes efeitos foram causados pela ativação da via de sinalização Wnt/β-catenina, sem intervenção da via de sinalização *Sonic Hedgehog* (SHh). O oxisterol Triol foi anti-osteogênico e anti-adipogênico nas CTMTAs apesar de induzir maior expressão da β-catenina.

Palavras-chave: Oxisteróis; Colesterol; Diferenciação celular; Células-tronco.

Abstract

Oliveira BA. *Action of oxysterols in adipose tissue derived mesenchymal stem cells osteogenic and adipogenic differentiation* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are the most frequently used cell type for research and clinical purposes. They are characterized by self-renewal ability and differentiation in multiple cell lines. Cholesterol is a structural component of cell membranes that can be easily oxidized by enzymatic or non-enzymatic oxidation into products known as oxysterols. It is known that oxysterols play a role in different pathophysiological processes, among then MSCs fate determination. The oxysterol pro-osteogenic characteristic has been arousing the interest of researchers about its potential action in treatment of bone diseases and it has been proposed as a substitute of BMPs. Here, we evaluate the action of cholesterol as well as oxysterols 7-ketocholesterol (7-KC) and Cholestane-3β,5α,6β-triol (Triol) in adipose tissue derived mesenchymal stem cells (ATMSCs). The results suggest that cholesterol and 7-KC have a pro-osteogenic and anti-adipogenic action on the ATMSCs differentiation by promoting the earlier expression of early osteogenic markers (*RUNX2* e *ALPL*) and inhibition of adipogenic markers (*PPARγ* e *C/EBPα).* These effects seem to be promoted by the activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway without intervention of Sonic Hedgehog (SHh) signaling pathway. The oxysterol Triol had anti-osteogenic and anti-adipogenic properties on ATMSCs, although it induced greater expression of β-catenin.

Key-words: Oxysterols; Cholesterol; Cell differentiation; Stem cells.

1.Introdução

1.1 Célula-tronco (CT)

A célula é a unidade viva funcional básica do organismo. Temos cerca de 100 trilhões de células no corpo, dentre elas quase todas têm a capacidade de gerar novas células, através da divisão celular (GUYTON; HALL, 2006). Dentre a grande variedade de células existentes em nosso corpo, existe uma linhagem celular em especial com característica de autorrenovação e diferenciação amplamente estudada, denominada célula-tronco (CT) (BYDLOWSKI *et al.,* 2009; LEYENDECKER JUNIOR *et al.,* 2018).

Em 1867 o patologista alemão Cohnheim sugeriu pela primeira vez a presença de fibroblastos oriundos da medula óssea atuantes no reparo tecidual (PROCKOP, 1997). Em 1970, Friedenstein reportou a presença de um pequeno número de células aderentes, provenientes da medula óssea com capacidade de diferenciação osteogênica e condrogênica. Após isso percebeu-se que estas células poderiam ser isoladas, purificadas e expandidas, podendo ser utilizadas como ferramentas de aplicação clínica, desde então diversos estudos vêm sendo realizados sobre a capacidade de diferenciação das CTs (CONGET; MINGUELL, 1999; LEVY *et al.,* 2017; PROCKOP, 1997).

Podemos caracterizar as CTs como células indiferenciadas com potencial de autorrenovação através de divisão assimétrica, ou seja, uma CT produz uma célula réplica da original e outra célula diferenciada, conhecida como célula progenitora (PARKER *et al.,* 2004; ROMÃO, 2012). Estas células possuem papel regenerativo em tecidos lesados, e diferenciação ilimitada podendo originar diversos tipos teciduais. A literatura descreve que são capazes de se diferenciar em mais de 200 tipos celulares diferentes, como tecido muscular, ósseo, cartilaginoso, adiposo, e também as células do sistema sanguíneo (BYDLOWSKI *et al.,* 2009; FERREIRA DE SOUZA *et al.,* 2003; LEVY *et al.,* 2017).

Uma das fontes conhecidas de CTs é a medula óssea, presente no interior dos ossos longos. As células-tronco hematopoiéticas (CTH) da medula

óssea são responsáveis pela hematopoese, uma vez que são fonte contínua de células progenitoras sanguíneas, tais como linfócitos, monócitos, granulócitos, plaquetas e hemácias (PROCKOP, 1997; SEITA; WEISSMAN, 2010). Além de ser fonte de CTH, o nicho da medula óssea também contém CTs não hematopoiéticas, como as células-tronco mesenquimais (CTM), importantes por sua atuação na manutenção da estabilidade óssea normal. Na medula óssea encontram-se osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, células perivasculares e endotélio sinusoidal (CONGET; MINGUELL, 1999; HU *et al.,* 2018; PANDO *et al.,* 2018; PROCKOP, 1997).

As CTs podem ser classificadas conforme fonte de obtenção e também conforme potencial de diferenciação. As células-tronco embrionárias (CTE), encontradas na fase de blastocisto são capazes de se diferenciar nas três camadas germinativas embrionárias: mesoderme que origina os músculos e sistema esquelético, sistema cardiovascular, excretor e *reprodutor*; a ectoderme que origina a epiderme, além do sistema nervoso central e periférico; e a endoderme que origina o trato gastrointestinal e respiratório (FAVAROLO; LÓPEZ, 2018; SOBHANI *et al.,* 2017).

As células-tronco adultas (CTA), podem ser originadas de diversas fontes não embrionárias, estão localizadas de forma que auxilie a reparação e autorrenovação tecidual atendendo desta forma às necessidades e demandas regenerativas dos tecidos (CLEVERS; LOH; NUSSE, 2014; FERREIRA DE SOUZA *et al.,* 2003; FORTE, 2014; MILLS; SZCZERKOWSKI; HABIB, 2017). A produção destas CTAs ocorre com precisão através de sinais bioquímicos transmitidos pelo nicho celular, que controla e determina o número de CTs a serem produzidas além de facilitar e promover a diferenciação e migração celular (CLEVERS; LOH; NUSSE, 2014; MILLS; SZCZERKOWSKI; HABIB, 2017).

Podemos classificar as CTs conforme seu potencial de diferenciação em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes (FERREIRA DE SOUZA *et al.,* 2003; SOBHANI *et al.,* 2017). As CTs totipotentes são capazes de originar todos os tipos celulares, dão origem ao embrião e aos tecidos extra-embrionários, são exclusivas da fase de zigoto e desaparecem poucos dias após a fertilização do ovócito (FERREIRA DE SOUZA *et al.,* 2003; ROMÃO, 2012; SOBHANI *et al.,* 2017). Por outro lado, as CTs pluripotentes,

encontradas na massa interna do blastocisto, podem originar todos os tipos celulares do embrião exceto células do folheto extra-embrionário (ROMÃO, 2012; SOBHANI *et al.,* 2017).

As CTs multipotentes têm uma capacidade mais limitada de diferenciação, podendo se diferenciar em todos os tipos celulares de uma linhagem específica, ou seja, podem dar origem aos tecidos pertencentes a apenas um camada germinativa (ectoderme ou mesoderme ou endoderme). As CTs unipotentes são capazes de se diferenciar em apenas uma única linhagem celular (BYDLOWSKI *et al.,* 2009; SOBHANI *et al.,* 2017).

1.2 Células-tronco mesenquimais (CTMs)

As CTMs são classificadas como multipotentes. Devido a capacidade de diferenciação destas células, estudos sugerem que sejam responsáveis pela manutenção dos tecidos do organismo, visto que podem se diferenciar em condroblastos, hepatócitos, osteócitos, neurônios e outros tipos celulares (BYDLOWSKI *et al.,* 2009; DEL CARLO; MONTEIRO; NETO, 2009).

As CTMs podem ser encontradas em pequena quantidade na medula óssea, e em outros tecidos, como: sangue do cordão umbilical, geléia de Wharton, placenta, líquido amniótico, tecido adiposo, cartilagem articular, trabéculas ósseas, entre outros (BYDLOWSKI *et al.,* 2009; DEL CARLO; MONTEIRO; NETO, 2009).

Como forma de padronização, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy - ISCT*) definiu critérios mínimos para classificação das CTMs (DOMINICI *et al.,* 2006). O primeiro deles é a aderência ao plástico quando mantidas em cultura, característica esta que vem sendo usada a fim de isolá-las das demais células provenientes da medula óssea, como as CTHs, por exemplo (DOMINICI *et al.,* 2006; OREFFO *et al.,* 2005). As CTMs aderem ao plástico enquanto as CTHs se mantêm em suspensão. No decorrer das passagens, as células não aderentes são removidas enquanto as colônias de CTMs são formadas (BYDLOWSKI *et al.,* 2009; HORWITZ *et al.,* 2005).

O segundo critério definido é a expressão de antígenos de superfície mesenquimais em quantidade maior ou igual a 95% das células: CD105 (*cluster of differentiation* 105 - endoglina), CD73 (*cluster of differentiation* 73 - ecto-5' nucleotidase) e CD90 (*cluster of differentiation* 90 - Thy-1) assim como a ausência de marcadores hematológicos: CD45 (*cluster of differentiation* 45 - marcador de células hematopoiéticas), CD34 (*cluster of differentiation* 34- marcador de progenitoras hematopoiéticas), CD14 ou CD11β (*cluster of differentiation* 14 ou *cluster of differentiation* 11β - expresso em monócitos e macrófagos), CD79α ou CD19 (*cluster of differentiation* 79α ou *cluster of differentiation* 19 - marcador de linfócitos B) e HLA-DR (*human leukocyte antigen – DR isotype* - não expresso em CTMs) (DOMINICI *et al.,* 2006).

O terceiro critério estabelecido é a capacidade de diferenciação das CTMs em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro,* sob determinadas condições (DOMINICI *et al.,* 2006). A alta capacidade de diferenciação das CTMs e suas diversas fontes tem despertado o interesse de pesquisadores a fim de utilizá-las em engenharia tecidual (LEITE; VASCONCELOS, 2007), como no reparo de lesões cerebrais e neurociência, doenças cardíacas, reparação de feridas cutâneas e falhas ósseas, doenças autoimunes entre outras (DEL CARLO; MONTEIRO; NETO, 2009; KULTERER *et al.,* 2007).

1.2.1 Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTMTAs)

O tecido adiposo é um importante regulador do equilíbrio energético, por onde ocorre o armazenamento de energia no corpo humano na forma de gordura. Conforme há necessidade de energia, essa gordura é liberada na forma de ácidos graxos pela corrente sanguínea atingindo assim os demais tecidos (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016).

Uma das células presentes no tecido adiposo são os adipócitos, responsáveis pelo acúmulo lipídico. Existe também uma população heterogênea chamada fração estroma-vascular (*Stroma vascular fraction* – SVF) contendo macrófagos, linfócitos, neutrófilos, células endoteliais, fibroblastos, células de músculo liso, além de pré-adipócitos. Os pré-adipócitos

são células menores se comparadas aos adipócitos, semelhantes a fibroblastos que se transformam em adipócitos maduros conforme estímulo recebido. Na SVF podemos encontrar também CTMs (ESTEVE RÀFOLS, 2014).

Rodbell (1960) foi o pioneiro no isolamento de CTMTAs a partir de modelos animais, subsequentemente Zuk (2001) apresentou os primeiros isolamentos de CTMTAs em humanos (DE FRANCESCO *et al.,* 2015; GIMBLE; KATZ; BUNNELL, 2007). O tecido adiposo assim como a medula óssea deriva do mesênquima, além de conter um estroma de suporte que pode ser facilmente isolado (DE FRANCESCO *et al.,* 2015; ZUK *et al.,* 2002).

Com o aumento da incidência da obesidade e por consequência o aumento do número de cirurgias de lipoaspiração, o tecido adiposo têm se mostrado uma fonte muito acessível de CTMs. Durante o processo cirúrgico de lipoaspiração são obtidos de 100 mL a 3 L de tecido lipoaspirado que é geralmente descartado (GIMBLE; KATZ; BUNNELL, 2007). Desta maneira a obtenção das CTMs ocorre de forma não invasiva, por se tratar de um material residual decorrente de uma operação (SCHNEIDER *et al.,* 2017).

Podemos considerar então que as CTMTAs são isoladas mais facilmente se comparadas às da medula óssea, além de apresentarem capacidade de expansão elevada e se diferenciarem nas mesmas linhagens que as CTMs derivadas da medula óssea, como linhagens osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas, miogênicas além de células endoteliais (DE FRANCESCO *et al.,* 2015; SACHS *et al.,* 2012). Além disso, as CTMTAs apresentam marcadores de superfície em comum com as CTMs derivadas da medula óssea além de expressarem genes de células indiferenciadas como OCT-4, SOX2 e NANOG (SACHS *et al.,* 2012; STREM *et al.,* 2005).

1.3 Diferenciação celular

A diferenciação celular é um processo na qual uma célula imatura se transforma em um tipo celular mais especializado capaz de realizar funções específicas proporcionando diversidade celular, processo importante para a reparação tecidual (DING; SCHULTZ, 2004).

Para ocorrer a diferenciação celular são necessários diversos processos, dentre os quais podemos citar: a interação célula-célula, a divisão celular e a

regulação gênica (BYDLOWSKI *et al.,* 2009). Atualmente sabe-se que as propriedades mecânicas do microambiente influenciam a diferenciação das CTs (FRANK *et al.,* 2016), bem como a atividade mitocondrial, que pode agir como indutor ou inibidor da diferenciação e proliferação destas CTs (SCHWARTZ; DA VEIGA MOREIRA; JOLICOEUR, 2018).

Diversos estudos matemáticos vêm sendo realizados a fim de elucidar as influências das dimensões espaciais e do contato célula-célula na diferenciação e proliferação das CTs. A literatura indica que em situações na qual as CTs estão em contato direto com outras células diferenciadas a diferenciação ocorre cerca de três vezes mais rápido se comparado a CTs envoltas por outras CTs indiferenciadas (SMITH *et al.,* 2015).

A interação entre as células desencadeia a secreção de substâncias que favorecem a diferenciação (BYDLOWSKI *et al.,* 2009). Estudos epigenéticos têm mostrado que a determinação da linhagem celular em que uma CTM irá se diferenciar está associada à ativação ou silenciamento de programas específicos de transcrição em resposta a estímulos ambientais (OZKUL; GALDERISI, 2016).

Outro fator importante que pode alterar a capacidade de diferenciação das CTs é a senescência, processo natural de envelhecimento celular. Culturas mantidas por um longo período *in vitro* podem apresentar alterações morfológicas e funcionais, reduzindo o potencial de diferenciação e capacidade de proliferação, característica de suma importância ao desenvolver experimentos com CTs (OZKUL; GALDERISI, 2016).

1.3.1 Diferenciação osteogênica

O osso é o principal componente do sistema esquelético, importante para locomoção, proteção de órgãos internos, homeostase do cálcio, além de ser um órgão endócrino envolvido na regulação do metabolismo energético, fertilidade masculina, secreção de insulina, atividade muscular e funções cognitivas (COMPTON; LEE, 2014; ROSSI *et al.,* 2019).

O processo de formação do osso é chamado de osteogênese e ocorre através de dois processos diferentes de mineralização: ossificação endocondral, se trata da substituição completa da cartilagem por osso durante

a cicatrização, que ocorre em ossos longos como fêmur e tíbia. A ossificação intramembranosa ocorre através da substituição direta do tecido mesenquimal por osso, principalmente nos ossos do crânio (LUO *et al.,* 2019; RATHER; JHALA; VASITA, 2019).

Outro processo importante para homeostase do tecido ósseo é chamado de remodelamento ósseo, descrito como um processo cíclico, que consiste nas fases de: reabsorção, que é a retirada do osso antigo através da ação de osteoclastos; fase de reversão através da ação de células mononucleares que preparam a superfície para a fase de formação através de sinais para diferenciação e migração; a última fase é chamada de formação através da deposição de osso pela ação de osteoblastos (HILL, 1998; MATSUO; IRIE, 2008; VÄÄNÄNEN; LAITALA-LEINONEN, 2008).

Dentre as células presentes no tecido ósseo destacamos a função dos osteócitos, osteoblastos e osteoclastos na homeostase óssea (COMPTON; LEE, 2014).

Os osteócitos estão presentes na matriz óssea e são o tipo celular mais abundante no osso maduro, atuam na remodelação óssea, transmissão de sinais através da regulação do fluxo de fluído no interior dos ossos e mecano-transdução (ROWE; SHARMA, 2018).

Osteoblastos são células de origem mesenquimal que contribuem no crescimento ósseo através da produção de colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas e minerais que preenchem as lacunas de *Howship* (depressões na matriz óssea), podem se diferenciar em osteócitos ou morrer por apoptose (ROWE; SHARMA, 2018).

Existe ainda um terceiro tipo celular chamado de osteoclasto; são células de origem hematopoiética atuantes na reabsorção óssea. Estas células utilizam enzimas lisossômicas e íons de hidrogênio para degradação da matriz óssea. Sabe-se que esta matriz é formada por uma porção inorgânica de cristais de cálcio e fosfato e uma porção orgânica de colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas. Conforme ocorre a reabsorção, lacunas vão se formando na matriz óssea chamadas de lacunas *Howship* anteriormente mencionadas (ROWE; SHARMA, 2018).

1.3.2 Fatores importantes para a diferenciação osteogênica

O fator de transcrição relacionado ao *Runt-2* (*Runt Related Transcription Factor 2* - RUNX2) faz parte de uma família de fatores de transcrição necessários na diferenciação de CTMs envolvido no desenvolvimento ósseo (AUGELLO; DE BARI, 2010; MARUYAMA *et al.,* 2007). Sua atividade transcricional se dá por meio da ligação ao *Core Binding Factor* β (Cbfβ). A literatura descreve que o RUNX2 atua aumentando a expressão da fosfatase alcalina (*Alkaline Phosphatase* - ALP), osteocalcina (osteocalcin - OCN) e osteopontina (osteopontin - OTP) além de diminuir a expressão de marcadores adipogênicos como receptores ativados por proliferador do peroxissoma γ (*Peroxisome Proliferator-activated Receptor* - PPARγ) e lipoproteína lipase (*Lipoprotein Lipase* - LPL) (MARUYAMA *et al.,* 2007; NARAYANAN *et al.,* 2019; ZHANG *et al.,* 2006).

O gene *ALPL* codifica uma proteína chama fosfatase alcalina utilizada como marcador de diferenciação osteogênica inicial (KULTERER *et al.,* 2007; LIU *et al.,* 2018). Apesar de se apresentar altamente expressa nos ossos, a expressão de *ALPL* pode ser observada em diferentes tecidos e em diferentes níveis (BUCHET; MILLÁN; MAGNE, 2013). Estudos revelam que o envelhecimento ósseo, bem como a determinação da linhagem celular durante a diferenciação das CTMs ocorre através da regulação da liberação e hidrólise do ATP (*Adenosine TriPhosphate*) e da via AMPKα (AMP-*activated protein kinase* α) pela ação da *ALPL* (LIU *et al.,* 2018).

O gene *Bone Gamma-carboxyglutamate* protein (*BGLAP*) codifica a proteína osteocalcina (OCN) fortemente expressa em osteoblastos maduros (KOMORI, 2019). A OCN é utilizada como marcador sérico de formação óssea e acredita-se que esteja envolvida na mineralização da matriz óssea (ZOCH; CLEMENS; RIDDLE, 2016). Estudos mostram que a produção de OCN está relacionada a atuação do receptor de insulina em osteoblastos, sendo considerada um dos principais genes responsivos à insulina em osteoblastos (ZOCH; CLEMENS; RIDDLE, 2016) além de ser vitamina K e vitamina D dependente (LEE; HODGES; EASTELL, 2000).

O *Secreted Phosphoprotein 1* (*SPP1*) é expresso por osteoblastos imaturos e codifica uma glicoproteína de ligação a integrina chamada osteopontina (OPN) (KOMORI, 2019; PANG *et al.,* 2019). A síntese da OPN é realizada através do calcitriol envolvido na reabsorção óssea (REINHOLT *et al.,* 1990). Sabe-se que a OPN está envolvida em processos fisiológicos como a calcificação e biomineralização além de atuar como inibidora da calcificação vascular (LOK; LYLE, 2019). A OPN é expressa em diversos tecidos como osso, cartilagem, rim, cérebro, útero, glândulas mamárias, salivares e sudoríparas entre outros (SODEK; GANSS; MCKEE, 2000).

*Wingless Int-1 (*Wnt*)* faz parte de uma família de moléculas importantes na sinalização intracelular, sabe-se que está envolvido na diferenciação de CTs, proliferação e migração celular. A sinalização celular por Wnt pode ocorrer pela via canônica e não canônica. A via canônica ocorre através da ligação com receptores *Freezled* (Fz) e ativação de *Dishevelled* (Dsh)*,* proteína mediadora citoplasmática levando a inibição da *Glycogen synthase kinase 3 beta* (GSK-3β) e estabilização e translocação da β-catenina para o núcleo. Caso não haja a presença de Wnt, a β-catenina interage com o complexo de destruição e é destruída por proteossomas (MILLS; SZCZERKOWSKI; HABIB, 2017; SOUSA *et al.,* 2010; TAYYAB *et al.,* 2018). A via não canônica de sinalização não ocorre pela ação da β-catenina e estudos indicam que a sinalização pela via não canônica de Wnt está associada a liberação de cálcio intracelular (VEEMAN; AXELROD; MOON, 2003).

Além destes, existe uma família de genes chamada *Hedgehog* (*Hh*) em que o *Sonic Hedgehog* (*SHh*) e *Indian Hedeghog* (*Ihh*) estimulam a atividade da *ALPL* e estão envolvidos na sinalização das proteínas morfogenéticas ósseas (*Bone morphogenetic protein* - BMPs), sendo reguladores determinantes da diferenciação celular (NAKAMURA *et al.,* 1997). Inicialmente é gerado um ligante ativo de Hh, este ligante se liga ao receptor transmembranar Patched (Ptch) impedindo que haja o bloqueio de *Smoothened* (Smo). O Smo ativa a sinalização de SHh e, em seguida, ocorre a translocação do *fator de transcrição Glioma-associated oncogene Family zync finger* (Gli) para o núcleo (COHEN, 2016; HSIEH *et al.,* 2013). A literatura descreve que ambas as vias (Wnt/β-catenina e SHh) são importantes na

osteogênese pela indução da expressão de marcadores osteogênicos como *ALPL* e *RUNX2* (MIDHA; MURAB; GHOSH, 2016).

1.3.3 Indutores de diferenciação osteogênica *in vitro*

O processo de diferenciação osteogênica *in vitro* ocorre através do uso de meios de cultura específicos para a osteogênese contendo (Fig. 1):

β-glicerofosfato, utilizado como fonte de fosfato, atua na sinalização intracelular pela regulação da expressão de determinados genes osteogênicos (ALMALKI; AGRAWAL, 2016; BATEMAN *et al.,* 2017; LANGENBACH; HANDSCHEL, 2013);

Dexametasona, atua na diferenciação osteogênica através da ativação de Wnt/β–catenina que agem por sua vez na regulação do *RUNX2* (ALMALKI; AGRAWAL, 2016; BATEMAN *et al.,* 2017; LANGENBACH; HANDSCHEL, 2013);

Ácido ascórbico-2-fosfato, promove a diferenciação celular através do aumento da secreção de colágeno tipo 1 sendo um cofator para enzimas que hidroxilam lisina e prolina em colágeno (ALMALKI; AGRAWAL, 2016; LANGENBACH; HANDSCHEL, 2013).

A confirmação da diferenciação osteogênica *in vitro* requer a análise de alguns marcadores sendo eles:

ALPL que aumenta sua expressão no início do período de diferenciação, após fase de proliferação das CTMs e diminui durante o período de mineralização (KULTERER *et al.,* 2007; NARAYANAN *et al.,* 2019);

Colágeno 1A1 (COL1A1), que é um marcador de progenitores osteogênicos (KULTERER *et al.,* 2007);

Osteonectina (osteonectin – ON) ou glicoproteína ácida rica em cisteína (*Secreted Protein Acidic and Cysteine Rich* - SPARC), proteína secretada pelos osteoblastos (KULTERER *et al.,* 2007);

OPN, que é uma proteína da matriz extracelular óssea (KULTERER *et al.,* 2007);

OCN, um marcador de osteoblastos com matriz mineralizada, promove alteração da morfologia e transformação de pré-osteoblastos em osteoblastos

maduros juntamente com colágeno tipo 1 e osterix (KULTERER *et al.,* 2007; NARAYANAN *et al.,* 2019);

Receptor de vitamina D (VDR); o inibidor de ligação ao DNA (IDA4), que atua no ciclo celular, senescência e diferenciação (KULTERER *et al.,* 2007).

A cristalina -αB (CRYAB), que está envolvida na diferenciação celular, porém sua função ainda não está clara e a sortilina1 (SORT1), que se sugere promover a maturação da matriz extracelular (KULTERER *et al.,* 2007).

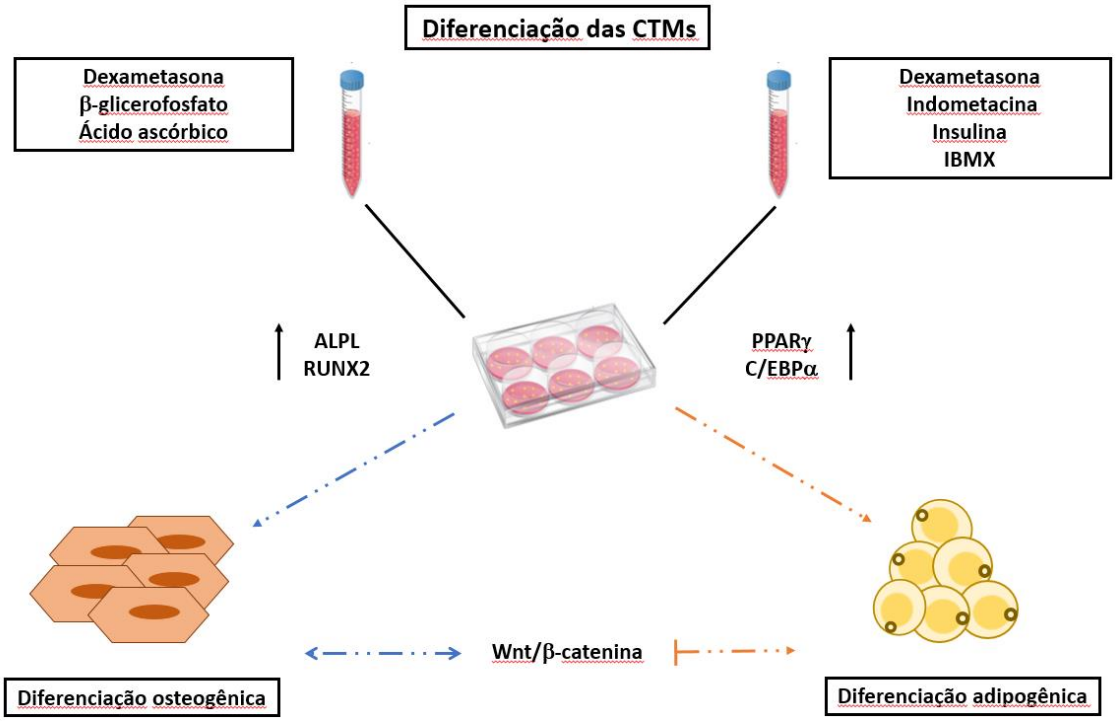

Figura 1: Diferenciação osteogênica e adipogênica de CTMs *in vitro* através da ativação de genes osteogênicos (*ALPL – Alkaline phosphatase e RUNX2 – Runt related transcription factor*) e adipogênicos (*PPARγ – peroxisome proliferator-activated receptor γ e C/EBPα – CCAAT/enhancer-binding protein α*) pela sinalização de Wnt/-βcatenina (Fonte: Adaptado de (SCIENTIFIC, 2019).

1.3.4 Diferenciação adipogênica

Adipogênese é o nome dado ao processo de transformação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, que são células especializadas no armazenamento de gordura. Essa gordura por sua vez será utilizada como fonte de energia para os tecidos. Portanto, o tecido adiposo é essencial para o

balanço energético e homeostase da glicose, estando presente no corpo de duas formas diferentes (ESTEVE RÀFOLS, 2014; MOSETI; REGASSA; KIM, 2016).

A primeira classe de tecido adiposo é o tecido adiposo marrom (*brown adipose tissue* - BAT) responsável pela termogênese através da metabolização de ácidos graxos. A termogênese é facilitada pela UCP-1 (proteína desacopladora 1 – *uncoupling protein 1*) presente na membrana mitocondrial interna, responsável pela geração de calor do tecido adiposo marrom (DE SÁ *et al.,* 2017; ESTEVE RÀFOLS, 2014).

O tecido adiposo branco (*white adipose tissue* - WAT) é responsável pelo armazenamento de triglicerídeos, sendo a maior reserva de energia em eucariotos. O tecido adiposo branco atua na sinalização de insulina e na secreção de diversos fatores lipídicos importantes para a regulação de processos fisiológicos e metabólicos (DE SÁ *et al.,* 2017; ESTEVE RÀFOLS, 2014; GEMMIS *et al.,* 2006; GREGOIRE; SMAS; SUL, 1998; MOSETI; REGASSA; KIM, 2016).

O tecido adiposo é extremamente heterogêneo. Ele é formado em momentos e locais específicos, diferindo em composição, morfologia, localização e função (DE SÁ et al., 2017). Os adipócitos marrons são células elipsoides com a presença de vários vacúolos de gordura, apresentam núcleo centralizado no citoplasma e número abundante de mitocôndrias. Os adipócitos brancos, são células esféricas com a presença de um único vacúolo de gordura que ocupa grande parte do citoplasma, o núcleo se encontra constrito entre a gotícula lipídica e a membrana plasmática e ocorre uma escassa distribuição de mitocôndrias nestas células (DE SÁ *et al.,* 2017; ESTEVE RÀFOLS, 2014).

1.3.5 Fatores importantes para a diferenciação adipogênica

O PPAR é um membro da família de receptores do peroxissoma que através da heterodimerização com o *Retinoid X Receptor* (RXR) atua regulando genes de diferenciação celular (LEVY *et al.,* 2017). Este gene é de extrema importância para a efetivação da diferenciação adipogênica pois atua inibindo a osteogênese (GEMMIS *et al.,* 2006; MOSETI; REGASSA; KIM, 2016). Estudos

indicam que o PPAR age na regulação da expressão de diversas proteínas associadas a gotículas lipídicas como perilipinas ou Plin envolvidas na lipólise (HAFIDI *et al.,* 2019).

O PPARα é altamente expresso em tecidos com alta capacidade de oxidação de ácidos graxos como hepatócitos, cardiomiócitos, córtex renal e músculo esquelético (FERRE, 2004). Ele atua na adipogênese do tecido marrom, assim como os fatores de transcrição *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator -1 alpha* (PGC-1α) e *CCAAT/enhancer-binding proteins* (C/EBPs) (HAFIDI *et al.,* 2019).

O PPARγ, age principalmente no desenvolvimento do tecido adiposo marrom e branco. Ele também é expresso em monócitos, macrófagos, na mucosa do colón, na placenta e está quase ausente no tecido muscular esquelético (FERRE, 2004; HAFIDI *et al.,* 2019). Sua isoforma PPARγ–2 é expressa apenas em tecido adiposo, estudos recentes mostraram que a expressão regulada de PPARγ-2 sozinho ou combinado com a proteína beta intensificadora de ligação (*CCAAT/enhancer-binding proteins beta* – C/EBPβ) ou *PR domain containing 16* (PRDM16) promove a adipogênese com 100% de eficiência (ALMALKI; AGRAWAL, 2016; GEMMIS *et al.,* 2006). O *PPARγ co-activator 1α* (PPARγ-Clα) quando presente em células de gordura branca ativa a expressão da UCP-1, proteína que converte adipócitos brancos maduros em marrons (GEMMIS *et al.,* 2006).

Os C/EBPs (*CCAAT/enhancer-binding proteins*) pertencem a uma família de fatores de transcrição que consistem em seis membros. Dentre eles a proteína alfa intensificadora de ligação (*CCAAT/enhancer-binding proteins alpha* – C/EBPα) está envolvida na diferenciação terminal de adipócitos, a literatura descreve que sua ausência leva a resistência à insulina *in* vitro (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016). A proteína beta intensificadora de ligação (*CCAAT/enhancer-binding proteins beta* – C/EBPβ) tem papel catalítico na adipogênese, sendo altamente expressa durante os períodos iniciais de diferenciação em resposta ao estímulo hormonal, diminuindo durante a fase tardia sendo substituídos por PPARγ e C/EBPα (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016).

