Leonardo Rokita de Rosa

**Avaliação do efeito antitumoral do tratamento combinado com
C6-ceramida e 7-cetocolesterol em uma linhagem celular de
câncer de mama**

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

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2021

Leonardo Rokita de Rosa

**Avaliação do efeito antitumoral do tratamento combinado com
C6-ceramida e 7-cetocolesterol em uma linhagem celular de
câncer de mama**

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

2021

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Bydlowski, por ter me aceito em seu laboratório em uma etapa tão importante da minha vida como a realização de um mestrado acadêmico. Agradeço por todos os ensinamentos, experiências e oportunidades que tive ao longo desses anos.

Aos meus pais, Silvia e Marcos, que me incentivaram e me deram oportunidades na vida para que eu tivesse condições de correr atrás dos meus sonhos e crescer profissionalmente.

À minha namorada, Priscila, que é uma parceira indispensável no meu cotidiano e que me muito me ajuda na minha jornada profissional.

A todos os colegas de laboratório que, sem eles, não imagino como este projeto seria desenvolvido. Débora, Fábio, Cadiele, Juliana, Priscila e Beatriz, sou muito grato pela ajuda e parceria no desenvolvimento do trabalho.

Ao Professor Erick José Ramo Silva, meu orientador de Iniciação Científica da UNESP, que muito me ensinou durante meus anos de faculdade e foi o melhor mentor que eu poderia ter durante minha graduação.

Aos demais colegas e professores do laboratório do InCor que fizeram parte do dia-a-dia e me permitiram participar de tantas discussões científicas enriquecedoras.

Aos meus avós, Nair e Jorge, que tiveram papel crucial durante minha infância e até os dias atuais.

Aos meus amigos desde a época de colégio, que me acompanham e fazem parte da minha vida já há tantas etapas e por muitas outras que virão.

Aos meus amigos de faculdade, que moraram comigo e dividiram esse período tão especial da minha vida.

À CAPES, pelo apoio financeiro que foi indispensável para permitir que eu investisse esses anos da minha vida na realização do mestrado.

A muitos outros, não especificamente citados aqui mas que fazem parte da minha vida e tiveram uma participação na minha vida, seja no âmbito social ou mesmo profissional.

Ficha catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rosa, Leonardo Rokita de
Avaliação do efeito antitumoral do tratamento
combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol em uma
linhagem celular de câncer de mama / Leonardo Rokita
de Rosa. -- São Paulo, 2021.

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.Ceramida 2.Oxisteróis 3.Neoplasias
da mama 4.Morte celular 5.Terapia combinada

USP/FM/DBD-305/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia De A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Câncer	8
1.2 Esfingolipídeos	10
1.3 Ceramida e câncer.....	13
1.4 Oxisteróis.....	17
1.5 7-cetocolesterol (7-KC) como agente antitumoral	19
1.6 Mecanismos de morte celular	20
1.6.1 Apoptose	21
1.6.2 Autofagia	23
1.6.3. Espécies reativas de oxigênio e seu envolvimento na morte celular.....	24
1.6.4. Metabolismo mitocondrial e morte celular.....	26
2. Objetivo	27
3. Material e Métodos	28
3.1 Linhagens Celulares	28
3.2 Cultivo e manutenção das células.....	28
3.3 Tratamento das células.....	28
3.4 Ensaio de Morte celular.....	29
3.4.1 Viabilidade celular – Iodeto de propídio	29
3.4.2 Apoptose - Caspase 3/7	30
3.4.3 Apoptose e necrose - Anexina/PI	30
3.4.4 Análise do potencial de membrana mitocondrial por TMRE.....	30
3.4.5 Análise de ROS com H ₂ DCFDA (Reactive Oxygen Species).....	31
3.4.6 Autofagia – Sensor LC3B	31
3.4.7 Análise de alterações na organização da F-actina.....	32
3.5 Análise de sinergismo das drogas - <i>Combination Index</i> (CI)	32
3.6 Análise estatística	32
4. Resultados	33
4.1 Linhagem de câncer de mama MDA-MB-231	33
4.1.1 C6-ceramida.....	33
4.1.2 7-cetocolesterol	39
5. Discussão.....	54
6. Conclusão	58
7. Referências	59
8. Anexos	71

8.1 Aprovação do Comitê de Ética.....	71
---------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-KC	7-cetocolesterol
AC	Ceramidase ácida
ANOVA	Análise de Variância
C1P	Ceramida-1-Fosfato
C6-Cer	C6-ceramida
Cer	Ceramida
CI	Índice combinatório
cm ²	Centímetros quadrados
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CTLA-4	Proteína T-Linfócito-Associada citotóxica 4
Cyt-C	Citocromo C
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-Padrão
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ER	Receptor de Estrogênio
Glc	Glicosilceramida
HER2	Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média (50%)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LC3	Cadeia leve 3 da proteína associada aos microtúbulos
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LXR α	Receptor X do Fígado Alfa
M	Molar
MDR	Múltipla Resistência a Drogas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MOMP	Permeabilização da membrana externa da mitocôndria
mTOR	Alvo mecanístico de rapamicina

nM	Nanomolar
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PDT	Terapia Fotodinâmica
P-Gp	Glicoproteína P
PI	Iodeto de Propídio
PR	Receptor de Progesterona
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
rpm	Rotações por minuto
S1P	Esfingosina-1-Fosfato
SFB	Soro Fetal Bovino
SHh	Sonic Hedgehog
SM	Esfingomielina
TMRE	Tetrametilrodamina, etil éster
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAIL	Ligante Indutor de Apoptose relacionado ao TNF
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, com exceção de câncer de pele não melanoma	9
Figura 2 Estruturas de algumas das principais moléculas do metabolismo esfingolipídico	11
Figura 3 As três vias do metabolismo dos esfingolipídeos: via de novo, via da esfingomielina e via de resgate	12
Figura 4 O mecanismo de funcionamento do modelo de reostato esfingolipídico	13
Figura 5 Comparação entre a estrutura da molécula de ceramida e seus análogos de cadeia curta (C2-, C6- e C8-ceramida).....	16
Figura 6 Estrutura da molécula de colesterol e alguns dos diferentes tipos de oxisteróis derivados de seu metabolismo.	18
Figura 7 Resumo das vias extrínseca e intrínseca da apoptose e moléculas envolvidas no processo.....	22
Figura 8 As cinco fases do processo autofágico: iniciação, alongação, formação do autofagossomo, fusão e formação do autolisossomo)	23
Figura 9 Fotomicrografia das células MDA-MB-231	33
Figura 10 Gráfico da citotoxicidade da C6-ceramida nas células MDA-MB-231.....	34
Figura 11 Gráfico do ensaio de apoptose e necrose nas células MDA-MB-231	35
Figura 12 Gráfico da presença da caspase 3/7 nas células MDA-MB-231.....	36
Figura 13 Gráfico do ensaio do potencial de membrana da mitocôndria nas células MDA-MB-231	37
Figura 14 Fotomicrografias das células MDA-MB-231 coradas com Hoechst 33342 (azul) e TMRE (vermelho)	38
Figura 15 Gráfico da produção de ROS nas células tratadas com C6-Ceramida por 48 horas	39
Figura 16 Fotomicrografias das células MDA-MB-231 coradas com Hoechst 33342 (azul)	

e anticorpo anti F-actina (vermelho)	40
Figura 17 Gráfico do ensaio de potencial de membrana da mitocôndria nas células MDA-MB-231	41
Figura 18 Fotomicrografias das células MDA-MB-231 coradas com Hoechst 33342 (azul) e TMRE (vermelho).	41
Figura 19 Gráfico da produção de ROS nas células tratadas com 7-cetocolesterol por 48 horas	42
Figura 20 Fotomicrografias das células MDA-MB-231 coradas com Hoechst 33342 (azul) e anticorpo anti F-actina (vermelho)	43
Figura 21 Representação gráfica de citotoxicidade nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6- ceramida e 7-cetocolesterol por 24 horas	44
Figura 22 Representação gráfica do ensaio de citotoxicidade nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol por 48 horas.....	46
Figura 23 Representação gráfica do ensaio de Caspase 3/7 nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol por 48 horas.....	48
Figura 24 Representação gráfica do ensaio de Anexina V/PI (apoptose) nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol por 48 horas.	49
Figura 25 Representação gráfica do ensaio de Anexina V/ PI (necrose) nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol por 48 horas	49
Figura 26 Representação gráfica do ensaio potencial de membrana mitocondrial nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol por 48 horas	50
Figura 27 Representação gráfica do ensaio de ROS nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6- ceramida e 7-cetocolesterol por 48 horas	51
Figura 28 Representação gráfica do ensaio de autofagia nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol por 48 horas	52

Figura 29 Fotomicrografias das células MDA-MB-231 coradas com Hoechst 33342 (azul)

e TMRE (vermelho) **53**

RESUMO

Rosa LR. *Avaliação do efeito antitumoral do tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol em uma linhagem celular de câncer de mama* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A busca por novas terapias antitumorais é incessante. A ceramida, molécula central no metabolismo dos esfingolipídeos, vem recebendo grande atenção na literatura devido a seu papel na regulação de processos celulares como proliferação celular, apoptose, autofagia, entre outros. A C6-ceramida, um análogo de cadeia curta, vem sendo vastamente explorada por conta de sua capacidade de indução de morte celular tumoral, principalmente quando em associação com outro composto antitumoral. Nesses estudos, os achados apontam para uma inibição sinérgica do tumor, com redução da toxicidade do tratamento e até reversão do fenótipo de múltipla resistência a drogas (MDR). O 7-cetocolesterol (7-KC), por sua vez, é um oxisterol com promissora atividade antitumoral, capaz de induzir um modo complexo de morte celular que envolve estresse oxidativo, apoptose e autofagia (oxiapoptofagia). Neste projeto, buscamos avaliar o potencial terapêutico antitumoral do tratamento combinado com as moléculas de C6-cer e 7-KC em uma linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231), visando elucidar os mecanismos de morte celular envolvidos no processo. A eficácia da combinação dessas moléculas mostrou-se tempo-dependente, pois células tratadas por 24 horas apresentaram efeitos irrisórios de morte celular em comparação com tratamento por 48 horas. Em ambos os casos, as moléculas agiram de maneira sinérgica, evidenciado pelo cálculo do índice combinatório (CI). A apoptose com ativação das caspases 3/7 apresentou-se como protagonista na indução da morte dessas células, ocorrendo de forma dose-dependente. Além disso, pudemos verificar efeitos substanciais desse tratamento no potencial da membrana mitocondrial e da estrutura do citoesqueleto por meio da análise da organização estrutural da F-actina. Quanto à geração de ROS, a C6-cer, mas não o 7-KC, foi capaz de produzir ROS após o tratamento. Finalmente, a autofagia não foi desencadeada por nenhuma dessas moléculas, seja em administração individual ou em combinação. Acreditamos que nossos resultados sobre a eficácia deste tratamento combinado nesta linhagem celular específica podem abrir caminho para estudos em diferentes linhas de células cancerígenas ou modelos mais complexos daqui em diante, visando verificar se este efeito também é conservado em outros modelos tumorais bem como compreender mais a fundo os processos de sinalização celular e moléculas envolvidas no desencadeamento de morte celular tumoral.

Descritores: Ceramida; Oxisteróis; Neoplasias da mama; Morte celular; Terapia combinada.

ABSTRACT

Rosa LR. *Evaluation of the antitumor effect of combined treatment with C6-ceramide and 7-ketocholesterol in a breast cancer cell line* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

New alternatives for cancer treatment are continuously sought. Ceramide, the central molecule in sphingolipids' metabolism, has received great attention in the literature due to its role in regulating cellular processes such as cell proliferation, apoptosis, autophagy, among others. C6-ceramide, a short-chain analog, has been widely explored because of its ability to induce tumor cell death, especially when in combination with another antitumor agent. In these studies, the findings point to synergistic inhibition of the tumor, with reduced treatment toxicity and even reversion of the multiple drug resistance (MDR) phenotype. 7-Ketocholesterol (7-KC), in turn, is an oxysterol with promising antitumor activity, capable of inducing a complex mode of cell death that involves oxidative stress, apoptosis and autophagy (oxypoptophagy). In this project, we sought to evaluate the antitumor therapeutic potential of the combined treatment with C6-cer and 7-KC in a breast cancer cell line (MDA-MB-231), and elucidate the mechanisms of cell death involved in this process. The effectiveness of the combination of these molecules proved to be time-dependent since cells treated for 24 hours showed little effect of cell death when compared to 48 hours treatment period. In both cases, molecules acted synergistically, evidenced by the calculation of the combination index (CI) Apoptosis with caspase 3/7 activation presented themselves as major players on these cells' death induction, both occurring in a dose-dependent manner. Also, we were able to verify substantial effect of this treatment on the mitochondrial membrane potential and cytoskeleton structure by analyzing F-actin structural organization. As for ROS Generation, C6-cer but not 7-KC was able to produce ROS after treatment. Finally, autophagy was not triggered by any of these molecules, nor as single agents neither in combination. We believe that our findings on this combined regimen efficacy in this specific cell line may pave the way for studies on different cancer cell lines or more complex models henceforth, in order to verify whether this outcome is also conserved in other tumor models as well as to perform a more in-depth analysis on signaling pathways and molecules involved in the process of triggering cell death.

Descriptors: Ceramide; Oxysterols; Breast neoplasms; Cell death; Combined therapy.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é a segunda maior causa de mortes mundialmente, responsável por um total de mortes estimadas em 9,6 milhões em 2018 pela Organização Mundial da Saúde (WHO - *World Health Organization*). Além disso, a incidência de novos casos vem crescendo drasticamente nos últimos anos, principalmente por conta do aumento da expectativa de vida e das drásticas mudanças nos hábitos da população. Além de seu evidente impacto na saúde da população, o câncer carrega consigo também números preocupantes relacionados ao custo direcionado para seu tratamento. Em 2010, avalia-se que o custo anual do tratamento do câncer foi de aproximadamente 1,16 trilhões de dólares (1).

De maneira geral, o câncer pode ser definido como um crescimento desordenado das células do organismo. Ainda, o câncer pode ser classificado como uma doença genética, pois origina-se a partir de mutações em genes envolvidos nos processos de divisão e crescimento celular, por exemplo (2). As células dos variados tecidos de nosso corpo estão suscetíveis a essas mutações que dão início ao câncer, o que culmina com os diversos tipos de câncer hoje conhecidos. É necessário pontuar que este caráter heterogêneo do câncer é um importante fator para o elevado grau de complexidade desta doença, seja a nível de prevenção ou mesmo tratamento.

De qualquer forma, certas células tumorais apresentam certas características preservadas entre os variados tipos de câncer, como: atividade angiogênica, evasão de sinais antiproliferativos, evasão do sistema imune, imortalidade replicativa, resistência à morte celular, entre outros (3). A definição destes sinais clássicos para os diversos tipos de câncer é essencial para compreensão da fisiopatologia desta doença e para que as terapias possam ser propostas de maneira a interferir nestas características no câncer, visando maneiras efetivas de combatê-lo.

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) realiza um levantamento anual sobre dados estatísticos relativos à doença, como sua incidência, letalidade e estimativas para o ano seguinte. Dados relativos ao ano de 2020 indicam entre os tipos de câncer mais prevalentes (com exceção de câncer de pele não melanoma): próstata, mama, cólon/reto e traqueia, brônquio e pulmão (Figura 1). As mesmas neoplasias acima citadas constam entre as de maior taxa de mortalidade, sendo: Mama (17%); traqueia, brônquio e pulmão (14%); próstata (13,4%); cólon e reto (8%) (INCA 2019).

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, com exceção de câncer de pele não melanoma. Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA).

O câncer de mama, assunto principal deste trabalho, é o câncer mais incidente entre as mulheres no mundo todo. Para o Brasil, especificamente, o INCA estima 66.280 novos casos de câncer de mama a cada ano do triênio 2020-2022, representando um risco aproximadamente de 61 casos novos a cada 100 mil mulheres. Além disso, há diferentes subtipos de câncer de mama, com distinta relevância clínica e que requerem abordagens diferentes (4).

Dentre os subtipos de câncer de mama, destaca-se o câncer de mama triplo negativo (TNBC – *Triple Negative Breast Cancer*). O TNBC é caracterizado pela ausência ou baixa expressão dos receptores de progesterona (PR), estrogênio (ER) e do fator de crescimento epidermal humano (HER2) (5). Este subtipo de câncer de mama representa aproximadamente 15-20% de todos os casos da doença e é

comumente reconhecido como o subtipo de maior agressividade clínica de câncer de mama, apresentando prognóstico ruim e alta incidência de metástase (6). Por conta de sua ausência dos receptores acima citados, o TNBC não responde a tratamentos hormonais ou terapias direcionadas comumente utilizados para outros subtipos de câncer de mama (7).

Por conta da alta incidência de casos de câncer de mama e a necessidade sempre latente de novas terapias que apresentem eficácia e custo-benefício apropriado, a comunidade científica segue pesquisando por moléculas, novas ou já existentes, que possam expandir o arsenal terapêutico disponível para o enfrentamento tanto do câncer de mama, como de muitos outros.

1.2 Esfingolipídeos

Os esfingolipídeos são uma diversa classe de lipídeos presentes de maneira ubíqua nas células eucarióticas, sendo encontrados majoritariamente nas membranas celulares. Os primeiros esfingolipídeos foram isolados de tecido cerebral no fim do século 19 por Johan Ludwig Thudichum. A raiz do termo “esfingo” deu-se em alusão à criatura mítica grega esfinge, com o intuito de representar a natureza enigmática desta classe de moléculas recém descoberta (8). Embora a existência dos esfingolipídeos tenha sido demonstrada há tempos, somente nos últimos anos ficou claro de que estas moléculas possuem papel crucial nas células além de suas propriedades estruturais na membrana.

Hoje, é conhecido que as mais diversas moléculas presentes no metabolismo esfingolipídico desempenham papel importante em processos biológicos como apoptose, controle do ciclo celular, autofagia e stress oxidativo (8-10). A partir de 1999 houve um aumento de 28 vezes em publicações sobre estas moléculas na literatura quando comparado com o observado nos anos de 1987-1998 (11). Desde então, o enfoque principal é de decifrar o complexo mecanismo de sinalização esfingolipídica e como alterações nesse mecanismo podem contribuir para o desencadeamento de processos fisiopatológicos (12).

Estruturalmente, os esfingolípídeos são moléculas com propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas variantes, mas são anfipáticos via de regra. A porção hidrofóbica consiste de uma cadeia longa de geralmente 18 carbonos, denominada base esfingóide, que se liga a um ácido graxo. A porção hidrofílica, por sua vez, consiste em um grupo hidroxila em seu caso mais simples (ceramida). As variações na porção hidrofílica conferem aos esfingolípídeos sua ampla variedade de moléculas, com consequente diversidade de funções (13, 14) (Figura 2) .

Figura 2. Estruturas de algumas das principais moléculas do metabolismo esfingolípídico. Adaptado de: Futerman & Hannun 2004 - The complex life of simple sphingolipids; *EMBO Reports* 777-782.

O metabolismo esfingolípídico é complexo e intrinsecamente regulado. As moléculas podem ser sintetizadas por três vias distintas, sendo: via *de novo*, via de resgate e via da esfingomielina (10). Entretanto, a via *de novo* é a principal responsável pela manutenção dos níveis dos esfingolípídeos, o que a torna a principal via de interesse para compreensão de como alterações nos níveis de esfingolípídeos podem resultar em alterações celulares de relevância (15). A Figura 3 sintetiza a complexidade das vias de síntese dos esfingolípídeos, que convergem na produção de ceramida, molécula principal dessa classe de lipídeos.

Figura 3. As três vias do metabolismo dos esfingolipídeos: via *de novo*, via da esfingomielina e via de resgate. Adaptado de: Castillo *et al* 2016 - From molecules to the clinic: Linking schizophrenia and metabolic syndrome through sphingolipids metabolism.; *Frontiers in Neuroscience* 10:488.

Alterações no metabolismo dos esfingolipídeos culminam no desenvolvimento de doenças denominadas esfingolipidoses, distúrbios de origem genética que causam degeneração progressiva do sistema nervoso central. Dentre as mais conhecidas e bem estudadas estão as Doenças de Fabry, Tay-Sachs, Gaucher e Niemann-Pick (16). Além dessas doenças de origem genética, o metabolismo esfingolipídico também se encontra alterado no desenvolvimento de aterosclerose (17), diabetes (18), Alzheimer (19) e, principalmente, no câncer (20), reforçando o papel crucial que essas moléculas têm para o correto funcionamento celular.

Apesar do quadro do câncer ser de veras complexo, o balanço entre duas moléculas do metabolismo esfingolipídico aparenta ocorrer de maneira bem definida. Em 1999, um dos trabalhos pioneiros na área cunhou um termo definido como “reostato esfingolipídico” para explicitar os papéis opostos que as moléculas de ceramida (Cer) e esfingosina-1-fosfato (S1P) poderiam exercer na regulação de

É conhecido que o surgimento dos tumores ocorre devido a um desbalanço entre morte e proliferação celular. O modelo de reostato esfingolipídico corrobora de maneira direta esta afirmativa: em células tumorais, há diminuição de Cer (indutora de morte celular) e aumento de S1P (estimuladora de crescimento celular). Tipicamente, os níveis de ceramida em células tumorais são suprimidos pela superexpressão de enzimas metabolizadoras de ceramida ou por diminuição da expressão de enzimas geradoras de ceramida. Entre os exemplos de enzimas que podem ser superexpressas pelas células tumorais está a ceramidase ácida (acid ceramidase -AC), responsável pela conversão da Cer em S1P, anti-apoptótica e pró-angiogênica (25). Estratégias terapêuticas que almejam retomar o correto balanço dos níveis de Cer/S1P emergiram com promissor potencial dentro das terapias antitumorais (Tabela 1). Além disso, a eficácia de terapias “clássicas” utilizadas no combate ao câncer como quimioterapia, radioterapia e uma ampla variedade de fármacos antitumorais foi demonstrada ser dependente, entre outros mecanismos, da geração de ceramida na célula tumoral (26,27).

Tabela 1 - Agentes utilizados em terapia antitumoral capazes de induzir produção de ceramida nas células tumorais.

Agente	Linhagem / Sistema tumoral	Referências
Tamoxifeno	MCF-7; MCF-7-Adr (câncer de mama)	28
Vincristina	ALL-697 (leucemia linfoblástica aguda)	29
Vinblastina	KB-3-1 (carcinoma epidermóide)	30
Paclitaxel	MCF-7; MDA-MB-468 (câncer de mama)	31
Doxorrubicina	MCF-7 (câncer de mama)	31
Radiação ionizante	Células de linfoma de Burkitt	32
Fludarabina	Leucemia linfocítica crônica;	33

Terapia fotodinâmica	L5178Y (linfoma murino)	34
Etoposídeo	Células Jurkat (linfoma de células T)	35
Daunorrubicina	HL-60 (leucemia); U-937 (linfoma histiocítico)	36

Os mecanismos celulares pelos quais a ceramida pode exercer sua atividade antitumoral variam desde indução de apoptose até a regulação da autofagia e modulação do ciclo celular (37) e foram minuciosamente descritos na revista *Nature Review Cancer* (38). Apesar de emergir como molécula de interesse terapêutico em células tumorais, o desenvolvimento da ceramida como ingrediente ativo em fármacos é dificultado por conta de seu grande tamanho molecular e sua insolubilidade, o que impede sua entrega nas células tumorais (39). Devido a isso, boa parte dos trabalhos que estudaram a atividade antitumoral da ceramida se deu através de métodos de interferência enzimáticas em reações-chave na via metabólica *de novo* (11). Embora estes trabalhos sejam importantes para elucidar o efeito antitumoral através da modulação dos esfingolipídeos, dificilmente é possível inferir que os efeitos observados são todos oriundos da produção de ceramida nas células tumorais. Além disso, terapias que visem a administração da molécula de ceramida em si, ao invés de gerá-la por vias enzimáticas, poderão expandir o número de estratégias antitumorais disponíveis, além de elucidar os efeitos intracelulares de sua administração exógena.

Para superar esses obstáculos, desenvolveram-se análogos de cadeias curtas da ceramida dissolvidos em solventes orgânicos que são permeáveis na membrana celular, possibilitando a entrega da ceramida nas células e consequentes estudos de seus efeitos celulares (40). Entre as principais ceramidas de cadeia curta disponíveis estão: C2-ceramida, C6-ceramida, C8-ceramida e C10-ceramida, que variam entre si pelo tamanho de sua cadeia carbônica (Figura 5). Quanto a citotoxicidade destes análogos, Shabbits *et al.* (41) testaram sua bioatividade através da aplicação de maneira exógena via lipossomos em células

tumorais *in vitro*, comprovando a capacidade dos análogos em mimetizar a ação da ceramida e, portanto, induzir morte celular tumoral. O estudo observou uma relação inversamente proporcional entre o comprimento da cadeia da ceramida e sua citotoxicidade para as formas C6, C8 e C10 da ceramida, sendo, portanto, a citotoxicidade da C6-ceramida a mais elevada. A C2-ceramida, por outro lado, não seguiu a esta relação, sendo a menos tóxica dentre os análogos testados. Segundo os autores, esta diferença no comportamento seria devido à natureza muito hidrofílica deste análogo com cadeia carbônica tão diminuído, fazendo com que a molécula permaneça em suspensão no meio de cultura (41).

Figura 5. Comparação entre a estrutura da molécula de ceramida e seus análogos de cadeia curta (C2-, C6- e C8-ceramida).

Nos últimos anos, terapias combinadas tornaram-se uma grande alternativa no tratamento do câncer. Esta prática de combinar dois agentes terapêuticos permite alcançar um efeito final maior quando comparado com a administração individual de cada um individualmente, almejando atingir efeitos sinérgicos entre as moléculas. Ainda, a possibilidade de agir por vias distintas de sinalização celular pode reduzir a possibilidade de resistência da célula tumoral ao tratamento, como na combinação de agentes quimioterápicos com moléculas inibidoras da glicoproteína-p (P-gp) (42). Diversos trabalhos com a C6-ceramida demonstraram que a molécula exerce um efeito de sensibilização da célula tumoral após sua administração, facilitando o efeito citotóxico de fármacos antitumorais utilizados em combinação e, assim, culminando com a potencialização do efeito terapêutico

desejado. Diversos quimioterápicos convencionais (doxorubicina, vincristina, paclitaxel, entre outros) foram administrados de maneira conjunta com a C6-cer e essa potencialização do efeito final foi observada, com taxas mais elevadas de morte celular e diminuição da concentração necessária da droga para atingir o efeito esperado (43-45).

1.4 Oxisteróis

Os oxisteróis são moléculas derivadas do colesterol ou de seus precursores em sua forma oxidada e são intermediários no metabolismo do colesterol para ácidos biliares (46). Essa classe de moléculas apresenta atividades regulatórias de suma importância como homeostase do colesterol, metabolismo lipídico, apoptose e autofagia. Além disso, os oxisteróis foram descritos como capazes de desencadear efeitos patológicos e estar diretamente envolvidos no desenvolvimento de doenças como a aterosclerose, doenças neurológicas e até no câncer (47).

A estrutura dessas moléculas varia de acordo com o número e posição dos grupos funcionais oxigenados, entre eles grupos -ceto, -epoxi e -hidroperoxi (Figura 6). A formação destes oxisteróis de variadas estruturas pode ocorrer pela via enzimática ou não-enzimática da oxidação do colesterol (47). Em sua produção pela via enzimática, há envolvimento das enzimas do citocromo P450 neste processo, como ocorre no caso da molécula de 27-hidroxicolesterol (CYP27A1) (48). Por outro lado, outros oxisteróis são produzidos por oxidação não-enzimática (auto-oxidação) pela ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou de nitrogênio (RNS). Exemplos de oxisteróis que passam por esse processo de produção são o 7-cetocolesterol (7-KC) e o 7 α / β -hidroxicolesterol.

Figura 6. Estrutura da molécula de colesterol e alguns dos diferentes tipos de oxisteróis derivados de seu metabolismo. Adaptado de: Jusakul, A 2011 - Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis; Lipids in Health and Disease; 10(1), 44.

A oxidação do colesterol pode ocorrer em diversos tecidos, mas com destaque principal na parede aórtica durante a formação do ateroma. De fato, alguns oxisteróis (como o 7-KC) são encontrados em grandes quantidades em lesões ateroscleróticas e estão envolvidos na gênese da aterosclerose (49). Entretanto, além deste papel bem descrito na literatura, essas moléculas possuem um efeito citotóxico e pro-inflamatório relevantes. Por isso, a contribuição dos oxisteróis em diversas doenças degenerativas como Alzheimer e osteoporose também é debatida e estudada (50, 51).