1.3.6 Indutores de diferenciação adipogênica *in vitro*

O processo de diferenciação adipogênica *in vitro* é mediado pela ação de (Fig. 1):

Insulina, que atua estimulando a absorção de glicose pelas células para armazenamento em forma de triglicerídeos, além de ativar as vias das quinases reguladas por sinais extracelulares (extracellular signal-regulated kinases – ERK) essencial na adipogênese *in vivo* (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016);

Dexametasona, indutor de genes responsáveis pela expressão do fator de transcrição C/EBP (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016);

Isobutil-metilxantina (IBMX), indutor de genes responsáveis pela expressão do fator de transcrição C/EBPβ (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016).

Indometacina, indutor da expressão de C/EBPβ e PPARγ além de diminuir a expressão da β-catenina (AVAL *et al.,* 2018; STYNER *et al.,* 2010).

Existe uma série de marcadores de diferenciação adipogênica *in vitro* como:

Adipsina, secretada pelos adipócitos na corrente sanguínea, sendo um indicador tardio de diferenciação (ALMALKI; AGRAWAL, 2016; MOSETI; REGASSA; KIM, 2016);

Hormônio leptina expresso por adipócitos maduros (ALMALKI; AGRAWAL, 2016; MOSETI; REGASSA; KIM, 2016);

Fatores de transcrição adipogênicos *Twist related protein 1* (Twist-1) e proteína 1 expressa na derme (*Dermis-Expressed Protein 1* - Dermo-1) mediadores da diferenciação de CTMs em adipócitos entre outros (ALMALKI; AGRAWAL, 2016; MOSETI; REGASSA; KIM, 2016).

1.4. Oxisteróis

Oxisteróis são produtos derivados da oxidação enzimática ou não enzimática do colesterol (Col), podendo ser produtos finais ou intermediários da via de excreção do mesmo (BJÖRKHEM; DICZFALUSY, 2002; LUU *et al.,* 2016). Os oxisteróis estão presentes nos tecidos em baixas concentrações.

Também encontram-se em alimentos com alto teor de Col, porém, quando comparados ao Col, os oxisteróis são absorvidos pelo intestino e coletados pelos tecidos mais rapidamente (OLKKONEN; BÉASLAS; NISSILÄ, 2012).

Estudos indicam que os oxisteróis participam do controle lipídico e do sistema imune além de estarem relacionados a processos fisiopatológicos como aterosclerose, apoptose, necrose, inflamação, imunossupressão, desenvolvimento de cálculos biliares, entre outros (OLKKONEN; BÉASLAS; NISSILÄ, 2012; SILVA *et al.,* 2016).

O Col é um componente essencial da membrana celular de mamíferos (SOCCIO; BRESLOW, 2004). Atua na regulação de diversos processos biológicos como interação com proteínas incorporadas a membrana celular e regulação de propriedades biofísicas da bicamada lipídica (KULIG *et al.,* 2016).

A molécula de Col é composta por três regiões, sendo: uma cauda de hidrocarboneto (cadeia lateral) em que ocorre a oxidação, uma estrutura com quatro anéis de hidrocarboneto e um grupo hidroxila (VEJUX; MALVITTE; LIZARD, 2008). A mudança de Col em oxisterol através do oxigênio ocorre nas porções hidroxila, carboxila, hidroperoxi, epóxi e ceto. A introdução de um oxigênio acelera a degradação do Col, portanto os oxisteróis possuem uma meia vida inferior ao Col sendo considerados produtos da via de catabolismo do Col (OLKKONEN; BÉASLAS; NISSILÄ, 2012).

Conforme mencionado, os oxisteróis podem surgir por oxidação enzimática e não enzimática através da ação de radicais livres conforme indicado na Fig. 2 (BROWN; JESSUP, 2009). As principais enzimas envolvidas no metabolismo do Col podem ser classificadas como oxidoredutases, hidrolases e transferases (MUTEMBEREZI; GUILLEMOT-LEGRIS; MUCCIOLI, 2016). A oxidação não enzimática, por outro lado, ocorre pela ação de radicais livres no Col proveniente de alimentos, lipoproteínas e membrana celular (LUU *et al.,* 2016).

Os oxisteróis presentes em alimentos mais comumente encontrados são 7-esterol oxigenado, 5,6-esterol oxigenado, 5β, 6β-epoxycolesterol, 25-hidroxicolesterol, 19-hidroxicolesterol, 20αhidroxicolesterol, 3βhidroxy-5α-colestane-6-one e 3β,5αdihidroxicolestane-6-one (OLKKONEN; BÉASLAS; NISSILÄ, 2012).

1.4.1 Transporte dos oxisteróis

Os oxisteróis são transportados no plasma ligados a lipoproteínas ou a albumina, podem estar presentes no interior do núcleo das lipoproteínas em sua forma esterificada ou na superfície das lipoproteínas em sua forma livre. Portanto, o transporte de oxisteróis para dentro das células ocorre via captação das lipoproteínas ou através da troca da superfície da membrana plasmática (LUU *et al.,* 2016).

Existem ainda as proteínas de ligação ao oxisterol (*Oxysterol-binding proteins* – OSBP) e proteínas relacionadas a OSBP (*OSBP-related proteins* – ORPs) que, além de sua alta capacidade de se ligar ao colesterol e oxisterol livre, estão envolvidas na sinalização celular e transporte intracelular de vesículas (LUU *et al.,* 2016; OLKKONEN; LI, 2013). A literatura descreve que estas proteínas promovem a formação de locais de contato de membrana (*membrane contact sites* – MCSs) em que detectam as composições lipídicas e as transportam entre o retículo endoplasmático e outras organelas (DU; TURNER; YANG, 2018).

Os transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) estão envolvidos no fluxo de colesterol e outros lipídios para fora da célula através da regulação do receptor x do fígado (*liver x receptor* – LXR) e RXR que são sensores de oxisteróis. Desta forma, os oxisteróis exercem uma função importante coordenando o funcionamento destes transportadores. Experimentos com camundongos knockout para ABCG1 demonstraram acúmulo de oxisteróis como 7-KC no tecido cerebral, sugerindo envolvimento deste transportador no efluxo de oxisteróis (LUU *et al.,* 2016; RUIZ *et al.,* 2013).

1.4.2 Regulação dos oxisteróis

Existem dois fatores de transcrição essenciais na biossíntese do Col, a proteína ligante ao elemento regulador de esteróis (*sterol regulatory element binding proteins* - SREBPs) e receptor x do fígado (*liver x receptor* – LXR), os

oxisteróis agem na inibição do SREBP e ativação do LXR (LUU *et al.,* 2016). O SREBP atua na homeostase do Col agindo em resposta a baixos níveis de Col celular (LUU *et al.,* 2016; SOCCIO; BRESLOW, 2004).

O SREBP-1 e 2 são sintetizados no retículo endoplasmático e ambos formam um complexo com a proteína ativadora de clivagem de SREBP (*sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein* - SCAP) e com a proteína de retenção do retículo endoplasmático denominada proteína do gene 1 induzida por insulina (*insulin-induced gene 1 protein* – Insig) (SATO, 2010). O SREBP é ativado através da SCAP e translocado para o núcleo atuando como fator de transcrição para genes envolvidos na síntese do colesterol (EDWARDS *et al.,* 2000; YEH *et al.,* 2004).

O LXR é um ligante natural dos oxisteróis, pertence a uma família de receptores nucleares expressos em grande quantidade no fígado, tecido adiposo, intestino, rins e macrófagos (OLKKONEN; BÉASLAS; NISSILÄ, 2012). As isoformas LXR compreendem 48 fatores de transcrição dependentes de ligantes que atuam na homeostase, metabolismo, desenvolvimento e crescimento celular (KOMATI *et al.,* 2017). O LXRα e LXRβ formam heterodímeros com o RXR (OLKKONEN; BÉASLAS; NISSILÄ, 2012) atuando na absorção de esteróis pelo intestino, síntese de ácidos biliares, transporte reverso do Col, regulação imunológica, bem como, na regulação de transportadores de Col como ABCA1 e ABCG1 (BJÖRKHEM; DICZFALUSY, 2002).

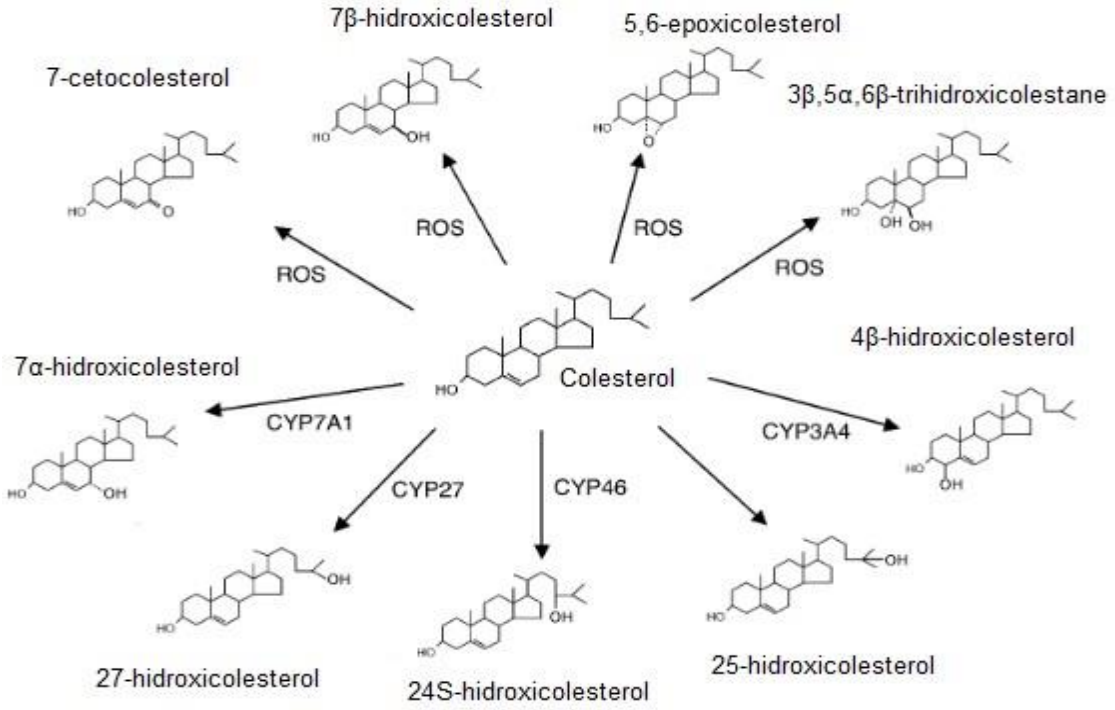

Figura 2: Formação dos oxisteróis (Fonte: Adaptado de Björkhem I, 2002)

1.4.3 Oxisteróis e distúrbios do tecido ósseo

Estudos recentes indicam uma ação dos oxisteróis na diferenciação celular, sendo a maior parte deles relacionado à osteogênese a partir de tipos específicos de oxisteróis (KHA *et al.,* 2004; LEVY *et al.,* 2014). Sabe-se que a diminuição do volume ósseo ocorre por uma diminuição na atividade osteogênica pelos osteoprogenitores, isso está em partes relacionado ao fato dos progenitores da medula óssea se diferenciarem em adipócitos ao invés de osteoblastos, gerando um aumento do tecido adiposo na medula (KHA *et al.,* 2004). Este evento é agravado com o avanço da idade, pois a quantidade e tamanho dos adipócitos na medula elevam-se, principalmente em ossos longos aonde a cavidade medular é 90% ocupada por adipócitos evidenciando a relação entre a adipogênese e osteogênese *in vivo* (NUTTALL; GIMBLE, 2000).

A osteoporose é um distúrbio caracterizado pela diminuição da densidade mineral óssea acarretando no aumento da fragilidade esquelética e risco de fraturas, sendo que as principais fraturas ocorrem nas vértebras, fêmur

e antebraço. Este distúrbio acomete tanto homens quanto mulheres, porém, predominantemente mulheres com deficiência estrogênica e idosos (PINTO NETO *et al.,* 2002). Atualmente não existem fatores osteogênicos de baixo custo e seguros que promovam uma formação óssea efetiva (MONTGOMERY *et al.,* 2014), além disso, existem poucos fatores osteo-indutores conhecidos capazes de induzir a diferenciação de CTMs em células osteoblásticas (RICHARDSON *et al.,* 2007).

As proteínas BMPs são osteo-indutores conhecidos que atuam aumentando a transcrição de genes como *RUNX2* e por consequência aumentam a diferenciação de osteoblastos (RYOO; LEE; KIM, 2006), porém, são necessárias altas concentrações de proteínas recombinantes para formação óssea adequada, além disso as BMPs possuem uma meia vida biológica e imunogenicidade curtas dificultando sua utilização (LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002; ZHANG *et al.,* 2006). Os oxisteróis são capazes de ativar determinadas vias de diferenciação celular de CTMs, sendo indutores da osteogênese além de serem propostos como substitutos das BMPs no reparo ósseo *in vivo* (HOKUGO *et al.,* 2013).

Considerando os aspectos abordados, pode-se concluir que a utilização dos oxisteróis na indução da diferenciação de CTMs pode promover um aumento da formação óssea através da modulação de osteoprogenitores. Podendo se tornar uma ferramenta viável no tratamento da osteoporose, osteopenia e fraturas *in vivo* (KHA *et al.,* 2004; KIM *et al.,* 2007). Com o intuito de adquirir maiores informações sobre a ação dos oxisteróis na diferenciação das CTMs, avaliamos a ação do Col, bem como, de dois diferentes oxisteróis 7-cetocolesteol (7-KC) e Colestane-3β,5α,6β-triol (triol) em cinco períodos diferentes durante a indução da diferenciação das CTMTAs.

2. Objetivo

Avaliar a ação dos oxisteróis 7-cetocolesteol (7-KC) e Colestane-3β,5α,6β-triol (Triol) na diferenciação osteogênica e adipogênica de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTMTAs) através da análise de marcadores de diferenciação osteogênica e adipogênica e suas vias moleculares.

3. Materiais e métodos

3.1 Cultura celular

Projeto realizado conforme aprovação emitida pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número: 93378418.0.0000.0068. Neste estudo foram utilizadas CTMTAs obtidas de três pacientes do sexo feminino (idade entre 20-45 anos) através de cirurgia de lipoaspiração pertencentes ao biorrepositório do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM-31) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

As CTMTAs criopreservadas com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 20% de soro fetal bovino (SFB; Vitrocell, Alemanha) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) (Sigma-Aldrich, EUA) em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose* (DMEM *low glucose* - Sigma-Aldrich) e armazenadas em ultrafreezer -80 °C foram descongeladas rapidamente por imersão em água no banho-maria a 37 °C, e cultivadas em meio DMEM *low glucose*, suplementado com 20% de SFB e 1% de P/S, em incubadora a 37 °C com atmosfera de 5% de CO_2 (Thermo Forma, EUA).

As culturas foram acompanhadas diariamente com o intuito de observar e registrar a morfologia celular. A substituição do meio de cultivo foi realizada a cada dois dias. No momento em que as células atingiram confluência de 80% foi realizada sua dissociação, inicialmente foi feita uma lavagem com solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline* - PBS) e posteriormente, o procedimento enzimático padrão com ATV (associação de tripsina e versene - Instituto Adolfo Lutz, Brasil), para expansão das células.

3.2 Imunofenotipagem

A caracterização das CTMTAs foi determinada pela análise de proteínas de membrana através do método de citometria de fluxo. A identificação dos antígenos foi realizada através da utilização de diferentes anticorpos

monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate* - FITC) e ficoeritina (*phycoeritin* - PE). Controles de marcações inespecíficas foram utilizados para adequada calibração do aparelho, análise dos resultados e definição da positividade da amostra. Após a dissociação celular, as células foram quantificadas, e foram distribuídas 5 x 10^5 células em tubos específicos para citometria (Becton Dickinson, EUA). Em cada tubo foi adicionado 1 ml de PBS para lavagem, e posteriormente foi feita centrifugação por 5 min à 1200 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi desprezado, e em cada tubo foi adicionado 500 μl de PBS e 5 μl do anticorpo (diluição 1:100) e incubado com os anticorpos monoclonais CD34 (PE), CD45 (PE), CD117 (PE), CD31 (PE), CD80 (PE), CD14 (PE), CD29 (FITC), CD44 (FITC) e CD105 (FITC - Invitrogen, EUA), conjugados aos fluorocromos por um período de 30 min no escuro em temperatura ambiente.

Em seguida, foram acrescentados 1 ml de PBS e foi realizada centrifugação a 1200 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular homogeneizado e ressuspenso em 500 μl de solução de paraformaldeído (Gibco, EUA) diluído a 1% em PBS. Por fim, as amostras foram estocadas em geladeira ao abrigo da luz até o momento da leitura no citômetro de fluxo, sendo este tempo para a análise de no máximo 24 h.

As células foram adquiridas e a intensidade de fluorescência foi captada pelo citômetro de fluxo no aparelho FacScaliburTM (Becton Dickinson). Os dados foram analisados no CELLQuestTM (Becton Dickinson). Para cada amostra foi realizada uma aquisição de 30.000 eventos. Os resultados foram fornecidos e analisados na forma de dot plot e em percentual da população celular com reação positiva para cada anticorpo.

3.3 Indução da diferenciação osteogênica

Para indução da diferenciação celular as CTMTAs foram transferidas para placas de 96 poços (Santa Cruz, EUA) na densidade de 7 x 10^3 células por poço com meio DMEM *low glucose* com 20% de SFB pelo período de 48 h. Após isto, foi substituído o meio de cultivo basal por um meio indutor

específico. A diferenciação osteogênica foi realizada em duplicata e teve duração de 21 dias. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37 º C com 5% de CO_2 durante este período, sendo o meio trocado duas vezes por semana.

O meio de cultivo estabelecido para indução da diferenciação osteogênica foi composto por DMEM *low glucose* 20% de SFB, 0,1 μM de dexametasona (Sigma Aldrich, D4902), 10 mM de β-glicerofosfato (Sigma Aldrich, G9422-10) e 50 μM de ácido ascórbico (Sigma Aldrich, A8960-59). Para estabelecimento deste meio utilizamos como referência os protocolos previamente descritos na literatura conforme tabela abaixo.

Tabela 1. Protocolos utilizados para diferenciação osteogênica das CTMTAs

Reagente	(ZUK *et al.,* 2002)	(MAMBELLI *et al.,* 2009)
Dexametasona	0,1 μM	0,0001μM (0,1 nM)
Ascorbato-2-fosfato	50 μM	50 μM
β-glicerofosfato	10 mM	10 mM *
Soro	10% SFB	2% KSR

*adicionado a partir do 10º dia de diferenciação

3.3.1 Confirmação da diferenciação osteogênica

Para confirmação da diferenciação osteogênica as CTMTAs foram coradas com o corante vermelho de alizarina (Sigma Aldrich), após 21 dias de incubação. Este corante tem afinidade por metais, evidenciando através da coloração vermelha a formação dos depósitos de cálcio característicos da diferenciação osteogênica. A solução de vermelho de alizarina foi preparada com a dissolução de 1 g de corante em 50 ml de água Milli-Q sob agitação. O pH da solução foi ajustado à 4,2. O meio de diferenciação osteogênico foi removido e as células foram submetidas a duas lavagens com DPBS. Em seguida foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4% por 2 h. Após esta etapa foram realizadas duas lavagens com *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) seguidas de duas lavagens com água Milli-Q.

Posteriormente, as células foram coradas com a solução de vermelho de alizarina por 3 min. Após este período as células foram lavadas 3 vezes com água Milli-Q para visualização e captura de imagens.

3.4 Indução da diferenciação adipogênica

Para diferenciação adipogênica, as CTMTAs foram transferidas para placas de 96 poços (Santa Cruz) na densidade de 7 x 10^3 células por poço com meio DMEM *low glucose* pelo período de 48 h, após isto foi substituído o meio de cultivo basal por um meio indutor específico. A diferenciação adipogênica foi realizada em duplicata e teve duração de 14 dias, as placas foram mantidas em estufa úmida a 37 º C com 5% de CO_2 durante este período, sendo o meio trocado duas vezes por semana.

O meio utilizado na diferenciação adipogênica foi composto por *Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose* (DMEM *high glucose* – Sigma Aldrich*)* 2% SFB, 1 μM de dexametasona, 2 μM de indometacina (Sigma Aldrich, I7378-25G), 1 μg/ml de insulina (Sigma Aldrich, I2643-250) e 0.5 mM de 3-isobutil-metil xantina (abreviado como IBMX - Sigma Aldrich, I5879-19). A partir do 10º dia de indução da diferenciação a concentração de insulina foi aumentada para 10 μg/ml.

Para estabelecimento do meio indutor de diferenciação foram testados diferentes protocolos previamente descritos na literatura conforme indicado na tabela abaixo.

Tabela 2. Protocolos utilizados para diferenciação adipogênica das CTMTAs

Reagente	(ZUK *et al.,* 2002)	(MAMBELLI *et al.,* 2009)
Dexametasona	1 μM	1 μM
IBMX	0,5 mM	0,5 mM
Indometacina	200 μM	100 μM
Insulina	10 μM	10 μg/ml
Soro	10% SFB	2% KSR

3.4.1 Confirmação da diferenciação adipogênica

A diferenciação adipogênica foi confirmada pelo acúmulo de vacúolos lipídicos citoplasmáticos neutros pela coloração *Oil Red O* (Sigma Aldrich). Após o período de diferenciação o meio indutor foi descartado, as CTMTAs foram lavadas duas vezes com DPBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 2 h. Em seguida, as células foram coradas com a solução de *Oil Red O* por 20 min em temperatura ambiente. Dado o tempo de incubação, foi feita a lavagem das CTMTAs com água Milli-Q por duas vezes a fim de retirar o excesso de coloração. Feito isto, as placas de cultura foram visualizadas em microscópio de inversão. A solução estoque do corante foi preparada com 0,25 g de *Oil Red O* dissolvidos em 50 ml de isopropanol (Merck, EUA) seguida de filtração. No momento das colorações foi preparada a solução de trabalho que consiste na mistura de 30 ml da solução estoque em 20 ml de água Milli-Q seguida de filtração.

3.5 Determinação do IC_{50} (half maximal inhibitory concentration)

Os dois oxisteróis utilizados foram sintetizados a partir do Colesterol (Col) (C8667- Sigma-Aldrich) conforme descrito (Carvalho et. al., 2011; Salvador et. al., 2013) sendo eles o 7-cetocolesterol (7-KC) e o Colestane-3β,5α,6β-triol (Triol). O Col foi usado como controle. Cada oxisterol foi determinado com uma pureza de aproximadamente 98% detectada através de GC/MS (Gas chromatography/mass spectrometry). Para todos os experimentos, uma solução estoque foi preparada a uma concentração de 10000 μM em etanol absoluto.

As CTMTAs foram plaqueadas em meio DMEM *low glucose* em uma densidade de 5 x 10^3 células em duplicata, em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (Corning, EUA - 3603), após atingirem confluência de 80-90% foram incubadas com oxisteróis nas concentrações de 10 µM, 25 µM, 50 µM e 100 µM por 24 h (LEVY *et al.,* 2014; SILVA *et al.,* 2016).

Transcorrido esse período, os núcleos das CTMTAs foram corados com 1 µg/mL de Hoechst 33342 (*Molecular Probes*, EUA - H1399). Após 24 h foi acrescentado 2 µl de iodeto de propídio (PI) (*Molecular Probes* - P3566) de uma solução de 50 µg/mL antes da leitura. Foi realizada a centrifugação da placa por 450 x g por 3 min em temperatura ambiente. As células coradas com PI foram consideradas não viáveis. Foi utilizado o programa *ImageXpress Micro High Content Screening System* (Molecular Devices, EUA) para avaliar o número de células vivas e células mortas. Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos. Foi usado o programa *Cell Scoring MetaXpress* para analisar o número de células e a viabilidade celular. O cálculo de IC_{50} foi realizado através de uma curva de ajuste de inclinação variável no programa estatístico *GraphPad Prism* (GradPad Software, USA).

3.5.1 Diferenciação celular pelo uso de oxisterói s

Para avaliação da diferenciação celular pelo uso de oxisteróis as CTMTAs foram transferidas para placas de 96 poços (Santa Cruz) na densidade de 7 x 10^3 células por poço com meio DMEM *low glucose* pelo período de 48 h, após isto foi substituído o meio de cultivo basal por um meio indutor específico associado a concentrações (3-30 µM) de oxisteróis (Fig.3). A diferenciação osteogênica teve duração de 21 dias enquanto a diferenciação adipogênica teve duração de 14 dias. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37 ºC com 5% de CO_2 durante este período, sendo o meio trocado duas vezes por semana.

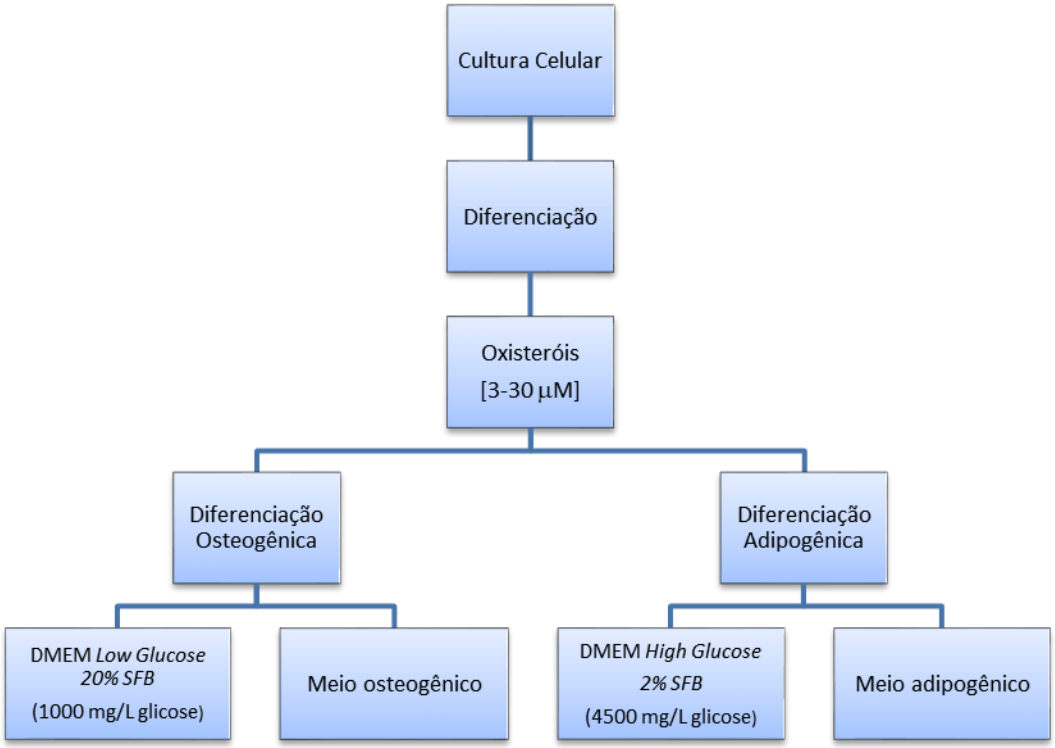

Figura 3. Organograma do processo de diferenciação pelo uso de oxisteróis

3.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) por TMRE (tetramethylrhodamine, ethyl ester)

As CTMTAs foram transferidas para placas de 96 poços pretas com fundo transparente (Corning) na concentração de 7 x 10^3 células por poço em duplicata e tratadas com os oxisteróis 7-KC e Triol durante 21 dias nas concentrações de 5, 10 e 20 µM para diferenciação osteogênica e 3, 5 e 10 µM para diferenciação adipogênica. Após período de tratamento, as células foram incubadas com 0,1 µg/mL Hoechst 33342 e 50 nM TMRE (Sigma Aldrich) por 40 minutos a 37 ºC. O TMRE é utilizado para determinar se a célula apresenta potencial de membrana alto ou baixo, mitocôndrias ativas ou mais polarizadas acumularão mais TMRE, as mitocôndrias menos polarizadas ou inativas têm um potencial de membrana diminuído e um menor acúmulo de TMRE (CROWLEY; CHRISTENSEN; WATERHOUSE, 2016; PERRY *et al.,* 2011). A fluorescência do TMRE foi determinada usando *Image X Press Micro High Content*. Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos. O

potencial de membrana mitocondrial foi determinado usando o software *Cell Scoring metaexpress*.

3.7 Estudo da diferenciação celular induzida por oxisteróis

3.7.1 Extração do RNA total

Após tratamento com oxisteróis conforme concentrações indicadas na tabela 3 e dissociação enzimática, as CTMTAs foram contadas para obter 1 x 10^6 células. As células foram centrifugadas a 1000 x g por 20 min em temperatura ambiente. O sobrenadante (meio de cultura) foi descartado e adicionado 1 ml de trizol. A mistura foi homogeneizada e coletada com o auxílio de uma pipeta e transferida para um microtubo de 1,7 ml. Foram adicionados 200 μl de clorofórmio às amostras, seguido de agitação vigorosa e incubação por 3 min em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 12000 x g a 4 °C. Na etapa seguinte à extração, foi realizada a precipitação do RNA, utilizando-se para cada tubo 500 µl de álcool isopropílico gelado. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 min e, em seguida, foi feita a centrifugação por 10 min à 12.000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e foi acrescentado ao RNA precipitado 1 ml de etanol a 75%, diluído em água livre de RNAse. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 7.500 x g por 5 min a 4 °C. Novamente o sobrenadante foi descartado, e em cada amostra foi acrescentado 20 µl de água livre de RNAse.

Tabela 3: Concentração de oxisteróis utilizada no tratamento das CTMTAs para análises moleculares

Oxisterol	Concentração
Col	10 μM
7-kc	10 μM
Triol	5 μM

3.7.2 Tratamento com DNAse

As amostras de RNA foram diluídas em água livre de RNAse, com o cuidado de obter como volume final a quantidade de 8 μl contendo 1 μg de RNA. Este material foi incubado com a enzima RQ1 RNase-Free DNase 1U/μL e com RQ1 DNase *Reaction Buffer* 1X, a 37 ºC durante 30 min, para a digestão do DNA genômico. Após o término do tempo de incubação foi adicionado o tampão de parada da reação RQ1 DNase Stop (Promega, EUA), para ocorrer a inativação da enzima, seguido de incubação a 65 ºC por 10 min.

3.7.3 Síntese do cDNA

Com o RNA tratado foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese do cDNA utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™, EUA) com os seguintes componentes: as bases nitrogenadas (dNTPs – 0,8 μL), primers (2,0 μL), a enzima transcriptase reversa (1,0 μL) e buffer (2,0 μL), possuindo como condições ideais para as reações a temperatura de 25 ºC por 10 min, 37 ºC por 120 min, 85 ºC por 5 min. Para as incubações utilizamos o termociclador *XP cycler* (Bioer technology, China).

3.7.4 Avaliação dos genes envolvidos na diferenciação celular

O PCR em tempo real foi utilizado para a análise da expressão gênica dos genes envolvidos na diferenciação celular. A expressão de mRNA Foi normalizada em relação a expressão do gene endógeno GAPDH (Thermo Fisher, EUA – 402869). Os ensaios foram realizados em duplicata e a variação no valor de CT (*Cycle of Threshold)* entre as duplicatas não ultrapassaram 0,5. Todos os ensaios utilizaram amostra referência e um controle de amplificação ao qual não foi adicionada amostra. As condições de programação dos ciclos foram 95 ºC por 5 min, seguidos de 40 ciclos de 95 ºC por 15 s e 60 ºC por 30 s. Foi utilizado o termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies, EUA).

Os primers utilizados foram adquiridos do DNA *Integrated Technologies* sendo adquiridos os ensaios pré-desenhados para sondas hidrolisáveis conforme tabela 4, foi utilizado Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™).