Em 1946, o primeiro relato acerca da relevância da oxidação do colesterol na carcinogênese foi descrito por Bischoff e Rupp (52). Desde então, a presença destas moléculas em pacientes portadores de tumor foi proposta como biomarcador e possível alvo de modulação terapêutica para inibição da progressão da doença

(53). Os mecanismos pelos quais os oxisteróis podem contribuir na carcinogênese variam desde a produção de ROS/RNS, regulação positiva de proteínas como a COX-2 e promoção de metástase (54).

Entretanto, a atividade dessas moléculas no quadro do câncer é, deveras, ambígua. Enquanto há um número substancial de estudos definindo atividade pró-tumoral dos oxisteróis, há também uma vertente que foca no potencial terapêutico de certos oxisteróis como agentes antitumorais, destacando sua ação no combate ao câncer. Esta atividade antitumoral de alguns oxisteróis pode ser simplesmente devido à inibição da síntese de esterol, com consequente diminuição no colesterol disponível para formação de novas membranas requeridas durante o processo de replicação celular (55). Ainda, mecanismos como superprodução de ROS, alteração nos níveis de cálcio e alterações na membrana mitocondrial também corroboram com a atividade citotóxica dos oxisteróis (56).

1.5 7-cetocolesterol (7-KC) como agente antitumoral

O 7-cetocolesterol (7-KC) é um dos grandes produtos oriundos da oxidação do colesterol, originado através da via não-enzimática e com estrutura que difere da molécula de colesterol apenas pela presença de um grupo cetona no C7 (57). Estudos sobre as funções do 7-KC inicialmente observaram sua elevada presença em lesões ateroscleróticas e um alto potencial aterogênico (58). De fato, o 7-KC mostrou-se de suma importância na compreensão do papel dos oxisteróis em dislipidemias e suas doenças correlatas. Entretanto, o potencial bioativo desta molécula abrange um amplo arsenal de mecanismos e desfechos moleculares que requerem maior atenção.

Além de seu papel no metabolismo lipídico já abordado, o 7-KC passou a ser intensivamente estudado por sua capacidade na indução de morte celular em diferentes modelos celulares, como em células-tronco mesenquimais e em linhagens tumorais (59). De maneira importante, o 7-KC é capaz de desencadear o processo de morte celular através de diferentes vias de sinalização e, conseqüentemente, por variados mecanismos. Por exemplo. O 7-KC é capaz de

induzir o processo apoptótico através da geração de ROS, redução do potencial de membrana mitocondrial (Δm) e liberação de citocromo C (59).

O potencial citotóxico da molécula de 7-KC ganha destaque na literatura a partir da demonstração da sua capacidade em desencadear um mecanismo complexo de morte celular denominado oxiaoptofagia. Este termo abrange três mecanismos distintos pelos quais o 7-KC exerce sua citotoxicidade, sendo: stress oxidativo, apoptose e autofagia (60). A ocorrência deste mecanismo de morte celular induzido pelo 7-KC foi demonstrado, por exemplo, em linhagens celulares de oligodendrócitos murinos (60) e em células-tronco mesenquimais de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) (61). Em linhagens tumorais de câncer de mama e melanoma, o uso do 7-KC também foi demonstrado como eficaz na promoção de morte celular tumoral, principalmente por indução de apoptose e atuação em vias de sinalização como Sonic Hedgehog (SHh) e LXR α (62). Entretanto, ainda há pouca evidência acerca de seu potencial terapêutico para os diversos tipos de câncer e os efeitos do uso da molécula em combinação com outros agentes antitumorais é, também, ainda desconhecido.

1.6 Mecanismos de morte celular

Para que organismos eucarióticos estejam em seu estado de homeostase, é necessária uma fina regulação entre a proliferação e a morte de suas células. Por sua vez, o processo de morte celular pode ocorrer tanto por mecanismos bem regulados e programados (apoptose) como também por mecanismos de menor regulação como no caso da necrose (63).

Os motivos pelos quais a morte celular ocorre são variados. Este processo pode ser em prol da manutenção da homeostase do indivíduo ou mesmo uma consequência de um processo danoso, como uma doença (64). Classicamente, os mecanismos mais estudados e reconhecidos de morte celular são a apoptose, autofagia e necrose. Entretanto, é necessário pontuar que um número emergente de novos mecanismos envolvidos no processo de morte celular vem sendo recentemente descritos na literatura, como: parthanatos (65), piroptose (66),

ferroptose (67), morte celular NETótica (68), etc. Estes novos mecanismos estão sendo essenciais para melhor compreensão de aspectos celulares básicos, para fomentar novas estratégias terapêuticas e, ainda, para abranger o conhecimento sobre aspectos fisiopatológicos de doenças que ainda são pouco esclarecidos.

Reconhecer e compreender a existência de diferentes tipos de mecanismos de morte celular é importante para refinar e propor de maneira mais assertiva novas terapias a serem utilizadas no combate de doenças infecciosas, degenerativas e proliferativas

1.6.1 Apoptose

A apoptose, um tipo de morte celular programada, é um processo pelo qual uma célula interrompe seu crescimento e divisão e entra em uma forma controlada de morte celular que não resulta no extravasamento de seu conteúdo nas adjacências (69). Este tipo de morte celular resulta em um eficiente e ordenado processo de remoção de células danificadas, podendo ocorrer em situações de stress ou mesmo como mecanismo de regulação durante o desenvolvimento (70). Este é um mecanismo extremamente conservado entre metazoários, o que explicita sua primordial função no desenvolvimento, manutenção de homeostase tecidual e até na prevenção do câncer (71).

A apoptose pode ser iniciada pela via intrínseca ou extrínseca. A via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, é ativada principalmente por influência de estímulos internos como dano na estrutura do DNA, privação de nutrientes e fatores de crescimento, entre outros (72). Esses estímulos pró-apoptóticos causam perturbação mitocondrial, levando à permeabilização da membrana externa mitocondrial. A partir deste fenômeno, uma série de proteínas como citocromo c e Smac/DIABLO são liberadas no citoplasma e dão sequência na sinalização que culmina com a morte celular (73). A via extrínseca, por sua vez, é ativada principalmente a partir de estímulos externos, através da ligação de receptores de morte celular como Fas, receptores da família TNF (*Tumor Necrosis Factor*) e TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (74). A ligação destes

receptores recruta uma série de fatores *downstream*, como a caspase-8, que, por sua vez, dão continuidade à sinalização do processo apoptótico (75).

Por fim, ambas as vias de apoptose convergem na fase de execução da apoptose, caracterizada pelo recrutamento das caspases executoras (caspase 3-, -6 e -7). Essas caspases são responsáveis pela degradação de estruturas celulares, fazendo com que a célula apresente uma série de alterações morfológicas como picnose e cariorrexe. No fim do processo, essas células destruídas são fagocitadas, (74).

Figura 7. Resumo das vias extrínseca e intrínseca da apoptose e moléculas envolvidas no processo. Adaptado de: www.biologydictionary.net/apoptosis/

1.6.2 Autofagia

A autofagia é um processo intracelular degradativo altamente conservado em eucariotos que ocorre sob condições estressantes como dano a organelas, privação de nutrientes e na presença de proteínas mutadas (76). Apesar de ocorrer em situações de estresse, a autofagia é um processo que também ocorre em nível basal durante condições fisiológicas para manutenção da homeostasia do organismo (77). Desta forma, distúrbios no processo autofágico estão correlacionados com diversas fisiopatologias como doenças neurodegenerativas (78), cardiomiopatias (79) e câncer (76, 80).

Resumidamente, o processo autofágico pode ser dividido em cinco fases: iniciação, elongação, formação do autofagossomo, fusão e formação do autolisossomo (Figura 8) (81). Na etapa inicial, ocorre a formação da membrana vesicular autofágica através da ativação principalmente do complexo ULK1 (Unc-51-like kinase 1). Na etapa de elongação, dois sistemas de conjugação *ubiquitin-like* recrutam as proteínas ATG12, ATG5 e LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*), permitindo a elongação e fechamento para formação do autofagossomo. Em sequência, o autofagossomo se funde com o lisossomo, culminando com a etapa final de formação do autolisossomo. Por fim, os componentes contidos dentro desta vesícula são degradados em aminoácidos, ácidos graxos e nucleotídeos.

Figura 8. As cinco fases do processo autofágico: iniciação, alongação, formação do autofagossomo, fusão e formação do autolisossomo. Adaptado de: *The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of câncer.* Xue Yang et al, 2015 *Cell & Bioscience*.

Especificamente sob a perspectiva do câncer, a autofagia possui um duplo papel. Por um lado, ela confere tolerabilidade das células tumorais a ambientes de hipóxia, privação de nutrientes e atividade de certas terapias, culminando em mais um mecanismo de resistência aos tumores (82). Outro fato relevante é que a autofagia pode promover a sobrevivência dessas células tumorais em um estado de dormência (ou quiescência), que é de importante nos processos de recidiva tumoral (83). Nesse aspecto, o uso de inibidores da autofagia se mostrou eficaz para eliminação destas células dormentes através do acúmulo de danos mitocondriais e consequente geração de ROS, culminando com um processo apoptótico. Entretanto, de maneira contrária, o papel autofágico de reciclagem de proteínas e organelas danificadas é um processo de mitigação de estresse celular que, por si só, pode impedir processos iniciais de tumorigênese (84). Desta forma, o uso de moléculas que consigam modular processos autofágicos em prol do tratamento antitumoral vem sendo estudado na literatura e pode conter avanços significativos para o combate ao câncer.

1.6.3. Espécies reativas de oxigênio e seu envolvimento na morte celular

O termo espécies reativas de oxigênio, ou ROS, refere-se a um conjunto de moléculas instáveis, reativas e reduzidas do oxigênio geradas como subprodutos através de processos metabólicos normais. Entre estas moléculas estão o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-), hidroxila ($\cdot OH$) e o oxigênio singlete (O_2) (85). Essas moléculas podem ser produzidas de maneira endógena (através do metabolismo mitocondrial, por exemplo) (86) ou de maneira exógena por exposição à luz UV ou radiação (87, 88). A existência de ROS nas células é essencial para correta regulação de funções fisiológicas como crescimento celular, diferenciação e até morte celular. Além disso, as células dispõem de mecanismos antioxidantes para manutenção dos níveis adequados desta classe de moléculas (89). Entretanto, havendo um desbalanço entre os níveis toleráveis de ROS, as células podem sofrer

efeitos deletérios decorrentes do processo de estresse oxidativo causado por ROS. De fato, níveis aumentados na produção de ROS foram associados com o desenvolvimento de doenças como Parkinson, Alzheimer, câncer, aterosclerose, esclerose lateral amiotrófica (ELA), entre outras (90, 91).

Devido ao seu importante papel como mensageiro celular, a participação de ROS no desencadeamento de mecanismos de morte celular, em especial na apoptose e autofagia, é relevante. Na indução do processo apoptótico, a presença de ROS em excesso resulta em danos oxidativos às mitocôndrias, com consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas como o citocromo-C (Cyt-C) da mitocôndria no citoplasma da célula (92, 93). Já no processo autofágico, ROS como o O_2^- e H_2O_2 são moléculas conhecidamente capazes de modular e induzir autofagia por vias mTOR-dependente, por exemplo (94).

É importante também ressaltar que, assim como a autofagia, o papel das ROS na progressão e combate tumoral é ambígua e conflitante. Ao mesmo tempo que diversos estudos demonstraram como essas moléculas atuam permitindo e facilitando o processo tumorigênico, diversas formas de tratamento tumoral como a própria quimioterapia combatem os tumores através do aumento de produção de ROS nestas células malignas (95). Desta forma, fica clara a importância de compreender as formas de modulação destas moléculas sob a ótica do combate aos tumores, buscando ressaltar e explorar seu papel como indutora de morte celular tumoral em detrimento de sua ação pró-tumorigênica. Inclusive, a terapia fotodinâmica (PDT - photodynamic therapy), uma forma emergente de combate a tumores (96), exerce seu papel antitumoral através de uma altíssima produção de ROS de maneira direcionada nas células tumorais que, por sua vez, atuam na ablação do câncer. Este tipo de alternativa vem se mostrando promissora para uma variedade de neoplasias, dentre elas o câncer de cabeça, pescoço e pele (97, 98).

1.6.4. Metabolismo mitocondrial e morte celular

As mitocôndrias são organelas complexas e multifuncionais envolvidas em processos essenciais do funcionamento celular como metabolismo energético e morte celular. Além disso, outras funcionalidades como regulação do metabolismo de cálcio e do processo de envelhecimento celular são também intrínsecas ao metabolismo mitocondrial (99, 100).

Além de seu papel bem descrito no metabolismo energético das células, as mitocôndrias atuam de maneira direta na regulação e no desencadeamento de morte celular principalmente por apoptose. Como já citado, na cascata de sinalização da via intrínseca apoptótica, o evento de permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP - Mitochondrial outer membrane polarization) é indispensável para conclusão do processo. Além disso, a ocorrência de MOMP é considerada um “ponto de não retorno” na via apoptótica (101), pois resulta na difusão de proteínas situadas entre as membranas internas e externas mitocondriais. Para que ocorra a formação de poros e, conseqüentemente, a permeabilização da mitocôndria, proteínas da família Bcl-2 como Bax e Bak são necessárias para efetivação do processo (102).

A função da mitocôndria é diretamente ligada a seu estado de polarização, onde mitocôndrias em condições fisiológicas são polarizadas e apresentam potencial altamente carregado negativamente (103). Assim, a perda deste potencial na membrana mitocondrial é seguida pelas respostas celulares acima descritas que dão sequência ao processo de morte celular, como a própria liberação do citocromo C (104). Por esta razão, diversos estudos visam avaliar o estado de polarização da mitocôndria em processos patológicos ou mesmo como terapias podem impactar nesta polarização. O TMRE (tetrametilrodamina, etil ester) é um corante permeável em células de caráter catiônico que se acumula em mitocôndrias polarizadas (103). Por ser um fluoróforo, é possível analisar de maneira quantitativa processos que estejam ocorrendo na organela, tornando-se uma excelente metodologia para avaliação da mitocôndria em processos de morte celular.

2. Objetivo

O objetivo do presente projeto é de investigar o potencial da administração combinada de C6-ceramida e 7-cetocolesterol quanto a sua capacidade de indução de morte celular tumoral em uma linhagem de câncer de mama triplo-negativa (MDA-MB-231). De maneira complementar, o projeto irá investigar também se há sinergismo no uso das moléculas e o envolvimento de mecanismos clássicos de morte celular como apoptose, necrose, geração de ROS, envolvimento mitocondrial e autofagia.

3. Material e Métodos

3.1 Linhagens Celulares

As células tumorais utilizadas foram da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), que permaneceram criopreservadas em ultrafreezer - 80°C (Sanyo) previamente até o momento de sua utilização. Essa linhagem, de caráter aderente, foi cultivada em meio DMEM Low Glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrocell, Brasil) e com antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina - Sigma Aldrich).

3.2 Cultivo e manutenção das células

As células foram descongeladas em banho-maria a 37°C e transferidas para um tubo plástico de fundo cônico de 15 mL contendo 10 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB e 1 mL de penicilina e estreptomicina. O tubo foi centrifugado a 250 X g (1240 rpm) por 7 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o botão celular foi ressuspendido em 15 mL de meio de cultura previamente suplementado. As células foram então transferidas para uma garrafa de cultura celular de 182 cm² de área de cultivo e armazenadas em incubadoras a 37°C e 5% de CO₂. A cada dois dias, as células foram observadas para acompanhamento do crescimento celular e para troca do meio de cultura. Para as células aderentes, quando estas atingiam uma confluência na garrafa de aproximadamente 90-95% com viabilidade mínima de 95%, as mesmas foram utilizadas. No caso das células em suspensão, verificávamos o crescimento através da turbidez do meio e com utilização do microscópio.

3.3 Tratamento das células

As linhagens celulares foram transferidas para placas pretas de 96 poços com fundo chato transparente (3603 - Corning, MA, USA) em duplicatas na

concentração de 1×10^4 células/poço. As células foram cultivadas até atingirem confluência de aproximadamente 85-90%.

O 7-KC foi sintetizado a partir da molécula de colesterol (C8667 - Sigma Aldrich, MO, USA) pelo Prof. Dr. Alessandro Rodrigues do campus de Diadema da Universidade Federal de São Paulo conforme descrito em Carvalho *et al*, 2011 e Salvador *et al*, 2013. Uma solução estoque de 10000 μM foi preparada em etanol absoluto e utilizada dentro do período de um mês. A C6-cer foi adquirida da Sigma Aldrich (860506P). Uma solução estoque de 5000 μM foi preparada em etanol absoluto e utilizada dentro do período de um mês.

Nos ensaios de monoterapia com C6-cer, as células foram tratadas com as concentrações de 1, 2, 5, 10, 20 e 50 μM . Na monoterapia com 7-KC, as concentrações utilizadas foram de 5, 10, 20 e 30 μM . Nos ensaios com administração combinada das moléculas, as concentrações utilizadas foram de 5, 10 e 15 μM de C6-cer e 5, 10, 20 e 30 μM de 7-KC. O período de tratamento das células com as moléculas foi de 24 ou 48 horas. Os ensaios abaixo descritos foram então realizados para avaliação da citotoxicidade e mecanismos de morte exercidos pelas moléculas.

3.4 Ensaios de Morte celular

3.4.1 Viabilidade celular – Iodeto de propídio

As células tumorais, após tratamento com as drogas, foram avaliadas quanto à sua viabilidade utilizando iodeto de propídio (PI) (P3566- Molecular Probes, OR, USA). Foi adicionado 1 μL (0,1 $\mu\text{g/mL}$) de Hoechst 33342 (H1399 - Molecular Probes, OR, USA) em cada poço da placa contendo as células previamente ao ensaio. Após o período de incubação, 1 μL de PI (50 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado nos poços. A verificação do número de células vivas e mortas foi feita com utilização do programa ImageXpress Micro High Content Screening System (Molecular Devices, CA, USA). O número total de células e a viabilidade celular foram analisados com utilização do programa Cell Scoring MetaXpress. Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos.

3.4.2 Apoptose - Caspase 3/7

As células tumorais, após o período de tratamento com as drogas, foram avaliadas quanto à ativação das caspases 3/7 através do ensaio com CellEvent Caspase-3/7 Green (Invitrogen, CA, USA) de acordo com a descrição do fabricante. Para tal, 1 μ L (0,1 μ g/mL) de Hoechst 33342 foi adicionado em cada poço da placa antes do término do período de incubação. As células foram incubadas com 2 μ L do substrato de caspase 3/7 por 30 min a 37°C. Após este período, a leitura da fluorescência foi realizada no ImageXpress Micro High Content System. Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos e a verificação da ativação das caspases 3/7 foi feita com utilização do software Cell Scoring MetaXpress.

3.4.3 Apoptose e necrose - Anexina/PI

Após o período de tratamento com as drogas, as células foram avaliadas quanto a ocorrência de morte celular por apoptose ou necrose. Para tal, o kit Annexin-V/PI (BD Pharmingen, USA) foi utilizado conforme descrição do fabricante. O núcleo das células foi corado com 1 μ L (0,1 μ g/mL) de Hoechst 33342. Em sequência, um mix de 13 μ L da solução de Anexina V/PI foi adicionado, sendo: 1 μ L de Anexina-V (FITC), 2 μ L de iodeto de propídio (PI) e 10 μ L de tampão Anexina V 10X contendo 0,1M de Hepes/NaOH, 1,4M de NaCl e 25mM de CaCl_2 . Por fim, a avaliação da ocorrência de morte celular por apoptose/necrose na placa foi feita com utilização do ImageXpress Micro High Content Screening System (Molecular Devices, CA, USA). Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos. O software Cell Health MetaXpress foi utilizado para analisar a porcentagem de células mortas (apoptose e necrose), fornecendo o percentual de células marcadas com Anexina-V, PI ou ambos os marcadores e o total de células analisadas.

3.4.4 Análise do potencial de membrana mitocondrial por TMRE

Adicionou-se 1 μ L de Hoechst 33342 (0,1 mg/mL) nos poços da placa contendo as células tumorais. Após o período completo de tratamento (24 e 48

horas), 1 μ L de TMRE (tetrametilrodamina, etil éster - 87917 - Sigma-Aldrich, MO, USA) a 50 nM foi adicionado nos poços da placa e incubado por 20 minutos. Este corante, de caráter catiônico, é utilizado para marcação de mitocôndrias em seu estado ativo, com carga negativa. Mitocôndrias inativas ou em processo de despolarização não são capazes de sequestrar o TMRE, resultando na diminuição de sua fluorescência na análise. Por fim, a fluorescência do TMRE foi determinada utilizando o equipamento ImageXPress Micro High Content System (Molecular Devices, USA). Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos. O potencial de membrana mitocondrial foi determinado utilizando o software Cell Scoring MetaExpress (Molecular Devices, CA, USA).

3.4.5 Análise de ROS com H₂DCFDA (Reactive Oxygen Species)

A determinação da existência de ROS foi avaliada através do kit DCFDA / H₂DCFDA – Cellular ROS Assay Kit (ab113851 Abcam, Cambridge, UK) de acordo com a descrição do fabricante. 1 μ L de Hoechst 33342 (0,1 mg/mL) foi adicionado nos poços da placa. Após o período de tratamento, as células foram incubadas com 10 μ M de H₂DCFDA em meio de cultura por 30 minutos. Após este período, as células foram lavadas com o tampão proveniente do kit e as células foram suspendidas com PBS. A produção de ROS intracelular foi determinada usando o ImageXPress Micro High Content System. Cinco sítios por poços e dois poços por tratamento foram adquiridos. O número de células positivas para ROS foi determinado usando o MetaXpress Cell Scoring software.

3.4.6 Autofagia – Sensor LC3B

A autofagia foi analisada medindo a agregação da proteína LC3B acoplada à proteína fluorescente verde (GFP) através do Premo™ Autophagy Sensor LC3B-GFP (BacMam 2.0) (Invitrogen - Life Technologies, MA, EUA) conforme descrito pelo fabricante. As células tumorais foram transduzidas com vetores baculovirais não replicantes contendo LC3B-GFP (componente A) ou LC3B Δ (G120A) -GFP (componente B). 16 horas após a transdução, as células foram tratadas com as concentrações descritas de C6-cer e 7-KC em combinação durante 48 horas. Duas horas antes do final do período de tratamento, as células foram incubadas com 1

μL (0,1 μg / mL) de Hoechst 33342 para coloração dos núcleos. Foram adquiridos cinco sítios por poço e dois poços por tratamento. O software Cell Scoring MetaXpress foi usado para determinar a porcentagem de células positivas para a proteína LC3B-GFP.

3.4.7 Análise de alterações na organização da F-actina

As alterações na organização da actina foram investigadas com utilização do kit de faloidina Alexa Fluor 568 (A12380- Molecular Probes, USA) de acordo com a descrição do fabricante. As células tratadas foram fixadas em uma solução de paraformaldeído a 4% por 2 horas. Após duas lavagens com DPBS, as células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,1% (93443–SigmaAldrich, USA) a 4°C por 15 minutos e, em seguida, foi feita uma incubação com 3 U/mL de faloidina Alexa Fluor 568 (A12380 - Molecular Probes, USA) em DPBS por 60 minutos. Após a lavagem com DPBS, o núcleo da célula foi marcado com 1 μL (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de Hoechst 33342. As placas foram lavadas duas vezes com DPBS e analisadas usando ImageXpress. Cinco sítios por poço e três poços por tratamento foram adquiridos.

3.5 Análise de sinergismo das drogas - *Combination Index (CI)*

Para avaliar se as moléculas de C6-ceramida e 7-cetocolesterol agiram de maneira sinérgica induzindo a morte celular tumoral, realizamos o cálculo do índice combinatório (*Combination Index – CI*), como descrito por Chou-Talalay (105). O cálculo do CI é realizado com base na equação de efeito-médio (median-effect equation – MEE), derivada da lei de ação das massas. Para tal, utilizamos do software Compusyn, também desenvolvido pelos autores do teorema. Valores de CI <1, =1 e >1 são indicativos de efeitos sinérgicos, aditivos e antagonistas, respectivamente.

3.6 Análise estatística

A verificação de diferenças estatísticas entre os parâmetros analisados nas células foi realizada com utilização da análise de variância (ANOVA) de uma via em

casos de tratamento das células com apenas uma molécula. Quando em associação de moléculas, verificamos possíveis diferenças estatísticas através do teste de ANOVA de duas vias. Por fim, utilizamos pós teste de Dunnett para comparações múltiplas. As análises foram feitas com utilização do pacote estatístico GraphPad Prism8®. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (DP) e foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1 Linhagem de câncer de mama MDA-MB-231

Os experimentos iniciais do projeto consistiram na avaliação da citotoxicidade das moléculas de C6-cer, 7-KC e de ambas na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™). A linhagem é caracterizada como aderente ao plástico quando em cultura e de morfologia epitelial com aspecto fusiforme, como demonstrado na figura abaixo (Figura 9).

Figura 9. Fotomicrografias das células MDA-MB-231. As imagens das células aderidas à garrafa de cultura demonstram seu caráter fusiforme, tendência à justaposição e diferentes densidades celulares na garrafa de cultura celular. A: Baixa densidade; B: alta densidade. Adaptado de: www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#characteristics

4.1.1 C6-ceramida

Inicialmente, para avaliar o potencial citotóxico da C6-cer, foi realizado ensaio de citotoxicidade para estipular uma dose ideal de C6-cer a ser utilizada nos experimentos seguintes. Desta forma, tratamos por 24 horas as células com

concentrações de 1, 2, 5, 10, 20 e 50 μM de C6-cer e avaliamos a quantidade de células viáveis em cada uma dessas concentrações (Figura 10). De fato, nestes experimentos com 24 horas de tratamento, as concentrações mais baixas de 1, 2, 5, 10 e 20 μM não apresentaram citotoxicidade significativa, evidenciado pela porcentagem de mais de 90% de células ainda viáveis após tratamento com todas essas concentrações. Por outro lado, na concentração de 50 μM de C6-cer, apenas 27% das células tratadas foram identificadas como viáveis. Com isso, estipulamos o valor de IC_{50} para a C6-cer nesta linhagem celular através de uma curva de ajuste de inclinação variável, resultando em um IC_{50} de 37.63 μM .

Figura 10. Gráfico da citotoxicidade da C6-cerâmica nas células MDA-MB-231. As células foram tratadas C6-cerâmica em concentrações de 1, 2, 5, 10, 20 e 50 μM por um período de 24 horas.

Em sequência, analisamos alguns mecanismos de morte celular possivelmente envolvidos na ação da C6-cer com o intuito de compreender por quais vias a molécula estaria exercendo seu potencial citotóxico.

A apoptose e necrose foram testadas com utilização do teste de Anexina-V/PI, onde os núcleos foram marcados com Hoechst 33342. Neste ensaio, a C6-cer promoveu a apoptose apenas na concentração de 50 μM , apresentando 81% ($p < 0.0002$) de células apoptóticas nesta concentração (Figura 11A). Por fim,

observamos que a droga foi pouco eficiente em induzir morte celular por necrose neste período de tratamento pois, mesmo na maior concentração, apenas 10% das células encontravam-se nesse estágio, não havendo também diferença estatística (Figura 11B).

Figura 11. Gráfico do ensaio de apoptose e necrose nas células MDA-MB-231. As células foram tratadas com concentrações crescentes de C6-ceramida pelo período de 24 horas. A: Porcentagem de células em apoptose; B: Porcentagem de células em necrose. Dados apresentados como média e desvio-padrão. Foi realizado teste de ANOVA uma via e pós teste de Dunnett para comparações múltiplas, onde foram considerados valores estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ (*). Valores de $p < 0,001$ foram representados como ***. Diferenças significativas são em relação ao controle. As análises foram feitas no software GraphPad Prism 8.0.1

Em seguida, ainda avaliando a capacidade da molécula em ativar a via apoptótica, verificamos a ativação das caspases efetoras (3 e 7) em decorrência do tratamento. Neste ensaio, as concentrações de 20 e 50 µM foram efetivas na ativação de caspase 3/7 observando-se 4% e 48% de ativação nas células, respectivamente ($p=0,03$ e $p<0,0001$, respectivamente) (Figura 12).