Tabela 4. Primers utilizados para análise de diferenciação celular

Genes	SEQ REF	Assay ID (IDT Technologies)
RUNX2	NM_001024630(3)	Hs.PT.56a.19568141
ALPL	NM_001127501(3)	Hs.PT.56a.40555206
BGLAP	NM_199173(1)	Hs.PT.56a.39318706.g
CEBPα	NM_004364(1)	Hs.PT.58.4022335.g
PPARγ	NM_005037(4)	Hs.PT.58.25464465

3.8 Imunofluorescência indireta para detecção das proteínas envolvidas nas vias Hedgehog e Wnt/β-catenina

As CTMTAs foram transferidas para placas de 96 poços pretas com fundo transparente (Corning) na concentração de 1 x 10^3 células por poço, em duplicata e tratadas com meio de diferenciação osteogênico associado a 7-KC (10 μM), Triol (5 μM) e Col (10 μM) durante 7 dias. Após este período foi realizada a retirada do meio de cultura de cada poço, seguido por duas lavagens com 100 μl de DPBS. As células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 2 h a 4 °C. Após as CTMTAs serem lavadas com DPBS, foi realizada a permeabilização das mesmas com solução de Triton X-100 a 0,1% (Sigma Aldrich) à 4 °C por 15 min, e bloqueio com 5% de BSA (Bovine sérum albumin - Sigma Aldrich) por 40 min em temperatura ambiente. Para investigar o processo de diferenciação celular foram analisadas as proteínas da tabela 5. Após a incubação com o anticorpo específico, foi realizada uma nova incubação das células por 1 h com um anticorpo secundário AlexaFluor 488 na

diluição 1:1000 (Molecular Probes - A11008) e R-phycoerynthin na diluição 1:1000 (Molecular Probes - P852). Após esta etapa, o núcleo foi marcado com 0,1 μg/mL de Hoechst 33342. A presença de células positivas e as localizações celulares foram determinadas usando o *High Content ImageXpress*. Seis sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos. As informações foram analisadas usando o software Cell Scoring MetaXpress.

Tabela 5. Anticorpos utilizados para imunofluorescência indireta

Anticorpos	Marca	Diluição
Anti-β-catenina (ab16051)	ABCam	1/500
Anti-Sonic Hedgehog (ab53281)	ABCam	1/400
Anti-Smoothened (NBP2-24543)	Novus Biologicals	1/100
GLI-3 antibody (H00002737-M01)	Novus Biologicals	1/100

3.9 Análise estatística

A verificação de diferenças estatisticamente significantes entre os parâmetros das células diferenciadas e dos controles foi realizada usando análise da variância amostral, *One-way ANOVA* e *Two-way ANOVA (Analysis of Variance)*, com comparações múltiplas de *Dunnett* e *Bonferroni* utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism 8. Os resultados foram expressos como média ± DP de dois diferentes experimentos realizados em duplicata. Foi considera um valor de $\rho<0,05$ estatisticamente significativo.

4. Resultados

4.1 Caracterização das CTMTAs

Com o intuito de caracterizar as CTMTAs pertencentes ao biorrepositório do LIM 31 foi realizada análise de marcadores mesenquimais e hematológicos por citometria de fluxo. Conforme representado na tabela 6, as CTMTAs apresentaram expressão para CD29, CD44 e CD105. Para os marcadores CD34, CD117, CD31, CD45, CD14 e CD80 a expressão dos antígenos foi abaixo de 5%.

Tabela 6. Caracterização imunofenotípica das CTMTAs

Células	CD29 %	CD44 %	CD105 %	CD34 %	CD117 %	CD31 %	CD45 %	CD14 %	CD80 %
Amostra 1	93.05	95,21	95.18	0.85	0.97	1.04	1.42	0.46	0.58
Amostra 2	99,8	97,7	99,9	1,3	1,5	2,0	3,8	1,2	1,2
Amostra 3	99,5	97,9	99,7	1,5	1,8	1,9	1,8	1,7	1,2

4.2 Padronização dos meios de diferenciação

Como parte da caracterização das CTMTAs as células foram induzidas a diferenciação osteogênica durante o período de 21 dias e diferenciação adipogênica durante o período de 14 dias.

Diferentes protocolos foram testados para definição do melhor meio de indução a ser utilizado. Durante a diferenciação osteogênica utilizamos como referência o meio de cultivo descrito por Mambelli et al. (2009) e também o meio descrito por Zuk et al. (2002), alterando apenas a concentração de soro dos meios para 20%.

Após indução da diferenciação e coloração com corante vermelho de alizarina foi possível notar que ambos os protocolos foram efetivos para diferenciação osteogênica. Porém, as células tratadas com o meio descrito por Zuk et al. (2002) apresentaram coloração mais intensa para o corante vermelho de alizarina (Fig. 4B) quando comparadas às células tratadas com meio descrito por Mambelli et al. (2009 - Fig. 4A). Portanto, foi escolhido o meio descrito por Zuk et al. (2002) para continuidade nos experimentos com ajuste da concentração de soro para 20%.

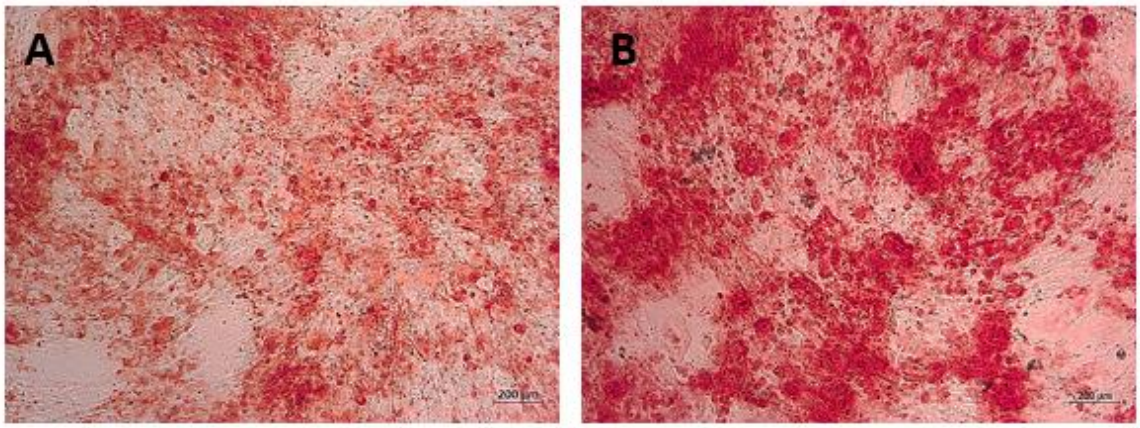

Figura 4: Padronização do meio de diferenciação osteogênico e coloração com corante vermelho de Alizarina. **A:** CTMTAs tratadas durante 21 dias com meio de diferenciação descrito por Mambelli *et al.,* (2009). **B:** CTMTAs tratadas durante 21 dias com meio de diferenciação descrito por Zuk *et al.,* (2002); barra de calibração = 200 μm

Para estabelecimento do melhor meio de diferenciação adipogênico também foram utilizados os protocolos descritos por Zuk et al. (2002) e Mambelli et al. (2009).

Após 24 h de indução da diferenciação com meio descrito por Zuk et al. (2002) observou-se alta taxa de morte celular, impossibilitando continuidade nos experimentos. Entretanto nas células tratadas com o meio descrito por Mambelli et al. (2009) observou-se alta taxa de morte celular a partir do 4º dia de diferenciação.

Realizamos alterações nos protocolos previamente descritos, sendo uma delas a redução da concentração de indometacina e redução da concentração de insulina durante os primeiros nove dias de tratamento, através destas alterações observou-se então que as células apresentaram morfologia mais

arredondada a partir do 4º dia de indução e formação de vacúolos lipídicos citoplasmáticos a partir do 8º dia, com coloração positiva para *Oil Red O* ao 14º dia.

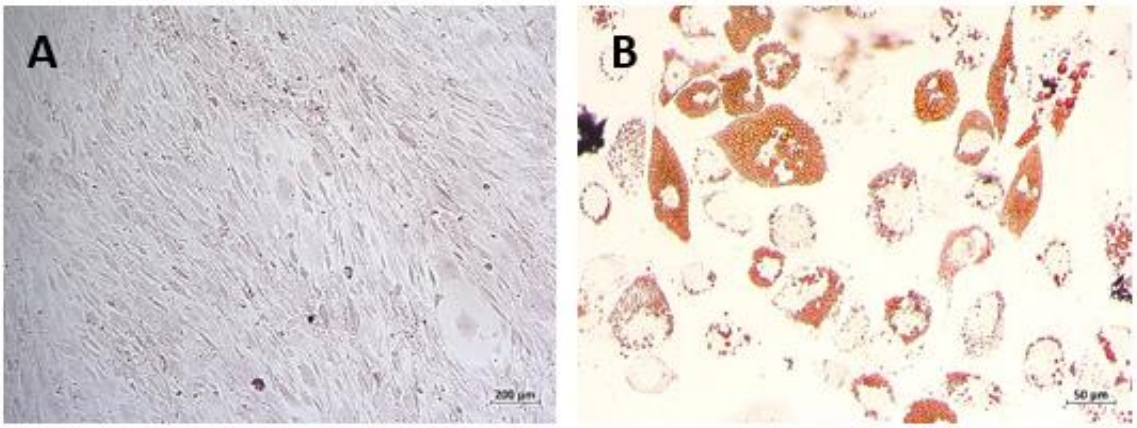

Figura 5: Padronização do meio de diferenciação adipogênico e coloração com corante *Oil Red O*. **A:** CTMTAs controle cultivadas durante 14 dias com DMEM *low glucose*; barra de calibração = 200 μm. **B:** CTMTAs tratadas durante 14 dias com meio de diferenciação adipogênico modificado; barra de calibração = 50 μm

4.3 Citotoxicidade dos oxisteróis nas CTMTAs

Foi avaliada a citotoxicidade dos oxisteróis 7-KC e Triol durante o período de 24 h utilizando o Col como controle nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 μM. O Col não apresentou morte celular em nenhuma das concentrações testadas. O oxisterol mais citotóxico entre os testados foi o Triol. Este apresentou morte celular na concentração de 25 μM, tendo como IC_{50} o valor de 38,68 μM. Foi avaliada também a citotoxicidade do oxisterol 7-KC que apresentou como resultado um IC_{50} de 59,54 μM (Fig. 6). A partir dos resultados obtidos através do cálculo de IC_{50} foram determinadas seis concentrações a serem utilizadas na indução da diferenciação: 3 μM, 5 μM, 10 μM, 15 μM, 20 μM e 30 μM.

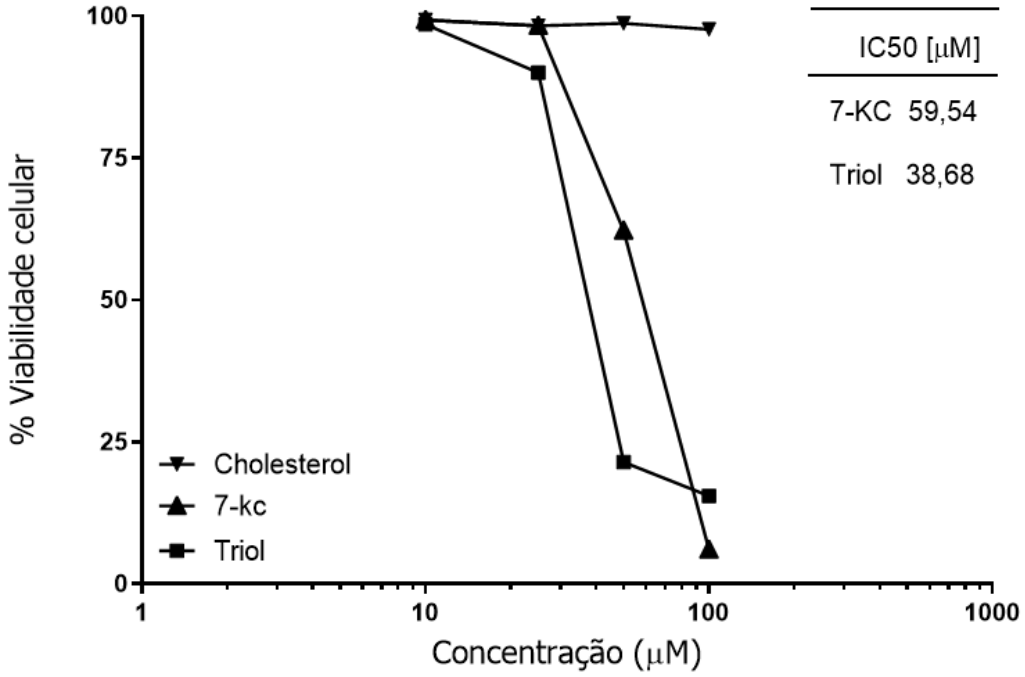

Figura 6: Análise da citotoxicidade dos oxisteróis após 24 h de tratamento. Ensaio realizado por Hoechst 33342 com Iodeto de Propídio. Análise realizado por *Curve fit no GraphPad Prism*

4.4 Indução da diferenciação adipogênica de CTMTAs tratadas com oxisteróis

Para indução da diferenciação adipogênica foram utilizados dois meios diferentes em associação aos oxisteróis, meio DMEM *high glucose* e meio de diferenciação adipogênico específico contendo DMEM *high glucose* e indutores de diferenciação.

4.4.1 Tratamento com oxisteróis e DMEM *high glucose*

Determinadas as concentrações de oxisteróis a serem utilizadas foi avaliada a ação dos oxisteróis na indução da diferenciação adipogênica. Primeiramente as células foram tratadas durante o período de 14 dias com meio DMEM *high glucose* associado a concentrações de 3 a 30 μM de Col e oxisteróis 7-KC e Triol.

Observou-se que o tratamento utilizando apenas DMEM *high glucose* não foi capaz de induzir a diferenciação adipogênica, apesar de alterar a morfologia das células para um formato levemente mais arredondado, ao término dos 14 dias as CTMTAs apresentaram coloração negativa para o corante *Oil Red O* (Fig. 7A).

O tratamento com o meio DMEM *high glucose* e Col não foi capaz de levar a diferenciação adipogênica em nenhuma das concentrações testadas, tendo coloração negativa para o corante *Oil Red O* (Fig. 7B-C). A associação do meio DMEM *high glucose* a maiores concentrações de Col (10-30 μM) levou a uma alta taxa de morte celular.

O tratamento com 7-KC e Triol nas concentrações de 10 a 30 μM associados ao meio DMEM *high glucose* acarretou em alta taxa de morte celular. As CTMTAs tratadas com meio DMEM *high glucose* em conjunto com as concentrações de 3 e 5 μM dos oxisteróis 7-KC (Fig. 7D-E) e Triol (Fig. 7F-G) apresentaram um citoplasma mais alongado quando comparado ao controle cultivado apenas com meio DMEM *high glucose* com coloração negativa para *Oil Red O*.

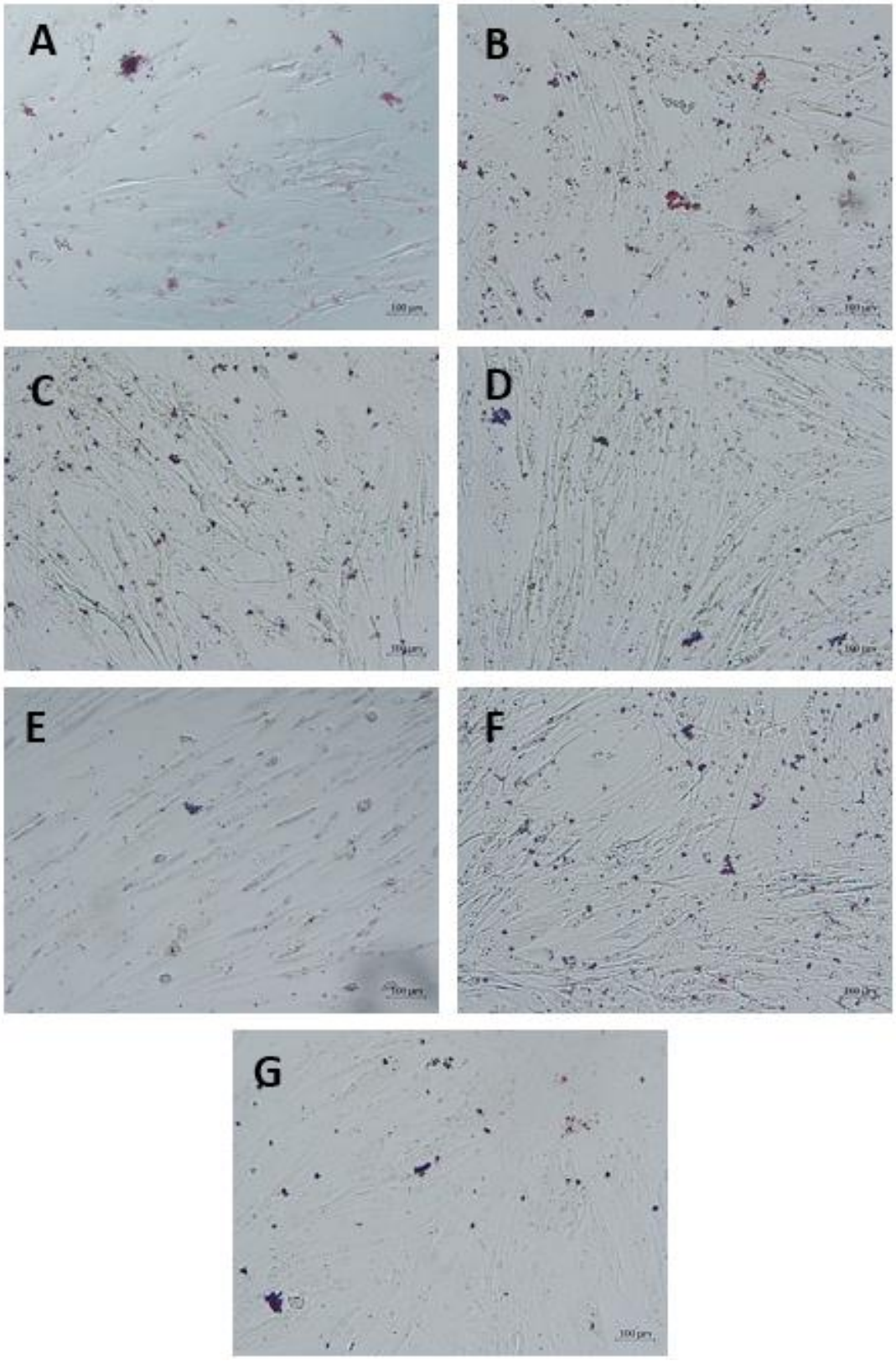

Figura 7. CTMTAs coradas com o corante *Oil Red O* após 14 dias de tratamento com DMEM *high glucose* e oxisteróis. **A:** Controle, DMEM *high glucose*. **B-C:** Col (3 e 5 μM). **D-E:** 7-KC (3 e 5 μM). **F-G:** Triol (3 e 5 μM); barra de calibração = 100 μm

4.4.2 Tratamento com oxisteróis e meio de diferenciação adipogênico

Continuando a avaliação sobre a ação dos oxisteróis na indução da diferenciação adipogênica, realizou-se o tratamento com meio indutor adipogênico associado a diferentes concentrações de oxisteróis durante 14 dias.

Após tratamento utilizando apenas meio indutor de diferenciação adipogênico específico as células apresentaram morfologia arredondada característica de adipócitos além de apresentarem formação de vacúolos lipídicos citoplasmáticos corados por Oil Red O (Fig. 8A).

O tratamento utilizando meio adipogênico em associação a concentração de 30 μM do Col foi citotóxico para as células, apresentando alta taxa de morte celular tornando impossível a avaliação. Em contrapartida, o tratamento com Col e meio adipogênico nas concentrações de 3-20 μM não influenciou o processo de diferenciação, tendo formação de vacúolos lipídicos citoplasmáticos após 14 dias de indução, com coloração positiva para Oil Red O em todos os tratamentos (Fig. 8B-F).

O tratamento com 7-KC nas concentrações de 10 a 30 μM associado ao meio adipogênico foi citotóxico para as células após 14 dias de tratamento impedindo avaliação. Nas CTMTAs tratadas com as menores concentrações de 7-KC (3 e 5 μM) em associação ao meio adipogênico observou-se um número menor de células com característica arredondada quando comparado ao controle, sugerindo uma possível inibição da diferenciação adipogênica (Fig. 9B-C)

O Triol nas concentrações de 10-30 μM em associação ao meio adipogênico foi citotóxico após 14 dias de tratamento, enquanto que as menores concentrações testadas (3 e 5 μM) em conjunto com meio indutor de diferenciação adipogênico não provocaram alterações na diferenciação celular quando comparadas ao controle tratado apenas com meio indutor adipogênico, ou seja, houve a formação vacúolos lipídicos citoplasmáticos corados pelo corante *Oil Red O* (Fig. 9D-E).

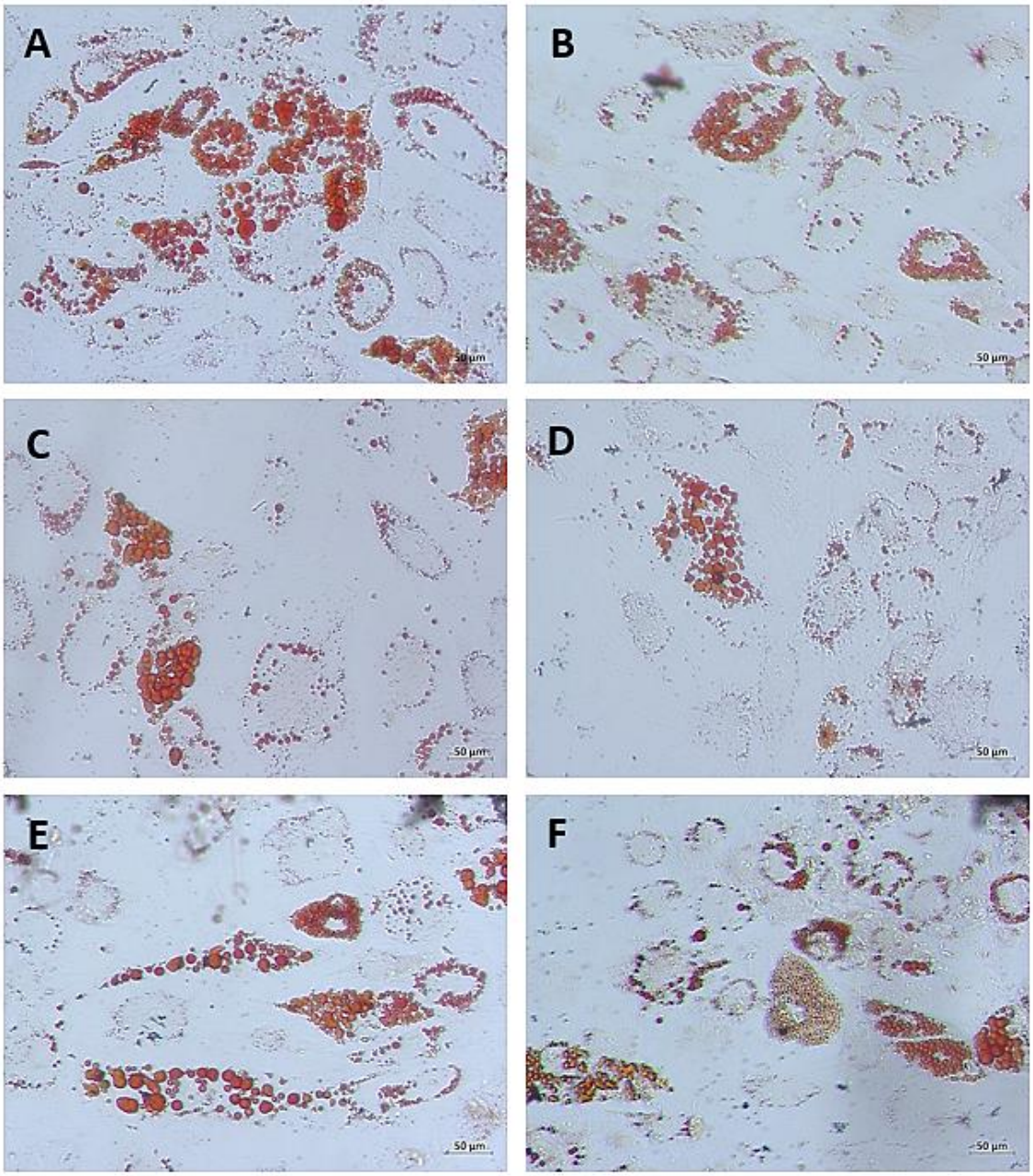

Figura 8. CTMTAs coradas com o corante *Oil Red O* após 14 dias de tratamento com meio de diferenciação adipogênico e diferentes concentrações de Col. **A:** Controle, meio adipogênico. **B:** 3 µM. **C:** 5 µM. **D:** 10 µM. **E:** 15 µM. **F:** 20 µM; barra de calibração = 50 µm

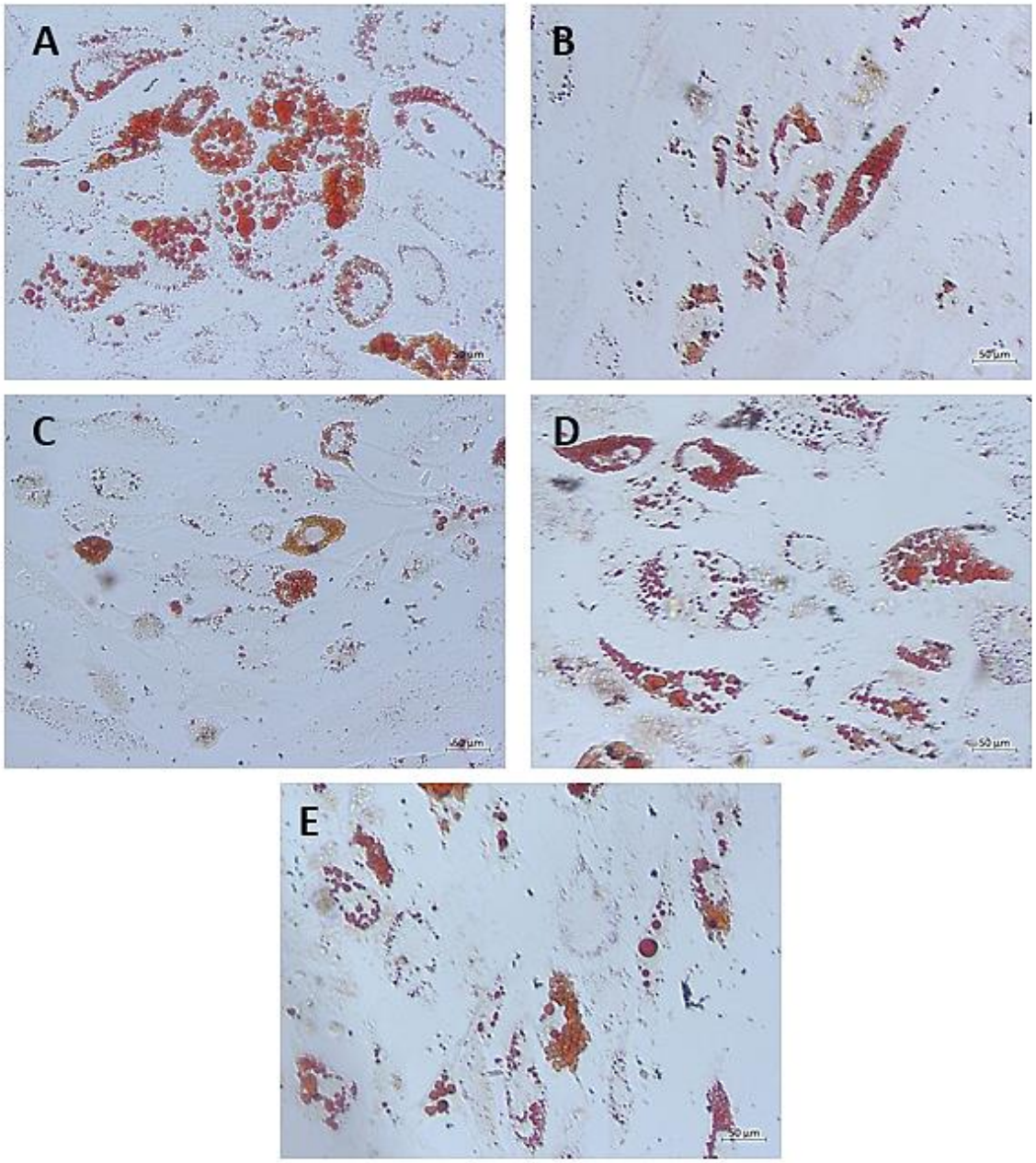

Figura 9. CTMTAs coradas com o corante *Oil Red O* após 14 dias de tratamento com meio de diferenciação adipogênico e oxisteróis 7-KC e Triol. **A:** Controle, meio adipogênico. **B-C:** 7-KC (3 μM e 5 μM). **D-E:** Triol (3 μM e 5 μM); barra de calibração = 50 μm

4.5 Indução da diferenciação osteogênica de CTMTAs tratadas com oxisteróis

Para indução da diferenciação osteogênica foram utilizados dois meios diferentes em associação aos oxisteróis, meio DMEM *low glucose* e meio de

diferenciação osteogênico específico contendo DMEM *low glucose* e indutores de diferenciação.

4.5.1 Tratamento com oxisteróis e meio basal DMEM *low glucose*

Para avaliação do potencial dos oxisteróis na diferenciação osteogênica utilizamos o meio basal DMEM *low glucose* em associação a concentrações de 3 a 30 μM dos oxisteróis.

Conforme esperado, após 21 dias de cultivo utilizando apenas meio basal DMEM *low glucose* não foi observada diferenciação celular, as CTMTAs apresentaram coloração negativa para o corante vermelho de alizarina (Fig. 10A).

O tratamento de 21 dias com Col associado ao meio DMEM *low glucose* não foi citotóxico em nenhuma das concentrações testadas, porém, não foi capaz de induzir a diferenciação osteogênica tendo coloração negativa para o corante vermelho de alizarina em todas as concentrações testadas (Fig. 10B-G).

Após 21 dias de tratamento utilizando 7-KC e meio DMEM *low glucose* foi possível observar alta taxa de morte celular apenas na maior concentração (30 μM). O tratamento com 7-KC não foi capaz de levar a diferenciação celular em nenhuma das concentrações testadas, tendo coloração negativa para o vermellho de alizarina (Fig. 11B-F).

O tratamento com DMEM *low glucose* e triol provocou alta taxa de morte celular após 21 dias de tratamento nas concentrações de 20 e 30 μM tornando impossível a avaliação. As CTMTAs tratadas com as concentrações de 3-15 μM de Triol não tiveram coloração positiva para o corante vermelho de alizarina após tratamento (Fig. 12B-E).