Figura 12. Gráfico da presença da caspase 3/7 nas células MDA-MB-231. As células foram tratadas com concentrações crescentes de C6-ceramida pelo período de 24 horas. Dados apresentados como média e desvio-padrão. Foi realizado teste de ANOVA uma via e pós teste de Dunnett para comparações múltiplas, onde foram considerados valores estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ (*). Valores de $p < 0,0001$ foram representados como ****. Diferenças significativas são em relação ao controle. As análises foram feitas no software GraphPad Prism 8.0.1.

A análise do potencial de membrana mitocondrial, por sua vez, foi realizada com utilização do reagente TMRE. A partir da concentração de 10 μM , observou-se diminuição estatisticamente significante ($p < 0,05$) no potencial de membrana da mitocôndria, evidenciado pela diminuição da intensidade de fluorescência em tais concentrações (Figura 13). Na concentração de 50 μM , a intensidade de fluorescência emitida foi ínfima em relação às concentrações anteriores ($p < 0,0001$), por conta da alta taxa de morte celular presente (Figura 13).

Figura 13. Gráfico do ensaio do potencial de membrana da mitocôndria nas células MDA-MB-231. As células foram tratadas com concentrações crescentes de C6-ceramida pelo período de 24 horas. Dados apresentados como média e desvio-padrão. Foi realizado teste de ANOVA uma via e pós teste de Dunnett para comparações múltiplas, onde foram considerados valores estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ (*). Valores de $p < 0,0001$ foram representados como ****. Diferenças significativas são em relação ao controle. As análises foram feitas no software GraphPad Prism 8.0.1.

Por fim, levando em consideração os efeitos exercidos na mitocôndria, avaliamos também aspectos morfológicos da organela nas variadas concentrações

da C6-cer (Figura 14). Nas fotomicrografias obtidas, observamos que nas células não tratadas as mitocôndrias encontram-se distribuídas pelo citoplasma apresentando sua estrutura normal, de formato alongado e tubular. As células tratadas com 2 e 5 μM (Figura 14B e C) apresentam pouca diferença estrutural em comparação ao controle (Figura 14A). Com 10 e 20 μM de C6-cer (Figura 14C e D), observa-se perda do aspecto alongado e tubular da organela, demonstrando aspecto fragmentado (mitocôndrias pontuadas). Há também acúmulo das organelas em torno do núcleo das células. Na concentração de 50 μM , por conta da morte celular presente, não é possível observar as mitocôndrias na grande maioria das células (Figura 14F). Nas células ainda vivas, as mitocôndrias demonstram-se extremamente fragmentadas.

Figura 14. Fotomicrografias das células MDA-MB-231 coradas com Hoechst 33342 (azul) e TMRE (vermelho). As células foram submetidas a diferentes concentrações de C6-ceramida. A: Controle; B: 2 μ M C6-cer; C: 5 μ M C6-cer; D: 10 μ M C6-cer; E: 20 μ M C6-cer e F: 50 μ M C6-cer. Escala de 50 μ m demonstrada nas imagens.

Então, avaliamos também a capacidade da C6-cer de produzir ROS quando utilizada baixas concentrações (0 até 15 μ M) pelo período de incubação de 48 horas. Como observado na figura 15, a produção de ROS está aumentada na concentração de 10 μ M ($p=0.03$) e 15 μ M ($p=0,007$) quando comparado com o controle. A concentração de 5 μ M não foi capaz de produzir ROS em níveis significantes.

Figura 15– Gráfico da produção de ROS nas células tratadas com C6-Ceramida por 48 horas. Foi realizado teste de ANOVA uma via e pós teste de Dunnett para comparações múltiplas, onde foram considerados valores estatisticamente significantes quando $p<0.05$ (*). ** $p<0.01$. Diferenças significativas são em relação ao controle. As análises foram feitas no software GraphPad Prism 8.0.1.

Por fim, avaliamos a distribuição das fibras de F-actina após tratamento de 48 horas para analisar possíveis alterações no citoesqueleto causadas pela C6-cer. As células não tratadas (Figura 16A) apresentam fibras pouca demarcadas no

citoplasma e com maior presença na borda da membrana citoplasmática. Na presença de 5 μM de C6-cer (Figura 16B), as fibras citoplasmáticas tornam-se mais evidentes, com algumas células apresentando encolhimento do citoplasma e perda da regularidade nas membranas. Nas concentrações de 10 e 15 μM , essas alterações tornam-se mais exacerbadas, demonstrando claro acometimento da estrutura normal das fibras (Figura 16C e D). Após a concentração de 15 μM a análise morfológica torna-se inviável devido à baixíssima adesão das células na placa de cultura.

Figura 16. Fotomicrografias das células MDA-MB-231 coradas com Hoechst 33342 (azul) e anticorpo anti F-actina (vermelho). As células foram submetidas a diferentes concentrações de C6-ceramida por 48 horas. A: Controle; B: 5 μM C6-cer; C: 10 μM C6-cer; D: 15 μM C6-cer; Escala de 100 μm demonstrada nas imagens.

4.1.2 7-cetocolesterol

O valor de IC_{50} do 7-KC nessa linhagem celular foi previamente estabelecido pelo grupo em 37,64 μM após o período de 24h de tratamento (106). Em

concentrações superiores a 25 μM , a presença de morte celular por apoptose é bem evidente (106). Ainda, a partir de concentrações acima de 50 μM , o 7-KC apresenta ativação das caspases efetoras 3 e 7 (106). Desta forma, os testes realizados neste estudo utilizaram concentrações subtóxicas de 7-KC para as análises de terapia combinada das moléculas pelo período de 48 horas.

Inicialmente, na análise do potencial de membrana da mitocôndria ($P\Psi_m$) por TMRE, o 7-KC não demonstrou capacidade em desencadear alterações significantes na intensidade de fluorescência do ensaio nas concentrações testadas (Figura 17).

Figura 17. Gráfico do ensaio de potencial de membrana da mitocôndria nas células MDA-MB-231. As células foram tratadas com concentrações crescentes de 7-cetocolesterol pelo período de 48 horas. Dados apresentados como média e desvio-padrão. Foi realizado teste de ANOVA uma via e pós teste de Dunnett para comparações múltiplas, onde foram considerados valores estatisticamente significantes quando $p < 0.05$ (*) As análises foram feitas no software GraphPad Prism 8.0.1.

Confirmando o observado acima, a morfologia das mitocôndrias também não demonstrou alterações visíveis após tratamento com 7-KC em comparação com as células controle (Figura 18).

Figura 18. Fotomicrografias das células MDA-MB-231 coradas com Hoechst 33342 (azul) e TMRE (vermelho). As células foram submetidas a diferentes concentrações de 7-cetocolesterol pelo período de 48 horas. A: Controle; B: 10 μ M 7-KC; C: 20 μ M 7-KC e D: 30 μ M 7-KC. Escala de 100 μ m demonstrada nas imagens.

Ainda, o 7-KC também não demonstrou capacidade de gerar ROS nesta linhagem celular com as concentrações aqui testadas (Figura 19).

Figura 19. Gráfico da produção de ROS nas células tratadas com 7-cetocolesterol por 48 horas. As células foram tratadas com concentrações crescentes de 7-cetocolesterol por 48 horas. Foi realizado teste de ANOVA uma via e pós teste de Dunnett para comparações múltiplas, onde foram considerados valores estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ (*). As análises foram feitas no software GraphPad Prism 8.0.1.

Por fim, a distribuição das fibras de F-actina nas células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC pelo período de 48 horas foi avaliada (Figura 20). As células não tratadas demonstraram baixa demarcação das fibras e predileção pelas bordas da membrana citoplasmática (Figura 20A). O tratamento com 5 μM não causou alterações morfológicas visíveis (Figura 20B). Com 10 μM de 7-KC, algumas fibras citoplasmáticas tornam-se mais evidentes e algumas células apresentam encolhimento citoplasmático (Figura 20C). A partir de 20 μM , a presença de bordas mais brilhantes soma-se às alterações anteriores (Figura 20D). Nas concentrações mais altas de 25 e 50 μM de 7-KC, há intenso encolhimento com ruptura das fibras do citoesqueleto e fica evidenciada a perda de adesão destas células nos poços da placa (Figura 20E e F).

Figura 20. Fotomicrografias das células MDA-MB-231 coradas com Hoechst 33342 (azul) e anticorpo anti F-actina (vermelho). As células foram submetidas a diferentes concentrações de 7-cetocolesterol por 48 horas. A: Controle; B: 5 μ M 7-KC; C: 10 μ M 7-KC; D: 20 μ M 7-KC; E: 30 μ M 7-KC e F: 50 μ M 7-KC. Escala de 100 μ m demonstrada nas imagens.

4.1.3 Análise da combinação de C6-ceramida com 7-cetocolesterol

Após compreender de maneira geral o perfil citotóxico da C6-cer e do 7-KC nas células de câncer de mama, realizamos a administração combinada destas moléculas para averiguar um possível potencial sinérgico entre elas. Inicialmente, efetuamos o tratamento em um período de 24 horas, com concentrações crescentes

de C6-cer em 5, 10 e 15 μM e de 7-KC de 5, 10, 20 e 30 μM . Os resultados obtidos acerca da citotoxicidade dessa combinação estão na figura abaixo (Figura 21). Nestes resultados, é possível observar a presença de morte celular em decorrência do tratamento conjunto de uma maneira dose-dependente bem evidente. Entretanto, em termos de números absolutos, mesmo na associação das maiores concentrações das duas moléculas (15 μM de C6-cer e 30 μM de 7-KC), apenas 24% das células tratadas estavam mortas. Ainda, nota-se que a associação combinada das moléculas mostrou-se essencial para observarmos um potencial citotóxico efetivo nestas células.

Figura 21. Representação gráfica de citotoxicidade nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol por 24 horas. As células foram tratadas com concentrações de 5, 10 e 15 μM de C6-ceramida com concentrações de 5, 10, 20 e 30 μM de 7-cetocolesterol por um período de 24 horas. Dados são apresentados em forma de média e desvio-padrão. Análise estatística feita por ANOVA de duas vias seguida por pós-teste de Dunnett para múltiplas comparações. Diferenças significativas são em relação ao controle. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ # = $p < 0,001$; & = $p < 0,0001$.

Quanto à sinergia dessas moléculas neste período de tratamento por 24 horas, os valores de CI sumarizados na Tabela 2 apontam para um efeito sinérgico ($\text{CI} < 1$) para todas as concentrações utilizadas neste tratamento, embora alguns pontos da combinação tenham apresentado valores mais expressivos e que indicam melhor sinergia.

Tabela 2. Relação entre as concentrações das drogas em combinação, seus efeitos nas células e valor de índice combinatório (CI) após tratamento em 24 horas. Na tabela abaixo, estão expressos os valores relativos do efeito obtido na combinação de cada concentração das drogas, com valores variando entre 0, onde há ausência de morte celular, e 1, representando 100% de morte celular. O cálculo do CI foi realizado com utilização do software Compusyn, desenvolvido pelos autores do teorema de Chou-Talalay. Valores de CI <1, =1 e >1 são indicativos de efeitos sinérgicos, aditivos e antagonistas, respectivamente.

Concentração C6-cer (μM)	Concentração 7-KC (μM)	Efeito	CI
5	5	0.024	0.638
5	10	0.04	0.331
5	20	0.065	0.175
5	30	0.114	0.008
10	5	0.037	0.713
10	10	0.069	0.317
10	20	0.106	0.178
10	30	0.184	0.080
15	5	0.058	0.596
15	10	0.116	0.235
15	20	0.167	0.139
15	30	0.233	0.084

Por conta da baixa porcentagem de células mortas no ensaio anterior, avaliamos o efeito desta mesma administração em um período de 48 horas, visando determinar a relevância do tempo de exposição à terapia proposta nessas células. Como demonstrado no gráfico da Figura 22, a variável tempo mostrou-se de grande importância na capacidade de indução de morte celular. Em contraste com o obtido no tratamento em 24 horas, nas menores concentrações combinadas um efeito

expressivo de aproximadamente de morte (30%) mostrava-se presente. No ponto de maior concentração de ambas as drogas, verificamos que apenas 12% das células tumorais estavam vivas ($p<0,0001$). Neste resultado, pudemos novamente verificar a relação dose-dependente de nossa terapia combinada como também inferir esta relação tempo-dependente para otimização do resultado final.

Figura 22. Representação gráfica do ensaio de citotoxicidade nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol por 48 horas. As células foram tratadas com concentrações de 5, 10 e 15 μM de C6-ceramida e com concentrações de 5, 10, 20 e 30 μM de 7-cetocolesterol por um período de 48 horas. Dados são apresentados em forma de média e desvio-padrão. Análise estatística feita por ANOVA de duas vias seguida por pós-teste de Dunnett para múltiplas comparações. Diferenças significativas são em relação ao controle. * = $p<0,05$; ** = $p<0,01$; # = $p<0,001$; & = $p<0,0001$.

Nos cálculos do CI para este período de tratamento, apresentados na tabela 3, novamente confirmamos uma relação sinérgica das moléculas. De fato, no ponto de maior citotoxicidade, o valor de CI foi de 0.24, indicativo de forte sinergismo.

Tabela 3. Relação entre as concentrações das drogas em combinação, seus efeitos nas células e valor de índice combinatório (CI) após tratamento em 48 horas. Na tabela abaixo, estão expressos os valores relativos do efeito obtido na combinação de cada concentração das drogas, com valores variando entre 0, onde há ausência de morte celular, e 1, representando 100% de morte celular. O cálculo do CI foi realizado com utilização do software Compusyn, desenvolvido pelos autores do teorema de Chou-Talalay. Valores de CI <1 , $=1$ e >1 são indicativos de efeitos sinérgicos, aditivos e antagonistas, respectivamente.

Concentração C6-cer (μM)	Concentração 7-KC (μM)	Efeito	CI
5	5	0.039	0.894
5	10	0.101	0.616
5	20	0.446	0.259
5	30	0.541	0.235
10	5	0.21	0.673
10	10	0.35	0.511
10	20	0.424	0.475
10	30	0.439	0.494
15	5	0.291	0.815
15	10	0.322	0.788
15	20	0.405	0.705
15	30	0.879	0.242

Com os resultados anteriores, decidimos aprofundar nos mecanismos envolvidos na morte celular para a terapia combinada pelo período de 48 horas de tratamento. Inicialmente, na análise da ativação das caspases efectoras 3/7, foi possível observar uma relação direta entre o aumento na dose das drogas com o aumento na ativação das caspases de maneira estatisticamente significativa (Figura 23). Quando utilizadas concentrações de 7-KC de 5 e 10 μ M, independente da concentração de C6-cer, não se observou ativação significativa de caspase 3/7. Nas maiores concentrações de 7-KC (20 e 30 μ M), todas as concentrações de C6-cer em associação ativaram caspase 3/7 ($p < 0,0001$). A análise de ANOVA duas vias confirmou a significância dos achados e para a interação dos efeitos entre as duas moléculas ($p = 0,0062$).

Figura 23. Representação gráfica do ensaio de Caspase 3/7 nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol por 48 horas. As células foram tratadas com concentrações de 5, 10 e 15 μM de C6-ceramida e com concentrações de 5, 10, 20 e 30 μM de 7-cetocolesterol. Dados são apresentados em forma de média e desvio-padrão. Análise estatística feita por ANOVA de duas vias seguida por pós-teste de Dunnett para múltiplas comparações. Diferenças significativas são em relação ao controle. * = $p < 0,05$; # = $p < 0,001$; & = $p < 0,0001$.

Ainda, aprofundando um pouco mais nesse mecanismo de morte celular, quantificamos a porcentagem de células mortas que se encontravam em processo de apoptose e de necrose através do ensaio de Anexina V/ PI. Como demonstrado nas Figuras 24 e 25 abaixo, o processo apoptótico demonstrou-se o mecanismo predominante na morte dessa linhagem celular. Todos os pontos das concentrações combinadas com 20 e 30 μM de 7-KC apresentaram aproximadamente 50% das células em apoptose. Por outro lado, como mostrado na Figura 25, a necrose não foi um evento de grande relevância na morte dessas células. Mesmo nas concentrações mais elevadas a quantidade de células necróticas encontrava-se em torno de 10% apenas.

Figura 24. Representação gráfica do ensaio de Anexina V/PI (apoptose) nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol por 48 horas. As células foram tratadas com concentrações de 5, 10 e 15 μM de C6-ceramida e com concentrações de 5, 10, 20 e 30 μM de 7-cetocolesterol e a quantidade de células em apoptose foi avaliada. Dados são apresentados em forma de média e desvio-padrão. Análise estatística feita por ANOVA de duas vias seguida por pós-teste de Dunnett para múltiplas comparações. Diferenças significativas são em relação ao controle. * = $p < 0,05$; # = $p < 0,001$; & = $p < 0,0001$.

Figura 25. Representação gráfica do ensaio de Anexina V/ PI (necrose) nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol por 48 horas. As células foram tratadas com concentrações de 5, 10 e 15 μM de C6-ceramida e com concentrações de 5, 10, 20 e 30 μM de 7-cetocolesterol e a quantidade de células em necrose foi avaliada. Dados são apresentados em forma de média e desvio-padrão. Análise estatística feita por ANOVA de duas vias seguida por pós-teste de Dunnett para múltiplas comparações. Diferenças significativas são em relação ao controle. * = $p < 0,05$; # = $p < 0,001$; & = $p < 0,0001$.

Na análise do potencial de membrana mitocondrial para a terapia combinada por 48 horas, observamos um evento de hiperpolarização da membrana mitocondrial nas combinações de 5 e 10 μM de 7-KC com 5 μM de C6-cer ($p < 0,01$

e $p < 0,001$, respectivamente) (Figura 26). A partir dos pontos de associação das moléculas de 20 μM de 7-KC com 10 e 15 μM de C6-cer, o processo de despolarização mitocondrial com consequente diminuição na intensidade de fluorescência foi observado ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$, respectivamente). Em qualquer ponto da combinação com 30 μM de 7-KC, o evento de despolarização da membrana mitocondrial ocorreu de maneira significativa para todas as combinações com C6-cer.

Figura 26. Representação gráfica do ensaio potencial de membrana mitocondrial nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol por 48 horas. As células foram tratadas com concentrações de 5, 10 e 15 μM de C6-ceramida e com concentrações de 5, 10, 20 e 30 μM de 7-cetocolesterol por um período de 48 horas. Dados são apresentados em forma de média e desvio-padrão. Análise estatística feita por ANOVA de duas vias seguida por pós-teste de Dunnett para múltiplas comparações. Diferenças significativas são em relação ao controle. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; # = $p < 0,001$; & = $p < 0,0001$.

Em sequência, verificamos a presença da formação de ROS nas células tumorais após tratamento com as moléculas combinadas por 48 horas através da utilização do reagente H_2DCFDA . Nesta análise, pudemos observar um mecanismo de ação bem distinto entre as duas moléculas estudadas. As células tratadas apenas com adição de C6-cer demonstraram aumento de ROS de maneira dose-dependente (Figura 27). As concentrações de 10 e 15 μM foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente). Por outro lado, não foi observado aumento de ROS nas células tratadas apenas com 7-KC, mesmo na maior concentração (30 μM).

Na administração combinada, todas as combinações de C6-cer com 5 μ M de 7-KC estavam significativamente aumentadas ($p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,001$) (Figura 25). Na combinação com 10 μ M de 7-KC, apenas as concentrações de 10 e 15 μ M de C6-cer também apresentaram ROS elevado de maneira significativa ($p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente). Para a combinação com 20 μ M de 7-KC, apenas a maior concentração de C6-cer ainda conservou este aumento em ROS ($p<0,05$). Por fim, com 30 μ M de 7-KC, apenas a associação com 10 μ M de C6-cer levou a um aumento significativo de ROS ($p<0,05$).

Figura 27. Representação gráfica do ensaio de ROS nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6-cerâmica e 7-cetocolesterol por 48 horas. As células foram tratadas com concentrações de 5, 10 e 15 μ M de C6-cerâmica e com concentrações de 5, 10, 20 e 30 μ M de 7-cetocolesterol por um período de 48 horas. A porcentagem de células com presença de ROS foi avaliada com uso da sonda H_2DCFDA . Dados são apresentados em forma de média e desvio-padrão. Análise estatística feita por ANOVA de duas vias seguida por pós-teste de Dunnett para múltiplas comparações. Diferenças significativas são em relação ao controle. * = $p<0,05$; ** = $p<0,01$ # = $p<0,001$.

Também analisamos a ocorrência do processo autofágico nessas células tumorais após tratamento com C6-cer e 7-KC. Como demonstrado na Figura 28, a autofagia não se demonstrou um processo relevante para o desencadeamento de morte celular nessas células. Mesmo que alguns pontos da combinação das moléculas tenham demonstrado significância estatística, a porcentagem de células positivas para o processo autofágico foi de, no máximo, 2%.

Figura 28. Representação gráfica do ensaio de autofagia nas células MDA-MB-231 após tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol por 48 horas. As células foram tratadas com concentrações de 5, 10 e 15 μM de C6-ceramida e com concentrações de 5, 10, 20 e 30 μM de 7-cetocolesterol por um período de 48 horas. A porcentagem de células positivas para autofagia foi mensurada através do ensaio de agregação da proteína LC3B utilizando o Premo Autophagy Sensor Kit. Dados são apresentados em forma de média e desvio-padrão. Análise estatística feita por ANOVA de duas vias seguida por pós-teste de Dunnett para múltiplas comparações. Diferenças significativas são em relação ao controle. *= p<0,05; **=p<0,01 # = p<0,001; & = p<0,0001.

Por fim, verificamos os efeitos da administração combinada de C6-cer e 7-KC na morfologia das células MDA-MB-231 através da análise dos filamentos de F-actina antes e depois do tratamento (Figura 29). Semelhante ao observado na administração de 7-KC ou C6-cer individualmente, concentrações crescentes danificaram gradativamente a estrutura do citoesqueleto, evidenciado pelo aumento da fluorescência nas imagens e pelo evento de encolhimento citoplasmático. Nas imagens da Figura 29, verifica-se nos poços A (células não tratadas) e B (5 μM C6-cer + 20 μM 7-KC) a estrutura mitocondrial em formato tubular e fibras com baixa demarcação. No entanto, nos poços E (10 μM C6-cer + 20 μM 7-KC) e F (10 μM C6-cer + 30 μM 7-KC), observa-se alta demarcação das fibras, evidente encolhimento citoplasmático e perda do aspecto tubular e alongado das mitocôndrias.

Figura 29. Fotomicrografias das células MDA-MB-231 coradas com Hoechst 33342 (azul) e TMRE (vermelho). As células foram submetidas a diferentes concentrações de C6-ceramida e 7-cetocolesterol pelo período de 48 horas. A: Controle; B: 5 μ M C6-cer + 20 μ M 7-KC; C: 5 μ M C6-cer + 30 μ M 7-KC; D: 10 μ M C6-cer + 10 μ M 7-KC; E: 10 μ M C6-cer + 20 μ M 7-KC; F: 10 μ M C6-cer + 30 μ M 7-KC. Escala de 100 μ m demonstrada nas imagens.

5. Discussão

O uso de terapias combinadas com finalidade antitumoral é uma vertente bem explorada na literatura (107). Entre os benefícios estão a possibilidade de ação por vias distintas, redução de efeitos adversos relacionados à dose e um possível potencial sinérgico entre as moléculas. Por isso, devido ao crescente número de trabalhos utilizando quimioterápicos em associação com a C6-ceramida obtendo resultados promissores, avaliar a associação desta molécula com o 7-cetocolesterol e seu potencial citotóxico foi de grande interesse.

De início, avaliamos o comportamento da C6-ceramida quando administrada isoladamente na linhagem de câncer de mama triplo-negativa (MDA-MB-231). Embora muitos estudos da literatura ressaltem principalmente o papel da C6-cer como uma molécula efetiva na sensibilização de células tumorais a quimioterápicos (44,45), nossos ensaios nesta linhagem celular também demonstraram sua eficácia sem estar em combinação com outra molécula antitumoral, principalmente em concentrações mais elevadas como 50 μ M.

Por outro lado, o 7-KC quando administrado individualmente e em concentrações subtóxicas (abaixo do seu valor de IC_{50}), não desempenhou papel tão efetivo quanto a C6-cer nessa linhagem estudada. Tal fato foi também observado no trabalho de nosso grupo de pesquisa publicado em 2018 (106), onde as concentrações de 7-KC abaixo do IC_{50} testadas apresentaram efeitos pouco expressivos, enquanto concentrações acima do IC_{50} tiveram efeitos substanciais em ensaios como de apoptose e ativação das caspases 3 e 7.

Iniciando o estudo da administração combinada do 7-KC e C6-cer moléculas, foco principal deste trabalho, ficou bem evidente a relação dose-dependente e, principalmente, tempo-dependente, como visto também em outros estudos (45, 108). Por conta disso, resolvemos aprofundar nossas análises de morte celular no período de tratamento de 48 horas para a administração combinada das moléculas de C6-cer e 7-KC.

Nossos resultados apontam para a ativação da via apoptótica no desfecho final de morte celular nas células tratadas com C6-cer e 7-KC em combinação, o que foi evidenciado tanto pela análise da ativação das caspases efetoras (3 e 7), quanto pela porcentagem de células em apoptose avaliadas no ensaio de Anexina V/ PI. A combinação de C6-cer e 7-KC demonstrou-se eficaz em aumentar a porcentagem de células em apoptose. Resultados de outros trabalhos na literatura também demonstraram papel similar da C6-cer na indução sinérgica de apoptose quando em combinação com agentes antitumorais como docetaxel e doxorrubicina, principalmente pelo mecanismo de ativação da AMPK (109, 43). Ainda, a importância do processo de apoptose na morte celular induzida pelo 7-KC é também documentada na literatura. Nesse caso, é descrito o envolvimento das vias de sinalização sonic hedgehog e LXR α (62).

Nos ensaios de potencial de membrana mitocondrial e de geração de ROS, entretanto, obtivemos resultados mais distintos quanto à ação de cada molécula. O ensaio de TMRE é utilizado para quantificação do potencial de membrana mitocondrial das células. Por definição, o TMRE é um composto de carga positiva que se acumula em mitocôndrias ativas por conta de sua carga negativa. Desta forma, mitocôndrias despolarizadas ou inativas possuem menor potencial de membrana e não se ligam tão efetivamente ao TMRE, diminuindo a fluorescência do ensaio. Em nossa análise, observamos nas menores concentrações da administração combinada um leve acréscimo da intensidade de fluorescência da mitocôndria, caracterizando uma hiperpolarização. Na literatura, outros autores explicam que este breve aumento no potencial de membrana da mitocôndria ocorre como um evento que precede o desencadeamento efetivo da morte celular (110, 111, 112). Corroborando com isso, nas concentrações mais altas que analisamos em sequência, é possível observar expressiva despolarização da membrana mitocondrial com consequente diminuição da intensidade de fluorescência do ensaio, acompanhada da drástica redução de células vivas.

Outros estudos na literatura reforçam o papel importante desempenhado pela molécula de ceramida quanto à dinâmica mitocondrial. Por exemplo, um trabalho que analisou a combinação de C6-ceramida com tamoxifeno em uma linhagem celular de leucemia mieloide aguda (LMA), demonstrou que a combinação

dessas moléculas foi eficaz em, além de induzir morte celular por apoptose, desencadear um processo denominado de mitofagia (113). A mitofagia pode ser definida como a autofagia da mitocôndria e pode desencadear um processo de morte celular programada independente de apoptose (114). Esse processo é reconhecido como um evento que traz benefícios terapêuticos na indução de morte celular de células tumorais (115, 116). Ainda, a molécula de ceramida atua na regulação dos processos de fusão e fissão mitocondrial, responsáveis por manter o balanço entre geração de novas mitocôndrias e remoção de mitocôndrias danificadas (117). Dessa forma, o estudo dessa organela em tratamentos que contenham ceramida mostra-se de grande importância para compreensão do desfecho final.

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um mecanismo extensivamente estudado na indução de morte celular de células tumorais (118, 119). Alterações no balanço de ROS no ambiente tumoral podem ser um fator crucial na iniciação de morte celular tumoral (120). Inclusive, alguns agentes quimioterápicos e estratégias como o uso da terapia fotodinâmica (PDT) exploram este mecanismo de indução de ROS para promover morte celular em células tumorais (121, 122)

No ensaio de verificação da presença de ROS, as moléculas demonstraram perfis bem opostos. Enquanto o tratamento com C6-cer em monoterapia demonstrou uma significativa produção de ROS, o mesmo não ocorreu com o 7-KC, pelo menos nesta linhagem e concentrações testadas. Inclusive, ao combinar as maiores concentrações destas duas moléculas, uma menor presença de ROS foi observada quando em comparação com a monoterapia com C6-cer. Entretanto, este fato em específico pode provavelmente ser atribuído à fase mais avançada de morte celular nessas concentrações altíssimas. Nesses casos, como o grau de comprometimento das células é exacerbado, esta diminuição na produção de ROS pode apenas ser um reflexo da incapacidade metabólica dessas células.