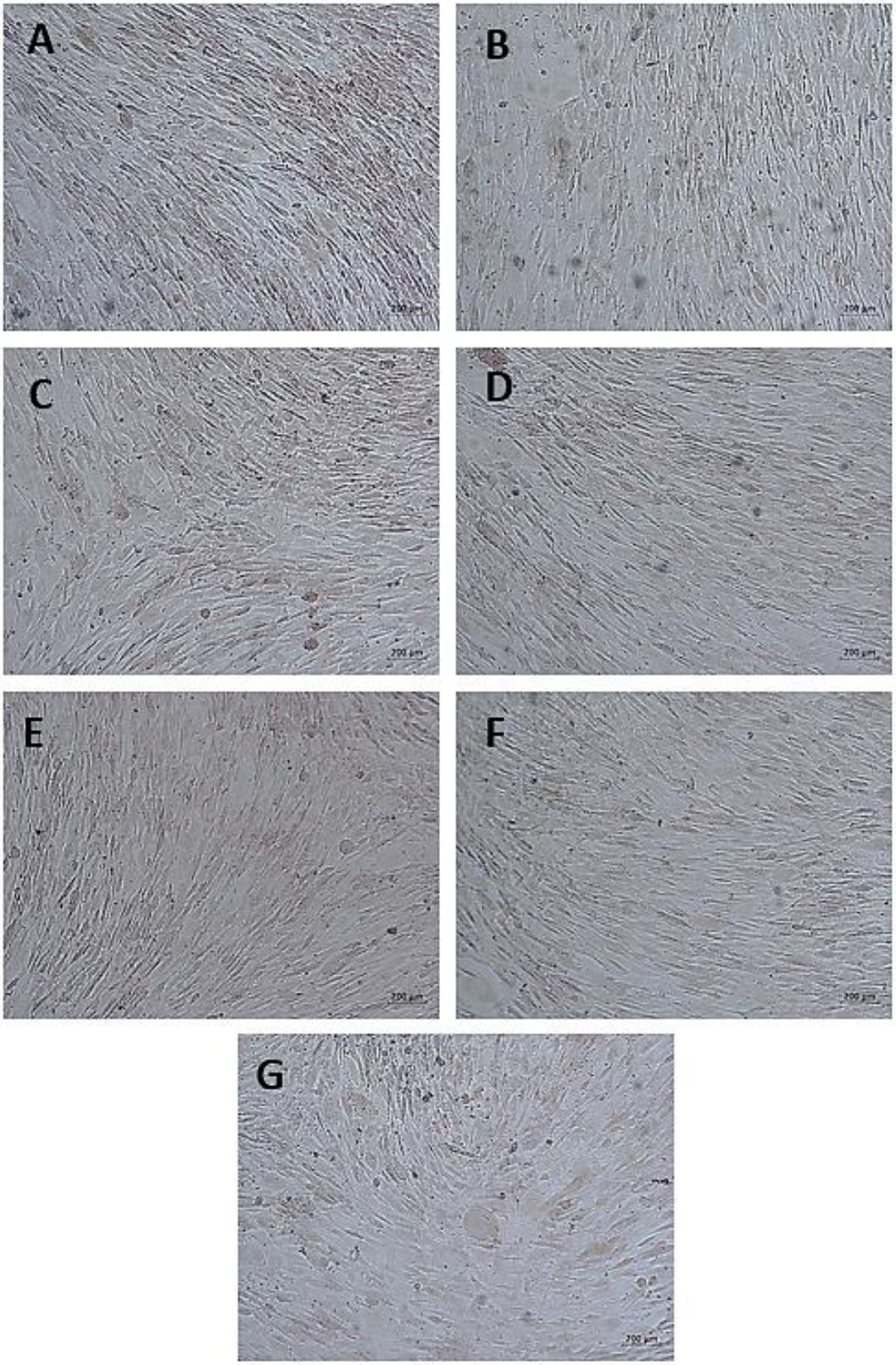

Figura 10. CTMTAs coradas com o corante vermelho de alizarina após 21 dias de tratamento com meio de cultivo DMEM *low glucose* e diferentes concentrações de Col. **A:** Controle, DMEM *low glucose*. **B:** 3 μM. **C:** 5 μM. **D:** 10 μM. **E:** 15 μM. **F:** 20 μM. **G:** 30 μM; barra de calibração = 200 μm

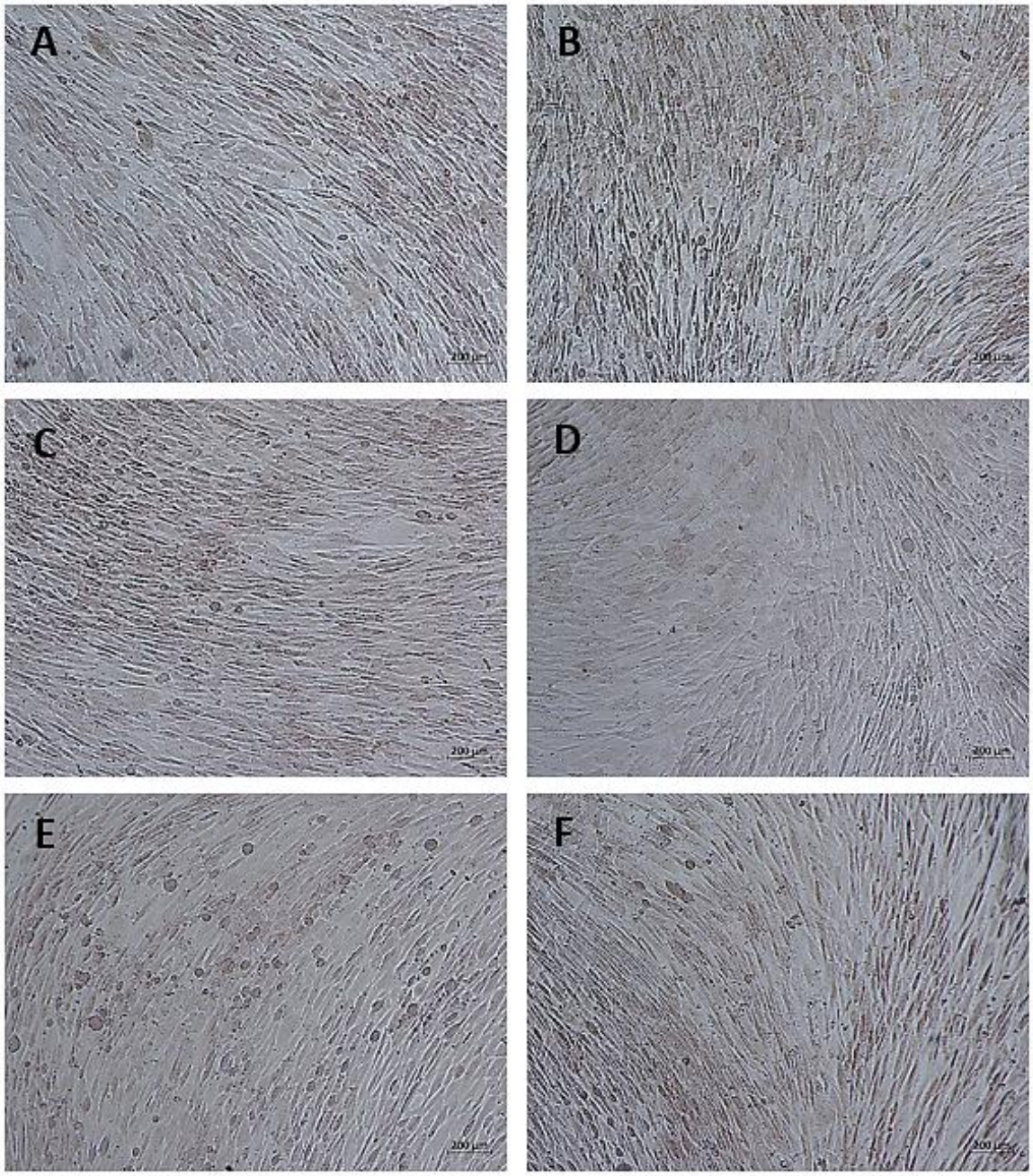

Figura 11. CTMTAs coradas com o corante vermelho de alizarina após 21 dias de tratamento com meio de cultivo DMEM *low glucose* e diferentes concentrações de 7-KC. **A:** Controle, DMEM *low glucose*. **B:** 3 μM. **C:** 5 μM. **D:** 10 μM. **E:** 15 μM. **F:** 20 μM; barra de calibração = 200 μm

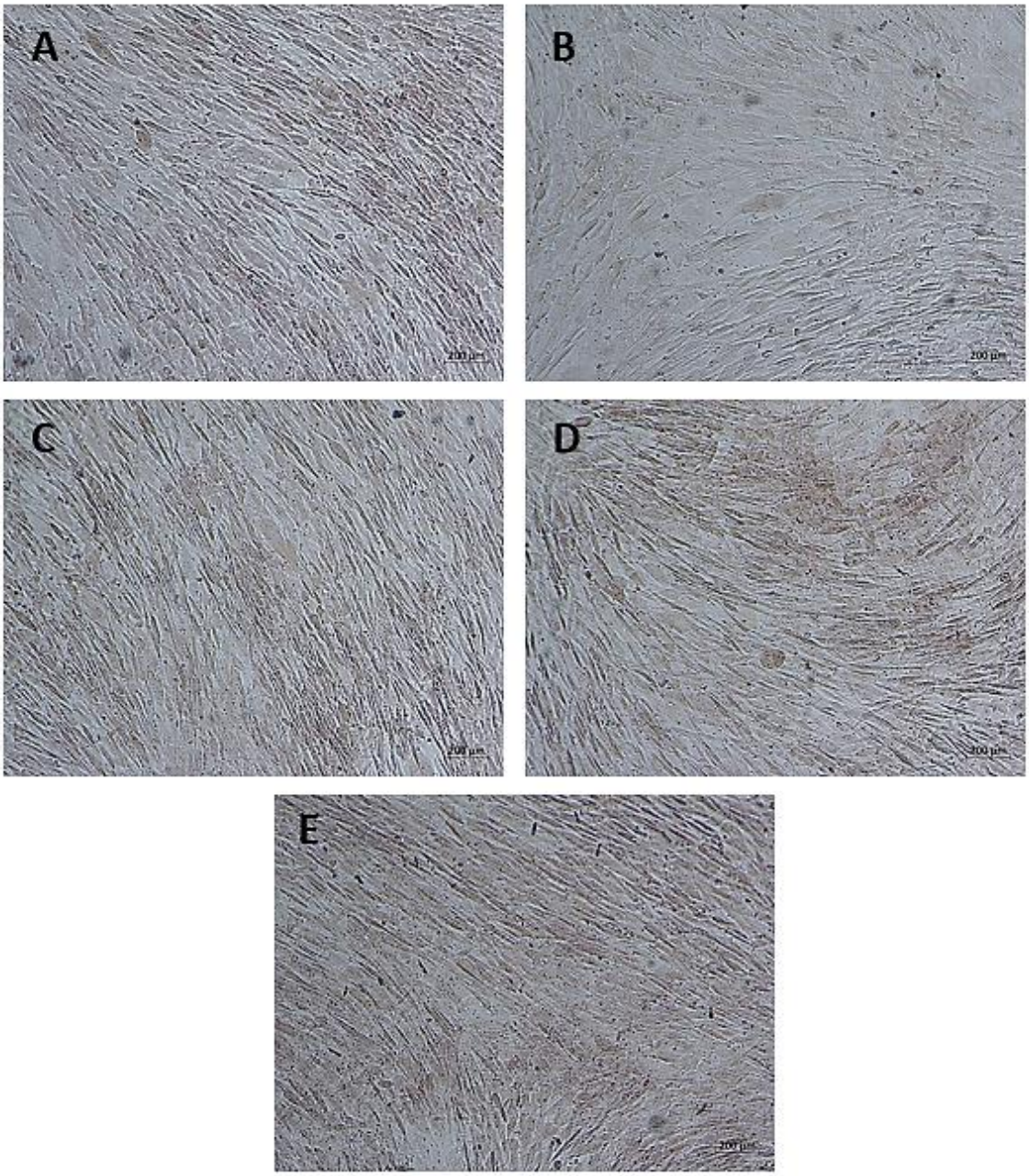

Figura 12. CTMTAs coradas com o corante vermelho de alizarina após 21 dias de tratamento com meio de cultivo DMEM *low glucose* e diferentes concentrações de Triol. **A:** Controle, DMEM *low glucose*. **B:** 3 μM. **C:** 5 μM. **D:** 10 μM. **E:** 15 μM; barra de calibração = 200 μm

4.5.2 Tratamento com oxisteróis e meio de diferenciação osteogênico

As CTMTAs foram submetidas a um tratamento com meio de diferenciação osteogênico específico associado a concentrações de 3 a 30 μM de oxisteróis durante 21 dias.

Após indução da diferenciação utilizando apenas meio osteogênico foi possível observar alteração da morfologia celular e coloração positiva para o corante vermelho de alizarina ao fim dos 21 dias (Fig. 13A). O tratamento com meio osteogênico específico e Col não foi citotóxico em nenhuma das concentrações testadas durante o período avaliado, as CTMTAs apresentaram coloração intensa para o corante vermelho de alizarina após diferentes tratamentos (Fig. 13B-G).

O tratamento com os oxisteróis 7-KC (Fig. 14B-F) e Triol (Fig. 15B-F) foram citotóxicos apenas na concentração de 30 μM. Nos demais tratamentos foi possível observar coloração positiva para o corante vermelho de alizarina após 21 dias de tratamento.

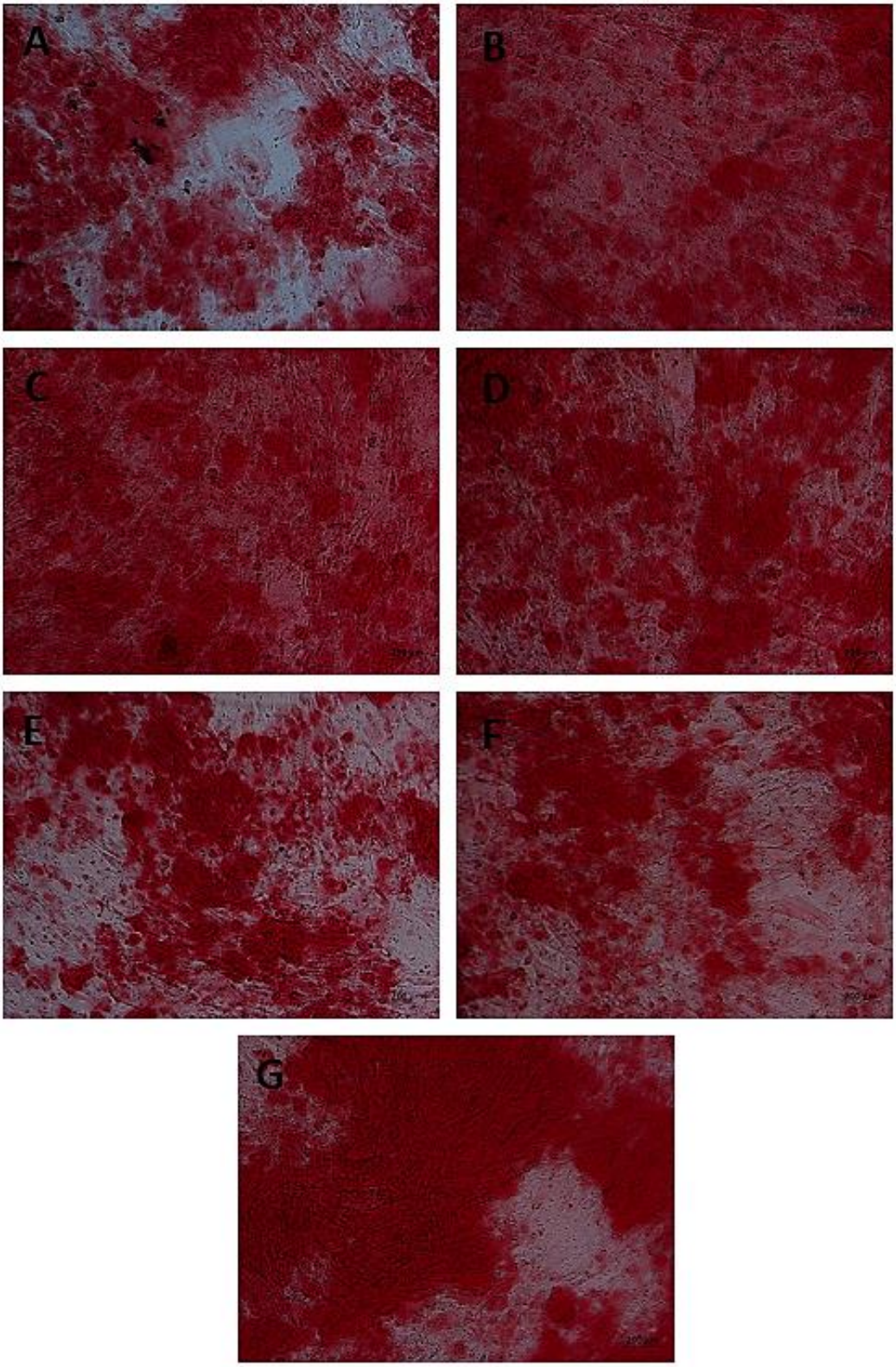

Figura 13. CTMTAs coradas com o corante vermelho de alizarina após 21 dias de tratamento com meio de diferenciação osteogênico e diferentes concentrações de Col. **A:** Controle, meio de diferenciação osteogênico. **B:** 3 μM. **C:** 5 μM. **D:** 10 μM. **E:** 15 μM. **F:** 20 μM. **G:** 30 μM de Col; barra de calibração = 200 μm

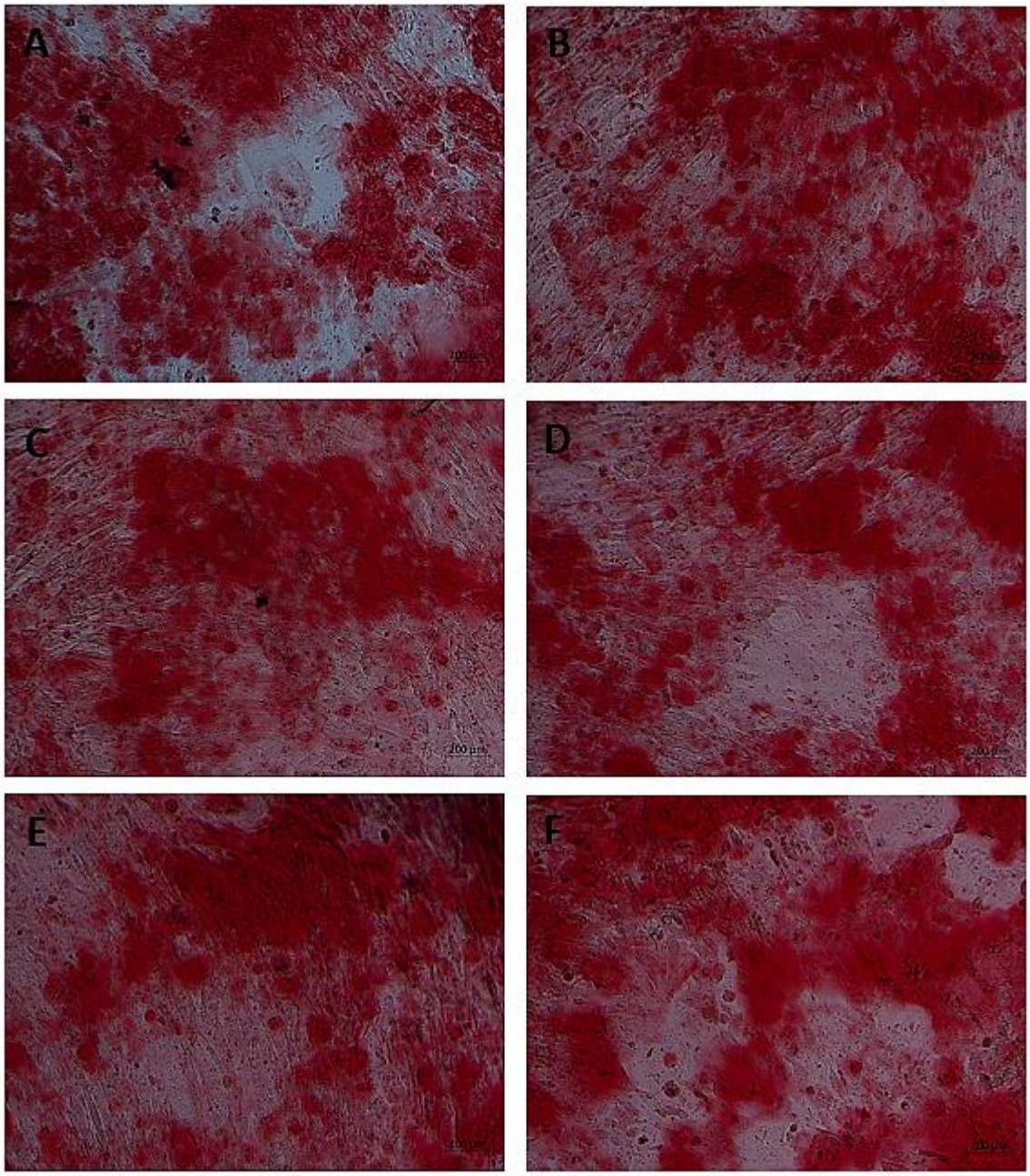

Figura 14. CTMTAs coradas com o corante vermelho de alizarina após 21 dias de tratamento com meio de diferenciação osteogênico e diferentes concentrações de 7-KC. **A:** Controle, meio de diferenciação osteogênico. **B:** 3 μM. **C:** 5 μM. **D:** 10 μM. **E:** 15 μM. **F:** 20 μM de 7-KC; barra de calibração = 200 μm

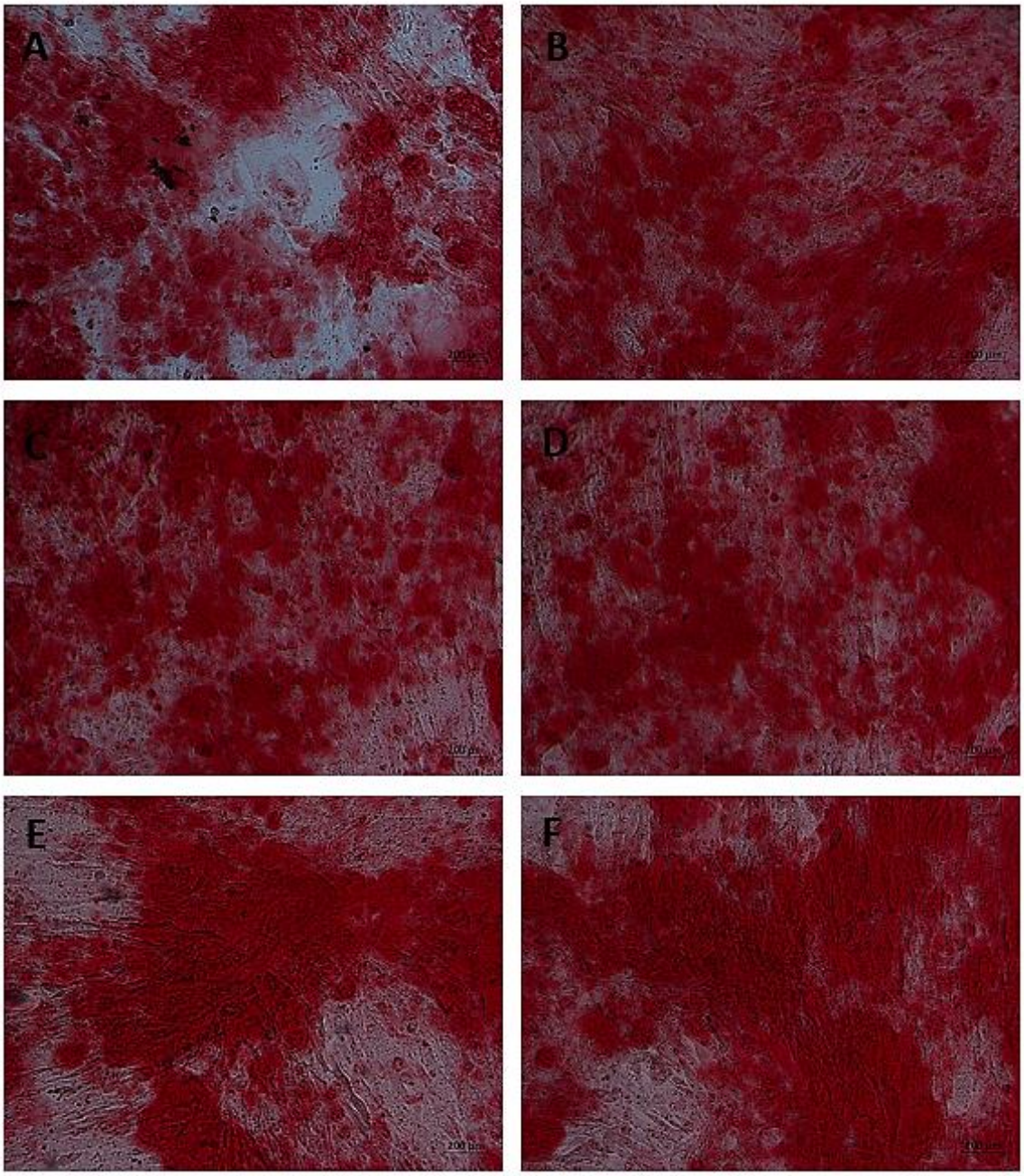

Figura 15. CTMTAs coradas com o corante vermelho de alizarina após 21 dias de tratamento com meio de diferenciação osteogênico e diferentes concentrações de Triol. **A:** Controle, meio de diferenciação osteogênico. **B:** 3 μM. **C:** 5 μM. **D:** 10 μM. **E:** 15 μM. **F:** 20 μM de Triol; barra de calibração = 200 μm

4.6 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial após indução da diferenciação

Realizada a avaliação da ação dos oxisteróis na diferenciação osteogênica e adipogênica através dos corantes vermelho de alizarina e *Oil*

Red O, foram avaliadas as possíveis alterações no potencial de membrana mitocondrial após indução da diferenciação. O potencial de membrana foi medido através da análise da intensidade de fluorescência produzida pelo corante TMRE.

Devido à alta taxa de morte celular no tratamento utilizando a concentração de 30 μM dos oxisteróis durante a indução da diferenciação osteogênica selecionamos as concentrações de 5, 10 e 20 μM para avaliação do potencial de membrana mitocondrial. Após 21 dias de indução da diferenciação utilizando meio osteogênico e oxisteróis não foi observada alteração significativa do potencial de membrana mitocondrial em nenhum dos tratamentos avaliados (Fig. 16).

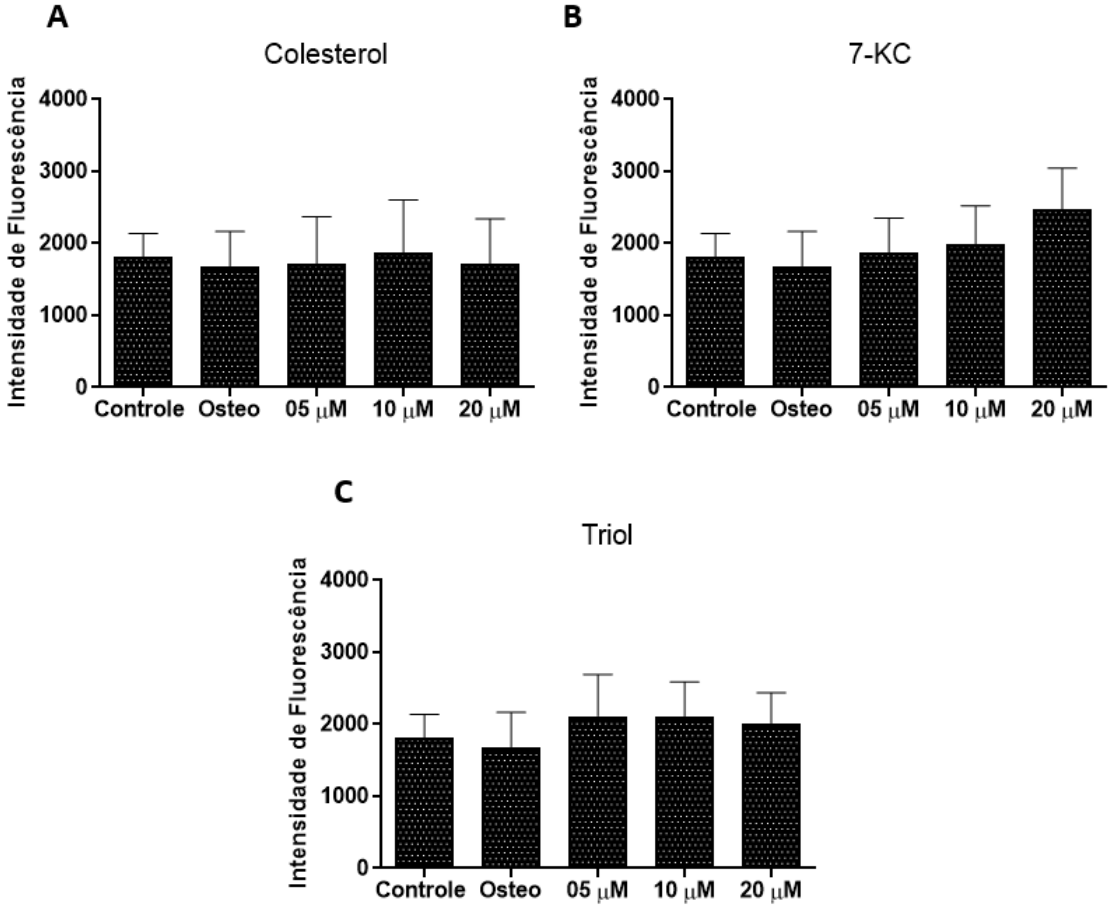

Figura 16. Análise do potencial de membrana mitocondrial nas CTMTAs após 21 dias de tratamento com meio de diferenciação osteogênico e oxisteróis. **A:** Col. **B:** 7-KC. **C:** Triol. Estes dados são representados pela intensidade de fluorescência do TMRE acumulado nas mitocôndrias ativas. A análise foi determinada usando o software *Cell Scoring MetaExpress da Molecular Devices*. Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos. Análise estatística representativa de 3 linhagens diferentes em duplicata por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com análise secundária de *Bonferron*i.

Avaliamos também o potencial de membrana mitocondrial após 14 dias de tratamento com meio adipogênico e oxisteróis nas concentrações de 3, 5 e 10 μM, foram selecionadas estas concentrações devido à alta taxa de morte celular na indução da diferenciação adipogênica nas concentrações de 15-30 μM de oxisteróis demonstrada pelos experimentos anteriormente descritos.

Através da análise foi possível observar que o Col não provocou alterações no potencial de membrana em nenhuma das concentrações testadas (Fig. 17A). O 7-KC e triol provocaram alta taxa de morte celular na concentração de 10 μM impossibilitando análise, o tratamento com estes oxisteróis nas concentrações de 3 e 5 μM não provocaram alteração significativa no potencial de membrana mitocondrial (Fig. 17B-C).

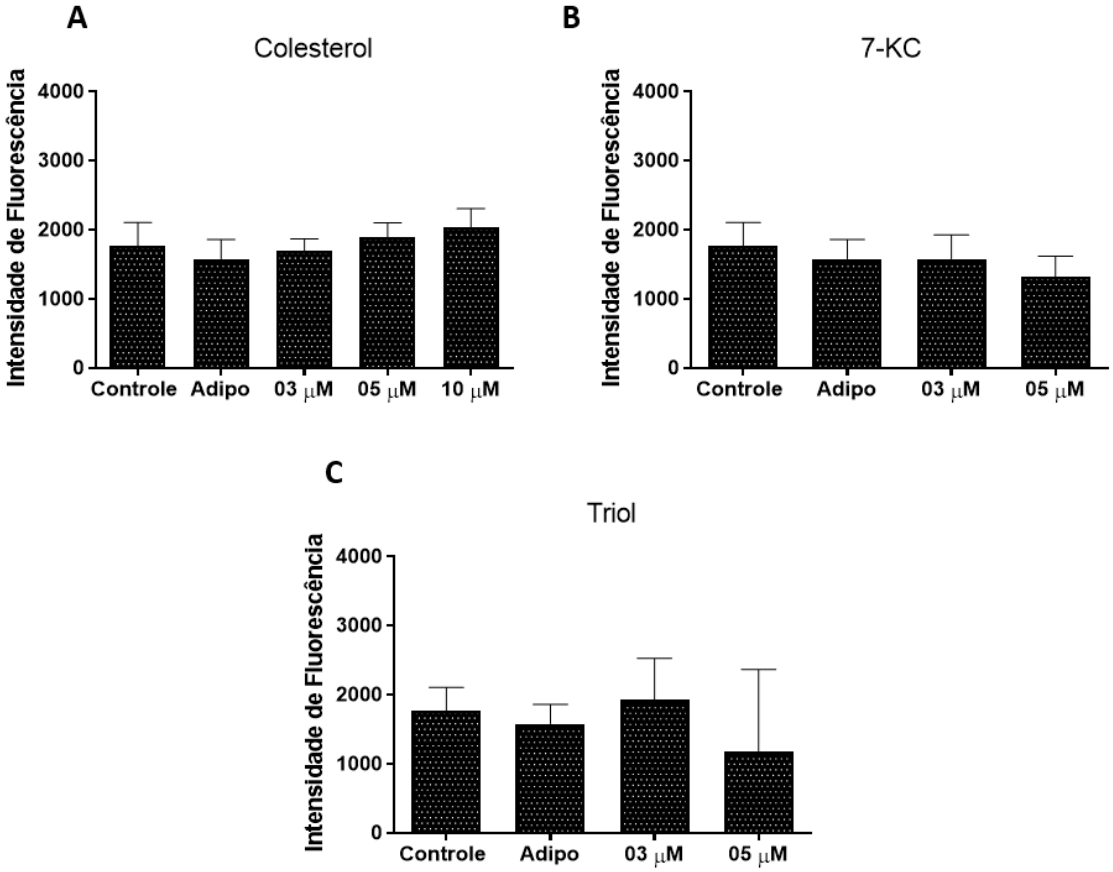

Figura 17. Análise do potencial de membrana mitocondrial nas CTMTAs após 14 dias de tratamento com meio de diferenciação adipogênico e oxisteróis. **A:** Col. **B:** 7-KC. **C:** Triol. Estes dados são representados pela intensidade de fluorescência do TMRE acumulado nas mitocôndrias ativas. A análise foi determinada usando o software *Cell Scoring MetaExpress da Molecular Devices*. Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos. Análise estatística representativa de 3 linhagens diferentes em duplicata por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com análise secundária de Bonferroni.

A partir das análises das figuras obtidas pelo uso do corante TMRE foi possível observar regiões de intensa fluorescência ao redor dos núcleos após indução da diferenciação osteogênica (Fig. 18B-E) quando comparado ao controle cultivado em DMEM *low glucose* (Fig. 18A), sugerindo uma alteração conformacional das mitocôndrias para região perinuclear.

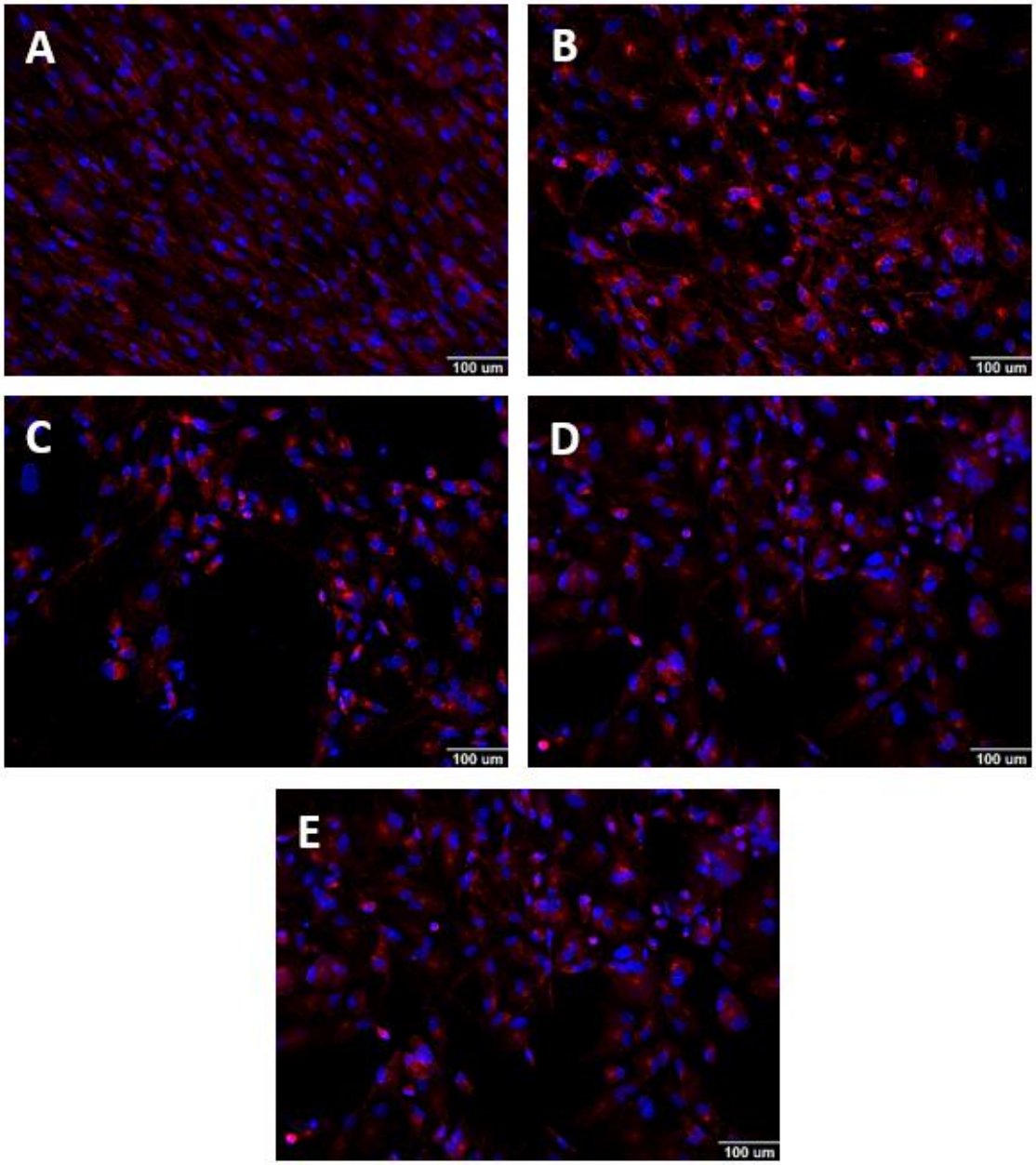

Figura 18. CTMTAs coradas por TMRE após 21 dias de tratamento. **A:** Controle, DMEM *low glucose*. **B:** Meio osteogênico. **C:** Col associado ao meio osteogênico. **D:** 7-KC associado ao meio osteogênico. **E:** Triol associado ao meio osteogênico

Na diferenciação adipogênica também observamos localização perinuclear nas mitocôndrias tratadas com meio adipogênico (Fig. 19B) e Col (19C) quando comparado ao controle cultivado com meio DMEM *high glucose* (Fig. 19A). Nas células tratadas com 7-KC e Triol (Fig. 19D-E) observamos um número menor de células marcadas por TMRE e uma retração citoplasmática nestas células, indicativo de morte celular.

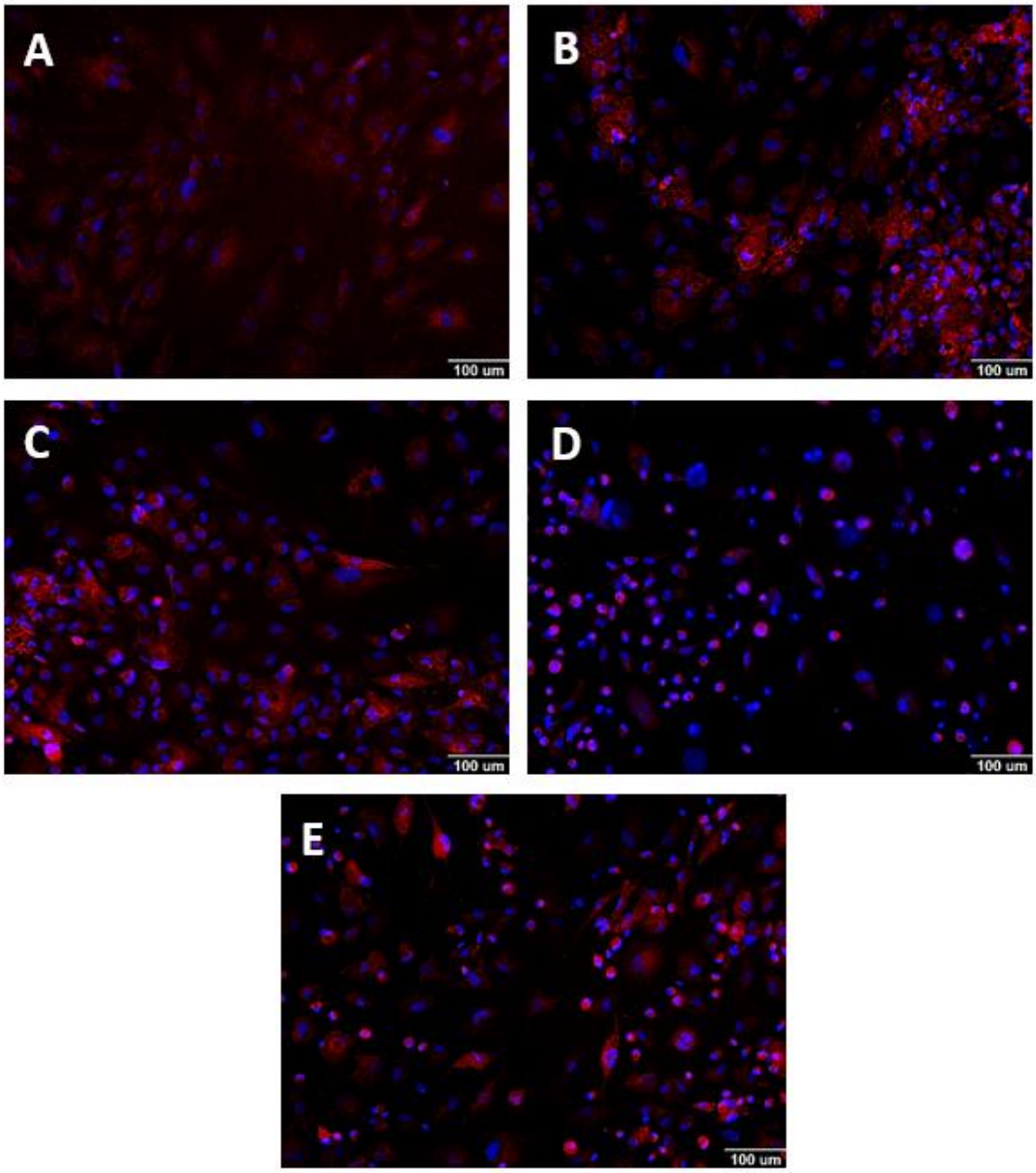

Figura 19. CTMTAs coradas por TMRE após 14 dias de tratamento. **A:** Controle, DMEM *high glucose*. **B:** Meio adipogênico. **C:** Col associado ao meio adipogênico. **D:** 7-KC associado ao meio adipogênico. **E:** Triol associado ao meio adipogênico

4.7 Análise da expressão de genes envolvidos na diferenciação celular

Com base nas colorações pelos corantes *Oil Red O* e vermelho de alizarina, viabilidade celular após tratamento com os oxisteróis e resultados obtidos através da análise do potencial de membrana mitocondrial foi selecionada uma concentração por oxisterol a ser utilizada em associação aos diferentes meios nos experimentos relacionados a expressão gênica, sendo a concentração de 10 μM para o Col e 7-KC e 5 μM para o Triol.

Após indução da diferenciação, avaliou-se a expressão de genes envolvidos neste processo através da técnica de PCR em tempo real em cinco períodos diferentes: 3 h, 2 dias, 4 dias, 7 dias e 21 dias.

Os genes estudados foram *RUNX2* e *ALPL*, marcadores de diferenciação osteogênica inicial, gene *BGLAP* marcador de diferenciação osteogênica tardia, *PPAR*γ e *C/EBP*α marcadores de diferenciação adipogênica.

4.7.1 Avaliação da expressão do gene *RUNX2*

Inicialmente foi realizada a análise da expressão do gene *RUNX2* utilizando a metodologia de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As análises foram realizadas através da divisão dos resultados das células tratadas com meio específico de diferenciação pelo resultado das células cultivadas com meio basal (DMEM *low glucose*) na presença e ausência de oxisteróis.

O RNA obtido das células cultivadas em meio basal foi utilizado como normalizador da expressão gênica, os resultados obtidos foram convertidos em escala logarítmica para melhor observação. A expressão basal em escala logarítmica foi equivalente a zero e este resultado não foi demonstrado nos gráficos.

Os resultados demonstraram que as CTMTAs tratadas apenas com meio osteogênico específico apresentaram um aumento da expressão de *RUNX2* a partir do 7º dia de tratamento ($\rho<0.0001$), esta expressão permaneceu aumentada até o 21º dia de indução da diferenciação ($\rho<0.05$). Não houve alteração significativa na expressão de *RUNX2* após 3 h, 2 e 4 dias de tratamento utilizando apenas meio osteogênico específico (Fig. 20).

Após indução da diferenciação utilizando Col pode-se observar que as CTMTAs demonstraram aumento da expressão de *RUNX2* a partir do 4º dia de tratamento permanecendo desta forma até o 7º dia ($\rho<0.0001$). Nos períodos de 3 h, 2 e 21 dias não houve alteração significativa da expressão de *RUNX2* (Fig. 20).

As CTMTAs tratadas com 7-KC apresentaram aumento da expressão de RUNX2 após 3 h de tratamento ($\rho<0.05$), esta expressão se manteve aumentada durante todos os períodos avaliados. O tratamento com o Triol não foi capaz de aumentar a expressão de *RUNX2* em nenhum dos períodos testados (Fig. 20).

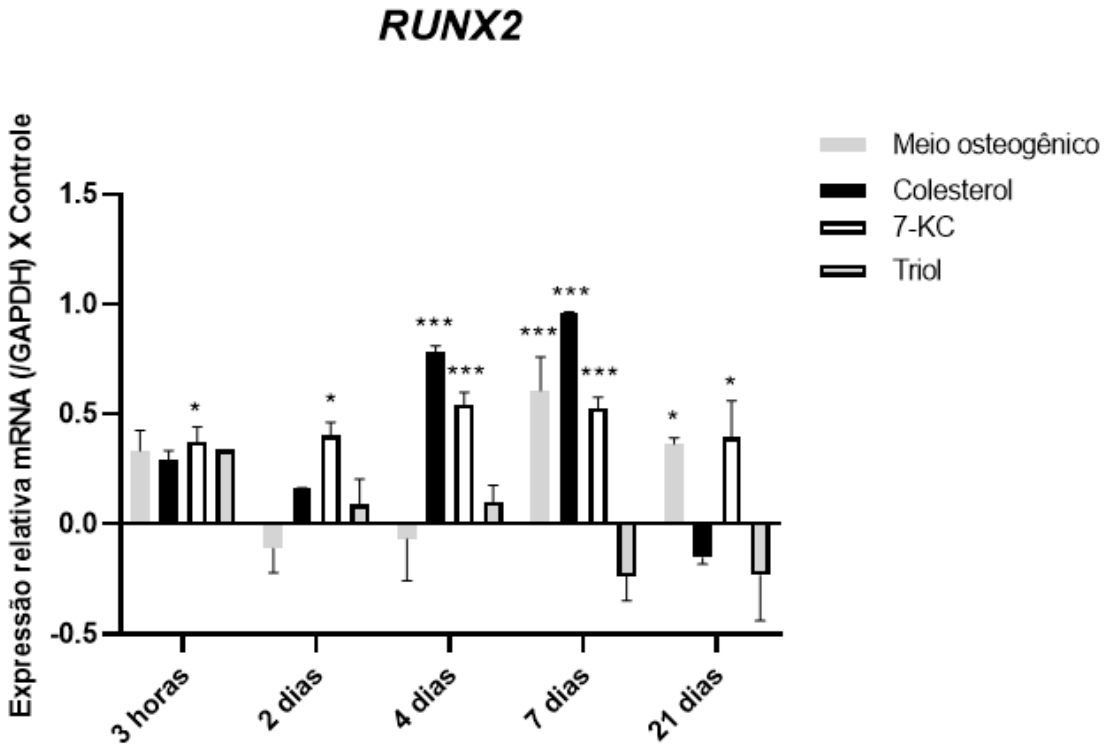

Figura 20. Expressão de *RUNX2* nas CTMTAs em diferentes períodos durante a indução da diferenciação osteogênica. A análise foi determinada usando termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Análise estatística de 3 linhagens em duplicata foi realizada por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Dunnett*. Como calibrador foram utilizadas as amostras tratadas com meio DMEM *low glucose*, diferença estatística em relação a estas amostras. * ρ<0.05; ** ρ<0.01; *** ρ<0.0001

4.7.2 Avaliação da expressão do gene *ALPL*

Ao analisar a expressão da *ALPL* após indução da diferenciação utilizando apenas meio osteogênico foi possível observar que houve um aumento da expressão deste gene a partir do 4º dia de tratamento (ρ<0.05) esta expressão se intensificou ainda mais ao 7º dia de tratamento (ρ<0.0001). As CTMTAs tratadas apenas com meio osteogênico não demonstraram alteração na expressão de *ALPL* nos períodos de 3 horas, 2 dias e 21 dias (Fig. 21).

As CTMTAs tratadas com Col apresentaram um aumento da expressão de *ALPL* a partir do 4º dia de indução da diferenciação (ρ<0.01) esta expressão

aumentou ainda mais ao 7º dia de tratamento (ρ<0.0001). Nos períodos de 3 h, 2 e 21 dias não houve alteração na expressão da *ALPL* (Fig. 21).

No tratamento com 7-KC foi observado um aumento significativo da expressão de *ALPL* a partir do 2º dia de indução (ρ<0.0001) permanecendo aumentado até o 21 º dia de tratamento (ρ<0.01). Após 3 h de tratamento utilizando 7-KC não foi observada alteração na expressão da *ALPL* (Fig. 21).

As CTMTAs tratadas com Triol apresentaram aumento na expressão de *ALPL* apenas no 4º dia de indução (ρ<0.05) e uma diminuição significativa da expressão deste gene no 7º dia de tratamento (ρ<0.0001). O Triol não provocou alteração na expressão da *ALPL* nos períodos de 3 h, 2 e 21 dias (Fig.21).

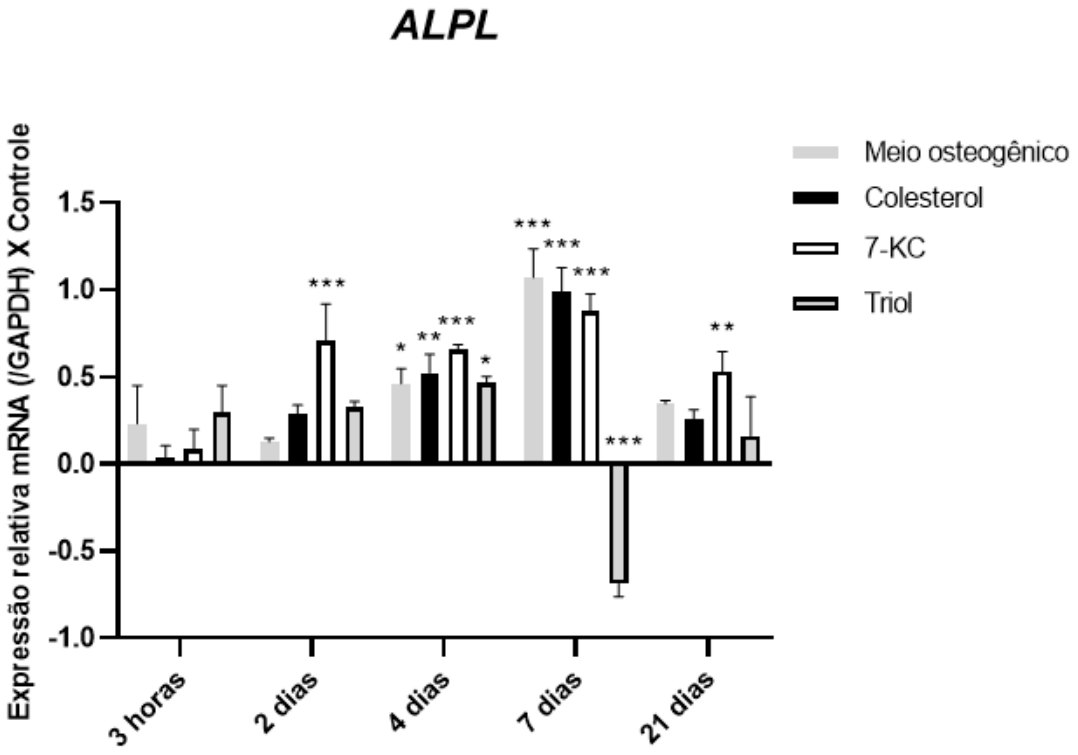

Figura 21. Expressão de *ALPL* nas CTMTAs em diferentes períodos durante a indução da diferenciação osteogênica. A análise foi determinada usando termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Análise estatística de 3 linhagens em duplicata foi realizada por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Dunnett*. Como calibrador foram utilizadas as amostras tratadas com meio DMEM *low glucose*, diferença estatística em relação a estas amostras. * ρ<0.05; ** ρ<0.01; *** ρ<0.0001

4.7.3 Avaliação da expressão do gene BGLAP

As CTMTAs tratadas apenas com meio osteogênico apresentaram um aumento na expressão de *BGLAP* no 2º dia ($\rho<0.0001$) e 7º dia ($\rho<0.0001$) de tratamento, não foi observada alteração no 4º e 21º dia de tratamento. No tratamento com Col houve aumento significativo apenas no 7º dia de indução ($\rho<0.01$), os demais períodos testados não demonstraram alteração significativa (Fig. 22).

Após tratamento com 7-KC e Triol não foi observado aumento significativo na expressão de *BGLAP* nas CTMTAs em nenhum dos períodos testados (Fig. 22).

Após 3 h de indução nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar a expressão de *BGLAP* (dados não apresentados no gráfico).

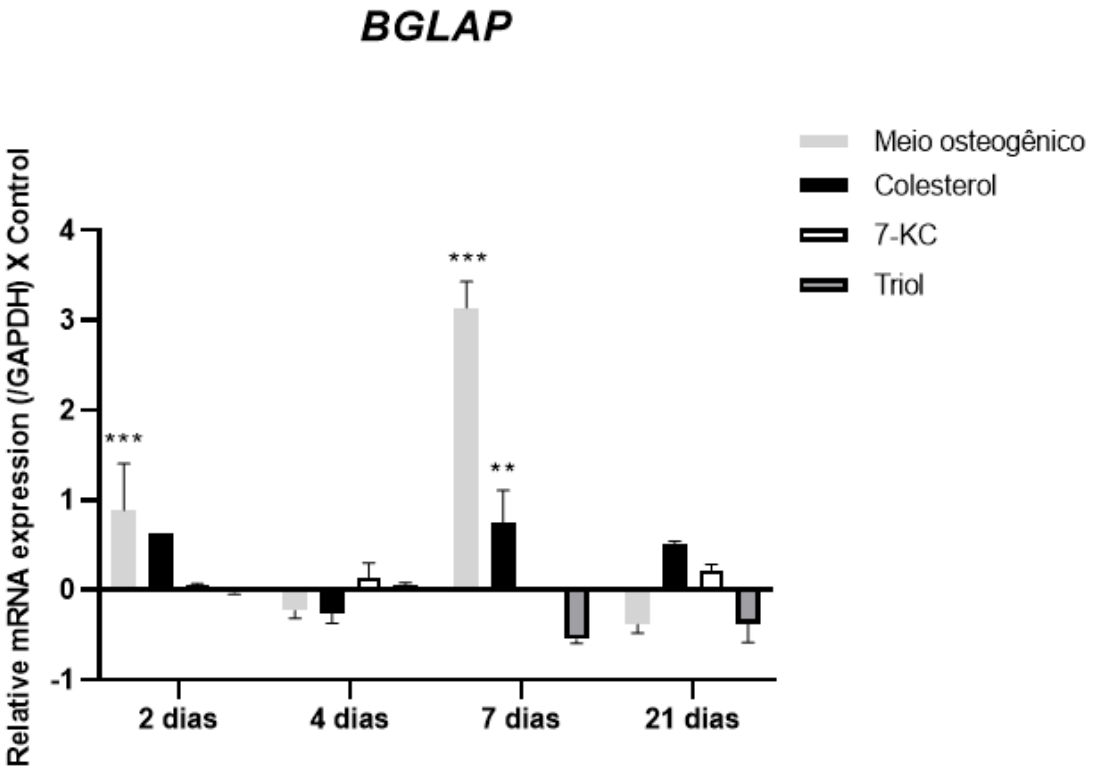

Figura 22. Expressão de *BGLAP* nas CTMTAs em diferentes períodos durante a indução da diferenciação osteogênica. A análise foi determinada usando termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Análise estatística de 3 linhagens em duplicata foi realizada por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Dunnett*. Como calibrador foram utilizadas as amostras tratadas com meio DMEM *low glucose*, diferença estatística em relação a estas amostras. * ρ<0.05; ** ρ<0.01; *** ρ<0.0001

4.7.4 Avaliação da expressão do gene *PPARγ*

Existe um equilíbrio entre a diferenciação osteogênica e adipogênica através da ativação ou silênciamento de determinados genes, considerando isto, foi selecionado o gene adipogênico *PPARγ* por se tratar de um dos principais genes envolvidos neste processo de diferenciação.

Após indução da diferenciação utilizando meio de diferenciação osteogênico percebeu-se um aumento na expressão de *PPARγ* após 2 dias de tratamento (ρ<0.0001), a expressão de *PPARγ* permaneceu aumentada até o 21º dia (ρ<0.01). Não foi observada alteração na expressão deste gene na 3º hora de indução da diferenciação (Fig. 23).

No tratamento utilizando Col foi possível observar um aumento da expressão de *PPARγ* após 4 dias tratamento (ρ<0.0001), esta expressão permaneceu elevada até o 21º dia (ρ<0.05). Nos períodos de 3 h e 2 dias não foi observada alteração na expressão de *PPARγ* (Fig. 23).

O tratamento com 7-KC levou a um aumento na expressão de *PPARγ* no 4º dia (ρ<0.0001) de indução da diferenciação osteogênica permanecendo elevada até o 21º dia. Não foi observada alteração nos períodos de 3 horas e 2 dias (Fig. 23).

O Triol levou a um aumento na expressão de *PPARγ* apenas no 4º (ρ<0.0001) e 21º dia (ρ<0.05) de tratamento, ao 7º dia de tratamento houve uma diminuição significativa da expressão de *PPARγ* (ρ<0.05). Os períodos de 3 h e 2 dias de tratamento com Triol não provocaram alterações nas CTMTAs (Fig. 23).

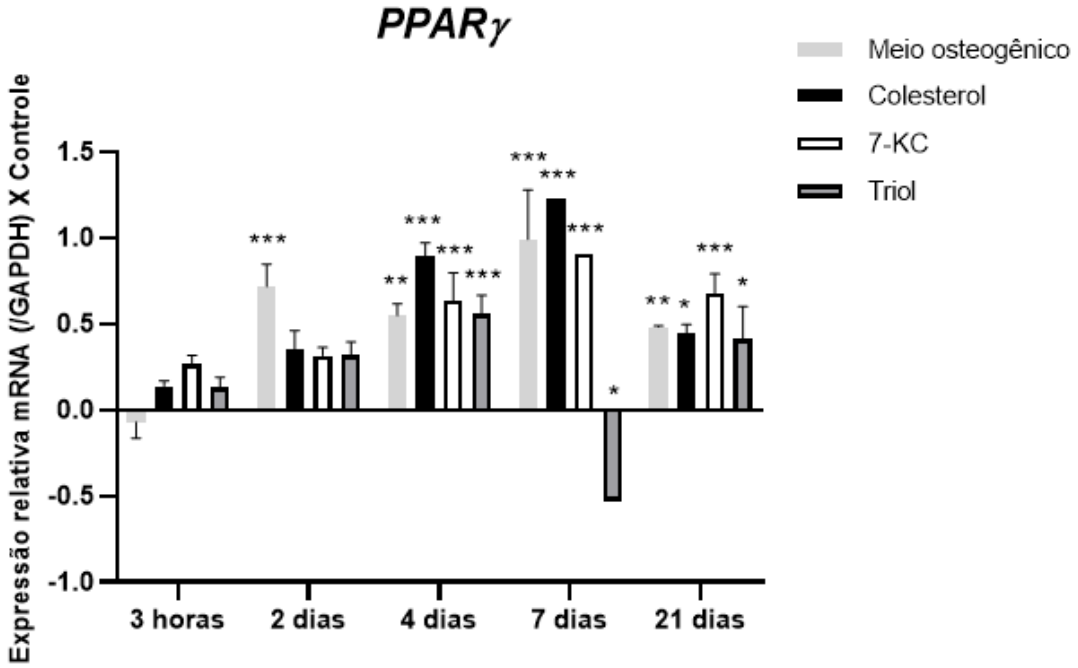

Figura 23. Expressão de *PPARγ* nas CTMTAs em diferentes períodos durante a indução da diferenciação osteogênica. A análise foi determinada usando termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Análise estatística de 3 linhagens em duplicata foi realizada por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Dunnett*. Como calibrador foram utilizadas as amostras tratadas com meio DMEM *low glucose*, diferença estatística em relação a estas amostras. * ρ<0.05; ** ρ<0.01; *** ρ<0.0001

O *PPARγ* é descrito por sua atuação facilitando a diferenciação adipogênica (LEVY *et al.,* 2017), a literatura relata que alguns oxisteróis exercem um efeito anti-adipogênico nas CTMs pela redução da expressão deste gene (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016). Por se tratar de um gene envolvido na adipogênese foi avaliada sua expressão após indução da diferenciação adipogênica na presença e ausência de oxisteróis com o intuito de comparar os resultados com os valores obtidos após indução da diferenciação osteogênica.

Após 21 dias de tratamento foi possível perceber que a expressão de PPARγ é significativamente menor nas CTMTAs tratadas com meio osteogênico específico, Col, 7-KC e Triol ($\rho<0.0001$) durante a indução da diferenciação osteogênica quando comparado as CTMTAs tratadas com apenas com meio adipogênico específico (Fig. 24).

Ao comparar as CTMTAs tratadas com meio osteogênico em associação aos oxisteróis e meio adipogênico e oxisteróis percebemos alteração na expressão de *PPARγ* estando mais elevado nas células induzidas a diferenciação adipogênica (Col, $\rho<0{,}0001$; 7-KC, $\rho<0.05$; Triol, $\rho<0{,}0001$ – Fig. 24).

Os resultados também demonstraram que o Col assim como o 7-KC e o Triol inibiram a expressão de *PPARγ* nas CTMTAs durante a indução da diferenciação adipogênica quando comparado ao controle cultivado apenas com meio adipogênico ($\rho<0.0001$), expressando níveis significativamente menores de PPARγ após tratamento (Fig. 24).

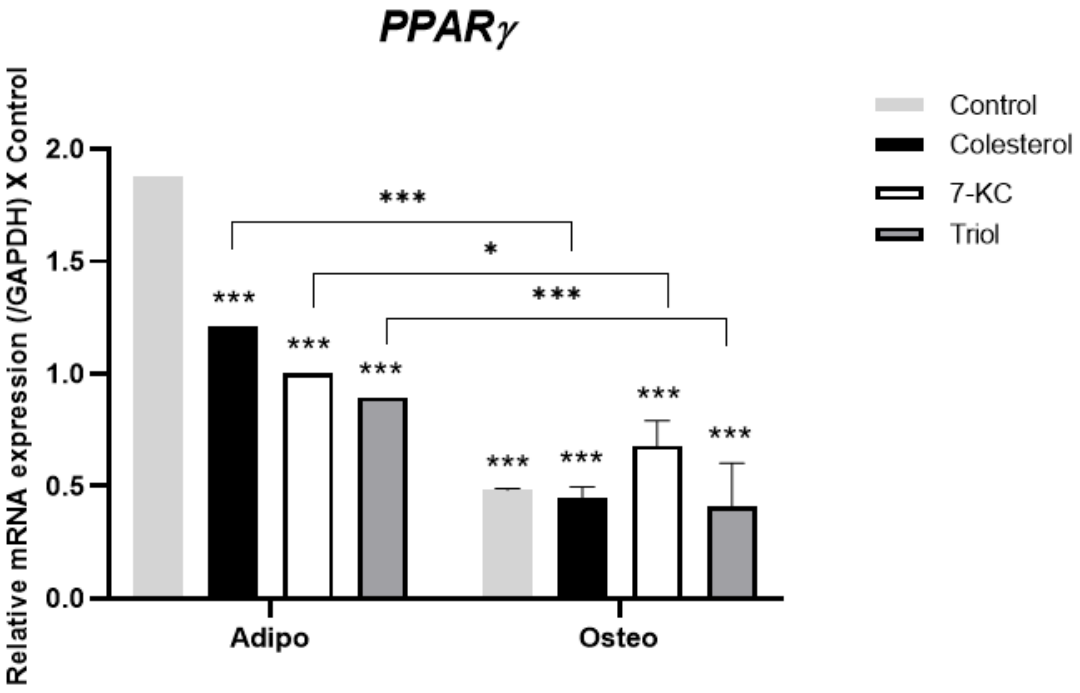

Figura 24. Comparação da expressão de *PPARγ* nas CTMTAs induzidas a diferenciação osteogênica e adipogênica durante 21 dias. Concentrações utilizadas durante a diferenciação osteogênica: Col 10 μM; 7-KC 10 μM; Triol 5 μM. Concentrações utilizadas durante a diferenciação adipogênica: Col 5 μM; 7-KC 5 μM; Triol 3 μM. A análise foi determinada usando termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Análise estatística foi realizada por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Dunnett*. Como calibrador foram utilizadas amostras tratadas durante 21 dias com meio DMEM *low glucose*. Diferença estatística com relação ao controle adipogênico. *ρ<0.05; *** ρ<0.0001

4.7.5 Avaliação da expressão do gene *C/EBPα*

Avaliamos a expressão de *C/EBPα* fator importante para a diferenciação final de adipócitos (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016) nas CTMTAs. Os resultados mostraram que após 3 h de indução da diferenciação com meio osteogênico houve uma diminuição significativa da expressão de *C/EBPα* nas CTMTAs (ρ<0.05). Após 4 dias de tratamento houve um aumento da expressão deste gene (ρ<0.01). Esta expressão aumentou ainda mais ao 7º dia de indução (ρ<0.0001). Não houve alteração na expressão de *C/EBPα* no período de 2 e 21 dias de tratamento utilizando apenas meio osteogênico (Fig. 25).

O Col aumentou a expressão de *C/EBPα* apenas no 4º dia de indução da diferenciação (ρ<0.01), não houve alteração na expressão de *C/EBPα* nos demais períodos avaliados. O tratamento com 7-KC provocou um aumento significativo da expressão do gene *C/EBPα* no 4º dia de indução (ρ<0.0001) e uma diminuição no 21º dia (ρ<0.0001). Não foi observada alteração na expressão do gene avaliado nos demais períodos.

O Triol aumentou a expressão de *C/EBPα* no 2º (ρ<0.05) e 4º dia (ρ<0.0001) de tratamento. O Triol não provocou alterações na expressão de *C/EBPα* nos períodos de 3 h, 7 e 21 dias (Fig. 25).

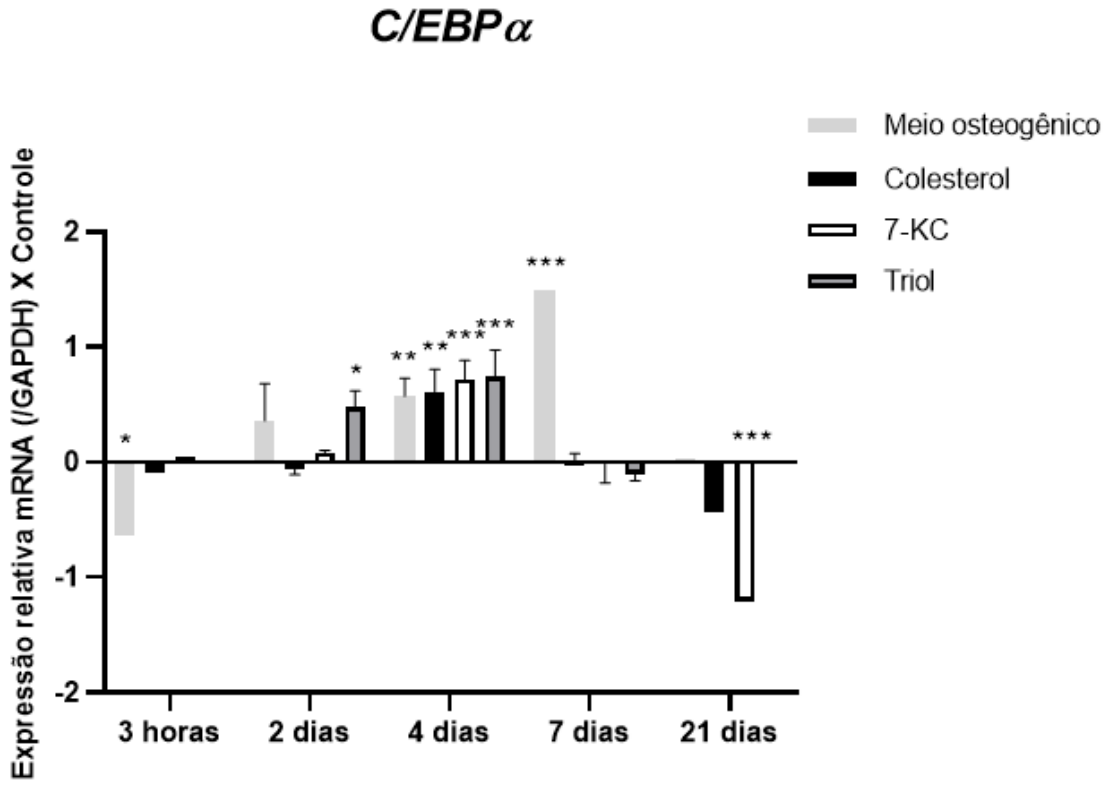

Figura 25. Expressão de *C/EBPα* nas CTMTAs em diferentes períodos durante a indução da diferenciação osteogênica. A análise foi determinada usando termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Análise estatística de 3 linhagens em duplicata foi realizada por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Dunnett*. Como calibrador foram utilizadas as amostras tratadas com meio DMEM *low glucose*, diferença estatística em relação a estas amostras. * ρ<0.05; ** ρ<0.01; *** ρ<0.0001

Comparou-se a expressão do gene *C/EBPα* durante a indução da diferenciação adipogênica e osteogênica na presença e ausência de oxisterói s

após 21 dias de tratamento. A expressão deste gene se apresentou significativamente mais elevada durante a diferenciação adipogênica quando comparado a diferenciação osteogênica independente da ação dos oxisteróis (ρ<0.0001 – Fig. 26).

Percebeu-se também que as CTMTAs tratadas apenas com meio de diferenciação adipogênico apresentaram expressão maior do gene *C/EBPα* quando comparado as células tratadas com meio adipogênico e Col,7-KC e Triol (ρ<0.0001) reforçando a ação anti-adipogênica dos oxisteróis (Fig. 26).

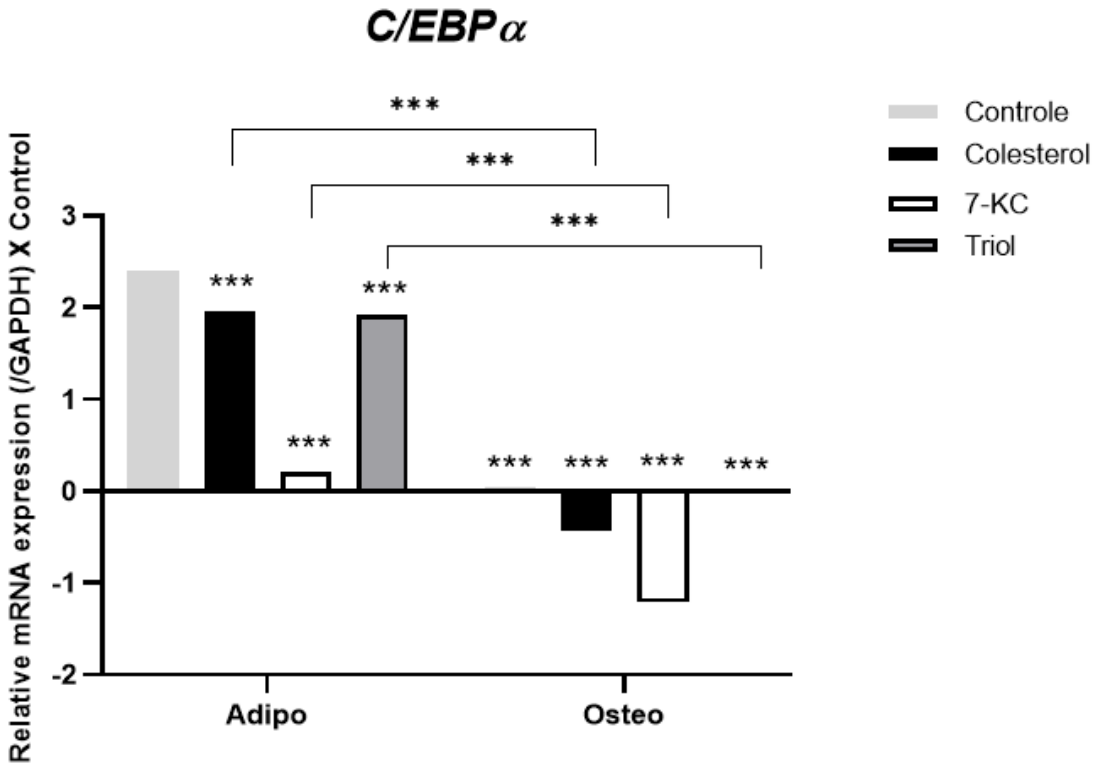

Figura 26. Comparação da expressão de *C/EBPα* nas CTMTAs induzidas a diferenciação osteogênica e adipogênica durante 21 dias. Concentrações utilizadas durante a diferenciação osteogênica: Col 10 μM; 7-KC 10 μM; Triol 5 μM. Concentrações utilizadas durante a diferenciação adipogênica: Col 5 μM; 7-KC 5 μM; Triol 3 μM. A análise foi determinada usando termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System (Life Technologies)*. Análise estatística foi realizada por *Two-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Dunnett*. Como calibrador foram utilizadas amostras tratadas durante 21 dias com meio DMEM *low glucose*. Diferença estatística com relação ao controle adipogênico. *** ρ<0.0001

4.8 Estudo da via SHh durante a indução da diferenciação pelo uso de oxisteróis

4.8.1 Proteína Smo

A proteína Smo está envolvida na ativação da via Hh, avaliamos a expressão de Smo pela intensidade de fluorescência no núcleo, bem como intensidade de fluorescência de Smo na membrana e citoplasma, também avaliamos a porcentagem de células positivas para Smo após diferentes tratamentos.

O tratamento realizado teve duração de 7 dias por se tratar do período com alterações mais significativas durante a avaliação da expressão gênica previamente descrita.

Após 7 dias de indução da diferenciação observou-se que os diferentes tratamentos não foram capazes de provocar alterações na expressão de Smo tanto no núcleo quanto na membrana/citoplasma quando comparado ao controle cultivado com meio DMEM *low glucose* (Fig. 27).

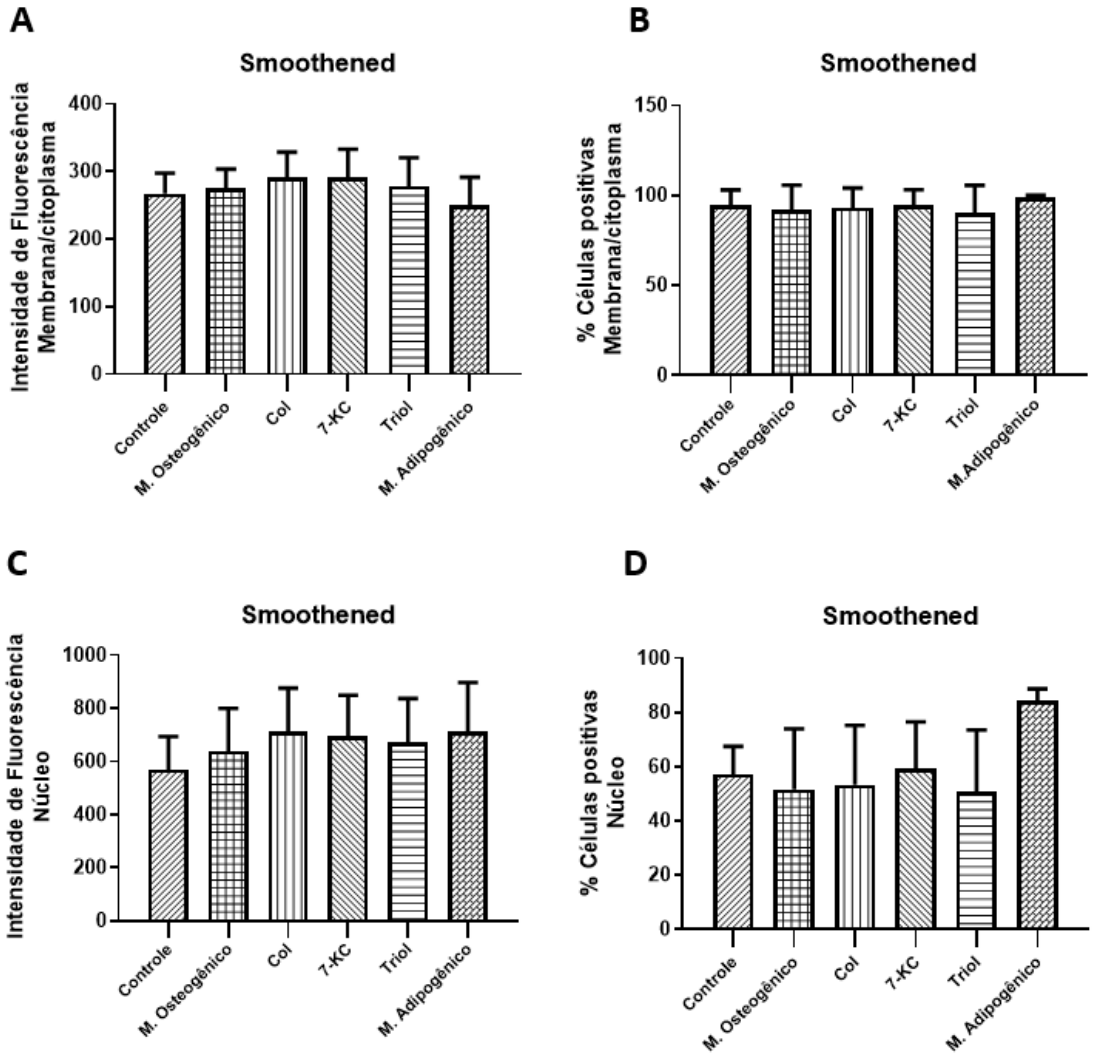

Figura 27. Avaliação da proteína Smo durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** Média da intensidade de fluorescência da expressão de Smo na membrana/citoplasma mensurado por imunofluorescência após diferentes tratamentos. **B:** Porcentagem de CTMTAs positivas para Smo na membrana/citoplasma. **C:** Média da intensidade de fluorescência da expressão de Smo no núcleo mensurado por imunofluorescência após diferentes tratamentos. **D:** Porcentagem de CTMTAs positivas para Smo no núcleo. Análise estatística realizada por *One-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Bonferroni*

Apesar de não haver alteração significativa na intensidade de fluorescência após diferentes tratamentos, através das imagens é possível observar pontos de intensa fluorescência sendo liberados pelas células além de um grande número de células com núcleo positivo para a proteína Smo, principalmente após tratamento com Col e os oxisteróis 7-KC e Triol (Fig. 28D-F).

.

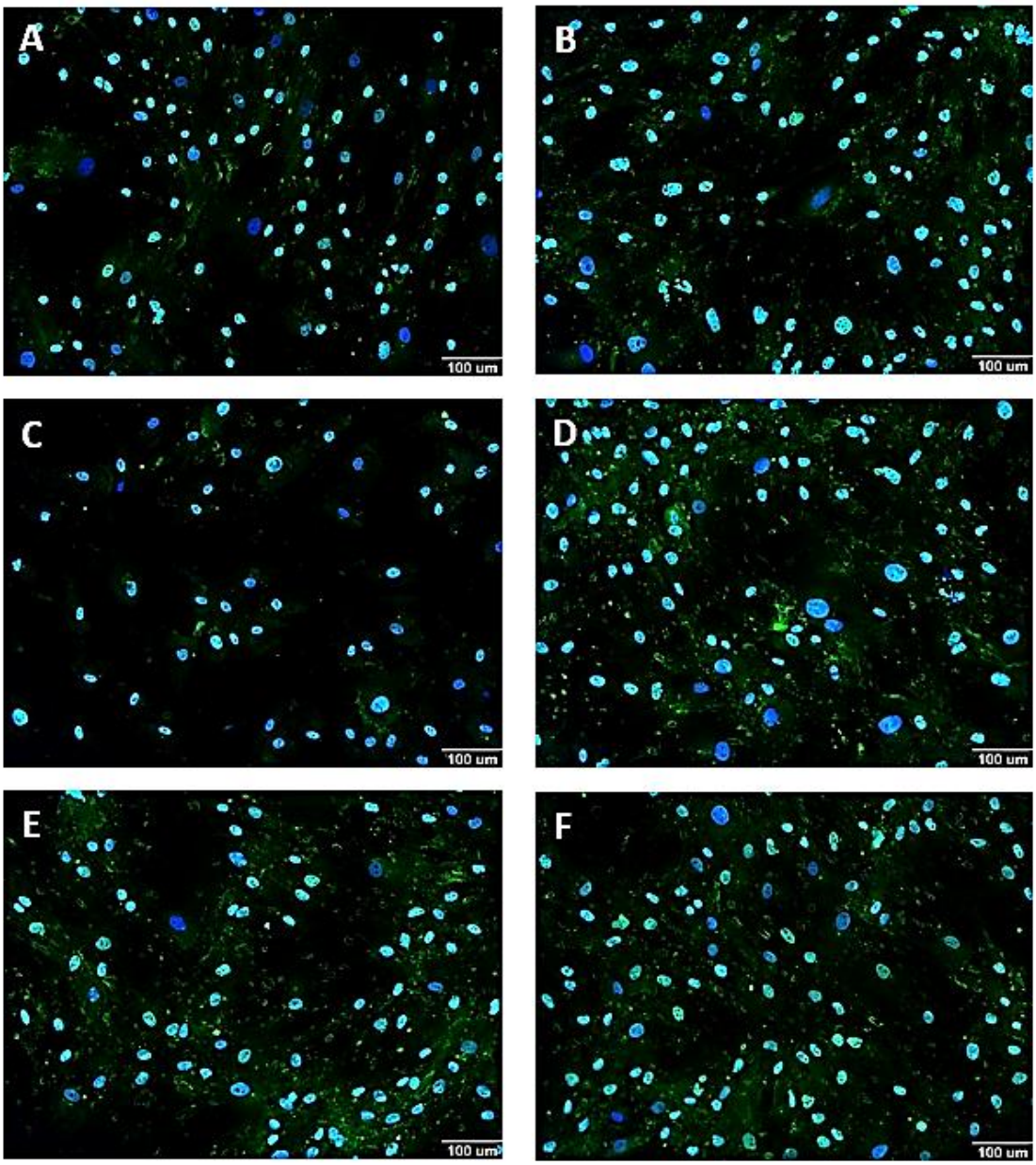

Figura 28. Avaliação da proteína Smo durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** DMEM *low glucose*. **B:** Meio osteogênico. **C:** Meio adipogênico. **D:** Col. **E:** 7-KC. **F:** Triol. Imagens representativas da intensidade de fluorescência pela expressão de Smo obtidas por *High Content ImageXpress*

4.8.2 Proteína SHh

Através da imunofluorescência indireta foi avaliada a proteína SHh nas CTMTAs após 7 dias de tratamento com meio de diferenciação e oxisteróis. A

análise foi realizada pela intensidade de fluorescência em comparação ao controle e também pela quantificação do número de células positivas.

Através da análise da intensidade de fluorescência observou-se que nenhum dos tratamentos testados foi capaz de provocar alterações na expressão de SHh após 7 dias de indução da diferenciação (Fig. 29A).

Pela quantificação da positividade SHh nas CTMTAs após tratamento foi possível notar que os oxisteróis assim como o Col não provocaram alterações no número de células positivas quando comparado ao controle cultivado com meio DMEM *low glucose*. Ao comparar o número de células positivas após tratamento das CTMTAs com meio de diferenciação osteogênico e Col e CTMTAs tratadas com meio adipogênico observa-se que as células induzidas a diferenciação adipogênica apresentaram maior positividade para a proteína SHh (ρ<0.01 - Fig. 29B).

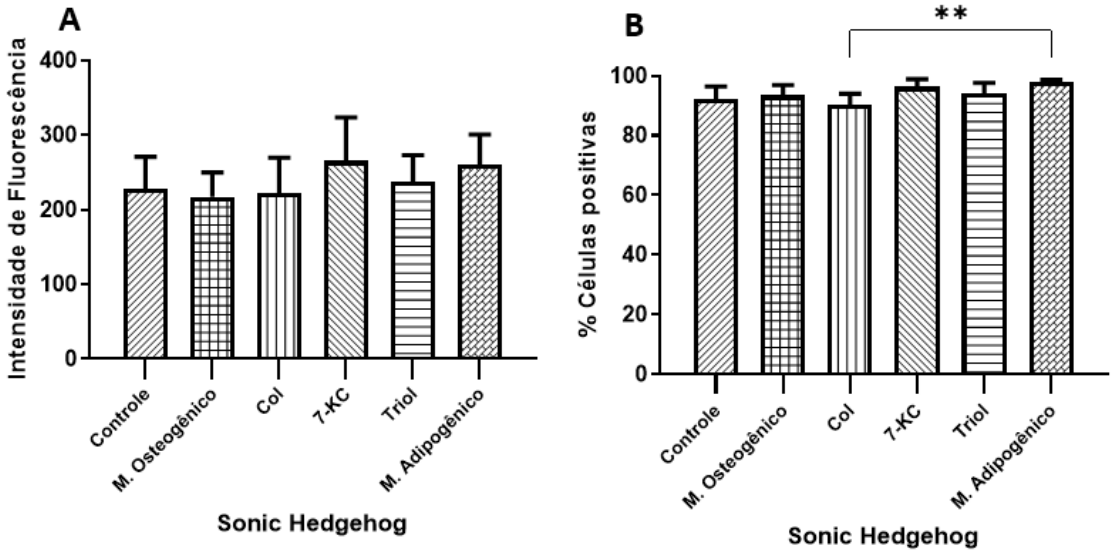

Figura 29. Estudo da via SHh durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** Média da intensidade de fluorescência da expressão de SHh mensurado por imunofluorescência após diferentes tratamentos. **B:** Porcentagem das CTMTAs expressando SHh. Análise estatística realizada por *One-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Bonferroni*. ** ρ<0.01

Através das imagens é possível observar a presença da proteína SHh distribuída uniformemente em todo o citoplasma celular nos tratamentos com o meio de diferenciação adipogênico (Fig. 30C) e os oxisteróis 7-KC e Triol (Fig. 30E-F) enquanto as células cultivas com meio DMEM *low glucose* (Fig. 30A), meio de diferenciação osteogênico (Fig. 30B) e Col (Fig. 30D) apresentam células com focos perinucleares de intensa fluorescência.

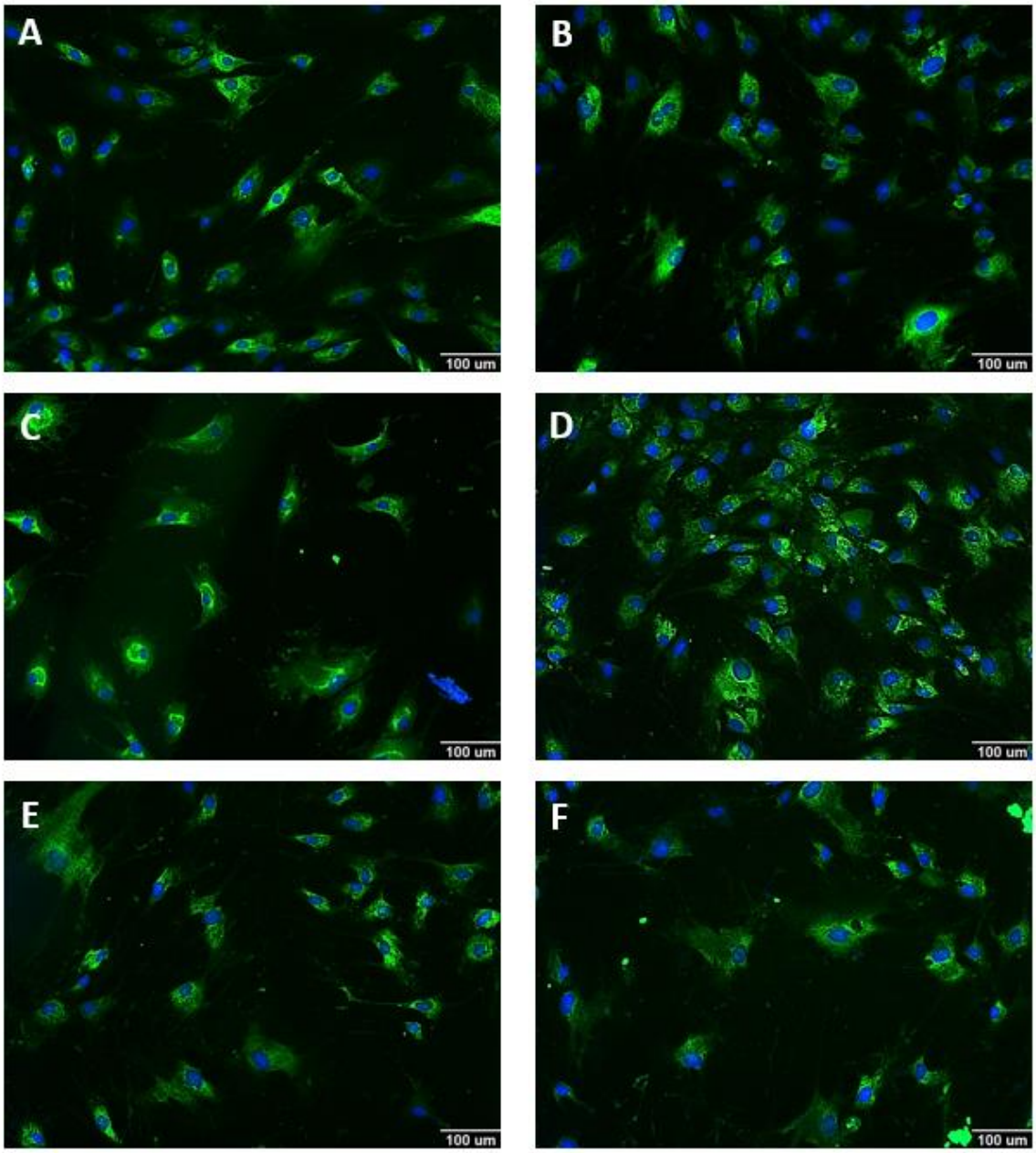

Figura 30. Avaliação da proteína SHh durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** DMEM *low glucose*. **B:** Meio osteogênico. **C:** Meio adipogênico. **D:** Col. **E:** 7-KC. **F:** Triol. Imagens representativas da intensidade de fluorescência pela expressão de SHh obtidas por *High Content ImageXpress*

4.8.3 Proteína Gli-3

A proteína Gli-3 também está envolvida na via de sinalização de SHh, foi avaliada a expressão desta proteína após 7 dias de tratamento com diferentes oxisteróis e meios de cultivo. Após análise observou-se que não houve alteração na intensidade de fluorescência da proteína Gli-3 na membrana/citoplasma e núcleo em nenhum dos tratamentos testados, também não houve alteração na porcentagem de células positivas para Gli-3 (Fig. 31).

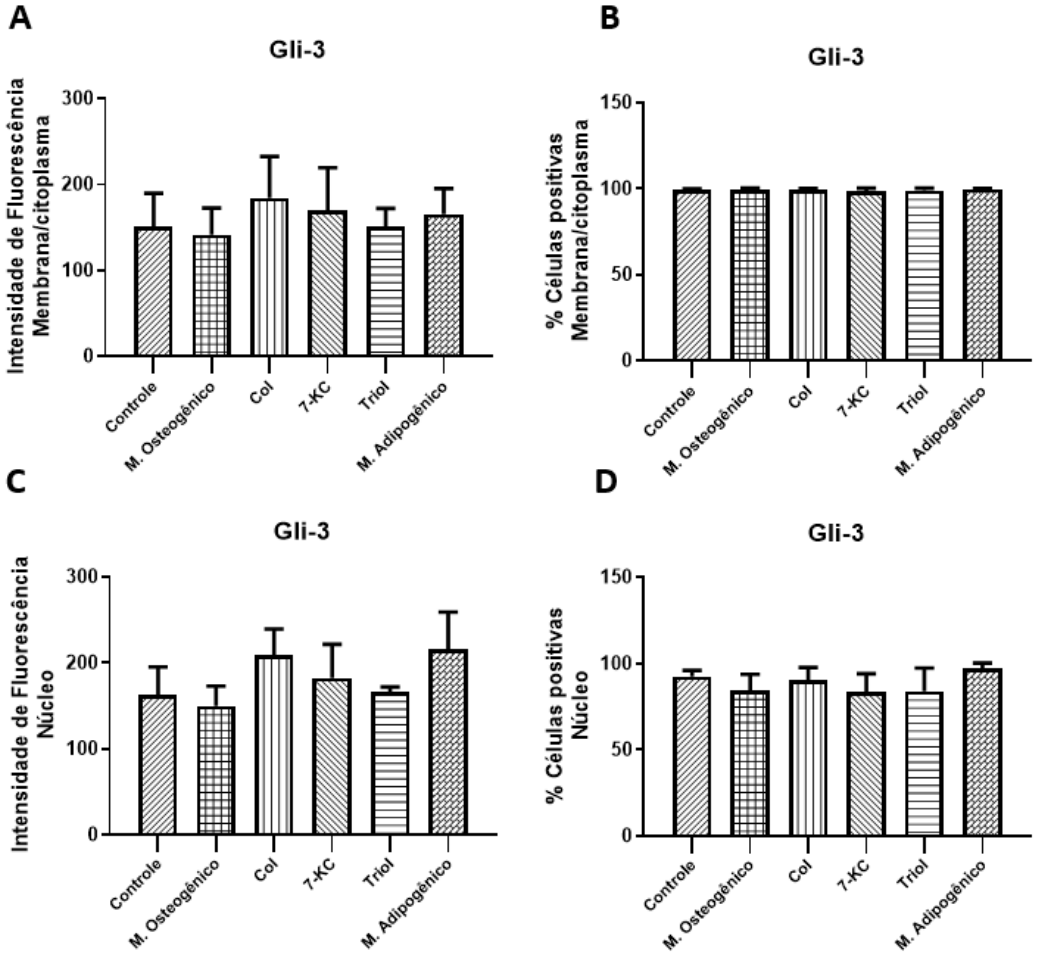

Figura 31. Avaliação da proteína Gli-3 durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** Média da intensidade de fluorescência da expressão de Gli-3 na membrana/citoplasma mensurado por imunofluorescência após diferentes tratamentos. **B:** Porcentagem de CTMTAs positivas para Gli-3 na membrana/citoplasma. **C:** Média da intensidade de fluorescência da expressão de Gli-3 no núcleo mensurado por imunofluorescência após diferentes tratamentos. **D:** Porcentagem de CTMTAs positivas para Gli-3 no núcleo. Análise estatística realizada por *One-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Bonferroni*

Ao observar as imagens da expressão da proteína Gli-3 após os diferentes tratamentos observamos a presença da Gli-3 distribuída uniformemente em todo o citoplasma celular com focos de intensa fluorescência na membrana celular (Fig. 32).

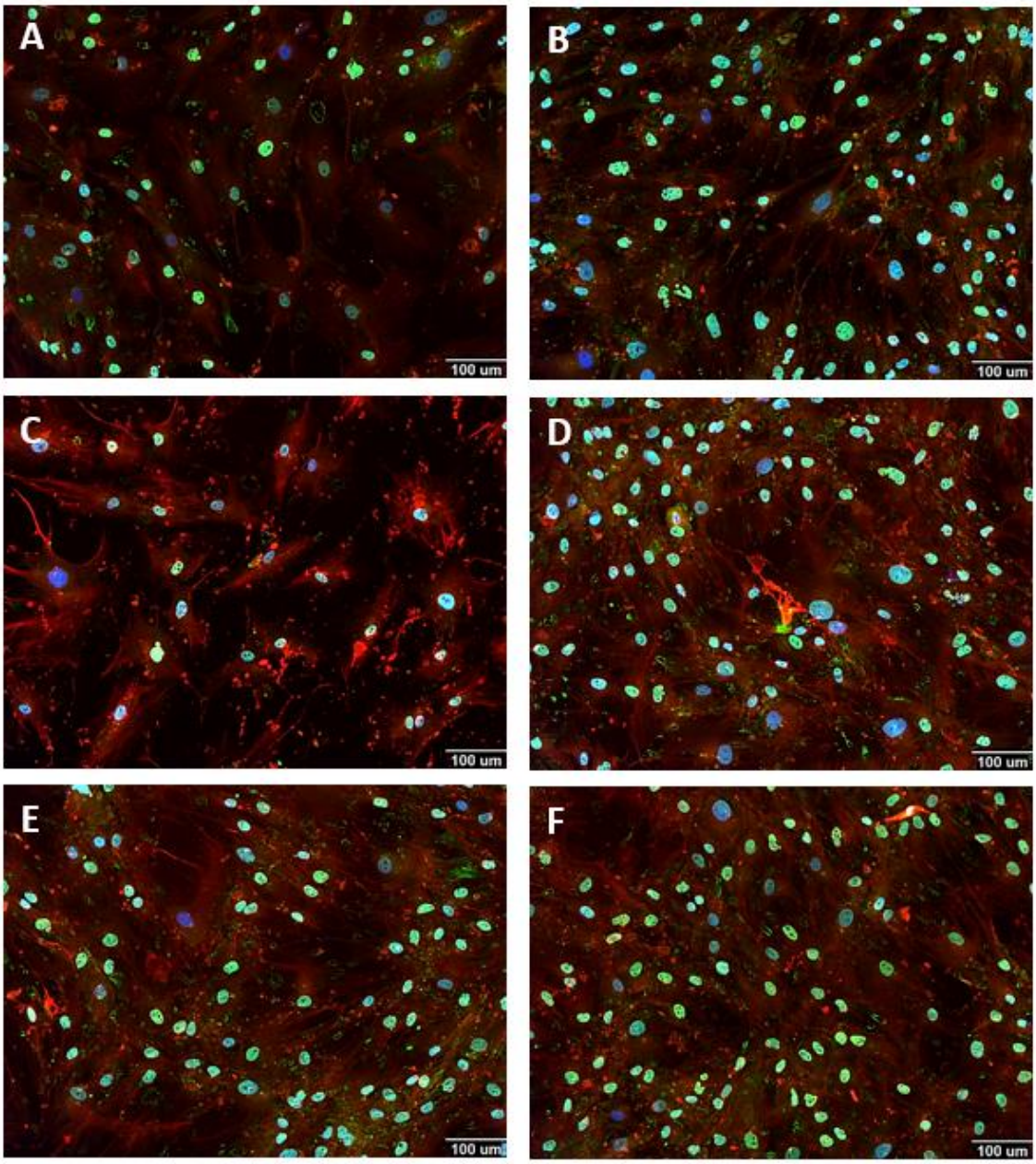

Figura 32. Avaliação da proteína Gli-3 durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** DMEM *low glucose*. **B:** Meio osteogênico. **C:** Meio adipogênico. **D:** Col. **E:** 7-KC. **F:** Triol. Imagens representativas da intensidade de fluorescência pela expressão de Gli-3 obtidas por *High Content ImageXpress*

4.8.4 Proteína β-catenina

Uma das vias de sinalização importantes para a diferenciação osteogênica é a via Wnt/β-catenina, avaliamos a expressão da β-catenina após indução da diferenciação através da análise da intensidade de fluorescência e porcentagem de células positivas para β-catenina.

Observou-se que o 7-KC aumentou a expressão da β-catenina na membrana/citoplasma quando comparado ao controle indiferenciado e as CTMTAs tratadas durante 7 dias com meio de diferenciação adipogênico ($\rho<0.05$) (Fig. 33A).

Avaliou-se a porcentagem das CTMTAs positivas para β-catenina na membrana/citoplasma. Através dos resultados pode-se observar que o meio de diferenciação osteogênico levou a um aumento do número de células positivas para β-catenina ($\rho<0.01$), assim como o Col ($\rho<0.05$), 7-KC ($\rho<0.01$) e Triol ($\rho<0.01$) quando comparado ao controle indiferenciado (Fig. 33B).

Ao comparar o número de células positivas para β-catenina na membrana/citoplasma durante a indução da diferenciação osteogênica com meio osteogênico específico ($P<0.01$), Col ($\rho<0.05$), 7-KC ($\rho<0.01$) e Triol ($\rho<0.05$) as CTMTAs tratadas com meio adipogênico é possível perceber que durante a diferenciação adipogênica houve um número menor de CTMTAs positivas para β-catenina (Fig. 33B).

Ao avaliar a intensidade de fluorescência da β-catenina no núcleo das CTMTAs observou-se que o 7-KC e Triol levaram a um aumento da expressão da β-catenina quando comparado ao controle indiferenciado e as CTMTAs induzidas a diferenciação adipogênica ($\rho<0.05$ – Fig. 33C).

Ao avaliar o número de células com núcleo positivo para β-catenina após sete dias de tratamento não foi detectado alteração significativa em nenhum dos tratamentos (Fig. 33D).

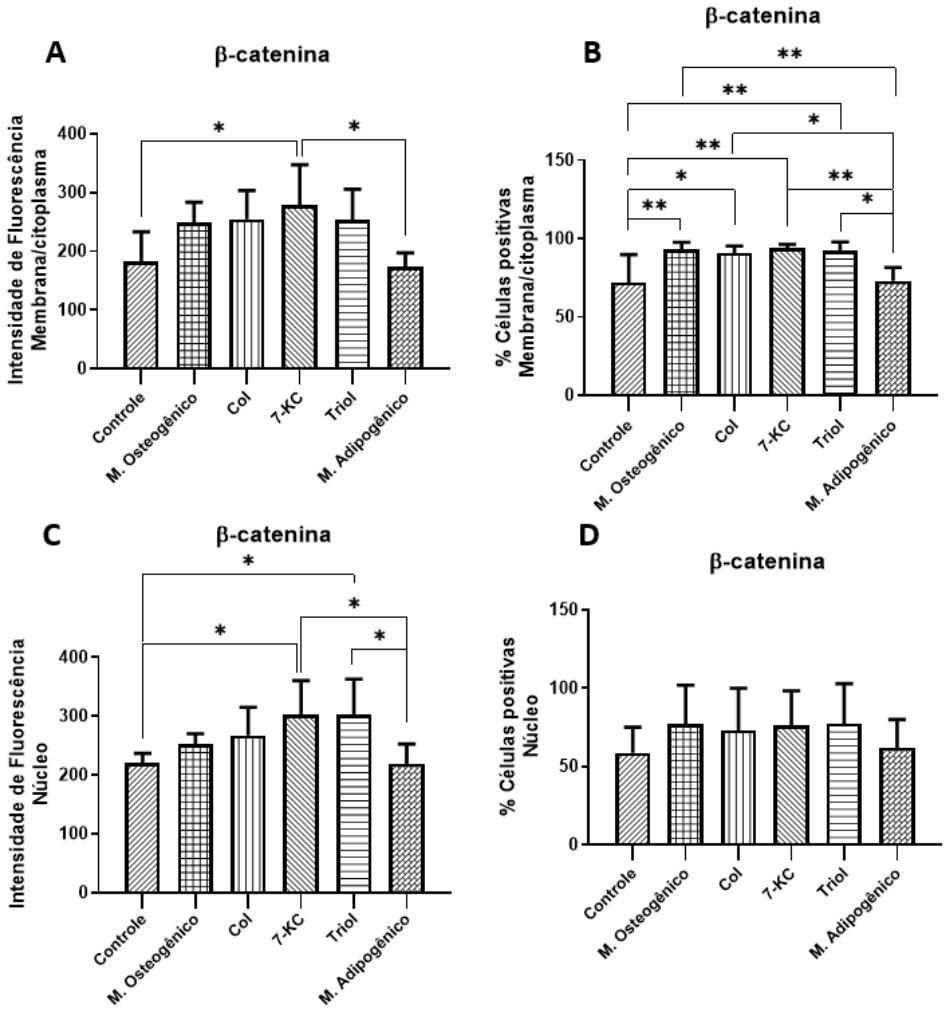

Figura 33. Avaliação da proteína β-catenina durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. **A:** Média da intensidade de fluorescência da expressão de β-catenina na membrana/citoplasma mensurado por imunofluorescência após diferentes tratamentos. **B:** Porcentagem de CTMTAs positivas para β-catenina na membrana/citoplasma. **C:** Média da intensidade de fluorescência da expressão de β-catenina no núcleo mensurado por imunofluorescência após diferentes tratamentos. **D:** Porcentagem de CTMTAs positivas para β-catenina no núcleo. Análise estatística realizada por *One-Way ANOVA* no *GraphPad Prism* com pós-teste de *Bonferroni*. * $\rho<0.05$; ** $\rho<0.01$

Ao observar as imagens é possível notar intensa fluorescência da β-catenina na membrana das CTMTAs principalmente após tratamento com Col (Fig. 34D) e 7-KC (Fig. 34E), é possível notar também pontos de marcação fluorescente no núcleo celular evidenciando a presença da β-catenina no núcleo das CTMTAs após tratamento com os oxisteróis (Fig. 34 E-F).

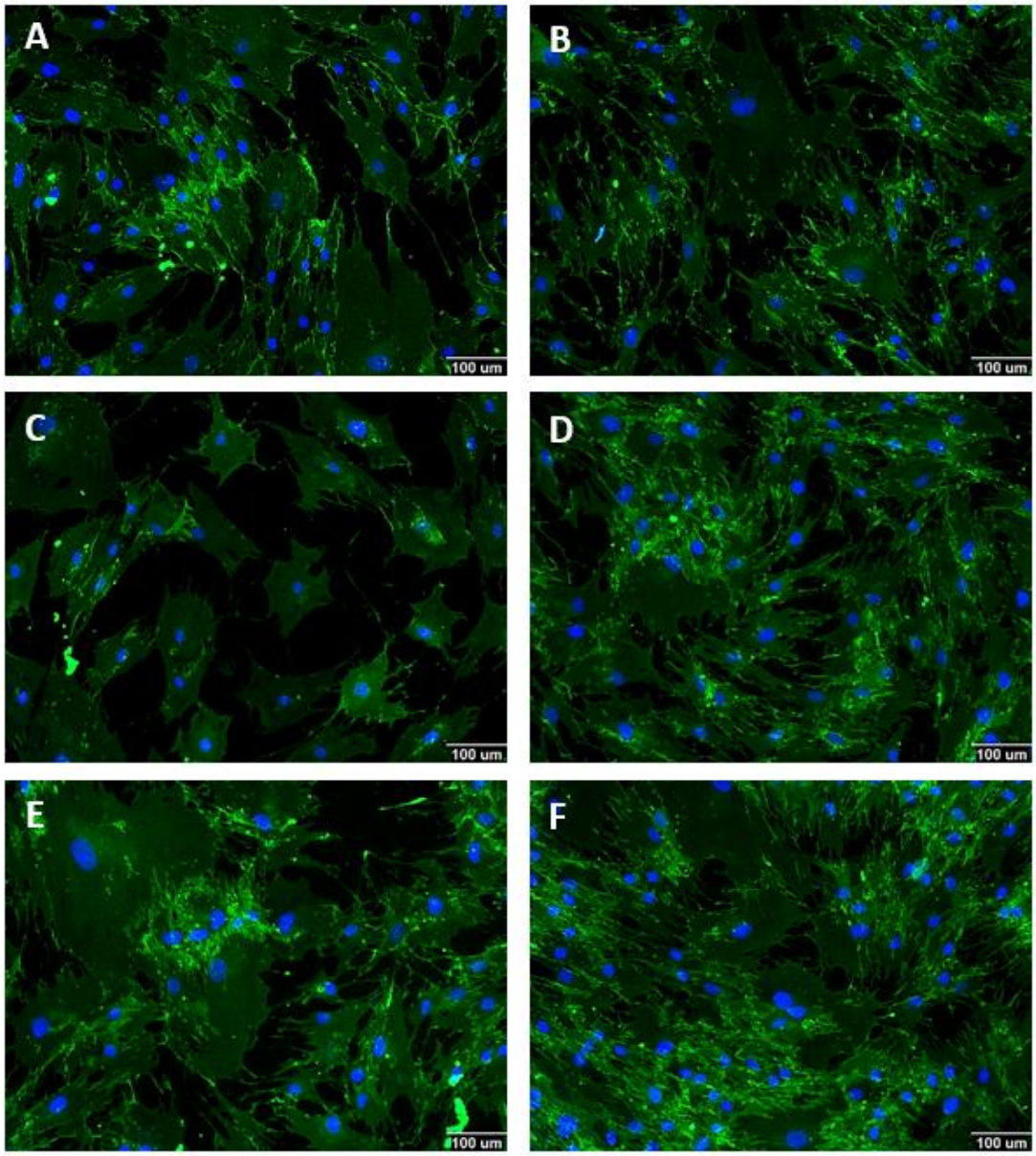

Figura 34. Avaliação da proteína β-catenina durante a indução da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis. A: DMEM *low glucose*. B: Meio osteogênico. C: Meio adipogênico. D: Col. E: 7-KC. F: Triol. Imagens representativas da intensidade de fluorescência pela expressão de β-catenina obtidas por *High Content ImageXpress*

5. Discussão

As CTMs são células indiferenciadas, multipotentes, com capacidade de diferenciação em linhagens mesodérmicas e não mesodérmicas conforme estímulo recebido, (BYDLOWSKI *et al.,* 2009; LEVY *et al.,* 2017) além de serem o tipo de CT mais utilizado na pesquisa com propósitos clínicos (LEVY *et al.,* 2017). Devido a sua característica multipotente e aplicabilidade terapêutica têm despertado o interesse de pesquisadores sobre os mecanismos envolvidos no processo de diferenciação celular.

Estudos recentes mostraram a ação de alguns oxisteróis na diferenciação de CTMs, principalmente no direcionamento da osteogênese, (BYDLOWSKI *et al.,* 2009; KHA *et al.,* 2004; LEVY *et al.,* 2017; SILVA *et al.,* 2016). Sendo proposto o uso de oxisteróis como uma alternativa em potencial para o tratamento de doenças ósseas, algo que atualmente ocorre através de BMPs (HOKUGO *et al.,* 2013). Uma melhor compreensão sobre a ação dos oxisteróis assim como do Col na diferenciação de CTMs é necessária para aprimoramento de estratégias que contribuam com a medicina regenerativa.

Diante dos relatos descritos, o presente estudo visou avaliar a ação dos oxisteróis 7-KC e Triol utilizando o Col como controle na indução da diferenciação osteogênica de CTMTAs em cinco períodos diferentes. As CTMTAs humanas foram isoladas de três pacientes saudáveis e caracterizadas conforme preconizado pela ISCT (DOMINICI *et al.,* 2006). A diferenciação das CTMTAs foi avaliada na presença e ausência de meio indutor de diferenciação específico combinado aos diferentes oxisteróis e ao Col.

Inicialmente, foi estabelecido o meio de diferenciação que seria utilizado no tratamento das CTMTAs. Bellows e colaboradores descreveram o uso de dexametasona, ácido ascórbico e β-glicerofosfato na diferenciação osteogênica *in vitro* em células de ratos (BELLOWS *et al.,* 1986). Desde então diversos protocolos vêm sendo testados com o intuito de otimizar a diferenciação osteogênica *in vitro* (BRAUER; POHLEMANN; METZGER, 2016).

Selecionamos dois protocolos descritos na literatura envolvidos na diferenciação de células derivadas do tecido adiposo, o protocolo descrito por Mambelli utilizado na diferenciação de células provenientes de equinos; e o protocolo descrito por Zuk utilizado em células humanas (MAMBELLI *et al.,* 2009; ZUK *et al.,* 2002). A concentração de soro fetal foi alterada para 20%, padrão este utilizado no cultivo e semeadura de nossas células.

Ambos os protocolos foram efetivos na diferenciação osteogênica, porém, o protocolo descrito por Zuk et al. (2002) apresentou coloração mais intensa pelo corante vermelho de alizarina. A diferença deste protocolo para o descrito por Mambelli et al. (2009) encontra-se na concentração de dexametasona, importante por estimular a proliferação celular, induzir a atividade da fosfatase alcalina além de possibilitar a formação de depósitos de fosfato de cálcio (COELHO; FERNANDES, 2000).

Conforme já descrito, alteramos a concentração de soro descrita nos protocolos para 20% e percebemos que esta concentração não foi prejudicial na indução da diferenciação osteogênica nas CTMTAs. Apesar de relatos na literatura que indicarem que baixas concentrações de soro favorecem a diferenciação osteogênica (SUEHIRO *et al.,* 2017), principalmente em células derivadas de tecido adiposo, em que o SFB interfere prejudicialmente na expressão de marcadores osteogênicos como a fosfatase alcalina (KYLLÖNEN *et al.,* 2013).

Diferentes meios também vêm sendo descritos na literatura para indução da diferenciação adipogênica (JANZ, 2010; KYLLÖNEN *et al.,* 2013; MAMBELLI *et al.,* 2009; ZUK *et al.,* 2002), utilizamos como referência os meios descritos por Mambelli e Zuk (MAMBELLI *et al.,* 2009; ZUK *et al.,* 2002) e verificamos que houve alta taxa de morte celular com estes tratamentos. Diminuímos a concentração de indometacina e percebemos que baixas concentrações de indometacina são suficientes para promoção da diferenciação adipogênica com alteração da morfologia celular e formação de vacúolos lipídicos citoplasmáticos.

A indometacina promove a diferenciação de adipócitos brancos e aumenta a diferenciação de pré-adipócitos marrons através da regulação da UCP1 e PPAR. A indometacina também age inibindo a diferenciação condrogênica (CARON *et al.,* 2017; HAO *et al.,* 2018). Para indução da diferenciação adipogênica utilizamos a concentração de 2% de SFB, a literatura descreve que o SFB atua aumentando a expressão de genes adipogênicos, sendo mais efetivo para diferenciação adipogênica do que para diferenciação osteogênica, portando, a concentração de 2% de SFB foi suficiente na promoção da adesão das CTMTAs ao plástico e diferenciação adipogênica (FANI *et al.,* 2016; SUEHIRO *et al.,* 2017).

Após padronização dos meios de diferenciação, foi avaliada a ação dos oxisteróis na indução da diferenciação osteogênica e adipogênica através de colorações. Para análise qualitativa da diferenciação celular foram utilizados os corantes tradicionalmente descritos na literatura. Um dos corantes utilizados foi o vermelho de alizarina, que evidencia a formação de cálcio e mineralização decorrentes da diferenciação osteogênica e o corante *Oil red O,* que realça a formação de vacúolos lipídicos citoplasmáticos (DOMINICI *et al.,* 2006).

Durante a indução da diferenciação adipogênica foram utilizados dois meios diferentes, o meio DMEM *high glucose* e também um meio de diferenciação adipogênico específico contendo DMEM *high glucose* e indutores de diferenciação ambos na presença e ausência de oxisteróis. Durante a indução da diferenciação adipogênica pelo uso de DMEM *high glucose* foi possível observar que este meio por si só provocou um leve arredondamento no citoplasma das CTMTAs, porém com coloração negativa para o corante *Oil Red O* após 14 dias de tratamento.

Existem informações divergentes na literatura a respeito da contribuição de altos níveis de glicose para indução da diferenciação adipogênica. Alguns trabalhos mostram que altos níveis de glicose favorecem a proliferação de pré-adipócitos, entretanto, outros relatam que a diferenciação adipogênica ocorre de forma igual independente dos níveis de glicose. Torna-se necessário, portanto, estudos mais aprofundados a respeito do tema para melhor elucidação desta questão (SORISKY, 2017).

Ao avaliar a ação da associação do meio DMEM *high glucose* e Col ou oxisteróis 7-KC e Triol percebeu-se que não houve formação de vacúolos lipídicos citoplasmáticos em nenhum dos tratamento testados, evidenciando que estes oxisteróis assim como o Col não foram capazes de induzir a diferenciação adipogênica. No tratamento com oxisteróis ou colesterol associado ao meio adipogênico específico observou-se que houve uma ação inibitória pelo oxisterol 7-KC neste processo de diferenciação. Isso foi evidenciado por um número menor de células diferenciadas, além de alta taxa de morte celular.

Estudos em CTMTAs mostram que a exposição destas células aos oxisteróis levam a uma diminuição da viabilidade celular tendo efeitos pró-apoptóticos (LEVY *et al.,* 2014; MURDOLO *et al.,* 2016; SILVA *et al.,* 2016), podendo ser uma justificativa a alta taxa de morte celular observada durante o período de diferenciação adipogênica, visto que é um tratamento crônico com duração de 14 dias. Um estudo que avaliou o efeito dos oxisteróis 7-KC e 7β-hydroxycholesterol em CTMTAs de pacientes com diabetes tipo 2 mostrou que estes oxisteróis apresentaram uma ação inibitória no processo adipogênico através da sinalização da via WNT e Proteino-quinases ativadas por mitógenos - MAP Quinase (*Mitogen Activated Protein Kinases* – MAPK) (MURDOLO *et al.,* 2016).

Para indução da diferenciação osteogênica também foram utilizados dois meios diferentes, sendo um deles o meio de cultivo DMEM *low glucose* e o meio de diferenciação osteogênico específico contendo DMEM *low glucose* e indutores de diferenciação, ambos na presença e ausência de oxisteróis. Através das análises dos resultados foi observado que os oxisteróis não tiveram ação na diferenciação quando utilizados em associação ao meio DMEM *low glucose* tendo coloração negativa para o corante vermelho de alizarina após 21 dias de tratamento.

Ao associar os oxisteróis ao meio de diferenciação osteogênico foi possível observar coloração intensa do vermelho de alizarina após tratamento com Col, 7-KC e Triol na indução da diferenciação. A literatura aponta uma ação dos oxisteróis como indutores da diferenciação de CTMs, destacando os

oxisteróis 22 (R)- ou 22(S)- e 20(S)-hydroxycholesterol como os oxisteróis mais estudados durante a indução osteogênica. 20(S)-hydroxycholesterol exerce um efeito osteogênico tanto *in vitro* quanto *in vivo*, capaz de induzir a formação óssea em CTMs derivadas da medula óssea. A ação conjunta do 22(R)- ou 22(S)- e 20(S)-hydroxycholesterol promove a atividade osteogênica pela ativação da sinalização Hh através de ativação indireta de Smo (DWYER *et al.,* 2007; KWON *et al.,* 2015; LEE *et al.,* 2017).

Apesar de estudos descreverem ação osteo-indutora a partir da combinação dos oxisteróis 22(R) ou 22(S) e 20 (S)-hydroxycholesterol *in vitro* e *in vivo* a literatura é escassa quanto aos mecanismos envolvidos na ativação da diferenciação osteogênica pelo uso de oxisteróis, havendo poucos relatos sobre a influência do 7-KC e Triol nestes processos (KWON et al., 2015). Com o intuito de avaliar a ação dos oxisteróis e Col quantitativamente na indução da diferenciação, foi realizada a análise do potencial de membrana mitocondrial e também de genes osteogênicos e adipogênicos após diferentes tratamentos.

Estudos com células-tronco embrionárias mostraram envolvimento mitocondrial na osteogênese induzida por oxisteróis, indicando aumento na produção de ATP e espécies reativas de oxigênio, foram detectados também marcadores de biogênese mitocondrial, bem como proteínas de potencial de membrana (KWON *et al.,* 2015). Na adipogênese, estudos indicam um aumento do consumo de oxigênio e consequente remodelamento mitocondrial para suprir este aumento na demanda de oxigênio (FORNI *et al.,* 2016).

Diante disto, avaliamos a ação do 7-KC e Triol no potencial de membrana mitocondrial, utilizando o Col como controle. Através de nossos resultados não foi possível observar alterações no potencial de membrana mitocondrial após indução da diferenciação osteogênica e adipogênica. Apesar de não haver alteração no potencial de membrana, observamos mitocôndrias localizadas de forma mais perinuclear após indução da diferenciação.

Sabe-se que a dinâmica e morfologia mitocondrial são fatores importantes tanto na manutenção da homeostase dos tecidos como no destino das CTMs, sendo descritos como eventos que direcionam a diferenciação e

não como consequência deste processo (FORNI *et al.,* 2016; LI *et al.,* 2017). Estudos com células murinas indicam que quando comparado as células indiferenciadas as células comprometidas com a osteogênese e adipogênese tem aumento da massa mitocondrial com morfologia mais alongada (FORNI *et al.,* 2016).

A literatura mostra que CTMs humanas derivadas da medula óssea apresentam mitocôndrias localizadas de forma mais perinuclear em células indiferenciadas tornando-se mais uniformemente localizadas no citoplasma em células diferenciadas (LI *et al.,* 2017). Nossos resultados apresentaram característica diferente do previamente descrito, com um grande número de agregados mitocondriais localizados ao redor do núcleo das células diferenciadas, uma possível explicação para a característica perinuclear das mitocôndrias em nossas células poderia ser a fonte de obtenção, visto que utilizamos CTMs derivadas de tecido adiposo.

Seguimos com as avaliações moleculares após indução da diferenciação, Kulterer e colaboradores descreveram três fases distintas de desenvolvimento durante a diferenciação osteogênica utilizando CTMs derivadas da medula óssea, sendo estas fases: fase de proliferação de 0 a 4 dias; fase de maturação da matriz de 4 a 14 dias e fase de mineralização de 14 a 21 dias (KULTERER *et al.,* 2007), descrevendo um aumento da expressão de marcadores de diferenciação inicial como ALPL a partir do 4º dia de indução da diferenciação.

A *ALPL* é um marcador ósseo conhecido utilizado no diagnóstico da capacidade de formação óssea na osteoporose (LIU *et al.,* 2018). Foi avaliada a expressão de *ALPL* assim como do marcador de diferenciação inicial *RUNX2* após tratamento com oxisteróis e Col. As CTMTAs cultivadas apenas com meio osteogênico apresentaram aumento da expressão da *ALPL* a partir do 4º dia e de *RUNX2* a partir do 7º dia. O Col demonstrou ter uma ação antecipatória na expressão do gene *RUNX2*, demonstrando aumento a partir do 4º dia de tratamento.

Devido à grande importância do Col em processos fisiológicos tem-se estudado sua ação na diferenciação celular. Estudos mostram que altos níveis de Col e LDL-colesterol (*low density lipoprotein* - lipoproteína de baixa densidade) estão relacionados a baixa densidade mineral óssea (MANDAL, 2015). Li e colaboradores descrevem que níveis fisiológicos de Col endógeno são importante para a diferenciação osteogênica através da sinalização de Hh, enquanto o Col exógeno inibe este processo de diferenciação em células estromais derivadas da medula óssea (LI *et al.,* 2018). Os resultados apresentados no decorrer do presente estudo confirmam o envolvimento do Col na diferenciação osteogênica.

O 7-KC exerceu ação antecipatória na expressão dos marcadores de diferenciação inicial *RUNX2* e *ALPL* aumentando sua expressão a partir do 2º dia de tratamento e 3 horas após indução da diferenciação respectivamente. 7-KC tem sido descrito como um dos oxisteróis mais importantes presente em altos níveis de oxLDL (*oxidized low-density lipoprotein* – lipoproteína de baixa densidade oxidada). Sabe-se que o 7-KC está envolvido em diversos processos fisiopatológicos como estresse oxidativo, morte celular, diferenciação de mastócitos, além de ser um modulador da diferenciação adipogênica conforme anteriormente descrito (LEVY *et al.,* 2014; MURDOLO *et al.,* 2016; SILVA *et al.,* 2016).

Neste trabalho foi avaliada a ação do oxisterol Triol nos marcadores de diferenciação inicial, porém, houve aumento da expressão do gene *ALPL* apenas no 4º dia de indução da diferenciação seguido por um declínio significativo. O Triol não foi capaz de aumentar a expressão de *RUNX2* em nenhum dos períodos testados. Estudos com CTMs derivadas da medula óssea de ratos demonstraram a ação anti-osteogênica do oxisterol Triol. O Triol é um dos oxisteróis mais angiotóxicos dentre os testados, com capacidade de inibir a diferenciação osteogênica através da diminuição da expressão da *ALPL*, diminuição da secreção de OCN e mineralização da matriz, além de induzir apoptose celular (LIU *et al.,* 2005). As avaliações realizadas durante os 5 períodos abordados neste estudo corroboram com o descrito na literatura.

Foi selecionado o gene *BGLAP* como marcador de diferenciação osteogênica tardia a ser avaliado nas CTMTAs após os diferentes tratamentos. Após comprometimento com a linhagem osteogênica as células passam a expressar proteínas de matriz óssea em diferentes níveis de acordo com o grau de maturação em que se encontram (KOMORI, 2019). Após indução da diferenciação com Col foi observado aumento da expressão de *BGLAP* apenas no 4º dia. O 7-KC e Triol não foram capazes de aumentar a expressão de *BGLAP* em nenhum dos períodos avaliados, sugerindo que os oxisteróis testados não foram capazes de induzir a mineralização da matriz e diferenciação em osteoblastos maduros.

BGLAP é o gene que codifica a OCN, uma hipótese sobre a baixa expressão de *BGLAP* nas CTMTAs seria a diminuição nos níveis de insulina. A OCN é considerada um dos principais genes responsivos a insulina presente em osteoblastos (ZOCH; CLEMENS; RIDDLE, 2016). A literatura descreve uma relação entre os níveis de OCN e insulina, sendo que a liberação da OCN é aumentada pela insulina e concomitantemente a OCN estimula a secreção de insulina (BILOTTA *et al.,* 2018).

O 7-KC assim como a LDL oxidada tem sido relacionados a resistência à insulina (MURDOLO *et al.,* 2013; WAMIL *et al.,* 2008). Experimentos utilizando a linhagem MG-63 (células semelhantes a osteoblastos humanos) evidenciou que a resistência à insulina assim como altas concentrações de glicose inibem a expressão de OCN (BILOTTA *et al.,* 2018). Outro fator importante que influencia os níveis de insulina é a expressão de *PPAR*γ*.* Existe um consenso sobre a importância do *PPAR*γ na sensibilidade a insulina (FERRE, 2004) e este gene também é modulado pela ação dos oxisteróis.

Estudos mostram que existe um equilíbrio entre a indução da adipogênese e osteogênese e entre expressão e inibição de genes envolvidos neste processo conforme mencionado, sugerindo que o *PPAR*γ tem uma ação pró-adipogênica e anti-osteogênica. Devido a esta relação de equilíbrio foram selecionados dois genes adipogênicos importantes para avaliação, o gene *PPAR*γ e *C/EBP*α*.* O gene *PPAR*γ se encontra em abundância no tecido

adiposo branco e marrom, além de ser um regulador da diferenciação adipogênica por sua ação em conjunto com *C/EBP* (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016).

A literatura descreve que a expressão da *ALPL* aumenta durante a diferenciação osteogênica antes de uma diminuição na fase de mineralização, mas esse aumento da *ALPL* ocorre de maneira semelhante durante a diferenciação adipogênica (VAN DE PEPPEL *et al.,* 2017). Através dos resultados obtidos por meio dos diferentes tratamentos nas CTMTAs, observa-se que durante a diferenciação osteogênica também ocorre um aumento da expressão de marcadores adipogênicos como *PPAR*γ e *C/EBP*α quando comparado as células indiferenciadas.

A comparação entre a expressão dos genes *PPAR*γ e *C/EBP*α durante a diferenciação osteogênica e adipogênica demonstrou que a expressão destes genes é significativamente maior durante a indução adipogênica quando comparado a osteogênica, porém, após tratamento com oxisteróis e Col notou-se que houve uma inibição da expressão destes marcadores, confirmando a ação anti-adipogênica dos oxisteróis anteriormente descrita.

Foram selecionadas duas das principais vias de sinalização envolvidas na diferenciação de CTMs, a via de sinalização SHh e via de sinalização Wnt/β-catenina. A literatura descreve a importância de ambas as vias na indução da expressão de genes osteogênicos como *ALPL* e *RUNX2* (MIDHA; MURAB; GHOSH, 2016) e alguns relatos sugerem uma relação cruzada entre as duas vias de sinalização (KWON *et al.,* 2015; MIDHA; MURAB; GHOSH, 2016; SONG *et al.,* 2015).

O efeito osteogênico do oxisterol 22(S)-hydroxycholesterol está relacionada a ativação da via de sinalização Hh, os oxisteróis Oxy34 e Oxy49 também foram descritos por sua ação osteogênica através da ativação desta via de sinalização, além destes oxisteróis, a literatura descreve a inibição da diferenciação adipogênica em fibroblastos embrionários pela ativação da via Hh através do oxisterol Oxy133 (LEVY *et al.,* 2017).

Os resultados da imunofluorescência indireta demonstraram que o Col assim como os oxisteróis 7-KC e Triol não foram capazes de aumentar a expressão de SHh nas CTMTAs. Esta falta de resposta do SHh ao Col e oxisteróis 7-KC e Triol foi descrita na literatura em estudo com células de câncer de mama humano (LEVY *et al.,* 2019). Os oxisteróis testados e Col também não foram capazes de aumentar expressão de Smo e Gli-3 após 7 dias de tratamento.

Com o intuito de avaliar a via canônica de sinalização por Wnt foi estudada a proteína β-catenina após 7 dias de tratamento. De acordo com os resultados apresentados o 7-KC induziu o aumento da expressão da β-catenina nuclear e citoplasmática após o período de 7 dias, enquanto o oxisterol Triol aumentou apenas a expressão da β-catenina nuclear. Ao avaliar o número de células positivas para β-catenina na membrana/citoplasma percebe-se que tanto o Col como os oxisteróis 7-KC e Triol aumentaram o número de células positivas.

A literatura sugere que os oxisteróis promovam a diferenciação osteogênica e inibam a diferenciação adipogênica através da inibição de Dickkopf-1 (DKK-1) (MANDAL, 2015). A família de proteínas DKK consiste em 4 membros e tem ação moduladora na via de sinalização Wnt/β-catenina (AMANTEA *et al.,* 2008; BAETTA; BANFI, 2019). A ação da proteína DKK-1 se dá pelo bloqueio da ligação de Wnt ao seu receptor LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein) 5 ou 6 (BAETTA; BANFI, 2019). DKK-1 se liga e remove o LRP5/6 da superfície celular por endocitose impedindo a sinalização de Wnt/β-catenina (AMANTEA *et al.,* 2008).

Em suma, os oxisteróis avaliados neste estudo foram capazes de aumentar a expressão da β-catenia, inclusive o Triol, fato interesse devido a sua baixa atividade durante a indução da expressão de marcadores osteogênicos como *ALPL*, *RUNX2* e *BGLAP*, algo a ser melhor estudado para maior entendimento quanto a ação anti-osteogênica do oxisterol Triol. Maiores estudos a respeito da ação do 7-KC e Col nas vias de sinalização durante a

diferenciação CTMs também devem ser realizados devido a sua ação potencial na indução osteogênica.

6. Conclusões

De acordo com os resultados, pode-se afirmar que os oxisteróis exercem funções distintas na diferenciação de CTMs.

Tanto o colesterol quanto o 7-cetocolesterol foram capazes de antecipar a fase de maturação da matriz óssea pelo aumento da expressão dos genes *ALPL* e *RUNX2*. Estes efeitos podem ser atribuídos a ativação da via de sinalização Wnt/β-catenina.

O oxisterol Triol teve efeito sobre a β-catenina; porém, teve sua atividade na indução da expressão de genes osteogênicos foi pequena, confirmando sua ação anti-osteogênica.

Conclui-se que durante a diferenciação osteogênica ocorre um aumento da expressão de genes adipogênicos, não tão acentuado quanto o que ocorre durante a indução da diferenciação adipogênica. Além disto, os oxisteróis exercem um efeito inibitório durante o processo de diferenciação adipogênica por sua ação na via Wnt/β-catenina.

Apenas o colesterol foi capaz de aumentar a expressão de *BGLAP*. O 7-KC e Triol não tiveram efeito na expressão deste gene; como consequência, não foram eficazes na indução da fase de mineralização óssea, sugerindo que não são capazes de levar à diferenciação final e maturação de osteoblastos, pelo menos no período estudado.

Estes resultados iniciais são promissores em relação ao potencial de utilização destes oxisteróis como agentes de indução osteogênica na medicina regenerativa.

7. Referências

ALMALKI, S. G.; AGRAWAL, D. K. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. **Differentiation**, v. 92, n. 1–2, p. 41–51, 2016.

AMANTEA, C. M. et al. Oxysterol-induced osteogenic differentiation of marrow stromal cells is regulated by Dkk-1 inhibitable and PI3-kinase mediated signaling. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 2, p. 424–436, 1 out. 2008.

AUGELLO, A.; DE BARI, C. The Regulation of Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. **Human Gene Therapy**, v. 21, n. 10, p. 1226–1238, out. 2010.

AVAL, S. F. et al. The effect of ketorolac and triamcinolone acetonide on adipogenic and hepatogenic differentiation through miRNAs 16/15/195: Possible clinical application in regenerative medicine. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, n. September 2017, p. 675–683, 2018.

BAETTA, R.; BANFI, C. Dkk (Dickkopf) Proteins. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, p. 1–13, 2019.

BATEMAN, M. E. et al. The effects of endocrine disruptors on adipogenesis and osteogenesis in mesenchymal stem cells: A review. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. JAN, p. 1–12, 2017.

BELLOWS, C. G. et al. Mineralized bone nodules formedin vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. **Calcified Tissue International**, v. 38, n. 3, p. 143–154, maio 1986.

BILOTTA, F. L. et al. Insulin and osteocalcin: Further evidence for a mutual cross-talk. **Endocrine**, v. 59, n. 3, p. 622–632, 2018.

BJÖRKHEM, I.; DICZFALUSY, U. Oxysterols: Friends, foes, or just fellow passengers? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 5, p. 734–742, 2002.

BRAUER, A.; POHLEMANN, T.; METZGER, W. Osteogenic differentiation of immature osteoblasts: Interplay of cell culture media and supplements. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 91, n. 3, p. 161–169, 2 abr. 2016.

BROWN, A. J.; JESSUP, W. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 3, p. 111–122, 2009.

BUCHET, R.; MILLÁN, J. L.; MAGNE, D. Multisystemic Functions of Alkaline

Phosphatases. In: [s.l: s.n.]. p. 27–51.

BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25–35, 2009.

CARON, M. M. J. et al. Indomethacin induces differential effects on in vitro endochondral ossification depending on the chondrocyte's differentiation stage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 35, n. 4, p. 847–857, abr. 2017.

CLEVERS, H.; LOH, K. M.; NUSSE, R. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. **Science**, v. 346, n. 6205, 2014.

COELHO, M. .; FERNANDES, M. . Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. **Biomaterials**, v. 21, n. 11, p. 1095–1102, jun. 2000.

COHEN, M. M. The Hedgehog Signaling Network*. **Epstein's Inborn Errors of Development**, v. 28, n. April, p. 270–277, 2016.

COMPTON, J. T.; LEE, F. Y. Current concepts review: A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. **Journal of Bone and Joint Surgery - American Volume**, v. 96, n. 19, p. 1659–1668, 2014.

CONGET, P. A.; MINGUELL, J. J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 181, n. 1, p. 67–73, 1999.

CROWLEY, L. C.; CHRISTENSEN, M. E.; WATERHOUSE, N. J. Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 12, p. pdb.prot087361, 1 dez. 2016.

DE FRANCESCO, F. et al. Human Adipose Stem Cells: From Bench to Bedside. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 21, n. 6, p. 572–584, 2015.

DE SÁ, P. M. et al. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017. p. 635–674.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. **Ceres**, v. 56, n. 4, p. 446–450, 2009.

DING, S.; SCHULTZ, P. G. A role for chemistry in stem cell biology. **Nature**

Biotechnology, v. 22, n. 7, p. 833–840, 2004.

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

DU, X.; TURNER, N.; YANG, H. The role of oxysterol-binding protein and its related proteins in cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 81, p. 149–153, set. 2018.

DWYER, J. R. et al. Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8959–8968, 2007.

EDWARDS, P. A. et al. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1529, n. 1–3, p. 103–113, 2000.

ESTEVE RÀFOLS, M. Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. **Endocrinología y Nutrición (English Edition)**, v. 61, n. 2, p. 100–112, 2014.

FANI, N. et al. Comparative epigenetic influence of autologous versus fetal bovine serum on mesenchymal stem cells through in vitro osteogenic and adipogenic differentiation. **Experimental Cell Research**, v. 344, n. 2, p. 176–182, jun. 2016.

FAVAROLO, M. B.; LÓPEZ, S. L. Notch signaling in the division of germ layers in bilaterian embryos. **Mechanisms of Development**, p. #pagerange#, 2018.

FERRE, P. The Biology of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Relationship With Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity. **Diabetes**, v. 53, n. Supplement 1, p. S43–S50, 1 fev. 2004.

FERREIRA DE SOUZA, V. et al. Células-tronco: uma breve revisão. **R. Ci. méd. biol., Salvador**, v. 2, n. 2, p. 251–256, 2003.

FORNI, M. F. et al. Murine Mesenchymal Stem Cell Commitment to Differentiation Is Regulated by Mitochondrial Dynamics. **STEM CELLS**, v. 34, n. 3, p. 743–755, mar. 2016.

FORTE, A. **Expansão ex vivo das células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical: análise comparativa da proliferação celular em cocultura de células-troco mesenquimais provenientes do endotélio vascular do cordão umbilical e do tecido adiposo**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 10 dez. 2014.

FRANK, V. et al. Frequent mechanical stress suppresses proliferation of mesenchymal stem cells from human bone marrow without loss of multipotency. **Scientific Reports**, v. 6, n. July 2015, p. 1–12, 2016.

GEMMIS, P. DE et al. A Real-Time PCR Approach to Evaluate Adipogenic Potential of Amniotic Fluid-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 15, n. 5, p. 719–728, out. 2006.

GIMBLE, J. M.; KATZ, A. J.; BUNNELL, B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Circulation Research**, v. 100, n. 9, p. 1249–1260, 2007.

GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. Understanding Adipocyte Differentiation. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 3, p. 783–809, 1998.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. **Elsevier Editora Ltda**, n. 11, p. 11, 2006.

HAFIDI, M. EL et al. Adipogenesis: A Necessary but Harmful Strategy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3657, 26 jul. 2019.

HAO, L. et al. Indomethacin Enhances Brown Fat Activity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 365, n. 3, p. 467–475, jun. 2018.

HILL, P. A. Bone remodelling. **British Journal of Orthodontics**, v. 25, n. 2, p. 101–107, 16 maio 1998.

HOKUGO, A. et al. In vitro study of a novel oxysterol for osteogenic differentiation on rabbit bone marrow stromal cells. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 132, n. 1, p. 70–80, 2013.

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

HSIEH, C. H. et al. Norcantharidin, derivative of cantharidin, for cancer stem cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

HU, L. et al. Mesenchymal stem cells: Cell fate decision to osteoblast or adipocyte and application in osteoporosis treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 2018.

JANZ, F. Características de expansão, diferenciação e criopreservação de

células-tronco mesenquimais obtidas do líquido amniótico no segundo trimestre de gestação. **Rev Bras Hematologia e Hemoterapia**, v. 6, p. 495–496, 2010.

KHA, H. T. et al. Oxysterols Regulate Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Pro-Bone and Anti-Fat. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 5, p. 830–840, 12 jan. 2004.

KIM, W. K. et al. 20(S)-hydroxycholesterol inhibits PPARγ expression and adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells through a hedgehog-dependent mechanism. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 11, p. 1711–1719, 2007.

KOMATI, R. et al. Ligands of therapeutic utility for the liver X Receptors. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1–24, 2017.

KOMORI, T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1694, 2019.

KULIG, W. et al. Cholesterol oxidation products and their biological importance. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 199, p. 144–160, 2016.

KULTERER, B. et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. **BMC Genomics**, v. 8, p. 1–15, 2007.

KWON, I. K. et al. Mitochondrial function contributes to oxysterol-induced osteogenic differentiation in mouse embryonic stem cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1853, n. 3, p. 561–572, 2015.

KYLLÖNEN, L. et al. Effects of different serum conditions on osteogenic differentiation of human adipose stem cells in vitro. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 1, p. 17, 2013.

LANGENBACH, F.; HANDSCHEL, J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and ?-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 5, p. 117, 2013.

LEE, A. J.; HODGES, S.; EASTELL, R. Measurement of osteocalcin. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 432–446, 2000.

LEE, J.-S. et al. Evaluating the oxysterol combination of 22(S)-hydroxycholesterol and 20(S)-hydroxycholesterol in periodontal regeneration using periodontal ligament stem cells and alveolar bone healing models. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 276, 6 dez. 2017.

LEITE, A. V.; VASCONCELOS, B. C. DO E. Células-tronco e engenharia tecidual: perspectivas de aplicação em odontologia. **Revista de Ciências Médicas**, v. 16, n. 1, p. 23–30, 2007.

LEVY, D. et al. Short-term effects of 7-ketocholesterol on human adipose tissue mesenchymal stem cells in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, n. 3, p. 720–725, 2014.

LEVY, D. et al. Oxysterols and mesenchymal stem cell biology. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 223–230, 2017.

LEVY, D. et al. 7-Ketocholesterol and cholestane-triol increase expression of SMO and LXRα signaling pathways in a human breast cancer cell line. **Biochemistry and Biophysics Reports**, n. December, p. 0–1, 2019.

LEYENDECKER JUNIOR, A. et al. The use of human dental pulp stem cells for in vivo bone tissue engineering: A systematic review. **Journal of Tissue Engineering**, v. 9, p. 204173141775276, 2018.

LI, K. et al. A dual role of cholesterol in osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. **Journal of Cellular Physiology**, 14 out. 2018.

LI, Q. et al. The role of mitochondria in osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Protein & Cell**, v. 8, n. 6, p. 439–445, 2017.

LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, v. 84–A, n. 6, p. 1032–44, jun. 2002.

LIU, H. et al. Cholestane-3β,5α,6β-triol inhibits osteoblastic differentiation and promotes apoptosis of rat bone marrow stromal cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 96, n. 1, p. 198–208, 1 set. 2005.

LIU, W. et al. Alpl prevents bone ageing sensitivity by specifically regulating senescence and differentiation in mesenchymal stem cells. **Bone Research**, v. 6, n. 1, p. 27, 11 dez. 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LOK, Z. S. Y.; LYLE, A. N. Osteopontin in Vascular Disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 39, n. 4, p. 613–622, 2019.

LUO, Z. et al. Notch Signaling in Osteogenesis, Osteoclastogenesis, and

Angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 189, n. 8, p. 1495–1500, ago. 2019.

LUU, W. et al. Oxysterols: Old Tale, New Twists. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 56, n. 1, p. 447–467, 2016.

MAMBELLI, L. I. et al. Characterization of Equine Adipose Tissue–Derived Progenitor Cells Before and After Cryopreservation. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 15, n. 1, p. 87–94, 2009.

MANDAL, C. C. High cholesterol deteriorates bone health: New insights into molecular mechanisms. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, n. OCT, p. 1–11, 2015.

MARUYAMA, Z. et al. Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. **Developmental Dynamics**, v. 236, n. 7, p. 1876–1890, 2007.

MATSUO, K.; IRIE, N. Osteoclast–osteoblast communication. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 201–209, maio 2008.

MIDHA, S.; MURAB, S.; GHOSH, S. Osteogenic signaling on silk-based matrices. **Biomaterials**, v. 97, p. 133–153, 2016.

MILLS, K. M.; SZCZERKOWSKI, J. L. A.; HABIB, S. J. Wnt ligand presentation and reception: From the stem cell niche to tissue engineering. **Open Biology**, v. 7, n. 8, 2017.

MONTGOMERY, S. R. et al. A novel osteogenic oxysterol compound for therapeutic development to promote bone growth: Activation of hedgehog signaling and osteogenesis through smoothened binding. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 29, n. 8, p. 1872–1885, 2014.

MOSETI, D.; REGASSA, A.; KIM, W. K. Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, p. 1–24, 2016.

MURDOLO, G. et al. Lipokines and oxysterols: Novel adipose-derived lipid hormones linking adipose dysfunction and insulin resistance. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 811–820, 2013.

MURDOLO, G. et al. Free Radical-derived Oxysterols: Novel Adipokines Modulating Adipogenic Differentiation of Adipose Precursor Cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, n. 12, p. 4974–4983, dez. 2016.

MUTEMBEREZI, V.; GUILLEMOT-LEGRIS, O.; MUCCIOLI, G. G. Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators. **Progress in Lipid Research**, v. 64, p. 152–169, 2016.

NAKAMURA, T. et al. Induction of osteogenic differentiation by hedgehog proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 237, n. 2, p. 465–469, 1997.

NARAYANAN, A. et al. Regulation of Runx2 by MicroRNAs in osteoblast differentiation. **Life Sciences**, v. 232, p. 116676, set. 2019.

NUTTALL, M. E.; GIMBLE, J. M. Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? **Bone**, v. 27, n. 2, p. 177–184, 2000.

OLKKONEN, V. M.; BÉASLAS, O.; NISSILÄ, E. Oxysterols and Their Cellular Effectors. **Biomolecules**, v. 2, n. 1, p. 76–103, 15 fev. 2012.

OLKKONEN, V. M.; LI, S. Oxysterol-binding proteins: Sterol and phosphoinositide sensors coordinating transport, signaling and metabolism. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 529–538, out. 2013.

OREFFO, R. O. C. et al. Mesenchymal stem cells lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. **Stem Cell Reviews**, v. 1, n. 2, p. 169–178, 2005.

OZKUL, Y.; GALDERISI, U. The Impact of Epigenetics on Mesenchymal Stem Cell Biology. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 11, p. 2393–2401, nov. 2016.

PANDO, A. et al. Extracellular vesicles in leukemia. **Leukemia Research**, v. 64, p. 52–60, jan. 2018.

PANG, X. et al. Osteopontin as a Multifaceted Driver of Bone Metastasis and Drug Resistance. **Pharmacological Research**, 2019.

PARKER, G. C. et al. Stem cells: shibboleths of development. **Stem cells and development**, v. 13, n. 6, p. 579–584, 2004.

PERRY, S. W. et al. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. **BioTechniques**, v. 50, n. 2, p. 98–115, fev. 2011.

PINTO NETO, A. M. et al. Consenso brasileiro de osteoporose 2002. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 42, n. 6, p. 343–354, 2002.

PROCKOP, D. J. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 71–74, 1997.

RATHER, H. A.; JHALA, D.; VASITA, R. Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 103, p. 109761, out. 2019.

REINHOLT, F. P. et al. Osteopontin-a possible anchor of osteoclasts to bone (bone matrix proteins/cell adhesion/vitronectin receptor). **Cell Biology**, v. 87, n. June, p. 4473–4475, 1990.

RICHARDSON, J. A. et al. Oxysterol-induced osteoblastic differentiation of pluripotent mesenchymal cells is mediated through a PKC- and PKA-dependent pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 100, n. 5, p. 1131–1145, 2007.

ROMÃO, C. M. **Expressão da P-gp, MPR1 e LRP em células-tronco mesenquimais humanas derivadas do líquido amniótico e medula óssea**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 28 jun. 2012.

ROSSI et al. The Endocrine Function of Osteocalcin Regulated by Bone Resorption: A Lesson from Reduced and Increased Bone Mass Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4502, 11 set. 2019.

ROWE, P.; SHARMA, S. **Physiology, Bone, Remodeling**. [s.l: s.n.].

RUIZ, J. L. M. et al. Interrelationship between ATP-binding cassette transporters and oxysterols. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 1, p. 80–88, jul. 2013.

RYOO, H. M.; LEE, M. H.; KIM, Y. J. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. **Gene**, v. 366, n. 1, p. 51–57, 2006.

SACHS, P. C. et al. Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 2, p. 505–515, 2012.

SATO, R. Sterol metabolism and SREBP activation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 2, p. 177–181, 2010.

SCHNEIDER, S. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells from liposuction and resected fat are feasible sources for regenerative medicine. **European Journal of Medical Research**, v. 22, n. 1, p. 1–11, 2017.

SCHWARTZ, L.; DA VEIGA MOREIRA, J.; JOLICOEUR, M. Physical forces modulate cell differentiation and proliferation processes. **Journal of Cellular**

and Molecular Medicine, v. 22, n. 2, p. 738–745, 2018.

SCIENTIFIC, F. I. **Protocol for Neural Progenitor Cell Expansion**. Disponível em: <http://www.irvinesci.com/protocol-for-neural-progenitor-cell-expansion>.

SEITA, J.; WEISSMAN, I. L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 2, n. 6, p. 640–653, nov. 2010.

SILVA, S. F. et al. Oxysterols in adipose tissue-derived mesenchymal stem cell proliferation and death. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 169, p. 164–175, 2016.

SMITH, Q. et al. Stochasticity and Spatial Interaction Govern Stem Cell Differentiation Dynamics. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 12617, 31 out. 2015.

SOBHANI, A. et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. **Acta Med Iran**, v. 55, n. 1, p. 6–23, 2017.

SOCCIO, R. E.; BRESLOW, J. L. Intracellular Cholesterol Transport. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 7, p. 1150–1160, 1 jul. 2004.

SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEE, M. D. Osteopontin. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, n. 3, p. 279–303, jul. 2000.

SONG, L. et al. Crosstalk between Wnt/β-catenin and Hedgehog/Gli signaling pathways in colon cancer and implications for therapy. **Cancer biology & therapy**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2015.

SORISKY, A. Effect of High Glucose Levels on White Adipose Cells and Adipokines—Fuel for the Fire. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 944, 29 abr. 2017.

SOUSA, K. M. et al. Wnt2 regulates progenitor proliferation in the developing ventral midbrain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 10, p. 7246–7253, 2010.

STREM, B. M. et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio J.Med.**, v. 54, n. 0022–9717 (Print), p. 132–141, 2005.

STYNER, M. et al. Indomethacin promotes adipogenesis of mesenchymal stem cells through a cyclooxygenase independent mechanism. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, n. 4, p. 1042–1050, 2010.

SUEHIRO, F. et al. Low-serum culture with novel medium promotes maxillary/mandibular bone marrow stromal cell proliferation and osteogenic

differentiation ability. **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 9, p. 2709–2719, 16 dez. 2017.

TAYYAB, M. et al. Sonic hedgehog, Wnt, and brain-derived neurotrophic factor cell signaling pathway crosstalk: potential therapy for depression. **Journal of Neuroscience Research**, v. 96, n. 1, p. 53–62, 2018.

VÄÄNÄNEN, H. K.; LAITALA-LEINONEN, T. Osteoclast lineage and function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 132–138, maio 2008.

VAN DE PEPPEL, J. et al. Identification of Three Early Phases of Cell-Fate Determination during Osteogenic and Adipogenic Differentiation by Transcription Factor Dynamics. **Stem Cell Reports**, v. 8, n. 4, p. 947–960, 2017.

VEEMAN, M. T.; AXELROD, J. D.; MOON, R. T. A second canon: Functions and mechanisms of β-catenin-independent Wnt signaling. **Developmental Cell**, v. 5, n. 3, p. 367–377, 2003.

VEJUX, A.; MALVITTE, L.; LIZARD, G. Side effects of oxysterols: Cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 7, p. 545–556, 2008.

WAMIL, M. et al. 7-Oxysterols Modulate Glucocorticoid Activity in Adipocytes through Competition for 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type. **Endocrinology**, v. 149, n. 12, p. 5909–5918, dez. 2008.

YEH, M. et al. Role for sterol regulatory element-binding protein in activation of endothelial cells by phospholipid oxidation products. **Circulation Research**, v. 95, n. 8, p. 780–788, 2004.

ZHANG, X. et al. Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose - Derived stem cells in vitro and in vivo. **Calcified Tissue International**, v. 79, n. 3, p. 169–178, 2006.

ZHANG, Y. et al. Mitochondrial Respiration Regulates Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77077, 18 out. 2013.

ZOCH, M. L.; CLEMENS, T. L.; RIDDLE, R. C. New insights into the biology of osteocalcin. **Bone**, v. 82, p. 42–49, 2016.

ZUK, P. A. et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 12, p. 4279–4295, dez. 2002.

Anexos

Anexo A:

ARTICLE IN PRESS

Biochemistry and Biophysics Reports xxx (xxxx) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemistry and Biophysics Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbrep

7-Ketocholesterol and cholestane-triol increase expression of SMO and LXRα signaling pathways in a human breast cancer cell line

Debora Levy[a], Thatiana Correa de Melo[a], Beatriz A. Oliveira[a], Jessica L. Paz[a], Fabio A. de Freitas[a], Cadiele O. Reichert[a], Alessandro Rodrigues[b], Sergio P. Bydlowski[a,c,*]

[a] Laboratory of Genetics and Molecular Hematology (LIM31), Department of Hematology, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, São Paulo, SP, Brazil
[b] Departamento de Química, Universidade Federal de Sao Paulo, Diadema, SP, Brazil
[c] Instituto Nacional de Ciencia e Tecnologia em Medicina Regenerativa (INCT-Regenera), CNPq, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Oxysterol
Apoptosis
Cancer
ABC transporters
Sonic hedgehog
LXRα

ABSTRACT

Oxysterols are 27-carbon oxidation products of cholesterol metabolism. Oxysterols possess several biological actions, including the promotion of cell death. Here, we examined the ability of 7-ketocholesterol (7-KC), cholestane-3β-5α-6β-triol (triol), and a mixture of 5α-cholestane-3β,6β-diol and 5α-cholestane-3β,6α-diol (diol) to promote cell death in a human breast cancer cell line (MDA-MB-231). We determined cell viability, after 24-h incubation with oxysterols. These oxysterols promoted apoptosis. At least part of the observed effects promoted by 7-KC and triol arose from an increase in the expression of the sonic hedgehog pathway mediator, smoothened. However, this increased expression was apparently independent of sonic hedgehog expression, which did not change. Moreover, these oxysterols led to increased expression of LXRα, which is involved in cellular cholesterol efflux, and the ATP-binding cassette transporters, ABCA1 and ABCG1. Diols did not affect these pathways. These results suggested that the sonic hedgehog and LXRα pathways might be involved in the apoptotic process promoted by 7-KC and triol.

1. Introduction

Cholesterol is an essential component of cell membrane and also a precursor of steroid hormones and bile acids [1]. Oxysterols are a large family of 27-carbon oxidized derivatives of cholesterol and similarly, they are made of a steroid backbone and a side chain [2]. Endogenous oxysterols are formed either by auto-oxidation or by enzyme-mediated mechanisms [3–5]. Oxidation promotes the addition of hydroxyl, keto, hyperoxy, carbonyl, or epoxy groups to the cholesterol backbone, mostly at the C4–7 positions or at the C24, 25, and 27 positions of the lateral chain [6]. This process generates a large class of different oxysterols.

Bioactive lipids are endogenous lipid mediators that have functional actions. Several elements point to oxysterols as bioactive lipids since they are involved in a plethora of physiological and pathophysiological processes. In fact, several oxysterols are biologically active as regulatory molecules. For example, they regulate sterol and lipid metabolism, modulate signaling pathways, and influence cell proliferation and differentiation [6]. Consequently, oxysterols participate in a variety of pathophysiological processes, including atherosclerosis and cancer [7–12]. Moreover, some oxysterols (e.g. 4β-hydroxycholesterol or 7α-hydroxycholestenone) are used as biomarkers of specific pathologies [12].

One particularly interesting effect of several oxysterols is the promotion of cell death. This effect has been observed in a number of cell lines [11,13–16], and it occurs through several mechanisms, including gene expression regulation [4], apoptosis, and autophagy induction [13,17,18]. Many cell types are sensitive to the cytostatic and cytotoxic effects of oxysterols, including several tumor cell lines [6,19–22].

These properties led us to investigate the potential use of oxysterols as chemotherapeutic agents in cancer [23]. Our results showed that 7-ketocholesterol (7-KC), a well-known oxysterol, had cytostatic and cytotoxic effects on melanoma, in vitro and in vivo. Therefore, we hypothesized that 7-KC cytotoxicity could be applied in cancer therapeutics. However, it has also been shown that the cytotoxic effect of oxysterols on cells varies according to both the type of oxysterol and the specific cell line [24]. This is not surprising considering the large number of molecules within this family and their complex metabolism

* Correspondence to: Department of Hematology, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Av.Dr. Enéas de Carvalho Aguiar,155, 1st floor, room 43, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil.
E-mail address: spbydlow@usp.br (S.P. Bydlowski).

https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.12.008
Received 13 November 2018; Received in revised form 14 December 2018; Accepted 20 December 2018
2405-5808/ © 2018 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/).

Please cite this article as: Levy, D., Biochemistry and Biophysics Reports, https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.12.008

Anexo B:

cells

MDPI

Article

7-Ketocholesterol Promotes Oxiapoptophagy in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell from Patients with Acute Myeloid Leukemia

Jessica Liliane Paz [1], Debora Levy [1], Beatriz Araujo Oliveira [1], Thatiana Correia de Melo [1], Fabio Alessandro de Freitas [1], Cadiele Oliana Reichert [1], Alessandro Rodrigues [2], Juliana Pereira [3] and Sergio Paulo Bydlowski [1,3,4,*]

1 Laboratory of Genetics and Molecular Hematology (LIM31), Department of Hematology, Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo 05403-000, SP, Brazil; paz.jl@usp.br (J.L.P.); d.levy@hc.fm.usp.br (D.L.); beatriz_oliveira@usp.br (B.A.O.); thatianacmelo@yahoo.com.br (T.C.d.M.); fabio.alessandro@alumni.usp.br (F.A.d.F.); kadielli@hotmail.com (C.O.R.)

2 Departmento de Ciencias Exactas e da Terra, Universidade Federal de Sao Paulo, Diadema 09972-270, SP, Brazil; alessandro.rodrigues@unifesp.br

3 Center of Innovation and Translational Medicine, Department of Medicine, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo 05403-000, SP, Brazil; julianapereira29@hotmail.com

4 National Institute of Science and Technology for Regenerative Medicine (INCT Regenera), CNPq, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil

* Correspondence: spbydlow@usp.br; Tel.: +55-(11)-2661-9553

Received: 16 April 2019; Accepted: 7 May 2019; Published: 21 May 2019

check for updates

Abstract: 7-Ketocholesterol (7-KC) is a cholesterol oxidation product with several biological functions. 7-KC has the capacity to cause cell death depending on the concentration and specific cell type. Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells with the ability to differentiate into various types of cells, such as osteoblasts and adipocytes, among others. MSCs contribute to the development of a suitable niche for hematopoietic stem cells, and are involved in the development of diseases, such as leukemia, to a yet unknown extent. Here, we describe the effect of 7-KC on the death of bone marrow MSCs from patients with acute myeloid leukemia (LMSCs). LMSCs were less susceptible to the death-promoting effect of 7-KC than other cell types. 7-KC exposure triggered the extrinsic pathway of apoptosis with an increase in activated caspase-8 and caspase-3 activity. Mechanisms other than caspase-dependent pathways were involved. 7-KC increased ROS generation by LMSCs, which was related to decreased cell viability. 7-KC also led to disruption of the cytoskeleton of LMSCs, increased the number of cells in S phase, and decreased the number of cells in the G1/S transition. Autophagosome accumulation was also observed. 7-KC downregulated the SHh protein in LMSCs but did not change the expression of SMO. In conclusion, oxiapoptophagy (OXidative stress + APOPTOsis + autophagy) seems to be activated by 7-KC in LMSCs. More studies are needed to better understand the role of 7-KC in the death of LMSCs and the possible effects on the SHh pathway.

Keywords: oxysterol; 7-KC; mesenchymal stem cell; apoptosis; autophagy; acute myeloid leukemia; bone marrow

1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a malignant disease of the hematopoietic cells characterized by impaired differentiation and uncontrolled clonal expansion of myeloid progenitors/precursors, resulting in bone marrow (BM) failure and impaired normal hematopoiesis [1]. Currently, 40–50% of