O citoesqueleto de actina é uma rede estrutural importante para a biologia da célula, atuando em processos biológicos como contração celular, citocinese, endocitose e na apoptose (123). Por isso, nós analisamos se este tratamento

combinado poderia desencadear quaisquer alterações morfológicas nas células MDA-MB-231 verificando a organização dos filamentos de F-actina antes e após o tratamento. De fato, observamos que concentrações crescentes danificaram de maneira substancial o citoesqueleto e levaram ao descolamento das células das placas onde estavam cultivadas. Na literatura, outros estudos já discutiram o potencial da ceramida em causar anoikis, um tipo de apoptose ligada à adesão celular interrompida (124), e sua importância fundamental na regulação da maquinaria do citoesqueleto através da via ASMase / ceramida (125) e através da regulamentação PKC ζ (126). O 7-KC, por sua vez, mostrou propriedades semelhantes na linhagem celular de melanoma B16F10, onde também se observou descolamento das células de melanoma além de uma mudança no morfotipo das células, passando de epitelióide para fibroblastoide (127).

Nossos resultados demonstraram que não houve envolvimento do processo autofágico na morte dessas células de câncer de mama após o tratamento com C6-cer e 7-KC. Diferente do que observamos, a literatura descreve envolvimento da autofagia em outros modelos de câncer tanto para a C6-ceramida quanto para o 7-KC. A combinação de C6-cer com vinblastina, por exemplo, foi eficaz na modulação de autofagia culminando com a morte celular em modelos celulares de hepatocarcinoma e câncer colorretal (128) Também, em modelos distintos como células do músculo liso vascular, oligodendrócitos e células-tronco mesenquimais, o 7-KC foi eficaz em desencadear o processo autofágico. O resultado negativo quanto à autofagia observado neste trabalho pode estar relacionado com a linhagem celular aqui testada ou ao mecanismo de ação exercido pela combinação de C6-cer e 7-KC.

6. Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que a combinação de C6-ceramida e 7-cetocolesterol atua de maneira sinérgica na indução de morte celular na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 principalmente por apoptose e de uma maneira dose- e tempo-dependente. Mecanismos de morte celular como a apoptose, ativação das caspases efetoras 3 e 7, geração de ROS, perturbação no citoesqueleto e despolarização da membrana mitocondrial demonstraram papel central na indução de morte dessas células. Entretanto, morte celular por autofagia e necrose não foram observados após tratamento com essas C6-cer e 7-KC nas condições aqui estudadas.

7. Referências

1. McGuire S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Adv Nutr.* 2016;7(2):418–9. Available from: <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>
2. The Genetics of Cancer. National Cancer Institute. 2020 [cited 21 August 2020]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics>
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74. Available from: doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013
4. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *The Lancet.* 2016. Available from: [doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)
5. Irvin Jr WJ, Carey AL. What is triple-negative breast cancer. *Eur J Cancer.* 2008; 44(18),0-2805. Available from: doi.org/10.1016/j.ejca.2008.09.034.
6. Pareja F, Geyer FC, Marchio C, Burke KA, Weigelt B, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *NPJ Breast Cancer.* 2016; 2()16036. Available from: doi.org/10.1038/npjbcancer.2016.36.
7. Tan AR, Swain SM. Therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *The Cancer Journal.* 2008; 14(6):343-51. Available from: doi.org/10.1097/PPO.0b013e31818d839b.
8. Young MM, Kester M, Wang HG. Sphingolipids: Regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *J Lipid Res.* 2013;54(1):5–19. Available from: doi.org/10.1194/jlr.R031278
9. Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, et al. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101(7):2070–5. Available from: <http://www.pnas.org/content/pnas/101/7/2070.full.pdf>
10. Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal.* 2008;20(6):1010–8. Available from: doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.12.006
11. Sahu SK, Hannun YA, Yao N. Emergence of membrane sphingolipids as a potential therapeutic target. *Biochimie.* 2019;158:257–64. Available from: doi.org/10.1016/j.biochi.2019.01.018

12. Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Publ Gr.* 2017;19(3):175–91. Available from: [dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.107](https://doi.org/10.1038/nrm.2017.107)
13. Futerman AH, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* 2004;5(8):777–82. Available from: doi.org/10.1038/sj.embor.7400208
14. Merscher S, Fornoni A. Podocyte pathology and nephropathy – sphingolipids in glomerular diseases. 2014;5(July):1–11. Available from: doi.org/10.3389/fendo.2014.00127
15. Giles C, Takechi R, Mellett NA, Meikle PJ, Dhaliwal S, Mamo JC. Differential regulation of sphingolipid metabolism in plasma, hippocampus, and cerebral cortex of mice administered sphingolipid modulating agents. *J Neurochem.* 2017;141(3):413–22. Available from: doi.org/10.1111/jnc.13964
16. Kolter T, Sandhoff K. Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2006;1758(12):2057–79. Available from: doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.027
17. Yu Z, Peng Q, Huang Y. Potential therapeutic targets for atherosclerosis in sphingolipid metabolism. *Clin Sci.* 2019;133(6):763–76. Available from: doi.org/10.1042/CS20180911
18. Haass NK, Nassif N, McGowan EM. Switching the sphingolipid rheostat in the treatment of diabetes and cancer comorbidity from a problem to an advantage. *Biomed Res Int.* 2015;2015. Available from: doi.org/10.1155/2015/165105
19. Crivelli SM, Giovagnoni C, Visseren L, Scheithauer AL, de Wit N, den Hoedt S, et al. Sphingolipids in Alzheimer's disease, how can we target them? *Adv Drug Deliv Rev.* 2020; Available from: doi.org/10.1016/j.addr.2019.12.003
20. Ogretmen B, Avenue A. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(1):33–50. Available from: doi.org/10.1038/nrc.2017.96
21. Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind JS, Spiegel S. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature,* 381(6585), 800–803. Available from: <https://doi.org/10.1038/381800a0>
22. Newton J, Lima S, Maceyka M, Spiegel S. Revisiting the sphingolipid rheostat: Evolving concepts in cancer therapy. *Exp Cell Res.* 2015;333(2):195–200. Available from: doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.02.025
23. Olivera A, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature.* 1993;365(6446):557–60. Available from: doi.org/10.1038/365557a0

24. Silva LC, Futerman AH, Prieto M. Lipid raft composition modulates sphingomyelinase activity and ceramide-induced membrane physical alterations. *Biophys J.* 2009;96(8):3210–22. Available from: [dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3923](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3923)
25. Cho SM, Kwon HJ. Acid ceramidase, an emerging target for anti-cancer and anti-angiogenesis. *Arch Pharm Res.* 2019;42(3):232–43. Available from: doi.org/10.1007/s12272-019-01114-3
26. Dimanche-Boitrel M-T, Rebillard A, Gulbins E. Ceramide in Chemotherapy of Tumors. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2011;6(3):284–93. Available from: doi.org/10.2174/157489211796957838
27. Aureli M, Murdica V, Loberto N, Samarani M, Prinetti A, Bassi R, et al. Exploring the link between ceramide and ionizing radiation. *Glycoconj J.* 2014;31(6):449–59. Available from: doi.org/10.1007/s10719-014-9541-y
28. Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z, Kolesnick R. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: An alternative mechanism for generating death signals. *Cell.* 1995;82(3):405–14. Available from: [doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90429-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90429-8)
29. Zhang I, Alter N, Reed JC, Borner C, Obeid LM, Hannun YA. Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(11):5325–8. Available from: doi.org/10.1073/pnas.93.11.5325
30. Cabot MC, Giuliano AE, Han T Van, Liu YY. SDZ PSC 833, the cyclosporine a analogue and multidrug resistance modulator, activates ceramide synthesis and increases vinblastine sensitivity in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells. *Cancer Res.* 1999;59(4):880–5. Available from: [doi.org/10.1016/s0304-3835\(99\)00353-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(99)00353-5)
31. Charles AG, Han TY, Liu YY, Hansen N, Giuliano AE, Cabot MC. Taxol-induced ceramide generation and apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001;47(5):444–50. Available from: doi.org/10.1007/s002800000265
32. Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z, et al. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med.* 1994;180(2):525–35. Available from: doi.org/10.1084/jem.180.2.525
33. Mengubas K, Riordan FA, Bravery CA, Lewin J, Owens DL, Mehta AB, et al. Ceramide-induced killing of normal and malignant human lymphocytes is by a non-apoptotic mechanism. *Oncogene.* 1999;18(15):2499–506. Available from: doi.org/10.1038/sj.onc.1202622

34. Separovic D, He J, Oleinick NL. Ceramide generation in response to photodynamic treatment of L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.* 1997;57(9):1717–21. Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/57/9/1717>
35. Perry DK, Carton J, Shah AK, Meredith F, Uhlinger DJ, Hannun YA. Serine palmitoyltransferase regulates de novo ceramide generation during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2000;275(12):9078–84. Available from: doi.org/10.1074/jbc.275.12.9078
36. Jaffrézou JP, Levade T, Bettaïeb A, Andrieu N, Bezombes C, Maestre N, et al. Daunorubicin-induced apoptosis: Triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *EMBO J.* 1996;15(10):2417–24. Available from: doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00599.x
37. Chen L, Alrbyawi H, Poudel I, Arnold RD, Babu RJ. Co-delivery of Doxorubicin and Ceramide in a Liposomal Formulation Enhances Cytotoxicity in Murine B16BL6 Melanoma Cell Lines. *AAPS PharmSciTech.* 2019;20(3). Available from: doi.org/10.1208/s12249-019-1316-0
38. Morad SAF, Cabot MC. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(1):51–65. Available from: doi.org/10.1038/nrc3398
39. Kester M, Bassler J, Fox TE, Carter CJ, Davidson JA. Preclinical development of a C6-ceramide NanoLiposome , a novel sphingolipid therapeutic. 2015;396:737–47. Available from: doi.org/10.1515/hsz-2015-0129
40. Sukumaran P, Lönnfors M, Långvik O, Pulli I, Törnquist K, Slotte JP. Complexation of C6-Ceramide with Cholesteryl Phosphocholine - A Potent Solvent-Free Ceramide Delivery Formulation for Cells in Culture. *PLoS One.* 2013;8(4). Available from: doi.org/10.1371/journal.pone.0061290
41. Shabbits JA, Mayer LD. Intracellular delivery of ceramide lipids via liposomes enhances apoptosis in vitro. 2003;1612:98–106. Available from: [doi.org/10.1016/s0005-2736\(03\)00108-1](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(03)00108-1)
42. Li F, Zhang N. Ceramide: Therapeutic Potential in Combination Therapy for Cancer Treatment. *Curr Drug Metab.* 2015;17(1):37–51. Available from: doi.org/10.2174/1389200216666151103120338
43. Zheng L, Tian Y, Zhang Z, Cao C, Zhang X, Wang X, et al. C6 ceramide dramatically enhances docetaxel-induced growth inhibition and apoptosis in cultured breast cancer cells: A mechanism study. *Exp Cell Res.* 2015;332(1):47–59. Available from: dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.12.017
44. Zhu QY, Wang Z, Ji C, Cheng L, Yang YI, Ren J, et al. C6-ceramide synergistically potentiates the anti-tumor effects of histone deacetylase inhibitors via AKT

- dephosphorylation and α -tubulin hyperacetylation both in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* 2011;2(1):1–12. Available from: doi.org/10.1038/cddis.2010.96
45. MB Chen, YY Lin, Y Zhang, BS He, MX Wei, JW Lu, Y Ji, Q Jiang PL. C6 ceramide dramatically increases vincristine sensitivity both in vivo and in vitro, involving AMP-activated protein kinase-p53 signaling Accepted. 2013;(510). Available from: doi.org/ 10.1093/carcin/bgv094
 46. Griffiths WJ, Wang Y. Oxysterols as lipid mediators: Their biosynthetic genes, enzymes and metabolites. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2020;147(July 2019). Available from: doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106381
 47. Guardiola F, Codony R, Addis PB, Rafecas M, Boatella J. Biological effects of oxysterols: Current status. *Food Chem Toxicol.* 1996;34(2):193–211. Available from: doi.org/ 10.1016/0278-6915(95)00094-1
 48. Russell DW. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2000;1529(1–3):126–35. Available from: doi.org/ 10.1016/s1388-1981(00)00142-6
 49. Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1999;142(1):1–28. Available from: doi.org/ 10.1016/s0021-9150(98)00196-8
 50. Cao G, Bales K, DeMattos R, Paul S. Liver X Receptor-Mediated Gene Regulation and Cholesterol Homeostasis in Brain: Relevance to Alzheimers Disease Therapeutics. *Curr Alzheimer Res.* 2007;4(2):179–84. Available from: doi.org/ /10.2174/156720507780362173
 51. Liu H, Yuan L, Xu S, Wang K, Zhang T. Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol inhibits osteoblastic differentiation and promotes apoptosis of rat bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem.* 2005;96(1):198–208. Available from: doi.org/10.1002/jcb.20510
 52. Bischoff F, Jerome Rupp J. The Production of a Carcinogenic Agent in the Degradation of Cholesterol to Progesterone. *Cancer Res.* 1946;6(8):403–9. Available from: https://cancerres.aacrjournals.org/content/6/8/403
 53. Kovač U, Skubic C, Bohinc L, Rozman D, Režen T. Oxysterols and gastrointestinal cancers around the clock. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10(JULY):1–19. Available from: doi.org/10.3389/fendo.2019.00483
 54. Jusakul A, Yongvanit P, Loilome W, Namwat N, Kuver R. Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis. *Lipids Health Dis.* 2011;10(1):44. Available from: doi.org/10.1186/1476-511X-10-44
 55. Schroepfer GJ, Wilson WK. Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev.* 2000;80(1):361–554. Available from: doi.org/ 10.1152/physrev.2000.80.1.361

56. Kloudova A, Guengerich FP, Soucek P. The role of oxysterols in human cancer HHS Public Access. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(7):485–96. Available from: doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.002
57. Lyons MA, Brown AJ. 7-Ketocholesterol. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31(3–4):369–75. Available from: [doi.org/10.1016/s1357-2725\(98\)00123-x](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(98)00123-x)
58. Brown AJ, Leong SL, Dean RT, Jessup W. 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J Lipid Res.* 1997;38(9):1730–45. Available from: <https://www.jlr.org/content/38/9/1730.long>
59. Prunet C, Lemaire-Ewing S, Ménétrier F, Néel D, Lizard G. Activation of caspase-3-dependent and -independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death: A morphological and biochemical study. *J Biochem Mol Toxicol.* 2005;19(5):311–26. Available from: doi.org/10.1002/jbt.20096
60. Nury T, Zarrouk A, Vejux A, Doria M, Riedinger JM, Delage-Mourroux R, et al. Induction of oxiaoptophagy, a mixed mode of cell death associated with oxidative stress, apoptosis and autophagy, on 7-ketocholesterol-treated 158N murine oligodendrocytes: Impairment by α -tocopherol. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;446(3):714–9. Available from: doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.081
61. Paz JL, Levy D, Oliveira BA, de Melo TC, de Freitas FA, Reichert CO, et al. 7-Ketocholesterol Promotes Oxiaoptophagy in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell from Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Cells.* 2019;8(5):482. Available from: doi.org/10.3390/cells8050482
62. Levy D, de Melo TC, Oliveira BA, et al. 7-Ketocholesterol and cholestane-triol increase expression of SMO and LXR α signaling pathways in a human breast cancer cell line. *Biochem Biophys Rep.* 2018;19:100604. Available from: doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.12.008
63. Nirmala J, Lopus M. An overview of cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Mol Toxicol.* 2019. Available from: doi.org/10.1007/s10565-019-09496-2
64. Tait SWG, Ichim G, Green DR. Die another way - non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci.* 2014;127(10):2135–44. Available from: doi.org/10.1242/jcs.093575
65. Wang Y, Luo W, Wang Y. PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response. *DNA Repair (Amst).* 2019;81(July):102651. Available from: doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102651
66. Bergsbaken T, Fink S, Cookson B. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 7, 99–109 (2009). Available from: doi.org/10.1038/nrmicro2070

67. Li J, Cao F, Yin H liang, Huang Z jian, Lin Z tao, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis.* 2020;11(2). Available from: doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2
68. Remijnsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ.* 2011;18(4):581–8. Available from: doi.org/10.1038/cdd.2011.1
69. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019;43(6):582–92. Available from: doi.org/10.1002/cbin.11137
70. Fuchs Y, Steller H. Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell.* 2011;147(7):1640. Available from: doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.033
71. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. 2020;20(3):175–93. Available from: doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8
72. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* (80-). 2004;305(5684):626–9. Available from: doi.org/10.1126/science.1099320.
73. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, Van Gurp M, Van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 2004;23(16 REV. ISS. 2):2861–74. Available from: doi.org/10.1038/sj.onc.1207523
74. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516. Available from: doi.org/10.1080/01926230701320337
75. Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res.* 2000;256(1):58–66. Available from: [10.1006/excr.2000.4840](https://doi.org/10.1006/excr.2000.4840)
76. Yun CW, Lee SH. The roles of autophagy in cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):1–18. Available from: doi.org/10.3390/ijms19113466
77. Antunes F, Erustes AG, Costa AJ, Nascimento AC, Bincoletto C, Ureshino RP, et al. Autophagy and intermittent fasting: the connection for cancer therapy? *Clinics (Sao Paulo).* 2018;73(16). Available from: doi.org/10.6061/clinics/2018/e814s
78. Cuervo AM, Wong E. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci.* 2012;29(6):997–1003. Available from: doi.org/10.1038/nn.2575
79. Sciarretta S, Maejima Y, Zablocki D, Sadoshima J. The Role of Autophagy in the Heart. *Annu Rev Physiol.* 2018;80(October):1–26. Available from: doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121427

80. Bhutia SK, Mukhopadhyay S, Sinha N, Das DN, Panda PK, Patra SK, et al. Autophagy: Cancer's Friend or Foe? 2015;1–29. Available from: doi.org/10.1016/B978-0-12-407173-5.00003-0
81. Yang X, Yu DD, Yan F, Jing YY, Han ZP, Sun K, et al. The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer. *Cell Biosci.* 2015;5(1):1–11. Available from: doi.org/10.1186/s13578-015-0005-2
82. Li YJ, Lei YH, Yao N, Wang CR, Hu N, Ye WC, et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer.* 2017;36(1):52. Available from: doi.org/10.3389/fphar.2020.00787
83. Vera-Ramirez L, Vodnala SK, Nini R, Hunter KW, Green JE. Autophagy promotes the survival of dormant breast cancer cells and metastatic tumour recurrence. *Nat Commun.* 2018;9(1). Available from: doi.org/10.1038/s41467-018-04070-6
84. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62 [published correction appears in *Cell.* 2011 Apr 15;145(2):322]. *Cell.* 2009;137(6):1062-1075. Available from: doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.048.
85. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016;1863(12):2977–92. Available from: doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012
86. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417(1):1–13. Available from: doi.org/10.1042/BJ20081386
87. de Jager TL, Cockrell AE, Du Plessis SS. Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species. *Adv Exp Med Biol.* 2017;996:15–23. Available from: doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_2
88. Tominaga H, Kodama S, Matsuda N, Suzuki K, Watanabe M. Involvement of Reactive Oxygen Species (ROS) in the induction of genetic instability by radiation. *J Radiat Res.* 2004;45(2):181–8. Available from: doi.org/10.1269/jrr.45.181
89. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. Vol. 44, *Free Radical Research.* 2010. 479–496 p. Available from: doi.org/10.3109/10715761003667554
90. Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: Implications for Health. *Crit Rev Toxicol.* 2015;45(9):765–98. Available from: doi.org/10.3109/10408444.2015.1074159
91. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause KH. Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012;142(August):1–14. Available from: doi.org/10.4414/smw.2012.13659
92. Simon, H, Haj-Yehia, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS). *Apoptosis.* 2000;415–8. Available from: doi.org/10.1023/a:1009616228304

93. Vacca RA, Valenti D, Bobba A, Merafina RS, Passarella S, Marra E. Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco bright-yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death. *Plant Physiol.* 2006;141(1):208–19. Available from: doi.org/10.1104/pp.106.078683
94. Fang C, Gu L, Smerin D, Mao S, Xiong X. The Interrelation between Reactive Oxygen Species and Autophagy in Neurological Disorders. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017. Available from: doi.org/10.1155/2017/8495160
95. Azad MB, Chen Y, Gibson SB. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): Implications for cancer progression and treatment. *Antioxidants Redox Signal.* 2009;11(4):777–90. Available from: doi.org/10.1089/ars.2008.2270
96. Agostinis P, Berg K, Cengel K, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *Ca Cancer J Clin.* 2017;61(April):250–81. Available from: doi.org/10.3322/caac.20114
97. Meulemans J, Delaere P, Vander Poorten V. Photodynamic therapy in head and neck cancer: Indications, outcomes, and future prospects. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2019;27(2):136–41. Available from: doi.org/10.1097/MOO.0000000000000521.
98. Griffin LL, Lear JT. Photodynamic therapy and non-melanoma skin cancer. *Cancers (Basel).* 2016;8(10). Available from: doi.org/10.3390/cancers8100098
99. Haas RH. Mitochondrial dysfunction in aging and diseases of aging. *Biology (Basel).* 2019;8(2):1–5. Available from: doi.org/10.3390/biology8020048
100. Duchen MR. Mitochondria and calcium: From cell signalling to cell death. *J Physiol.* 2000;529(1):57–68. Available from: doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00057.x
101. Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: The innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.* 2006;13(8):1396–402. Available from: doi.org/10.1038/sj.cdd.4401963
102. Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J.* 2018;285(3):416–31. Available from: doi.org/10.1111/febs.14186
103. Walsh DWM, Siebenwirth C, Greubel C, Ilicic K, Reindl J, Girst S, et al. Live cell imaging of mitochondria following targeted irradiation in situ reveals rapid and highly localized loss of membrane potential. *Sci Rep.* 2017;7(October 2016):1–11. Available from: doi.org/10.1038/srep46684
104. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007;87(1):99–163. Available from: doi.org/10.1152/physrev.00013.2006

105. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 2010 Jan 15;70(2):440-6. Available from: doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
106. Levy D, Correa de Melo T, Ohira BY, Fidelis ML, Ruiz JLM, Rodrigues A, Bydlowski SP. Oxysterols selectively promote short-term apoptosis in tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Nov 10;505(4):1043-1049. Available from: doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.008.
107. Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, Yeger H. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget.* 2017;8(23):38022-38043. Available from: doi.org/10.18632/oncotarget.16723
108. Yu T, Li J, Sun H. C6 ceramide potentiates curcumin-induced cell death and apoptosis in melanoma cell lines in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;66(5):999-1003. Available from: doi.org/10.1007/s00280-010-1374-1
109. Ji C, Yang B, Yang Y, S-H He, D-S Miao, L He, Z-G Bi . Exogenous cell-permeable C6 ceramide sensitizes multiple cancer cell lines to Doxorubicin-induced apoptosis by promoting AMPK activation and mTORC1 inhibition. *Oncogene* 2010; 29, 6557–6568. Available from: doi.org/10.1038/onc.2010.379
110. Sánchez-Alcázar, J., Ault, J., Khodjakov, A. et al. Increased mitochondrial cytochrome c levels and mitochondrial hyperpolarization precede camptothecin-induced apoptosis in Jurkat cells. *Cell Death Differ* 7, 1090–1100 (2000). Available from: doi.org/10.1038/sj.cdd.4400740
111. Gergely P Jr, Niland B, Gonchoroff N, Pullmann R Jr, Phillips PE, Perl A. Persistent mitochondrial hyperpolarization, increased reactive oxygen intermediate production, and cytoplasmic alkalinization characterize altered IL-10 signaling in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2002;169(2):1092-1101. Available from: doi.org/10.4049/jimmunol.169.2.109258
112. Perl A, Gergely P Jr, Nagy G, Koncz A, Banki K. Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity. *Trends Immunol.* 2004;25(7):360-367. Available from: doi.org/10.1016/j.it.2004.05.001
113. Morad SAF, MacDougall MR, Abdelmageed N, Kao LP, Feith DJ, Tan F et al. Pivotal role of mitophagy in response of acute myelogenous leukemia to a ceramide tamoxifen-containing drug regimen. *Exp Cell Res.* 2019;381(2):256-264. Available from: doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.05.021
114. Sentelle RD, Senkal CE, Jiang W, Ponnusamy S, Gencer S, Ogretmen B et al. Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nature chemical biology.* 2012; 8(10), 831–838. Available from: doi.org/10.1038/nchembio.1059

115. Dany M, Ogretmen B. Ceramide Mediated Lethal Mitophagy: A Novel Cell Death Mechanism in FLT3 Targeted Therapy for Acute Myeloid Leukemia. *The FASEB Journal*. 2015; 29: 147.1. Available from: doi.org/10.1096/fasebj.29.1_supplement.147.1
116. Hamacher-Brady A, Brady NR. Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cellular and molecular life sciences*. 2016; 73(4), 775–795. Available from: doi.org/10.1007/s00018-015-2087-8
117. Fugio LB, Coeli-Lacchini FB, Leopoldino AM. Sphingolipids and Mitochondrial Dynamic. *Cells*. 2020 Mar 1;9(3):581. Available from: doi.org/10.3390/cells9030581
118. Reczek CR, Chandel NS. The two faces of reactive oxygen species in cancer. *Annual Review of Cancer Biology*. 2017; 1:79-98. Available from: doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-041916-065808
119. Moon DO, Kim MO, Choi YH, Hyun JW, Chang WY, Kim GY. Butein induces G(2)/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through ROS generation. *Cancer Lett*. 2010; 28;288(2):204-13. Available from: doi.org/10.1016/j.canlet.2009.07.002
120. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2018; 80:50-64. Available from: doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023
121. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*. 2010; 44(5):479-96. Available from: doi.org/10.3109/10715761003667554
122. Zhang Q, Li L. Photodynamic combinational therapy in cancer treatment. *J BUON*. 2018; 23(3):561-567. Available from: doi.org/10.3109/10715761003667554
123. Franklin-Tong VE, Gourlay CW. A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *Biochem J*. 2008; 1;413(3):389-404. Available from: doi.org/10.1042/BJ20080320
124. Hu W, Xu R, Zhang G, Jin J, Szulc ZM, Bielawski J, Hannun YA, Obeid LM, Mao C. Golgi fragmentation is associated with ceramide-induced cellular effects. *Mol Biol Cell*. 2005;16(3):1555-67. Available from: doi.org/10.1091/mbc.e04-07-0594.
125. Zeidan YH, Jenkins RW, Hannun YA. Remodeling of cellular cytoskeleton by the acid sphingomyelinase/ceramide pathway. *J Cell Biol*. 2008;181(2):335-50. Available from: doi.org/10.1083/jcb.200705060
126. Zhang P, Fu C, Hu Y, Dong C, Song Y, Song E. C6-ceramide nanoliposome suppresses tumor metastasis by eliciting PI3K and PKC ζ tumor-suppressive activities and regulating integrin affinity modulation. *Sci Rep*. 2015 ;5:9275. Available from: doi.org/10.1038/srep09275

127. Favero GM, Paz JL, Otake AH, Maria DA, Caldini EG, Bydlowski SP et al. Cell internalization of 7-ketocholesterol-containing nanoemulsion through LDL receptor reduces melanoma growth in vitro and in vivo: a preliminary report. *Oncotarget*. 2018;9(18):14160-14174. Available from: doi.org/10.18632/oncotarget.24389
128. Adiseshaiah PP, Clogston JD, McLeland CB, Rodriguez J, Potter TM, McNeil SE et al. Synergistic combination therapy with nanoliposomal C6-ceramide and vinblastine is associated with autophagy dysfunction in hepatocarcinoma and colorectal cancer models. *Cancer Lett*. 2013 ;337(2):254-65. Available from: doi.org/10.1016/j.canlet.2013.04.034

8. Anexos

8.1 Aprovação do Comitê de Ética

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18/09/2019, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 302/19 intitulado: Avaliação do efeito antitumoral da terapia combinada com C6-ceramida e 7-cetocolesterol em diferentes linhagens de câncer. Apresentado pelo Departamento Instituto do Coração.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

Pesquisador (a) Executante: Leonardo Rokita de Rosa

CEP-FMUSP, 18 de Setembro de 2019.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa