UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

JESSICA LILIANE PAZ

**Características da toxicidade promovida por oxisteróis em células-tronco
mesenquimais derivadas da medula óssea de pacientes com leucemia mieloide
aguda**

São Paulo

2019

JESSICA LILIANE PAZ

**Características da toxicidade promovida por oxisteróis em células-tronco
mesenquimais derivadas da medula óssea de pacientes com leucemia mieloide
aguda**

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

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Paz, Jessica Liliane

Características da toxicidade promovida por oxisteróis em células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de pacientes com leucemia mieloide aguda / Jessica Liliane Paz. -- São Paulo, 2019.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Sérgio Paulo Bydlowski.

Descritores: 1.Oxisteróis 2.Células-tronco mesenquimais 3.Leucemia mieloide aguda 4.Morte celular 5.Medula óssea 6.Apoptose 7.Autofagia 8.ROS 9.7-cetocolesterol

USP/FM/DBD-218/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À minha família...

Meu porto seguro, meu exemplo de força e coragem.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida e por ter uma família maravilhosa, sempre me apoiando e me dando forças para continuar seguindo os meus sonhos. Mãe, Pai e minha irmã, vocês são o meu tudo, amo vocês!!

Ao Prof. Drº Sérgio Paulo Bydlowski, pela oportunidade e orientação em seu laboratório, agradeço imensamente quando o senhor me tranquilizou na qualificação, onde sem o apoio do senhor e das meninas não sei se conseguiria. Muito obrigada!

Agradeço a Drª Juliana Pereira pela colaboração com as amostras utilizadas nesse projeto.

A Drª Débora pelo companheirismo, conversas, amizade, pelo convívio, pela paciência e todo ensinamento, agradeço do fundo do meu coração, muito obrigada!

A Linah, muito obrigada pelo carinho, ajuda e amizade, por ter sido essa mãezona.

A Prof. Drª Elia Caldini, agradeço por ter a senhora como supervisora do estágio PAE, por seus ensinamentos durante as aulas ministradas, carinho e dedicação por essa profissão maravilhosa. A senhora foi o exemplo de professora que quero seguir.

A minha fiel escudeira Bia, nunca pensei que durante esse tempo de mestrado encontraria uma amiga/irmã como você, sem você não teria sido tão divertido. Muito obrigada pelas conversas, risos, choro, ajuda na pesquisa e toda nossa bobolândia, a final ela é a nossa marca registrada.

Oxi, não poderia esquecer da Thatiana Corrêa de Melo, muito obrigada pelo ensinamento, brincadeiras, ajuda, conversas e amizade.

Ao pessoal do LIM-31, muito obrigada pela amizade e convívio, em especial a Mari e o pequeno Davi, Ritinha e o pequeno Vitor, a Naná, Gi, Pri, Dani, Rô, Denise, Cleidinha, e seu Joel.

A minha conterrânea Cadi e ao Fábio, obrigada pelas conversas, brincadeiras, companheirismo, ajuda, ensinamentos e almoços juntos, adoro vocês.

As meninas da casa da Dona Regina, em especial a minha Big Sister Flávia, Luana, Fran, Karli, Andresa, Tatá, muito obrigada pelas conversas, brincadeiras, convívio, pelos passeios, pelas alegrias e tristezas compartilhadas. Vocês foram a minha segunda família!

Aos meus amigos de longa data, em especial a Giulia, Luis, Paula, Bianca, Sigrid e ao nosso anjo da guarda Cado. Mesmo estando em lugares diferentes sempre me incentivaram e apoiaram constantemente, vocês são maravilhosos, amo vocês!

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio no auxílio financeiro deste trabalho e com a bolsa de mestrado.

A todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, estiveram presentes nesta caminhada, muito obrigada por tudo!

“O espírito sem limites é o maior tesouro do homem.”

J.K. Rowling.

RESUMO

Paz, JL. *Características da toxicidade promovida por oxisteróis em células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de pacientes com leucemia mieloide aguda*. 2019. 104f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2019.

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia que afeta a maturação das células-tronco hematopoiéticas (CTH), comprometendo a produção dos componentes saudáveis da medula óssea. A LMA acomete pessoas de todas as idades e a sobrevida de indivíduos portadores da doença ainda é baixa. Vários estudos relatam a interação das células-tronco mesenquimais (CTM) na regulação e manutenção das CTH, onde podem secretar mediadores no microambiente que estão envolvidos na malignidade dos tumores hematológicos. Desse modo, são imprescindíveis novas formas de adjuvantes terapêuticos no combate ao câncer. Como forma de tratamento adjuvante, estudos demonstraram que substâncias como oxisteróis, que são compostos oxidados do colesterol, tem a capacidade de induzir morte celular em diversas linhagens celulares. Portanto, este trabalho relata as características de morte celular dos oxisteróis 7-cetocolesterol (7-KC), colestane-3 β -5 α -6 β -triol (Triol), 3,5 colestane-7-ona (Colestona), 3 α -5 β -6 α -colestane-3,6-diol (Diol), acetato de colesterol (Acetato), 7-oxocolesterol-5-em-3-beta-il-acetato (7-oxo), 5 β -6 β epoxicolesterol (Epoxi) em CTM de indivíduos portadores de LMA. Os resultados indicaram que os oxisteróis 7-KC e Triol tiveram efeitos citotóxicos promovendo a morte celular. O 7-KC foi avaliado em relação aos mecanismos de sua citotoxicidade, gerando aumento de ROS, apoptose e autofagia de modo dose-dependente, o que explica pelo menos em parte, seu efeito citotóxico. Desse modo, o 7-KC apresenta potencial efeito como adjuvante terapêutico.

Descritores: Oxisteróis; Células-tronco mesenquimais; Leucemia mieloide aguda; Morte celular; Medula óssea; Apoptose; Autofagia; ROS; 7-cetocolesterol.

ABSTRACT

Paz, JL. *Characteristics of toxicity promoted by oxysterols in mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with acute myeloid leukemia*. 2019. 104f. Dissertation (Master) - Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Acute myeloid leukemia (AML) is a neoplasm that affects maturation of hematopoietic stem cells (HSC), compromising the production of healthy bone marrow components. AML affects people of all ages and the survival rates of individuals with the disease are still low. Several studies report the interaction of mesenchymal stem cells (MSC) in the regulation and maintenance of HSC. MSC can secrete mediators in the microenvironment that are involved in the malignancy of hematological tumors. Thus, new forms of therapeutic adjuvants in the fight against cancer are essential. As an adjuvant treatment, studies have shown that substances such as oxysterols, which are oxidized compounds of cholesterol, have the ability to induce cell death in several cell lines. Therefore, this paper reports the cell death characteristics of oxysterols. 7-ketocholesterol (7-KC), cholestane-3 β -5 α -6 β -triol (Triol), 3,5-cholestane-7-one (Cholestone), 3 α -5 β -6 α -cholestane-3,6-diol (Diol), cholesteryl acetate (Acetate), 7-oxocholesterol-5-em-3-beta-yl-acetate (7-oxo), 5 β -6 β epoxycholesterol (Epoxy) in MSC of individuals with AML. The results indicated that 7-KC and Triol oxysterols had cytotoxic effects promoting cell death. Further, 7-KC was evaluated in relation to the mechanisms of cytotoxicity. It led to ROS increase, apoptosis and autophagy in a dose-dependent manner, which explains, at least in part, the observed cytotoxic effect. Thus, 7-KC is a potential therapeutic adjuvant in the treatment of this disease.

Keywords: Oxysterol; Mesenchymal stem cells; Acute myeloid leukemia; Cell death; Bone marrow; Apoptosis; Autophagy; ROS; 7-ketocholesterol.

LISTA DE ABREVIATURAS

LMA	Leucemia mielóide aguda
CT	Células-tronco
MO	Medula óssea
CTA	Células-tronco adultas
CTH	Células-tronco hematopoiéticas
CTM	Células-tronco mesenquimais
CTE	Células-tronco embrionárias
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
LLC	Leucemia linfocítica crônica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
WHO	<i>World Health Organization</i>
FAB	Classificação Franco-Americana-Britânica
SMD/MDS	Síndrome Mielodisplásica
SSEA-3	<i>Stage-specific embryonic antigen</i>
Oct-4	<i>Octamer-binding transcription factor</i>
LXR	<i>Receptor x</i> do fígado
IAPs	Inibidores de proteínas de apoptose
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
SFB	Soro fetal bovino
ATV	Associação de tripsina e versene
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM-Low	Dulbecco's Modified Eagle's Medium <i>low glucose</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
RT-PCR	Reação em cadeia polimerase por transcriptase reversa
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
IC₅₀	Inhibitory Concentration 50%
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Sox-2	<i>SRY(sex determining region Y)-box 2</i>
NANOG	<i>Nanog homeobox</i>
SMO	<i>Smoothened</i>

MDR	Resistência a multiplas drogas
Bcl-2	<i>B-cell CLL / lymphoma 2</i>
SHh	<i>Sonic Hedgehog</i>
CCD1	<i>Cyclin D1</i>
7β-OHC	7 β -hidroxicolesterol
Cyp27	Esterol 27-hidroxilase
DR	<i>Death receptor</i>
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral alfa
TRAIL-R1, DR4	Ligante do receptor 1 do fator de necrose tumoral alfa
TRAIL-R2, DR5	Ligante do receptor 2 do fator de necrose tumoral alfa
TRADD	Receptor do fator de necrose tumoral tipo 1- associado a proteína do domínio de morte
FADD	Fas associado com a proteína do domínio de morte
DISC	Complexo sinalizador indutor de morte
tBid	Bid truncada
MOMP	Complexo de permeabilização da membrana externa da mitocôndria
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Atg	<i>Autophagy – related genes</i>
LC3B	Proteína associada ao microtúbulo 1 de cadeia leve – 3B
RIPK1	Complexo proteína quinase 1
Hh	<i>Hedgehog</i>
PTCH1	<i>Patched-1</i>
7-KC	7-cetocolesterol
Triol	Colestane-3 α -5 β -6 α -triol
Colestona	3,5 colestane-7-ona
Diol	3 α -5 β -6 α -colestane-3,6-diol
Acetato	Acetato de colesterol
7-oxo	7-oxocholesterol-5-em-3-beta-il-acetate
Epoxi	5 β -6 β -Epoxicolesterol
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
PE	<i>Phycoeritin</i>

PerCP	<i>Peridin chlorophyll protein complex</i>
RNA	Ácido ribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
RNase	Ribonuclease
cDNA	DNA complementar
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
TMRE	<i>Tetramethylrhodamine, ethyl Ester</i>
ALDH	Aldeído desidrogenase
3-MA	<i>3-methyladenine</i>
Nec-1	<i>Necrostatin-1</i>
PI	Iodeto de propídio
GUSB	<i>Human GUSB (Beta Glucoronidade)</i>
NAC	N-acetilcisteína
PI-3k	<i>Type III Phosphatidylinoditol 3-kinases</i>
HCFMUSP	Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Células NK	<i>Natural Killer</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor – α</i>
ABC	<i>ATP-binding cassetes</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração da classificação das células-tronco adultas.....	5
Figura 2	Ilustração da oxidação enzimática e oxidação não enzimática do colesterol.....	10
Figura 3	Ilustração do processo apoptótico em células eucarióticas.....	12
Figura 4	Ilustração do processo autofágico em células eucarióticas.....	13
Figura 5	Casuística e critérios de exclusão das amostras.....	19
Figura 6	Metodologia do processamento e estabelecimento das células-tronco mesenquimais.....	22
Figura 7	Gráficos representativos dos resultados da citometria de fluxo.....	37
Figura 8	Fotomicrografia ilustrando a diferenciação osteogênica das CTM de medula óssea de pacientes portadores de LMA.....	38
Figura 9	Fotomicrografia ilustrando a diferenciação adipogênica das CTM de medula óssea de pacientes portadores de LMA.....	39
Figura 10	Expressão dos genes de indiferenciação.....	40
Figura 11	Fotomicrografia representativa do ensaio de ALDH.....	41
Figura 12	Gráficos do efeito da citotoxicidade sobre as CTM de pacientes portadores de LMA tratadas 24 horas nas concentrações de 10µM, 25µM, 50µM e 100µM.....	42
Figura 13	Gráficos da citotoxicidade sobre as CTM de pacientes portadores de LMA tratadas por 24 horas nas concentrações de 10µM, 25µM, 50µM e 100µM.....	43
Figura 14	Gráficos das fases do ciclo celular das CTM de pacientes portadores de LMA tratadas com oxisterol por 24 horas.....	45
Figura 15	Gráficos das fases do ciclo celular das CTM de pacientes portadores de LMA tratadas com oxisterol por 24 horas.....	46
Figura 16	Gráficos do potencial de membrana mitocondrial nas CTM de pacientes portadores de LMA após 24 horas de incubação com oxisteróis.....	47
Figura 17	Gráficos do potencial de membrana mitocondrial nas CTM de pacientes portadores de LMA após 24 horas de incubação com oxisteróis.....	48
Figura 18	Fotomicrografia representativa das mitocôndrias das CTM de pacientes portadores de LMA após 24 horas de incubação com oxisteróis.....	50

Figura 19	Gráfico da inibição da morte celular por apoptose com inibidor Z-VAD-FMK nas CTM de pacientes portadores de LMA.....	51
Figura 20	Gráfico da inibição da morte celular por autofagia com inibidor 3-MA nas CTM de pacientes portadores de LMA.....	52
Figura 21	Gráfico da inibição da morte celular por necrose com inibidor Necrostatin-1 nas CTM de pacientes portadores de LMA.....	52
Figura 22	Gráficos da porcentagem de morte celular nas CTM de pacientes portadores de LMA após 24 horas de incubação com 7-KC.....	53
Figura 23	Gráfico da porcentagem de células positivas para caspase 3/7 nas CTM de pacientes portadores de LMA após tratamento com diferentes concentrações de 7-KC.....	54
Figura 24	Gráfico da ativação da caspase 8 nas CTM de pacientes portadores de LMA.....	55
Figura 25	Gráfico da expressão do gene Bcl-2 após tratamento de 24 horas com oxisterol 7-KC.....	56
Figura 26	Gráfico da expressão do gene CCD1 após o tratamento de 24 horas com oxisterol 7-KC.....	56
Figura 27	Fotomicrografias representativas da proteína LC3B-GFP após 24 horas de incubação com 7-KC em CTM de pacientes portadores de LMA.....	57
Figura 28	Gráfico da porcentagem de células autofágicas em CTM de pacientes portadores de LMA.....	58
Figura 29	Gráfico da porcentagem de células mortas tratadas com NAC 4mM nas CTM de pacientes portadores de LMA.....	59
Figura 30	Gráfico da produção de ROS nas CTM de pacientes portadores de LMA.....	59
Figura 31	Fotomicrografias representativas de ROS após 24 horas de incubação com 7-KC em CTM de pacientes portadores de LMA....	60
Figura 32	Gráficos da positividade celular (A) e da intensidade de fluorescência (B) do <i>Sonic Hedgehog</i> nas CTM de pacientes portadores de LMA.....	61
Figura 33	Fotomicrografias representativas das CTM de pacientes portadores de LMA após 24 horas de incubação com 7-KC.....	62
Figura 34	Gráfico de intensidade de fluorescência do Smo nas CTM de pacientes portadores de LMA.....	63
Figura 35	Gráfico de intensidade de fluorescência das ABCs nas CTM de pacientes portadores de LMA.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação FAB da Leucemia mielóide aguda.....	3
Tabela 2	Características do total das 22 amostras coletadas da medula óssea.....	20
Tabela 3	Primers com os tamanhos do produto de PCR e temperatura de anelamento.....	26
Tabela 4	Imunofenotipagem das CTM de pacientes portadores de LMA...	36
Tabela 5	Concentração inibitória dos oxisteróis nas CTM de pacientes portadores de LMA e CTM normais.....	44

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CÂNCER	1
1.2 CÉLULAS-TRONCO (CT)	4
1.2.1 CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS.....	6
1.2.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	6
1.3 MICROAMBIENTE MEDULAR	7
1.4 OXISTERÓIS	8
1.4.1 VIAS DE MORTE CELULAR	10
1.4.2 VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG (Hh)	14
1.4.3 TRANSPORTADORES ABCs	15
2. OBJETIVOS	17
2. 1 OBJETIVO GERAL.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 CASUÍSTICA.....	18
3.2 OBTENÇÃO E ESTABELECIMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA	20
3.3 CULTURA CELULAR.....	22
3.4 IMUNOFENOTIPAGEM.....	23
3.5 ANÁLISE DO ESTADO DE INDIFERENCIAÇÃO POR RT-PCR	24
3.5.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL PELO MÉTODO DE TRIZOL.....	24
3.5.2 TRATAMENTO COM DNASE.....	24
3.5.3 SÍNTESE DO CDNA	25
3.5.4 RT-PCR	25
3.6 PLASTICIDADE DAS CTM DA MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES LEUCÊMICOS.....	26
3.6.1 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA	26
3.6.2 DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA.....	27
3.7 TRATAMENTO DAS CÉLULAS.....	28
3.8 ANÁLISE DO ALDH (ALDEÍDO DESIDROGENASE)	28
3.9 VIABILIDADE CELULAR E CÁLCULO DE IC50	29
3.10 CICLO CELULAR DAS CTM DE MEDULA ÓSSEA LMA	29
3.11 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL (PΨM) POR TMRE.....	30
3.12 APOPTOSE E NECROSE	30
3.13 ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR COM INIBIDORES DE MORTE Z-VAD-FMK, 3-MA E NEC-1	31
3.14 ANÁLISE DA CASPASE 3/7	31
3.15 ANÁLISE DA CASPASE 8.....	32
3.16 EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES Bcl-2 E CCD1	32

3.17 AUTOFAGIA (LC3B-FP)	33
3.18 ENSAIO DE ROS (REACTIVE OXYGEN SPECIES).....	33
3.19 ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR COM INIBIÇÃO DE ROS	34
3.20 DETECÇÃO DO SMOOTHENED (SMO), SONIC HEDGEHOG (SHH), ABCA1 E ABCG1 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	34
3.21 ANÁLISE DE DADOS	35
4. RESULTADOS.....	36
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	36
4.2 ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA	38
4.3 ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA	38
4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DE INDIFERENCIAÇÃO.....	39
4.5 ENSAIO DE ALDH (ALDEÍDO DESIDROGENASE).....	40
4.6 CITOTOXICIDADE DOS OXISTERÓIS NAS CTM DE MEDULA ÓSSEA PACIENTE PORTADOR DE LMA.....	41
4.7 ANÁLISE DO CICLO CELULAR EM CTM DE PACIENTES PORTADORES DE LMA APÓS TRATAMENTO COM OXISTERÓIS.....	44
4.8 ANÁLISE DO POTENCIAL DE MEMBRANA DA MITOCÔNDRIA (PΨM) POR TMRE.....	46
4.9 ESTUDO DE MORTE CELULAR	51
4.9.1 INIBIDORES DAS VIAS DE MORTE CELULAR	51
4.9.2 APOPTOSE E NECROSE	53
4.9.3 ANÁLISE DA CASPASE 3/7	53
4.9.4 ANÁLISE DA CASPASE 8.....	54
4.9.5 EXPRESSÃO DOS GENES BCL-2 E CCD1	55
4.9.6 AUTOFAGIA	57
4.10 ANÁLISE DA INIBIÇÃO DE MORTE CELULAR POR ROS E DA PRESENÇA DO ROS INTRACELULAR	58
4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS SHH E SMO	61
4.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ABCA1 E ABCG1	63
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	72
7. ANEXOS	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o câncer é uma das doenças que mais causam mortes no mundo. Este processo ocorre por consequência de fatores ambientais e/ou genéticos que podem ocasionar conjunto de mutações sequenciais, resultando na instabilidade genética de células normais (WHO, 2018; Soltanian & Matin, 2011).

Segundo Huang e colaboradores (2015), essas células tem a capacidade de influenciar o seu próprio microambiente, juntamente com fatores sistêmicos e locais. Uma das causas essenciais para o funcionamento e desenvolvimento das células cancerígenas é a instabilidade genômica. Se estas mutações não forem reparadas pelos sistemas reparatórios da própria célula ou eliminadas pelas células do sistema imunológico do hospedeiro, ocorrerá o desenvolvimento tumoral.

Conforme estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2018, houve cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil. Dentre estes, as leucemias apresentaram cerca de 5.940 casos em homens e 4.860 casos em mulheres, correspondendo a 5,75 casos novos a cada 100 mil homens e 4,56 casos novos para cada 100 mil mulheres no país (INCA, 2018).

A Leucemia é uma neoplasia que afeta o sistema hematopoiético, sendo caracterizada pelo aumento da proliferação e bloqueio maturativo na célula-tronco hematopoiética podendo afetar a linhagem linfóide e/ou mielóide. Essa alteração pode ser resultado de alterações genéticas, epigenéticas, fatores ambientais, físicos e químicos. O acúmulo dessas células imaturas (blastos) na medula óssea afeta a produção das células eritróides, células linfóides e células granulocíticas, bem como compromete a produção de plaquetas na medula óssea e posteriormente, sua função no sangue periférico. Devido a dificuldade na produção de leucócitos, os pacientes estão suscetíveis à novas infecções (Boyd *et. al.*, 2017; Bonnet & Dick, 1997).

Essas neoplasias são classificadas em quatro categorias: Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), Leucemia Mieloide Crônica (LMC) e Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) (INCA, 2018).

A Leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia mielóide maligna frequente em adultos. Estudos sugerem que não somente há mutações nas células-tronco hematopoiéticas (CTH), mas que estas mutações também ocorram no nicho celular onde as CTH residem (Chen *et al.*, 2014). É caracterizada como uma doença heterogênea que acomete as células indiferenciadas da linhagem mielóide, denominado mieloblasto (blasto). Esses progenitores mielóides apresentam uma elevada proliferação e crescimento desordenado com potencial irregular e de autorrenovação. Durante o processo de desenvolvimento da doença, os blastos ocupam todo o ambiente das células-tronco hematopoiéticas saudáveis, fazendo com que o seu nicho fique comprometido. Portanto, essas células inibem a renovação de linhagens celulares diferentes e componentes sanguíneos, bem como, impedem a maturação da própria linhagem mielóide levando à deficiência de células diferenciadas na medula óssea e no sangue periférico (Blau, 2014; Chandran, 2015).

Atualmente, a sobrevida de indivíduos portadores de LMA é baixa, mesmo nos pacientes que tem a remissão da leucemia com o tratamento quimioterápico, a recidiva é frequente (Shafat, 2017). A LMA acomete indivíduos de todas as idades, mas a prevalência ocorre em indivíduos acima dos 60 anos de idade. O diagnóstico da LMA é realizado pela identificação de mieloblastos presentes no sangue periférico e medula óssea (Kumar *et al.*, 2018; Löwenberg *et al.*, 1999).

Portanto, é necessário o desenvolvimento e descoberta de novas formas ou adjuvantes farmacológicos que possam auxiliar no tratamento da leucemia mieloide aguda. Posto isto, alguns estudos sugerem que a recidiva da doença nesses pacientes é devido à presença de múltiplos clones resistentes ao tratamento e que se encontram presentes nos microambientes formados na medula óssea, fazendo com que haja a recaída da neoplasia (Chandran, 2015; Shafat, 2017). Devido a esses subclones, a LMA tem uma classificação diferenciada e consequentemente, o tratamento.

A classificação dos subtipos de LMAs é realizada pelo *World Health Organization* (WHO) e pela classificação Franco-Americana-Britânica (FAB). O WHO tem quatro classificações para as leucemias mieloides agudas. A primeira são as LMAs com anomalias genéticas recorrentes. A segunda classificação, são as leucemias com alterações relacionadas a Síndrome Mielodisplásica (MDS) e a terceira é caracterizada por neoplasias mieloides relacionadas à terapia. A última

categoria são aquelas LMAs que são distintas das classificações anteriores (sem especificidade). Este último grupo, classificado pelo WHO, é subdividido na classificação da FAB, de acordo com o grau de diferenciação e linhagens dos blastos, nos subtipos M0 a M7 (Tabela 1) (Kumar *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2018). No Brasil, além da classificação do WHO, ainda é utilizado a classificação da FAB para determinar os subtipos de LMA e o tratamento.

Tabela 1. Classificação FAB da Leucemia mielóide aguda

FAB	Nome
M0	Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada
M1	Leucemia mieloblástica aguda com maturação mínima
M2	Leucemia mieloblástica aguda com maturação
M3	Leucemia promielocítica aguda
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M4 eos	Leucemia mielomonocítica aguda com eosinofilia
M5	Leucemia monocítica aguda
M6	Leucemia eritroide aguda
M7	Leucemia megacarioblástica aguda

Fonte: Adaptado de American Cancer Society, 2018.

1.2 Células-tronco (CT)

Ernest A. McCulloch e James E. Till foram os primeiros a propor o conceito de células-tronco (CT), através de experimentos realizados em camundongos irradiados que receberam transplante de medula, nos quais foi observado colônias hematopoiéticas no baço desses animais (Till *et al.*, 1964).

As CT podem ser definidas basicamente como células precursoras indiferenciadas com a capacidade de se diferenciar em qualquer outro tipo celular. Essas células exibem capacidade de autorrenovação, e isso é essencial para que haja a preservação da população das células-tronco nos diferentes tecidos (Sobhani *et al.*, 2017).

As células-tronco podem ser classificadas de acordo com a sua origem ou de sua capacidade de diferenciação. Baseado em sua capacidade de diferenciação, as células-tronco são classificadas como totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes. As células-tronco totipotentes, são capazes de gerar todos os tipos celulares de um organismo, incluindo os anexos embrionários. As células-tronco pluripotentes podem dar origem a todos os tipos celulares, excluindo as células dos anexos embrionários. As células-tronco multipotentes tem a capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares. As células-tronco unipotentes são células que se diferenciam somente em uma única linhagem celular (Gage, 2000; Robey, 2000; Romão, 2012).

Em relação à origem, as células-tronco são classificadas em duas formas, células-tronco embrionárias e células-tronco adultas. As células-tronco embrionárias (CTE), têm como característica a pluripotência, são derivadas da massa celular do embrião e tem habilidade de originar a ectoderme, endoderme e mesoderme; portanto, todos os tipos celulares de um organismo. Essas células apresentam a expressão de marcadores específicos de membrana, como SSEA-3 (*stage-specific embryonic antigen*), SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 e fosfatase alcalina, marcadores utilizados na sua caracterização. Além desses marcadores, essas células expressam alguns genes essenciais e que são usados para avaliar a pluripotência das células-tronco: o Oct-4 (*octamer-binding transcription factor*), Nanog (*Nanog homeobox*) e Sox-2 (*SRY(sex determining region Y)-box 2*) (Almalki & Agrawal, 2016;

Hochedlinger & Plath, 2009; Pereira, 2008.; Sobhani *et al.*,2017; Thomson *et al.*, 1998).

Após o desenvolvimento embrionário, as células-tronco adultas (CTA) podem ser encontradas e isoladas de diversos tecidos, como no líquido amniótico, cordão umbilical, placenta, polpa dentária, medula óssea, dentre outros tecidos (Almalki & Agrawal, 2016; Pereira, 2008; Sobhani *et al.*,2017).

As CTA são responsáveis pela manutenção dos diferentes tipos celulares dependendo dos estímulos externos. Na medula óssea, as CTA, são divididas em dois tipos; as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais. Cada grupo celular é responsável pela regeneração de células específicas de acordo com a necessidade do tecido (figura 1) (Almalki & Agrawal, 2016; Pereira, 2008.; Sobhani *et al.*,2017).

Figura 1- Ilustração da classificação das células-tronco adultas. Modificado (Fonte: Adaptado de NIH, 2016).

O tecido mais estudado que origina CTA é a medula óssea (MO), devido a diversidade de células produzidas. O microambiente medular é composto de vasos sanguíneos e por vários componentes envolvidos na função primária da hematopoiese, incluindo células precursoras do tecido e matriz óssea (osteócitos/osteoblastos/osteoclastos), células perivasculares, endotélio sinusoidal, células do sistema imunológico, células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as células-tronco mesenquimais (CTM) que agem como suporte na MO, contribuindo na regulação normal da hematopoiese (Conget & Minguell, 1999; Pando *et al.*, 2018; Shafat *et al.*, 2017).

1.2.1 Células-tronco Hematopoiéticas

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) são células multipotentes. No desenvolvimento fetal essas células estão presentes no saco vitelínico, placenta, baço, medula óssea e dentre outros tecidos (Morrison & Scadden, 2014). Após o nascimento, as CTH irão encontrar-se situadas nas áreas trabeculares da MO, dando origem ao órgão primário das CTH para o reparo, e regeneração das células do sistema sanguíneo. No entanto, as CTH representam cerca de 0.005-0.01 % das células presentes na medula óssea, sendo difícil o isolamento destas células. Contudo, se houver algum estresse no nicho medular, poderá ocorrer à mudança na produção para sítios extramedulares (Basilico & Göttgens, 2017; Frenette *et al.*, 2013; Medyouf, 2017; Morrison & Scadden, 2014; Shields *et al.*, 2016).

1.2.2 Células-tronco Mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTM) são classificadas como células multipotentes adultas existentes em vários tecidos, não somente na MO. Portanto, as CTMs tem a capacidade de se diferenciar em diversas linhagens, sendo que um distúrbio no processo de diferenciação, pode estar envolvido com alterações que favorecem à oncogênese (Behrmann *et al.*, 2018).

A caracterização de uma célula-tronco mesenquimal deve seguir as recomendações propostas pela *International Society for Cellular Therapy* (ISCT). De acordo com as recomendações a CTM, deve exibir determinadas características, sendo as principais: aderência ao plástico da garrafa ou placa de cultura; serem fibroblastóides; expressar como marcadores de superfície celular CD105, CD73, CD90, CD166, CD44 e CD29; não apresentar os marcadores CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79a e HLA classe II. Além disso, após estímulo apropriado, estas células devem ter a capacidade de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro* (Janz *et al.*, 2015; Mafi *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2017).

1.3 Microambiente Medular

O microambiente medular é subdividido em compartimentos e cada célula de suporte presente neste ambiente pode afetar o crescimento e o desenvolvimento das células-tronco hematopoiéticas (CTH) (Sison & Brown, 2011). As células-tronco mesenquimais (CTM) também são conhecidas por serem células de suporte para as CTH e podem regular a hematopoiese do ambiente medular através da produção de fatores solúveis que interagem com os receptores da superfície celular das CTH (Shafat *et al.*, 2017). Esse contato de célula-célula auxilia em vários processos como proliferação, diferenciação, migração e entre outras funções celulares das CTH e células-tronco progenitoras (Sison & Brown, 2011).

Sabe-se que as CTM podem influenciar positivamente o tratamento de pacientes que receberam transplantes de CTH, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras do microambiente. Todavia, há evidências de que, durante o desenvolvimento do câncer, as CTM podem favorecer o desenvolvimento e sobrevida do tumor. Pando e cols (2018) demonstraram que as células leucêmicas produzem vesículas extracelulares que são internalizadas pelas células-tronco estromais (mesenquimais) da medula óssea. Sua função seria a redução na atividade da cadeia respiratória da mitocôndria e de sua capacidade de resposta na mudança metabólica. Por outro lado, as vesículas extracelulares liberadas pelas células-tronco mesenquimais atuariam como imunomoduladoras e imunossupressoras (Pando *et al.*, 2018).

Segundo Sison & Brown (2011), o desenvolvimento da leucemia provoca modificações no ambiente medular e a interação entre as células nos diferentes compartimentos da medula podem levar a sobrevida das células leucêmicas, tanto em estudos *in vitro* quanto em estudos *in vivo*.

Yehudai-Resheff e cols (2019) demonstraram que as CTM e CTH secretam mediadores no microambiente como citocinas e quimiocinas que estão envolvidos na malignidade dos tumores hematológicos. Ou seja, anormalidades no nicho celular podem afetar diretamente ou indiretamente a produção de células saudáveis na medula óssea.

Pesquisas recentes vêm sugerindo que o microambiente da medula óssea é importante no escape das células-tronco leucêmicas e a resistência do processo quimioterápico (Behrmann *et al.*, 2018; Isidori *et al.*, 2014). Experimentos realizados em modelo animal, demonstram que alterações moleculares na medula óssea contribuem para o desenvolvimento de doenças hematopoiéticas. Um exemplo desta alteração, refere-se as moléculas β -catenina e a deleção do miRNA do gene *DICER1* nos osteoblastos, em que há o desenvolvimento da Síndrome Mielodisplásica e a LMA em camundongos (Nishiyama *et al.*, 2018; von der Heide *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

Sendo assim, todos os fatos citados acima referentes ao microambiente contribuem para uma baixa sobrevida, tanto em pacientes adultos como em crianças portadores de LMA, mesmo que esses pacientes alcancem a remissão completa da doença. A falha na terapia da LMA ainda é alta, pois o tratamento pode levar a mutações e conseqüentemente a resistência das células com as drogas utilizadas, fazendo com que esses pacientes tenham a recaída da doença (Castelli *et al.*, 2019).

1.4 Oxisteróis

Os oxisteróis são componentes de uma família de compostos naturais presentes em plantas e animais (Aupeix *et al.*, 1995). Eles são compostos oxidados do colesterol ou bioproduto do processo biosintético e exibem uma ampla atividade biológica, incluindo a função da inibição da síntese de colesterol, imunossupressão,

modificação do metabolismo do ácido aracdônico, dentre outras funções (Olkkonen *et al.*, 2012). Entretanto, os oxisteróis estão envolvidos em diversos processos patológicos, como em lesões cerebrais de indivíduos com esclerose múltipla e no acúmulo de lipoproteínas oxidadas na aterosclerose e em dislipidemias (He *et al.* 2013; Leoni *et al.*, 2017; Levy *et al.*, 2018).

A formação dos oxisteróis sucede da oxidação do colesterol. O colesterol é um composto responsável pela síntese de hormônios esteróides e ácidos biliares, e faz parte das membranas lipídicas das células, estando suscetível à oxidação (Kulig *et al.*, 2016). Essa oxidação ocorre através de duas formas: oxidação enzimática e oxidação não enzimática (Olkkonen *et al.*, 2012). A oxidação não enzimática do colesterol ocorre através da ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), presentes no organismo, em alimentos ricos em colesterol como carne processada, leite, ovos, e outros (Vejux *et al.*, 2008). Sendo os principais compostos decorrentes dessa oxidação não enzimática o 7-cetocolesterol (7-KC) e 7 β -hidroxicolesterol (7 β -OHC) (Olkkonen *et al.*, 2012).

Contudo, a oxidação enzimática ocorre através de hidroxilases do colesterol da família do citocromo P450, presente na membrana mitocondrial das células produtoras de hormônios esteróides. Uma das enzimas pertencentes a esta família é a Cyp27 (esterol 27-hidroxilase), que tem como função modificar a molécula de colesterol para 27-hidroxicolesterol, sendo este encontrado em grandes quantidades no plasma (Figura 2) (Soccio & Breslow, 2004).

Figura 2 - Ilustração da oxidação enzimática e oxidação não enzimática do colesterol. (Fonte: Adaptado de Ruiz *et al.*, 2013).

Estudos de Aupeix e cols (1995) e Olkkonen e cols (2012) demonstraram a ação que alguns oxisteróis exercem na inibição da proliferação e na citotoxicidade celular. A morte celular por citotoxicidade pode ocorrer por vários mecanismos, incluindo a apoptose (Aupeix *et al.*, 1995; Olkkonen *et al.*, 2012).

1.4.1 Vias de morte celular

A morte celular pode ocorrer por diversos mecanismos e ser classificada de acordo com algumas características como a morfologia da célula, aspectos funcionais, característica imunológica. Dentre as vias de morte, há três vias principais que são estudadas: apoptose, autofagia e necrose (Kroemer *et al.*, 2009).

A apoptose ocorre através de duas vias: a via intrínseca, controlada pelo grupo de família das proteínas BCL2, e a via extrínseca, regulada pelos inibidores de

proteínas de apoptose (IAPs), responsáveis por inibir o sinal apoptótico (Cassier *et al.*, 2017; Gamet-Payrastre *et al.*, 2000).

A via extrínseca é ativada através de receptores de morte de superfície celular (Death receptor – DR) que se ligam em seus ligantes naturais, como TRAIL, FasL e TNF- α (Lordan *et al.*, 2009). O TNFR (Receptores do Fator de Necrose Tumoral) contém uma superfamília de receptores (Hassan *et al.*, 2014) como, receptor 1 do fator de necrose tumoral alfa (TNFR1), o ligante do receptor 1 do fator de necrose tumoral alfa (TRAIL-R1, DR4), o ligante do receptor 2 do fator de necrose tumoral alfa (TRAIL-R2, DR5), DR3, DR6 e Fas (CD95) (Mahalingam *et al.*, 2009; Naoum *et al.* 2017; Wu *et al.*, 2018). Quando ocorre a ligação do ligante no DR, há formação do complexo de sinalização ligado a membrana (Lordan *et al.*, 2009).

Sabe-se que alguns receptores da família TNF se ligam a proteínas adaptadoras TRADD (Receptor do fator de necrose tumoral tipo 1-associado a proteína do domínio de morte), juntamente com o FADD (Fas associado com a proteína do domínio de morte) formam o complexo DISC (complexo sinalizador indutor de morte) que é responsável pelo recrutamento e ativação das caspases 8 e 10, desencadeando apoptose (Kufe *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2018). Ativação das caspases 8 e 10, podem ativar concomitantemente a via intrínseca da apoptose, através da clivagem da proteína Bid em tBid (Bid truncada) que é translocada para a mitocôndria (Lordan *et al.*, 2009).

A via intrínseca da apoptose é controlada pela família das proteínas BCL2 que são responsáveis pela permeabilidade da membrana mitocondrial (Hassan *et al.*, 2014). Esta família consiste de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo/Diva e Nr13) e proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bok/Mtd, Bcl-xS, Bid, Bad, Bik, Hrk, Bim/Bod, Bnip3, Nix, Noxa, Puma e Spike) (Papaliagkas *et al.*, 2007). O contato entre essas proteínas regulam a formação do complexo de permeabilização da membrana externa da mitocôndria (MOMP), este processo leva a liberação do citocromo c que juntamente a proteína Apaf1, leva a formação do apoptossoma, consequentemente ativando a caspase 9 que ativa as caspases executoras (caspases 3, 6 e 7) (Hassan *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2018). O envolvimento das caspases é fundamental para a finalização do processo apoptótico, as caspases são subdivididas em caspases iniciadoras (caspase-2, 8, 9, 10) e caspases executoras (caspase-3, 6 7) (Pfeffer & Singh, 2018). Ao final da via

da apoptose, ocorre o desarranjo do DNA, digestão dos componentes celulares e absorção fagocitária (Figura 3) (Sivagnanam *et al.*, 2017).

Figura 3 - Ilustração do processo apoptótico em células eucarióticas.

A morte celular através da apoptose e autofagia são processos distintos, porém, em um dado momento elas podem convergir e interagir em cada uma das vias (Satyavarapu *et al.*, 2018).

O processo de digestão dos constituintes celulares com finalidade energética é vital para homeostase e sobrevivência do organismo, este processo é denominado de autofagia (He *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2016). Por outro lado, em um ambiente tumoral onde há escassez de “alimento”, as células cancerígenas como estratégia

de sobrevivência tem uma vantagem com o processo autofágico. Quando o organismo é privado da alimentação, a célula utiliza a matriz citoplasmática, que tem como finalidade envolver organelas celulares desgastadas, formando os autofagossomos que se fundem com os lisossomos repletos de enzimas, efetuando a degradação das organelas. Dessa forma, a célula reaproveita os constituintes moleculares dessa digestão enzimática (Satyavarapu *et al.*, 2018) (Figura 4).

Figura 4 - Ilustração do processo autofágico em células eucarióticas. 1- O fagóforo envolve componentes citoplasmáticos como mitocôndria e proteínas. 2- Há o recrutamento da proteína LC3B e a formação do autofagossomo. 3- Ocorre a fusão do lisossomo, formando o autolisossomo. 4- Ocorre a dissociação do LC3B e a digestão dos componentes citoplasmáticos induzindo a liberação de aminoácidos e ácido graxos. (Fonte: Adaptado de Invitrogen, 2010).

Para que haja este processo, logo no início da via autofágica, há o envolvimento de determinados componentes, como alguns genes da família Atg (Autophagy-related genes) e o envolvimento do complexo ULK1/2-Atg13-FIP200-Atg101, onde são essenciais para a ocorrência da morte celular (Satyavarapu *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2017). Quando ocorre a formação do autofagossomo nas organelas danificadas e/ou sem função, ocorre o processo de auto-digestão, através da fusão

com lisossomos formando a organela autolisossomo (Yuan *et al.*, 2016). Uma molécula utilizada normalmente para a investigação do processo autofágico, são as moléculas da subfamília LC3B (proteína associada ao microtúbulo 1 de cadeia leve-3B). Em que a conversão do LC3B-I em LC3B-II é importante para que haja a formação dos autofagossomos (Satyavarapu *et al.*, 2018).

Outra via de morte celular que pode ser presenciada nas células tratadas com oxisteróis é a necrose, que foi observada tanto em experimentos *in vitro* como *in vivo* (Favero *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2016). A necrose, pode ser identificada através do inchaço celular que leva ao rompimento da membrana plasmática e consequentemente ao extravasamento do conteúdo celular (Yamanaka *et al.*, 2011). Estudos vêm demonstrando que a necrose também pode ser uma morte celular programada, sendo esta morte denominada como necroptose (Liu *et al.*, 2015; Yamanaka *et al.*, 2014).

Alguns mediadores celulares utilizados na ativação da via de morte por apoptose, como TNF, Fas ligante, TRAIL, também podem ser estímulos para a via da necroptose. Este processo ocorre através das pan-caspases bloqueando a via apoptótica, e a presença dos mediadores podem ser utilizados na necroptose como via alternava de morte celular (Liu *et al.*, 2015). A ativação do receptor do complexo proteína quinase 1 (RIPK1)-RIPK3 é essencial na morte por necroptose, este fato foi comprovado em experimentos utilizando um inibidor alostérico da RIPK1, a necrostatina-1, em que foi observado a importância desta quinase para o funcionamento da via (Liu *et al.*, 2015; Yamanaka *et al.*, 2014).

1.4.2 Via de sinalização Hedgehog (Hh)

A via de sinalização Hedgehog (Hh) participa de vários processos biológicos nas células embriogênicas (Carpenter & Ray, 2019). Tendo um importante papel na embriogênese, proliferação celular, desenvolvimento e diferenciação dos tecidos. A via canônica do Hh é composta por três principais proteínas, o sonic hedgehog (SHh), o indian hedgehog, e a desert hedgehog. Essas proteínas são encontradas no período embrionário após três semanas do desenvolvimento do embrião em que está ocorrendo a formação da notocorda, participando dos processos de sinalização

e ativação celular. Dentre essas três principais proteínas, a SHh se destaca (Carballo *et al.*, 2018).

Essa proteína está presente na vida adulta, participando das funções nos processos inflamatórios e homeostase tecidual. Quando a proteína SHh é expressa, ela bloqueia a proteína transmembranar Patched-1 (PTCH1). Com este bloqueio, ocorre a ativação de uma via intracelular através da proteína Smoothened (SMO). A SMO é uma proteína de sete hélices que regula positivamente essa via (Zeng & Ju, 2018).

Quando a proteína SMO é ativada, ocorre o desencadeamento de sinalizações intracelulares que envolvem o complexo SUFU-GLI. A partir da ativação da SMO o complexo SUFU-GLI se desfaz e a proteína GLI é transloca para o núcleo, ativando as proteínas PTCH1, CycD1, Myc, Bcl-2, NANOG e SOX-2 que são responsáveis pela proliferação, apoptose, supressão e auto-renovação das células-tronco (Rimkus *et al.*, 2016).

Quando ocorre a desregulação da via, há uma proliferação celular descontrolada, resultando na tumorigênese, metastase celular e contribuindo ao fenótipo de resistência de múltiplas drogas (MDR) (Bariwal *et al.*, 2018).

1.4.3 Transportadores ABCs

Os transportadores ABCs (*ATP-binding cassetes*) são consideradas uma das maiores famílias de proteínas transmembrana contendo 49 integrantes, e são constituídos de dois domínios de ligação nucleotídicos e dois domínios transmembrânicos. Essas proteínas são classificadas em sete subgrupos de A a G (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF e ABCG). A maior parte desses transportadores é ativada e tem função de transportar moléculas através da membrana celular contra o gradiente de concentração (Begicevic & Falasca, 2017).

Os membros da família ABCs possuem várias atividades fisiológicas: transporte de lipídios, colesterol, esfingomielina, sais biliares, fosfolipídios, esteróides, xenobióticos, incluindo a remoção de compostos tóxicos das células (endógenos e exógenos) (Neumann *et al.*, 2017).

Alguns cânceres apresentam o aumento na expressão dos transportadores ABC. Este fato ocorre devido ao processo terapêutico, onde as células tumorais exportam os quimioterápicos para fora da célula. Contudo, há indícios que as células tumorais também exportam moléculas bioativas específicas para o meio extracelular, levando à resistência a múltiplas drogas. (Begicevic & Falasca, 2017).

Foi identificado que os oxisteróis são capazes de se ligar os receptores LXR (Receptores nucleares do fígado X) (Moresco *et al.*, 2018). A ativação desses receptores regula a homeostase do colesterol, modulando a expressão de vários genes da família ABC (Levy *et al.*, 2017). Dentre a ativação desses genes, sabe-se que a expressão das ABCA1 e ABCG1 são estimuladas pelos níveis de colesterol e oxisterol através dos receptores LXR (Hardy *et al.*, 2017).

Determinados oxisteróis poderiam exercer um papel importante como agente e/ou adjuvante antitumoral (Aupeix *et al.*, 1995; Olkkonen *et al.*, 2012). Assim, por essa ação citotóxica e antiproliferativa demonstrada por estes compostos, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com alguns oxisteróis, testando essa hipótese. Foi observado, em experimentos previamente realizados em células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo, que alguns oxisteróis apresentaram a capacidade de promover a inibição da proliferação celular *in vitro* (Silva, 2017). Porém, em outro estudo, foi possível observar que os oxisteróis citotóxicos foram capazes de inibir a fase S do ciclo celular e estimular a fase G0/G1 ou a fase G2/M em linhagem de câncer de mama (Levy *et al.*, 2018). Em outro trabalho foi observado uma redução do tamanho da área tumoral em mais de 50 %, em modelo de melanoma murino (Favero *et al.*, 2018). O presente trabalho visa estudar as características da morte de células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes com leucemia mieloide aguda promovida por oxisteróis.

2. OBJETIVOS

2. 1 Objetivo Geral

Avaliar as características de morte celular causada por diversos oxisteróis: 7-cetocolesterol, colestane-3 α -5 β -6 α -triol, 3,5 colestane-7-ona, 3 α -5 β -6 α -colestane-3,6-diol, acetato de colesterol, 7-oxocolesterol-5-em-3-beta-il-acetate, e 5 β -6 β epoxicolesterol, em células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

O projeto foi aprovado pela comissão de ética para análise de projetos de pesquisa (CAPPesq), sob o nº 89768418.7.0000.0068.

A medula óssea de 22 pacientes, com suspeita de leucemia mieloide aguda (LMA) foi coletada para diagnóstico, sendo que as amostras foram processadas antes do diagnóstico definitivo. As células-tronco mesenquimais foram obtidas do remanescente da amostra de medula óssea utilizada no diagnóstico por imunofenotipagem destes pacientes. Nosso critério de inclusão foram pacientes adultos de ambos os sexos, com diagnóstico confirmado para LMA. Os critérios de exclusão foram: amostras de crianças, pacientes com leucemia secundária e com síndrome mielodisplásica.

Das 22 amostras coletadas, oito amostras atenderam aos critérios previamente estabelecidos para nosso estudo. Nove amostras foram excluídas por não formarem colônias, impossibilitando o cultivo celular. Cinco amostras foram excluídas do estudo, pois não se confirmou o diagnóstico de LMA. Dos oitos pacientes restantes, aleatoriamente cinco foram escolhidos para o estudo. O fluxograma da figura 5 mostra as características de inclusão e não inclusão dos pacientes. As características do perfil do diagnóstico dos pacientes estão descritas na tabela 2.

Figura 5 – Casuística e critérios de exclusão das amostras * Foram somente utilizadas 5 amostras das 8 que atenderam aos critérios.

Tabela 2. Características do total das 22 amostras coletadas da medula óssea

Amostras LMA	Idade	Sexo	Diagnóstico	Classificação FAB	Uso
1	71	Feminino	LMA	M2	Excluído
2	13	Masculino	DRM		Excluído
3	33	Feminino	DRM		Excluído
4	34	Masculino	LMA	M4	Excluído
5	65	Masculino	LMA	M3	Excluído
6	56	Masculino	SMD		Excluído
7		Feminino	LMA	M4	Excluído
8	88	Masculino	LMA	M5b	Excluído
9	26	Masculino	LMA	M1	Incluído
10	29	Feminino	LMA	M3	Incluído
11	65	Masculino	LMA	M4	Incluído
12	62	Masculino	Secundária		Excluído
13	44	Feminino	LMA	M4	Incluído
14		Feminino	LMA	M1	Excluído
15	35	Masculino	LMA	M4	Incluído
16	66	Feminino	LLA		Excluído
17	61	Masculino	LMA	Hipocelular	Incluído
18	55	Masculino	Sem classificação		Excluído
19	62	Feminino	SMD		Excluído
20	25	Masculino	LMA	M1	Incluído
21	64	Feminino	LMA	M5b	Incluído
22	56	Feminino	LMA	M3	Excluído

*SMD = Síndrome Mielodisplásica

* DRM = Doença Residual Mínima

* LLA = Leucemia Linfocítica Aguda

3.2 Obtenção e estabelecimento das células-tronco mesenquimais de medula óssea

Em sistema de fluxo laminar e em condições assépticas, as amostras de medula óssea obtidas dos pacientes foram processadas para obtenção das células-tronco mesenquimais. Para separação das células mononucleadas e eliminação dos eritrócitos, o aspirado de medula foi diluído com solução salina tamponada com fosfato (PBS – *phosphate-buffered saline*, pH 7,2-7,4), na proporção 1:1 (v/v). Em tubos para centrifugação de 15 mL, o aspirado de medula diluído foi depositado pelas paredes do tubo, vagarosamente, sobre uma fase de Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare Life Sciences, EUA) na proporção 3:1, evitando-se mistura. Os tubos

foram então centrifugados a 450 x g durante 30 minutos, sem frenagem e à temperatura ambiente.

Após a centrifugação, os componentes sanguíneos foram separados de acordo com sua densidade e em relação ao Ficoll. Nessa separação, as células mononucleares que compreendem os linfócitos e monócitos, formam uma fina camada que se dispõe na interface entre o Ficoll e o plasma. A camada de células mononucleares foi coletada com uso de pipeta Pasteur e transferida para outro tubo para centrifugação. Para remoção de resíduos de Ficoll e plasma (que contaminam a suspensão com granulócitos e excesso de plaquetas, respectivamente), as células foram ressuspensas em PBS, a uma proporção 3:1 e centrifugadas novamente a 450 x g por 10 minutos. Esta etapa foi repetida três vezes.

Após o processo de separação e lavagens, as células foram contabilizadas e investigadas a sua viabilidade. Para estas análises, as células foram coradas com o corante azul de trypan e em um microscópio de campo claro as células foram contabilizadas como viáveis e não-viáveis utilizando uma câmara de Neubauer. Tendo uma viabilidade de 90 %, as células foram ressuspensas em meio de crescimento celular: DMEM-Low (Sigma-Aldrich®, EUA), suplementado com 20 % de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Brasil), penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL (Sigma-Aldrich®, EUA) (Figura 6).

As células em meios de cultura foram plaqueadas em garrafas de cultura de tecido para células aderentes com dimensões de 75 cm² (Santa cruz) e foram mantidas em incubadora a 37 °C com atmosfera de CO₂ a 5 % (Thermo Forma, EUA). Após 72 horas, as células não aderentes foram removidas e o meio de cultura substituído. As células aderentes ao plástico com características fibroblastoides foram cultivadas até serem observadas as primeiras unidades formadoras de colônias.

Figura 6 – Metodologia do processamento e estabelecimento das células-tronco mesenquimais. Disposição sangue-ficoll antes (a) e após (b) a centrifugação, e com a separação das células mononucleadas diluídas em PBS (c) para realização de lavagens (d) garrafas de culturas de tecidos.

3.3 Cultura Celular

As unidades formadoras de colônias cultivadas, ao atingirem confluência de 80 % foram dissociadas enzimaticamente. Para tanto, as células foram lavadas com PBS e posteriormente, foi executado o procedimento enzimático padrão com ATV (associação de tripsina e versene) (Instituto Adolfo Lutz), para expansão das células e posterior caracterização da população celular com marcadores específicos. As células foram mantidas em cultura, até passagens P5.

Parte destas células expandidas foram criopreservadas em uma concentração de 1×10^6 células, para futuros experimentos. A criopreservação das linhagens foi feita com 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) em meio DMEM-Low com 10 % SFB e armazenadas em ultrafreezer -80 °C. Para execução dos experimentos, as células criopreservadas foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37 °C, e cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium *low glucose* (DMEM *low glucose*) (Sigma-Aldrich®, EUA), suplementado com 20 % de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Brasil), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®, EUA), e acondicionadas em incubadora a 37 °C com atmosfera úmida e 5 % de CO₂ (Thermo Forma, EUA).

As culturas foram acompanhadas diariamente, para observar e registrar a morfologia das células. A substituição do meio de cultivo foi realizada três vezes por

semana. Quando as células atingiram a confluência de 80 %, foi feita a dissociação destas células, realizando a lavagem com PBS e posteriormente, o procedimento enzimático padrão com ATV para expansão das células.

3.4 Imunofenotipagem

A caracterização da população das células-tronco mesenquimais de cada amostra foi realizada pela análise de proteínas de membrana através do método de citometria de fluxo. A identificação dos antígenos foi realizada através da utilização de diferentes anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*), ficoeritina (PE, do inglês *phycoeritin*) e complexo de proteína clorofila peridina (PerCP, do inglês *peridin chlorophyll protein complex*). Controles de marcações inespecíficas foram utilizados para adequar a calibração do aparelho, análise dos resultados e definição da positividade da amostra. As células obtidas e quantificadas foram coletadas na concentração de 1×10^6 em um tubo específico para citometria (Becton Dickinson, EUA), previamente identificado e incubado com os anticorpos monoclonais CD11b-FITC (VIM12), CD29-PE (TS2/16), CD44-PE (MEM-85), CD34-FITC (581), CD45-PerCP (MEM-28), CD90-FITC (5E10), CD105-PE (SN6) e HLA-DR-FITC (MEM-12) (Invitrogen, USA), conjugados aos fluorocromos por um período de 20 minutos em campo escuro à temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 2 mL de PBS e feita centrifugação a $300 \times g$ por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular homogeneizado e ressuspenso em 500 μL de solução PBS e realizado a leitura no citômetro de fluxo.

As células foram adquiridas e a intensidade de fluorescência foi captada pelo citômetro de fluxo no aparelho FACS CaliburTM (Becton Dickinson, EUA). Os dados foram analisados no CELLQuestTM (Becton Dickinson, EUA). Para cada amostra foi obtida uma aquisição de 10.000 eventos. Os resultados foram fornecidos e analisados na forma de dotplot e em percentual da população celular com reação positiva para cada anticorpo.

3.5 Análise do estado de indiferenciação por RT-PCR

3.5.1 Extração do RNA total pelo método de trizol

As células mantidas em cultura foram dissociadas enzimaticamente e 1×10^6 células foi utilizada para obtenção do RNA. Para a extração do RNA, foi adicionado 1 mL de trizol em 1×10^6 células e homogeneizado gentilmente. Subsequentemente, foi adicionado às amostras, 200 μ L de clorofórmio e agitado vigorosamente com uma pausa de 3 minutos em temperatura ambiente. Transcorrido este período, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a $15.000 \times g$, a 4°C . Após a centrifugação, a fase aquosa da mistura foi transferida para um novo tubo estéril previamente tratado com água DEPC (dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich, EUA) para inativação de nucleases.

Para precipitação do RNA, 500 μ L de álcool isopropílico gelado foi adicionado à solução aquosa. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e, após esse período, centrifugadas por $15.000 \times g$ por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se ao RNA precipitado, 1 mL de etanol a 75 % em água DEPC. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por $6.000 \times g$ por 5 minutos a 4°C . Novamente o sobrenadante foi descartado e 50 μ L de água DEPC foi utilizado para ressuspender o RNA total extraído.

3.5.2 Tratamento com DNase

Para o tratamento com DNase foi utilizado o kit RQ1 (RNA Qualified) RNase-Free DNase. As amostras de RNA à 1 μ g foram diluídas em água tratada com DEPC, em volume final de 8 μ L. Este material foi incubado, com a enzima RQ1 RNase-Free DNase 1 U/ μ L e com Reaction Buffer 1X, a 37°C durante 30 minutos para a digestão do DNA genômico. Subsequentemente à incubação foi adicionado o tampão de parada da reação (Promega, Madison, WI, USA), para a inativação da enzima, seguido de incubação a 65°C por 10 minutos.

3.5.3 Síntese do cDNA

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 1 µg do RNA total obtido conforme descrito anteriormente. A preparação foi realizada conforme orientações do fabricante do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems™). O cDNA foi obtido em volume final da reação de 20 µL, contendo 1 µg de RNA total, 1 µL de iniciadores aleatórios (20 pmol), 2 µL de RT Buffer (10 X tampão de reação), 1 µL de dNTP mix (4 mM de cada dNTP), 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (transcriptase reversa) e H₂O tratada com DEPC para completar o volume final de 20 µL. As amostras foram submetidas às variações de temperatura de 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos, 85 °C por 5 minutos no termociclador PTC-200® (Peltier Engine, EUA).

3.5.4 RT-PCR

Para determinar o estado de indiferenciação das célula-tronco mesenquimais de medula óssea cultivadas *in vitro*, foi realizada a análise da expressão gênica a partir do RNA total extraído das culturas celulares. Foi utilizada a técnica da reação em cadeia polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR), para verificação dos genes Oct-4 e Nanog (Tabela 3). Foi utilizado como controle da reação do experimento, células mesenquimais previamente caracterizadas. O gene GUSB foi utilizado como controle endógeno da reação de RT-PCR.

Cada reação foi feita com 1,5 mM de MgCl₂, aproximadamente 1 unidade de Taq DNA polimerase, 10 mM de Tris HCl, 60 mM de KCl, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP). Concentração mínima de 10 ng de cDNA foi utilizado para cada reação. Todos os *primers* senso e antissenso foram ressuspensos em água tratada com DEPC e utilizados na concentração de 10 µM cada.

As condições ideais para a reação de PCR foram: 95 °C por 5 minutos para a desnaturação, em seguida a amplificação por 35 ciclos consistindo de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização conforme o primers (Tabela 3) por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e uma etapa de extensão final a 72 °C

por 7 minutos. Os produtos da PCR foram analisados através de um gel de agarose 2 % (Sigma-Aldrich®, EUA) corado com GelRed (0,1 µg/mL) (Biotium, USA) visualizado em transiluminador de luz ultravioleta ImageQuant LAS 4000 (GE - Boston, Massachusetts, EUA).

Tabela 3. Primers com os tamanhos do produto de PCR e temperatura de anelamento

GENE	PRIMERS	PRODUTO	°C
	5'- cgt gaa gct gga gaa gga gaa gct g – 3'		
OCT-4	5'- caa ggg ccg cag ctt aca cat gtt c – 3'	247 pb	61
	5'- cat gag tgt gga tcc agc ttg – 3'		
NANOG	5'- cct gaa taa gca gat cca tgg – 3'	191 pb	52
	5'- gaa aat acg tgg ttg gag agc tac tt -3'		
GUSB	5'- ccg agt gaa gat ccc ctt ttt a -3'	101pb	60

3.6 Plasticidade das CTM da medula óssea de Pacientes leucêmicos

3.6.1 Diferenciação Osteogênica

A diferenciação osteogênica foi realizada em placas de 96 poços. As células foram plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células/cm² e ao terceiro dia de crescimento ao atingirem 70-80 % de confluência foram tratadas com meio indutor para diferenciação osteogênica (Gibco, Brasil). As trocas de meios seguiram as indicações descritas pelo fabricante. Como controle do experimento, as células foram plaqueadas e cultivadas com meio de crescimento basal (DMEM-Low com 20 % de SFB e 1 % penicilina/estreptomicina mantidas nas mesmas condições de cultura). A placa foi mantida em estufa úmida a 37 °C com 5 % de CO₂ por 21 dias. A troca de meio realizada a cada dois dias. Para visualizar os cristais de cálcio

depositados pelas células, foi realizado o método de coloração com vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich, EUA).

3.6.1.1 Coloração por vermelho de alizarina

As células diferenciadas foram fixadas com paraformaldeído 4 % por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com água miliQ e coradas por 3 minutos com a solução alizarina. Esta solução foi preparada com 2 g de alizarina dissolvida em 100 mL de água destilada, com o pH 5. Os depósitos de cálcio produzidos pelas células foram visualizados por uma coloração vermelha intensa.

3.6.2 Diferenciação adipogênica

A diferenciação adipogênica foi realizada em placas de 96 poços. As células foram plaqueadas com $0,5 \times 10^4$ células/cm² e ao terceiro dia de crescimento ao atingirem 70-80 % de confluência foram tratadas com meio indutor para diferenciação adipogênica (Gibco, Brasil). As trocas de meio seguiram as indicações descritas pelo fabricante. Como controle do experimento, as células foram plaqueadas e cultivadas com meio de crescimento basal (DMEM-Low com 20 % de SFB e 1 % penicilina/estreptomicina mantidas nas mesmas condições de cultura). A placa foi mantida em estufa úmida a 37 °C com 5 % de CO₂ por 15 dias. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela presença de vacúolos lipídicos citoplasmáticos através do método de coloração Oil Red O (Sigma-Aldrich, EUA).

3.6.2.1 Coloração de Oil Red O

As células foram fixadas com paraformaldeído 4 % por 2 horas e lavadas três vezes com água miliQ. Subsequentemente, as células foram coradas com a solução de Oil Red O por 20 minutos em temperatura ambiente. Transcorrido este tempo as células foram lavadas com água miliQ por três vezes a fim retirar o excesso de coloração. O acúmulo de lipídios citoplasmáticos foram evidenciados na cor vermelha e foram registrados por microscopia de campo claro. A solução estoque de

Oil Red O foi preparada utilizando 0,5 g de Oil Red O dissolvido em 100 mL de isopropanol. A solução trabalho para coloração das células fixadas consistiu de uma mistura de 20 mL da solução estoque diluída em 30 mL de água destilada.

3.7 Tratamento das células

Os oxisteróis foram sintetizados a partir do colesterol (C8667-Sigma-Aldrich, MO, USA), pelo Dr. Alessandro Rodrigues da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, como descrito (Carvalho *et al.*, 2011; Salvador *et al.*, 2013). Os sete oxisteróis produzidos a partir do colesterol foram: 7-cetocolesterol (7-KC), colestane-3 β -5 α -6 β -triol (triol), 3,5 colestane-7-ona (colestona), 3 α -5 β -6 α -colestane-3,6-diol (diol), acetato de colesterol (acetato), 7-oxocolesterol-5-em-3-beta-il-acetato (7-oxo), 5 β -6 β epoxicolesterol (epoxi). O colesterol foi utilizado como controle.

Os oxisteróis sintetizados tinham uma pureza de aproximadamente 98 % detectada por meio de GS/MS. Para os experimentos, foi preparada uma solução estoque na concentração de 10000 μ M em etanol absoluto.

Foram colocadas 5×10^3 células/cm² em duplicatas, em microplacas pretas de fundo chato transparente com 96 poços (3603 - Corning, MA, USA) e cultivadas até atingirem uma confluência de 80-90 % de células. Subsequentemente foi realizado o tratamento com os oxisteróis nas concentrações descritas a seguir por 24 horas. Como controle positivo de morte celular (100 % de morte) adicionou-se 20 % de DMSO e como controle negativo foi adicionado apenas meio de cultivo basal. Após o período experimental, vários parâmetros foram observados conforme descrito abaixo.

3.8 Análise do ALDH (aldeído desidrogenase)

As CTM da medula óssea foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/cm² em duplicata, em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (3603-corning, USA). Como controle foi utilizado células da linhagem A549 (células de adenocarcinoma pulmonar) na mesma densidade celular, pois essas células conhecidamente expressam ALDH. Após 24 horas, foi utilizado o kit Aldefluor (StemCell™) segundo as instruções do fabricante. Foi adicionado um reagente

específico para inibição do ALDH (DEAB) nos poços controles (0,5 µL). Nos poços testes e controles foram adicionados 0,5 µl do reagente aldefluor ativado, junto com 0,1 µg/mL Hoechst 33342 (H1399- Molecular Probes, OR, USA). A placa foi incubada em estufa úmida a 37 °C com 5 % de CO₂ por 45 minutos. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada por 3 minutos a 100 x g (Allegra® X-12R Centrifuge, Beckman Coulter), o sobrenadante foi removido e foram adicionado 50 µl do tampão de ensaio e realizada a leitura no equipamento *ImageXPress Micro High Content System* (Molecular Devices, USA).

3.9 Viabilidade celular e cálculo de IC₅₀

As CTM da medula óssea foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^3 células/cm² em duplicata, em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (3603-corning, USA), após atingirem confluência de 80-90 % foram incubadas com oxisteróis nas concentrações 100 µM, 50 µM, 25 µM e 10 µM por 24 horas.

Transcorrido esse período, os núcleos das células foram marcados com 1 µg/mL de Hoechst 33342 (H1399- Molecular Probes, OR, USA) e foi acrescentado 2 µL de iodeto de propídio (PI) (P3566- Molecular Probes, OR, USA) de uma solução de 50 µg/mL antes da leitura. Foi realizada a centrifugação da placa por 450 x g por 3 minutos em temperatura ambiente. As células marcadas somente Hoechst 33342 foram consideradas vivas. As células marcadas tanto com Hoechst 33342 como com PI foram consideradas mortas. A presença das marcações celulares fluorescentes foi determinada usando o *ImageXPress Micro High Content System* (Molecular Devices, CA, USA). Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos. Foi usado o programa *Cell Scoring MetaXpress* (Molecular Devices, CA, USA) para analisar o número de células e a viabilidade celular. Para o cálculo de IC₅₀ foram avaliados através de uma curva de ajuste de inclinação variável no programa estatístico GraphPad Prism (GradPad Software, CA, USA).

3.10 Ciclo Celular das CTM de medula óssea LMA

Avaliamos os efeitos do tratamento dos oxisteróis por 24 horas no ciclo celular nas CTM de medula óssea. A análise do ciclo foi investigada pela intensidade de

fluorescência dos núcleos marcados com Hoechst 33342 (0,1 mg/mL). Este corante é um intercalante de DNA e a intensidade de fluorescência é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA. O Hoechst 33342 foi incubado nas células por no mínimo 2 horas antes da realização da leitura no *ImageXPress Micro High Content System*. Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento dos oxisteróis foi adquirido. O software *Cell Cycle MetaExpress* (Molecular Devices, CA, USA) foi utilizado para analisar as diferentes fases do ciclo celular.

3.11 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PΨm) por TMRE

As CTM foram plaqueadas 5×10^3 células/cm² em duplicata e tratadas com oxisteróis por 24 horas. Ao final do período experimental, as células foram incubadas com 0,1 µg/mL Hoechst 33342 e 50 nM TMRE (87917-Sigma Aldrich, MO, USA) por 40 minutos a 37 °C. O TMRE (*tetramethylrhodamine, ethyl ester*) é utilizado para marcar mitocôndrias ativas, as mitocôndrias despolarizadas ou inativas tem um potencial de membrana diminuído e não conseguem sequestrar o TMRE. A fluorescência do TMRE foi determinada usando *ImageXPress Micro High Content System* (Molecular Devices, USA). Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos. O potencial transmembranar mitocondrial foi determinado usando o software *Cell Scoring MetaExpress* (Molecular Devices, CA, USA).

3.12 Apoptose e necrose

As CTM da medula óssea foram plaqueadas na densidade de $1,5 \times 10^3$ células/cm² em duplicata, em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (3603-Corning, MA, USA). Após 24 horas, as células foram incubadas com diferentes concentrações de 7-KC por mais 24 horas. Foi utilizado o kit de detecção de apoptose, *Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit I* (556420-BD Biosciences), como descrito pelo fabricante. As células foram incubadas com 0,5 µL de FITC Anexina V e 2 µL de PI (50 µg/mL) e incubadas por 15 min, no escuro em temperatura ambiente. Os núcleos foram marcados com 0,1 µg/mL Hoechst 33342 por 10 min. A presença de apoptose foi analisada em 1 hora usando o *ImageXPress Micro High Content System* (Molecular Devices, CA, USA). Cinco sítios por poços e

dois poços por tratamento foi adquirido. A porcentagem (%) de apoptose foi determinada usando o *MetaXpress Cell Health software*. As células marcadas com Hoechst 33342 foram consideradas células vivas. O processo apoptótico foi definido pela presença de Anexina V ou Anexina V/PI. O processo necrótico foi definido por somente a presença do reagente PI.

3.13 Ensaio da viabilidade celular com inibidores de morte Z-VAD-FMK, 3-MA e Nec-1

As CTM da medula óssea foram plaqueadas em uma densidade de $1,5 \times 10^3$ células/cm² em duplicata, em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (3603-Corning, MA, USA). Após 24 horas, as células foram tratadas com 100 µM de Z-VAD-FMK (1140, BioVision, Ca, USA) ou 3-methyladenine (3-MA) (2249-25, BioVision, CA, USA) na concentração de 10 mM ou Necrostatin-1 (Nec-1) (ab141053 ABCAM, Cambridge, UK) na concentração de 100 µM por três horas. Após incubação com os inibidores, Z-VAD-FMK ou 3-methyladenine ou Necrostatin-1 foram removidos e o oxisterol 7-KC foi adicionado em diferentes concentrações por 24 horas. As CTM de medula óssea sem o tratamento com os inibidores, foram sujeitas ao tratamento com o 7-KC por 24 horas como controle. Após isto, as células foram incubadas com 0,1 µg/mL Hoechst 33342 (H1399- Molecular Probes, OR, USA) e 0,1 µg/mL de iodeto de propídio (PI) (P3566-Molecular Probes, OR, USA) por 15 min. *ImageXPress Micro High Content System* (Molecular Devices, CA, USA) foi utilizado para determinar o número de células vivas e células mortas. Cinco sítios por poços e dois poços por tratamento foram adquiridos. *Cell Scoring MetaXpress software* foi utilizado para analisar os números de células e a viabilidade.

3.14 Análise da caspase 3/7

As CTM foram plaqueadas com 5×10^3 células/cm² em duplicata e tratadas com oxisteróis por 24 horas. Após o período de incubação foi adicionado 5 µL do substrato da caspase 3/7 (*CellEvent Caspase-3/7 Green* - Invitrogen, CA, USA), e incubado em estufa a 37 °C com concentração de 5 % CO₂, por 30 minutos. A fluorescência foi determinada usando *ImageXPress Micro High Content System*.

Foram adquiridos cinco sítios e dois poços por tratamento. A ativação da caspase 3/7 foi analisada utilizando o *Cell Scoring MetaXpress* software.

3.15 Análise da caspase 8

As CTM da medula óssea de pacientes com LMA foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^3 células/cm² em duplicata, em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (3603-corning, USA). Após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações do oxisterol 7-cetocolesterol, foi utilizado o kit Vybrant® FAM Caspase-8 Assay (V35119 - Molecular Probes) segundo as instruções do fabricante. Foi adicionado 3,33 µL do reagente FLICA (FAM-LETD-FMK caspase-8 reagente) por poço, juntamente com 0,1 µg/mL Hoerchst 33342. A placa foi incubada em estufa úmida a 37 °C com 5 % de CO₂ por 60 minutos. Após o período de incubação, foi realizado duas vezes a lavagem da placa, com 100 µL de 1X solução de lavagem. Após as lavagens, foi adicionado 0,1 µg/mL de iodeto de propídio. A presença da caspase 8 foi analisada usando o *ImageXPress Micro High Content System* (Molecular Devices, CA, USA). Foi adquirido cinco sítios por poços e dois poços por tratamento. *Cell Scoring MetaXpress* software foi utilizado para analisar a porcentagem de células positivas.

3.16 Expressão gênica dos genes Bcl-2 e CCD1

Foi utilizada a técnica de PCR em tempo real para análise da expressão gênica dos genes Bcl-2 e CCD1 (ciclina D1). O mRNA e o cDNA foram preparados como descrito anteriormente. A expressão do mRNA foi normalizada em relação a expressão do gene endógeno GUSB (*Human GUSB (Beta Glucoronidase) Endogenous Control* – 4333767F). Os ensaios foram realizados em duplicatas e a variação no valor de CT (*Cycle of Threshold*) entre as duplicatas não ultrapassou 0,5. Todos os ensaios utilizaram amostras referência e um controle de amplificação ao qual não foi adicionada amostra. Os primers utilizados foram adquiridos da *Applied Biosystems* sendo adquiridos os ensaios pré-desenhados para sondas hidrolisáveis de Bcl-2 (HS00153350_M1) e CCD1 (HS00765553_M1).

Foi utilizado o termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies).

3.17 Autofagia (LC3B-FP)

As CTM da medula óssea foram plaqueadas na densidade de $1,5 \times 10^3$ células/cm² em duplicata, em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (3603-Corning, MA, USA). Após 24 horas, as células foram incubadas com diferentes concentrações de 7-KC por mais 24 horas. O kit de detecção de autofagia utilizado foi o *Premo™ Autophagy Sensors (LC3B-FP) *BacMam 2.0** (P36235 – Molecular Probes®) foi utilizado para determinar a porcentagem de células autofágicas, como descrito pelo fabricante. Acrescentou-se, 16 horas antes da leitura do experimento, 0,5 µL do reagente LC3B-FP nos poços controle, só meio e nos poços com o tratamento com o 7-KC. Foi adicionado 0,5 µL do reagente cloroquina difosfato no controle autofágico e adicionado 1 µL do reagente controle LC3B(G120A)-FP nos poços controle da reação. Os núcleos foram marcados com 0,1 µg/mL Hoechst 33342 e a placa foi incubada em estufa úmida a 37 °C com 5 % de CO₂ por 16 horas. A presença de autofagia foi analisada usando o *ImageXPress Micro High Content System*. (Molecular Devices, CA, USA). Cinco sítios por poços e dois poços por tratamento foi adquirido. A porcentagem (%) de autofagia foi determinada usando o *MetaXpress Cell Scoring software*.

3.18 Ensaio de ROS (Reactive Oxygen Species)

A determinação do ROS foi avaliada através do kit *DCFDA / H2DCFDA – Cellular ROS Assay Kit* (ab113851 Abcam, Cambridge, UK). As CTM da medula óssea foram plaqueadas na densidade de $1,5 \times 10^3$ células/cm² em duplicata, em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (3603-Corning, MA, USA) e tratadas com 7-cetocolesterol por 24 horas. Após o período experimental, as células foram incubadas com 10 µM de DCFH-DA em meio de cultura por 45 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*.

3.19 Ensaio da viabilidade celular com inibição de ROS

As CTM da medula óssea foram plaqueadas na densidade de 5×10^3 células/cm² em duplicata, em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (3603-Corning, MA, USA). 4 horas antes do tratamento com o oxisterol, foi realizado o tratamento com o inibidor de ROS, a N-acetilcisteína (NAC) (Eurofarma) a 4 mM. Após este período, foi realizado o tratamento com 7-cetocolesterol nas concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM e 10 µM por 24 horas. Após isto, as células foram incubadas com 0,1 µg/mL Hoechst 33342 (H1399- Molecular Probes, OR, USA) e 0,1 µg/mL de iodeto de propídio (PI) (P3566-Molecular Probes, OR, USA). *ImageXPress Micro High Content System* (Molecular Devices, CA, USA) foi utilizado para determinar o número de células vivas e células mortas. Cinco sítios por poços e dois poços por tratamento foram adquiridos. *Cell Scoring MetaXpress software* foi utilizado para analisar os números de células e a viabilidade.

3.20 Detecção do Smoothened (SMO), Sonic Hedgehog (SHh), ABCA1 e ABCG1 por imunofluorescência indireta

As CTM da medula óssea foram plaqueadas na densidade de $1,5 \times 10^3$ células/cm² em duplicata, em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (3603-Corning, MA, USA), tratadas com 7-cetocolesterol nas concentrações de 70 µM, 50 µM e 30 µM por 24 horas. Foi realizada a fixação com paraformoldeído 4 % (P-6148 Sigma Aldrich) por 2 horas a 4 °C. Após a lavagem das placas com DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), as células foram permeabilizadas com 0,1 % da solução de Triton X-100 a 4 °C por 15 minutos, seguido do bloqueio com BSA a 5 % por 40 minutos em temperatura ambiente.

As células foram incubadas por 16 horas com os anticorpos SMO (diluição 1:100) (NBP2-24543-Novus Biologicals, CO, USA); SHh (diluição 1:400) (ab53281 – Abcam, Cambridge, UK); ABCA1 (diluição 1:400) (NB100-2068- Novus Biologicals); e ABCG1 (diluição 1:50) (H9619-M03- Abnova, Tapei, Taiwan). Após incubação com

SMO e SHh, as células foram incubadas por 2 horas com anticorpo secundário anti-rabbit AlexaFluor 488 (diluição 1:1000) (A-11008- Molecular Probes, OR, USA). As células incubadas com os anticorpos anti-ABCA1 e ABCG1, foram incubadas por 2 horas com anticorpo secundário anti-mouse R-phycoerythrin (diluição 1:1000) (P852- Molecular Probes). A intensidade de fluorescência do SMO, SHh, ABCA1 e ABCG1 foram determinadas usando o *ImageXPress Micro High Content System* (Molecular Devices, CA, USA). Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos. A intensidade de fluorescência das células e a porcentagem de células positivas foram determinadas utilizando o *Cell Scoring MetaXpress Software*.

3.21 Análise de Dados

As análises estatísticas foram realizadas entre os parâmetros das células-tronco mesenquimais de pacientes leucêmicos e do controle experimental. Os dados foram analisados usando a variância amostral - ANOVA uma-via e ANOVA duas-vias, com comparações múltiplas de Bonferroni, utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism 5®. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP de cinco diferentes experimentos realizados em duplicata considerando um valor de $P < 0,05$ estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das células-tronco mesenquimais

As linhagens celulares estabelecidas da medula óssea de pacientes portadores de LMA foram caracterizadas através de imunofenotipagem e analisadas por citometria de fluxo. As expressões dos marcadores imunofenotípicos estão de acordo com os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT). O perfil imunofenotípico positivo para células-tronco mesenquimais (CD29, CD44, CD105 e CD90), bem como para os marcadores negativos (CD11b, HLA-DR, CD34 e CD45) estão descritos na tabela 4 e representados pelos dot plots na figura 7.

Tabela 4. Imunofenotipagem das CTM de pacientes portadores de LMA.

Amostras	CD29% PE	CD11b% FITC	CD44% PE	HLA-DR% FITC	CD105% PE	CD34% FITC	CD45% PerCP	CD90% FITC
LMA 9	97,02	0,00	97,60	0,02	95,65	0,00	0,05	84,35
LMA10	99,07	0,00	99,18	0,00	98,65	0,00	0,01	98,39
LMA11	94,62	0,01	96,55	0,01	87,78	0,09	0,00	80,70
LMA15	94,13	0,00	93,78	0,03	97,85	0,00	0,34	93,78
LMA20	99,45	0,00	98,25	0,00	99,42	0,01	0,10	98,25

Figura 7 – Gráficos representativos dos resultados da citometria de fluxo. **A:** Gráfico representando o FSC e SSC; **B:** Gráfico representando dot plot do controle isotópico. **C:** Células marcadas com CD105 PE e com CD34 FITC. **D:** Células marcadas com CD29 PE e com CD 11b FITC. **E:** Células marcadas com CD105 PE e com CD45 PerCP. **F:** Células marcadas com CD44 PE e com HLA-DR FITC. **G:** Células marcadas com CD44 PE e com CD90 FITC. **H:** Células marcadas com CD45 PerCP e com CD34 FITC.

4.2 Análise da diferenciação osteogênica

Todas as células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes portadores de LMA submetidas à incubação com meio de crescimento basal não apresentaram coloração avermelhada com o corante Vermelho de Alizarina (figura 8A). Enquanto as células tratadas com meio indutor de diferenciação osteogênica ao serem coradas com Vermelho de Alizarina, apresentaram depósitos de cálcio visualizados pela coloração vermelho intensa (figura 8B).

Figura 8 - Fotomicrografia ilustrando a diferenciação osteogênica das CTM de medula óssea de pacientes portadores de LMA. **A:** Controle, células-tronco mesenquimais cultivadas com meio de cultura basal; **B:** Células-tronco mesenquimais cultivadas com meio indutor de diferenciação osteogênica. Todas as células foram coradas com Vermelho de Alizarina após 21 dias de incubação.

4.3 Análise da diferenciação adipogênica

As células submetidas à incubação apenas com meio de cultivo não apresentaram coloração pelo Oil Red O (figura 9A). As células incubadas com meio indutor de diferenciação adipogênica e coradas com Oil Red O, apresentaram os acúmulos lipídicos citoplasmáticos, que foram evidenciados na cor vermelho claro (figura 9B).

Figura 9 – Fotomicrografia ilustrando a diferenciação Adipogênica das CTM de medula óssea de pacientes portadores de LMA. **A:** Controle, células-tronco mesenquimais cultivadas com meio de cultura basal; **B:** Células-tronco mesenquimais cultivadas com meio indutor de diferenciação adipogênica. Todas as células foram coradas pelo corante Oil Red O após 14 dias de incubação.

4.4 Análise da expressão de genes de indiferenciação

Das amostras de CTM de medula óssea de pacientes portadores de LMA investigadas, todas expressaram o gene GUSB, demonstrando que o RNA das amostras foi devidamente extraído e o cDNA preparado de forma adequada (figura 10A). A amostra LMA 9 e LMA 10 apresentou negatividade para o gene Oct-4 enquanto que as amostras LMA 11, LMA 15, e LMA 20 foram positivas (figura 10B). Somente a amostra LMA 9 foi negativa para o gene Nanog (figura 10B).

Figura 10 – Expressão dos genes de indiferenciação. RT-PCR dos genes de indiferenciação Oct-4 e Nanog. Como gene endógeno foi avaliado o GUSB. Foi utilizado Ladder de 100 pb (pares de bases). CT-: Controle negativo; CT+: Controle positivo.

4.5 Ensaio de ALDH (aldeído desidrogenase)

O ensaio de ALDH foi realizado nas cinco linhagens de CTM de pacientes portadores de LMA. Foi utilizada como controle a linhagem A549 (Células de adenocarcinoma pulmonar) (figura 11B), uma vez que ela é conhecida positivamente para esse ensaio. Não foi possível identificar a marcação do ALDH em nenhuma das linhagens testadas (figura 11A).

Figura 11 – Fotomicrografia representativa do ensaio de ALDH. **A:** CTM de paciente portador de LMA (LMA10). **B:** Controle positivo, linhagem A549 (Células de adenocarcinoma pulmonar).

4.6 Citotoxicidade dos oxisteróis nas CTM de medula óssea paciente portador de LMA

Os oxisteróis 7-cetocolesterol (7-KC), colestane-3 β -5 α -6 β -triol (triol), 3,5 colestane-7-ona (colestona), 3 α -5 β -6 α -colestane-3,6-diol (diol), acetato de colesterol (acetato), 7-oxocolesterol-5-em-3-beta-il-acetato (7-oxo), 5 β -6 β epoxicolesterol (epoxi) foram testados para citotoxicidade por 24 horas, utilizando o colesterol como controle. Utilizou-se as concentrações 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M. As curvas de citotoxicidade estão representadas na figura 12 e figura 13. O colesterol (figura 12A), 7-oxo (figura 12B), acetato (figura 12C) e colestona (figura 12D) não apresentaram citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas após incubação por 24 horas.

Figura 12 – Gráficos do efeito da citotoxicidade sobre as CTM de pacientes portadores de LMA tratadas por 24 horas nas concentrações de 10 μ m, 25 μ m, 50 μ m e 100 μ m. **A:** colesterol; **B:** 7-oxocolesterol-5-em-3-beta-il-acetato (7-oxo); **C:** Acetato de colesterol (acetato); **D:** 3,5 colestane-7-ona (colestona). Os dados foram analisados por *curve fit* no GraphPad Prism.

O oxisterol triol (figura 13A) apresentou a maior citotoxicidade entre os oxisteróis testados. Apresentou nas concentrações de 100 μ M e 50 μ M, 96,9% e 35,9% de morte celular respectivamente. O IC₅₀ para o triol foi de 55,3 μ M. O 7-KC (figura 13B) foi o segundo oxisterol mais citotóxico com IC₅₀ de 81,1 μ M. O Diol (figura 13D) e o Epoxi (figura 13D) só apresentaram citotoxicidade nas células em concentrações próximas de 100 μ M.

Figura 13 – Gráficos da citotoxicidade sobre as CTM de pacientes portadores de LMA tratadas por 24 horas nas concentrações de 10 μ m, 25 μ m, 50 μ m e 100 μ m. **A:** colestane-3 β -5 α -6 β -triol (Triol); **B:** 7-cetocolesterol (7-KC); **C:** 3 α -5 β -6 α -colestane-3,6-diol (Diol); **D:** 5 β -6 β epoxicoolesterol (Epoxi). Os dados foram analisados por curve fit no GraphPad Prism.

Quando comparamos o IC₅₀ das CTM de pacientes portadores de LMA com as provenientes de medula óssea normal (CTM normal) (tabela 5), observamos que o IC₅₀ de 2 dos oxisteróis estudados é maior nas CTM normais do que nas de LMA, indicando que estas são mais sensíveis à ação citotóxica dos oxisteróis.

Tabela 5. Concentração inibitória dos oxisteróis nas CTM de pacientes portadores de LMA e CTM normais.

	CTM LMA	CTM normal
Oxisteróis	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
7-cetocolesterol (7-KC)	81,1	92,9
colestane-3β-5α-6β-triol (Triol)	55,3	167,5

4.7 Análise do ciclo celular em CTM de pacientes portadores de LMA após tratamento com oxisteróis

As CTM de pacientes portadores de LMA foram incubadas com os diferentes oxisteróis conforme descrito acima pelo período de 24 horas e analisou-se o ciclo celular. Não se observaram alterações significativas nas fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) nas células tratadas com o colesterol (figura 14A), triol (figura 14B), colestona (figura 14C), acetato (figura 14D), 7-oxo (figura 15C) e epoxi (figura 15D) nas concentrações e tempo testados.

Figura 14 – Gráficos das fases do ciclo celular das CTM de pacientes portadores de LMA tratadas com oxisterol por 24 horas. **A:** colesterol; **B:** colestane-3 β -5 α -6 β -triol (Triol); **C:** 3,5 colestane-7-ona (Colestona); **D:** Acetato de colesterol (Acetato). As células foram tratadas com oxisterol por 24 horas. O software Cell Cycle MetaExpress foi utilizado para analisar as diferentes fases do ciclo celular. Análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism.

Observou-se que o 7-KC levou ao aumento da fase S das CTM de pacientes portadores de LMA, quando utilizada nas concentrações de 50 μ M, com diminuição da fase G2/M (figura 15A). Diferente do esperado não houve alteração na concentração de 100 μ M, isso se deve provavelmente a grande quantidade de células mortas. Nas outras concentrações testadas não se observou alterações.

O diol na concentração de 100 μ M levou o aumento da fase G2/M ($p < 0.01$) e a fase G0/G1 ($p < 0.001$), com diminuição da fase S ($p < 0.001$). Não houve efeito no ciclo celular nos tratamentos realizados nas concentrações de 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M (figura 15B).

Figura 15 – Gráficos das fases do ciclo celular das CTM de pacientes portadores de LMA tratadas com oxisterol por 24 horas. **A:** 7-cetocolesterol (7-KC); **B:** 3 α -5 β -6 α -colestane-3,6-dioli (dioli); **C:** 7-oxocolesterol-5-em-3-beta-il-acetato (7-oxo); **D:** 5 β -6 β epoxicolesterol (epoxi). As células foram tratadas com oxisterol por 24 horas. O software *Cell cycle MetaExpress* foi utilizado para analisar as diferentes fases do ciclo celular. Análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism. **p<0,01; ***p<0,001

4.8 Análise do potencial de membrana da mitocôndria (P Ψ m) por TMRE

Este experimento foi utilizado para analisar o P Ψ m das células-tronco mesenquimais de pacientes portadores de LMA quando tratadas com os oxisteróis. O reagente utilizado não se acumula em mitocôndrias energizadas, estando diminuída em células apoptóticas. O potencial da membrana foi medido pela análise da intensidade de fluorescência produzida pelo TMRE, após 24 horas de tratamento. Os oxisteróis 7-KC (figura 16C) e trioli (figura 16D) na maior concentração (100 μ M) testada, apresentaram diminuição acentuada de acúmulo de TMRE, este dado é

justificável uma vez que, após 24 horas de tratamento com estes oxisteróis estas células já apresentam aproximadamente 90 % de morte.

Não foram observadas alterações na intensidade de fluorescência das mitocôndrias marcadas com TMRE nos diferentes tratamentos com os oxisteróis 7-oxo (figura 16A), epoxi (figura 16B), colestona (figura 17B), diol (figura 17C), acetato (figura 17D) e no controle colesterol (figura 17A).

Figura 16 – Gráficos do potencial de membrana mitocondrial nas CTM de pacientes portadores de LMA após 24 horas de incubação com oxisteróis. **A:** 7-oxocolesterol-5-em-3-beta-il-acetato (7-oxo); **B:** 5β-6β epoxicolesterol (Epoxy) **C:** 7-cetocolesterol (7-KC); **D:** colestane-3β-5α-6β-triol (Triol). Estes dados são representados pela intensidade de fluorescência do TMRE acumulado nas mitocôndrias ativas. A análise foi determinada usando software Cell Scoring MetaExpress do *Micro High Content*. Análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism. **p<0,01; ***p<0,001

Figura 17 – Gráficos do potencial de membrana mitocondrial nas CTM de pacientes portadores de LMA após 24 horas de incubação com oxisteróis. **A:** colesterol; **B:** 3,5 colestane-7-ona (colestona); **C:** 3 α -5 β -6 α -colestane-3,6-diol (diol); **D:** acetato de colesterol (acetato). Estes dados são representados pela intensidade de fluorescência do TMRE acumulado nas mitocôndrias ativas. A análise foi determinada usando software *Cell Scoring MetaExpress* do *Micro High Content*. Análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism.

Foi realizada a análise das imagens das mitocôndrias com TMRE. O colesterol não apresentou nenhuma alteração de mitocôndrias em comparação com o controle, apresentando uma estrutura normal, alongada e tubular, ele foi utilizado como base na análise das alterações das mitocôndrias (figura 18A). Podemos observar que o oxisterol Diol (figura 18B) somente apresentou alteração na concentração de 100 μ M, observam-se as mitocôndrias agrupadas ao redor do núcleo. Já no oxisterol 7-KC em 100 μ M as células já estavam mortas e não foi possível observar as mitocôndrias, a 50 μ M foi observada uma mudança conformacional das mitocôndrias sendo que se acumularam de forma perinuclear

com a presença de mitocôndrias pontuadas demonstrando estruturas mitocôndriais fragmentadas (figura 18C), nas outras concentrações não foi possível observar alterações. O oxisterol triol em 50 μM e 100 μM mostrou células muito degeneradas e não foi possível fazer a análise. Na concentração 25 μM é possível identificar estruturas mitocôndriais fragmentadas (figura 18D).

Figura 18 – Fotomicrografia representativa das mitocôndrias das CTM de pacientes portadores de LMA após 24 horas de incubação com oxisteróis. **A:** colesterol; **B:** 3 α -5 β -6 α -colestane-3,6-diol (diol); **C:** 7-cetocolesterol (7-KC); **D:** colestane-3 β -5 α -6 β -triol (triol). Estas imagens são representativas de TMRE acumulado nas mitocôndrias ativas.

4.9 Estudo de morte celular

4.9.1 Inibidores das vias de morte celular

Após realizar a análise de citotoxicidades nos oxisteróis estudados, optou-se por utilizar o 7-KC para aprofundar os estudos de morte celular. Para determinar o papel da morte celular dependente de caspases, foi utilizado um inibidor seletivo da via apoptótica, o Z-VAD-FMK, que de forma irreversível se liga ao sítio catalítico das caspases. As CTM foram pré-tratadas com 100 μ M de Z-VAD-FMK, após isso, tratadas com diferentes concentrações de 7-KC (50 μ M, 75 μ M e 100 μ M) por 24 horas. A figura 19, mostra que a incubação com Z-VAD-FMK diminuiu o número de células mortas quando tratadas com 100 μ M de 7-KC. Este resultado demonstra a presença da via de morte por apoptose. Os resultados com Z-VAD-FMK e 7-KC na concentrações de 75 μ M e 50 μ M não alteraram a porcentagem de células mortas.

Figura 19– Gráfico da inibição da morte celular por apoptose com inibidor Z-VAD-FMK nas CTM de pacientes portadores de LMA. As células foram tratadas com oxisterol 7-cetocolesterol (7-KC) por 24 horas. Análise realizada por One-Way ANOVA no GraphPad Prism. * $p < 0,05$

O 3-Methyladenine (3-MA) é comumente utilizado como um inibidor da autofagia, através do bloqueio da formação do autofagossomo através da inibição da PI-3k (*Type III Phosphatidylinositol 3-Kinases*). As CTMs foram pré-tratadas com 10 mM de 3-MA, após isto, tratadas com concentrações de 50 μ M, 75 μ M e 100 μ M de 7-KC por 24 horas. A figura 20, mostra que a incubação com 3-MA não alterou os resultados de morte celular por autofagia.

Figura 20– Gráfico da inibição da morte celular por autofagia com inibidor 3-MA nas CTM de pacientes portadores de LMA. As células foram tratadas com oxisterol 7-cetocolesterol (7-KC) por 24 horas. Análise realizada por One-Way ANOVA no GraphPad Prism.

Para determinar se a via da necrose também está envolvida com a morte celular causada por 7-KC, foi utilizado um inibidor específico da necroptose. A Necrostatin-1 (Nec-1) é um inibidor alostérico do receptor do domínio de morte associado ao adaptador kinase RIP1 *in vitro*. As CTMs foram pré-tratadas com 100 µM de Nec-1, e após isto, tratadas com as diferentes concentrações do 7-KC por 24 horas. A figura 21, mostra que a incubação com Nec-1 não alterou os resultados para a morte celular por necroptose.

Figura 21– Gráfico da inibição da morte celular por necrose com inibidor Necrostatin-1 nas CTM de pacientes portadores de LMA. As células foram tratadas com oxisterol 7-cetocolesterol (7-KC) por 24 horas. Análise realizada por One-Way ANOVA no GraphPad Prism.

4.9.2 Apoptose e necrose

A apoptose e necrose foram testadas utilizando o teste annexin V e PI, onde os núcleos foram marcados com Hoerchst 33342 para a localização da célula na imagem obtida (figura 22). O 7-KC promoveu a apoptose na concentração de 50 μ M e 100 μ M, apresentando 22 % ($p<0.05$) e 34 % ($p<0.001$) de células apoptóticas, respectivamente (figura 22A).

A necrose também foi demonstrada pela presença da marcação das células com iodeto de propídio e com a falta de marcação do reagente Annexin V. Em todas as concentrações testadas, os resultados não foram estatisticamente significativos para a presença de morte celular através da necrose (figura 22B).

Figura 22 – Gráficos da porcentagem de morte celular nas CTM de pacientes portadores de LMA após 24 horas de incubação com oxisterol 7-cetocolesterol (7-KC). **A:** Porcentagem de células positivas para apoptose; **B:** Porcentagem de células positivas para necrose. Análise estatística foi realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism. * $p<0,05$; *** $p<0,001$

4.9.3 Análise da caspase 3/7

Para analisar o mecanismo de morte celular promovido pelos oxisteróis nas CTMs de pacientes portadores de LMA, foi investigada a atividade da caspase 3/7, como indicativo de morte por apoptose. A atividade da caspase 3/7 se mostrou presente quando as células foram tratadas com 7-KC (figura 23) na concentração de

100 μ M. Não houve atividade da caspase 3/7 nas outras concentrações testadas (figura 23).

Figura 23 – Gráfico da porcentagem de células positivas para caspase 3/7 nas CTM de pacientes portadores de LMA após tratamento com diferentes concentrações de 7-KC. *** $p < 0,001$

4.9.4 Análise da caspase 8

Foi investigada também a atividade da caspase 8, como indicativo inicial da via de morte por apoptose. A atividade da caspase 8 se mostrou presente quando as células foram tratadas com 7-KC (figura 24) na concentração de 100 μ M ($p < 0,01$). Não houve atividade da caspase 8 nas concentrações de 50 μ M e 25 μ M.

Figura 24 – Gráfico da ativação da caspase 8 nas CTM de pacientes portadores de LMA. As células foram tratadas com oxisterol 7-cetocolesterol (7-KC) por 24 horas. Análise realizada por One-Way ANOVA no GraphPad Prism. ** $p < 0,01$

4.9.5 Expressão dos genes Bcl-2 e CCD1

A análise da expressão do gene Bcl-2, foi realizada através da técnica de PCR em tempo real. A metodologia utilizada foi do método descrito por Livak & Schmittgen (2001), de $2^{-\Delta\Delta CT}$ e como amostra calibradora, foi utilizado o controle cultivado em meio basal. Os resultados foram convertidos em escala logarítmica. Foram utilizadas concentrações subtóxicas de 7-KC (70 μ M, 50 μ M e 30 μ M).

Os resultados apresentados na figura 25, mostram que há uma maior expressão do gene Bcl-2 após o tratamento com o 7-KC nas concentrações de 70 μ M ($p < 0,001$), 50 μ M ($p < 0,01$) e 30 μ M ($p < 0,05$), comparados com as células controles.

Figura 25 – Gráfico da expressão do gene Bcl-2 após o tratamento de 24 horas com oxisterol 7-cetocolesterol. A análise foi determinada usando o termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies). Análise estatística é representativa de três linhagens em duplicata, foi realizada por One-Way ANOVA no GraphPad Prism com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

A análise da expressão do gene CCD1, também foi realizada através da técnica de PCR em tempo real. A metodologia utilizada foi do método descrito por Livak & Schmittgen (2001). Os resultados apresentados na figura 26, mostram que há uma menor expressão do gene CCD1 após o tratamento com o 7-KC na concentração de 70μM ($p < 0,001$), comparados com as células controles. O tratamento nas concentrações de 50μM e 30μM, não alterou a expressão do gene CCD1.

Figura 26 – Gráfico da expressão do gene CCD1 após o tratamento de 24 horas com oxisterol 7-cetocolesterol. A análise foi determinada usando o termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies). Análise estatística é representativa de três linhagens em duplicata, foi realizada por One-Way ANOVA no GraphPad Prism com pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$

4.9.6 Autofagia

A autofagia foi demonstrada pela presença da proteína citoplasmática LC3B com GFP, usada para marcação de membrana autofágica. GFP é uma proteína fluorescente verde químera, que permite a visualização da proteína LC3B. A figura 27A é o controle somente com meio basal. A figura 27B é o controle da reação autofágica com a droga cloroquina difosfato, utilizado como base na análise da presença da proteína LC3B. Podemos observar que o tratamento com as concentrações de 30 μ M (figura 27C), 50 μ M (figura 27D) e 70 μ M (figura 27E) do oxisterol 7-KC apresentou aumento gradativo da expressão da LC3B, sendo esse aumento característico de resposta dose dependente.

Figura 27 – Fotomicrografias representativas da proteína LC3B-GFP após 24 horas de incubação com 7-KC em CTM de pacientes portadores de LMA. **A:** Controle só meio; **B:** Controle tratado com hidroxicloroquina; **C:** 30 μ M de 7-KC; **D:** 50 μ M de 7-KC; **E:** 70 μ M de 7-KC. Estas imagens são representativas da intensidade de fluorescência da proteína LC3B-GFP.

A intensidade de fluorescência do LC3B foi avaliada e observou-se aumento significativo da expressão da proteína somente com a utilização de 70 μ M de 7-KC ($p < 0,001$ – figura 28). Cloroquina difosfato (CD) foi utilizada como controle ($p < 0,01$) de expressão da proteína LC3B.

Figura 28. Gráfico da porcentagem de células autofágicas em CTM de pacientes portadores de LMA. As células foram tratadas com oxisterol 7-KC por 24 horas. Análise realizada por One-Way ANOVA no GraphPad Prism. CD: Cloroquina difosfato. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.10 Análise da inibição de morte celular por ROS e da presença do ROS intracelular

Foi realizada a avaliação do efeito do NAC na morte celular induzida pelo 7-KC. NAC é um precursor sintético da cisteína intracelular e da glutathiona, e sua atividade anti-ROS resulta de sua propriedade de eliminação de radicais livres diretamente através do potencial redox dos tióis, ou secundariamente através do aumento dos níveis de glutathiona nas células. Na figura 29, observa-se que o tratamento com 100 μ M de 7-KC induziu a citotoxicidade nas CTM de pacientes com LMA, e o co-tratamento com NAC propiciou a proteção das células contra o efeito do tratamento com oxisterol. Nas concentrações de 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M não foi possível observar morte celular após tratamento com o 7-KC.

Figura 29 – Gráfico da porcentagem de células mortas tratadas com NAC 4mM nas CTM de pacientes portadores de LMA. As células sem NAC foram tratadas com oxisterol 7-cetocolesterol (7-KC) por 24 horas. Análise realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism. **p<0,01

Foi avaliado a capacidade do oxisterol 7-KC de induzir a toxicidade através da produção de ROS. Como observado na figura 30, a produção de ROS é aumentada somente na concentração de 100 μM quando comparado com as células controles (p<0,001). Nas concentrações de 10 μM, 25 μM e 50 μM não houve a produção significativa de ROS.

Figura 30 – Gráfico da produção de ROS nas CTM de pacientes portadores de LMA. As células foram tratadas com oxisterol 7-cetocolesterol (7-KC) por 24 horas. Análise realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism. ***p<0,001

Foi realizada a análise das fotomicrografias da presença de ROS nas CTM de pacientes com LMA após tratamento com 7-KC. Podemos observar que o controle não apresenta expressão de ROS (figura 31A). O tratamento com as concentrações de 10 μ M (figura 31B), 25 μ M (figura 31C), 50 μ M (figura 31D) e 100 μ M (figura 31E) de 7-KC apresentaram aumento gradativo da quantidade de ROS expressa, sendo que esse aumento foi significativo somente na concentração de 100 μ M de 7-KC.

Figura 31 – Fotomicrografias representativas de ROS após 24 horas de incubação com 7-KC em CTM de pacientes portadores de LMA. **A:** Controle só meio; **B:** 10 μ M de 7-KC; **C:** 25 μ M de 7-KC; **D:** 50 μ M de 7-KC; **E:** 100 μ M de 7-KC. Estas imagens são representativas da intensidade de fluorescência de ROS.

4.11 Análise da expressão das proteínas SHh e SMO

Nesse experimento foi realizada a técnica de imunofluorescência indireta para quantificação da proteína SHh nas células-tronco mesenquimais de pacientes portadores de LMA, quando tratadas com diferentes concentrações de 7-KC após 24 horas de tratamento. Observou-se diminuição no número de células positivas para a expressão de SHh (38,11 %) quando as células foram tratadas com 70 μ M de 7-KC ($p < 0,001$ - figura 32A). As outras concentrações testadas não apresentaram alteração de positividade da SHh. Observou-se também a expressão da proteína SHh (figura 32B). O 7-KC na concentração de 30 μ M e 50 μ M, não apresentou diferença na expressão da SHh, comparado com as células controle. Somente ocorreu a diminuição expressão da SHh na concentração de 70 μ M ($p < 0,001$).

Figura 32 – Gráficos da positividade celular (**A**) e da intensidade de fluorescência (**B**) do *Sonic Hedgehog* (SHh) nas CTM de pacientes portadores de LMA. As células foram tratadas com oxisterol 7-KC por 24 horas. Análise realizada por One-Way ANOVA no GraphPad Prism. *** $p < 0,001$

Foi realizada a análise das fotomicrografias da imunofluorescência indireta da expressão do SHh, que se mostrou distribuído pelo citoplasma tanto nas células controle (figura 33A), nas tratadas com 30 μ M (figura 33B) e 50 μ M (figura 33C) de 7-KC. Podemos observar que o 7-KC na concentração de 70 μ M (figura 33D), apresentou alteração na presença do SHh, onde ele deixou de ser expresso por algumas células, se acumulando ao redor do núcleo e com menor intensidade de expressão.

Figura 33 – Fotomicrografias representativas das CTM de pacientes portadores de LMA após 24 horas de incubação com 7-KC. **A:** Controle só meio; **B:** Tratamento com 30 µM de 7-KC; **C:** Tratamento com 50 µM de 7-KC; **D:** Tratamento com 70 µM de 7-KC. Estas imagens são representativas da intensidade de fluorescência indireta da expressão do *Sonic Hedgehog* (SHh).

Foi avaliado o efeito do 7-KC na expressão da proteína SMO como parte da via do SHh. Foi observado que não houve alteração na expressão da SMO tanto no citoplasma (figura 34A) como no núcleo (figura 34B) em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 34 – Gráfico de intensidade de fluorescência do *Smoothened* (Smo) nas CTM de pacientes portadores de LMA. **A:** avaliação do Smo no citoplasma. **B:** avaliação do Smo no núcleo. As células foram tratadas com oxisterol 7-KC por 24 horas. Análise realizada por One-Way ANOVA no GraphPad Prism.

4.12 Análise da expressão das proteínas ABCA1 e ABCG1

Baseado nos resultados obtidos até o momento, nós avaliamos o efeito do tratamento do 7-KC na expressão das proteínas ABCA1 e ABCG1, devido essas proteínas serem responsáveis pela regulação do efluxo de colesterol das células. O tratamento com 7-KC não alterou a expressão da proteína ABCA1 (figura 35A) nem a ABCG1 (figura 35B).

Figura 35 – Gráfico de intensidade de fluorescência das ABCs nas CTM de pacientes portadores de LMA. **A:** avaliação da expressão da ABCA1. **B:** avaliação da expressão da ABCG1. As células foram tratadas com oxisterol 7-KC por 24 horas. Análise realizada por One-Way ANOVA no GraphPad Prism.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar e caracterizar os efeitos citotóxicos dos oxisteróis em células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes portadores de LMA. Para o isolamento das células mononucleares, foram coletadas 22 amostras para diagnóstico no Laboratório de Imunopatologia do HCFMUSP no período de janeiro a dezembro de 2017. No entanto, das amostras obtidas, 36% (8 de 22 amostras) não foram capazes de ser isoladas, devido ao fato de não aderirem ao plástico, como é previsto pela ISCT. Dentre estas, cerca de 27% (6 amostras) não foram utilizadas, pois apesar de aderirem ao plástico a confirmação do diagnóstico não eram amostras provenientes de pacientes portadores de LMA. Corradi e cols (2018) obtiveram resultados semelhantes no isolamento das CTM de pacientes com LMA na aderência ao plástico, e estes autores hipotetizaram que a dificuldade de isolamento dessas CTM é devido ao baixo número de células precursoras na medula óssea desses pacientes.

As amostras de CTM de pacientes portadores de LMA utilizadas nos experimentos demonstraram todas as características necessárias de células-tronco determinadas pela ISCT. Quando realizado a cultura dessas linhagens, apresentaram aderência ao plástico da garrafa de cultura, com morfologia fibroblastóide. Como toda célula-tronco, apresentou características de diferenciação, quando induzidas com meios específicos para diferenciação osteogênica e adipogênica (figura 8 e figura 9). Apresentou expressão de marcadores específicos de membrana para células-tronco mesenquimais como o CD29, CD44, CD105 e CD90, e não expressou os marcadores para leucócitos como CD11b, HLA-DR, CD34 e CD45 (tabela 4). Como experimento complementar, as células expressaram os genes de indiferenciação NANOG e OCT-4 (figura 10).

O câncer ainda é uma das principais causas de morte no mundo, e atualmente os vários tratamentos modernos com radiação, quimioterapia e remoção cirúrgica dos tumores não são o suficiente para diminuição da mortalidade (Allahyari *et al.*, 2017). Deste modo, são imprescindíveis novas formas terapêuticas de tratamento que atuem de forma específica nas células tumorais, sem que haja efeitos adversos nas células normais.

Outro componente que pode estar envolvido na resistência das células cancerígenas é a presença da enzima aldeído desidrogenase (ALDH), que está relacionada com a expressão das proteínas ABC. A alta expressão do ALDH pode ser usada como marcador de células-tronco tumorais, pois esta enzima normalmente está presente em células-tronco (Januchowski *et al.*, 2013). Deste modo, como as CTM são provenientes de pacientes com LMA, fomos investigar se esta enzima estaria expressa. Utilizamos células da linhagem A549 como controle positivo e comparamos com as CTM de LMA. Não houve expressão da enzima ALDH em nenhuma das amostras estudadas (figura 11). O resultado obtido foi o esperado, pois a expressão da enzima ALDH está presente nas CTH e como as CTM eram derivadas de pacientes com LMA, executamos este experimento para avaliar se as CTM poderiam estar produzindo o ALDH.

Neste estudo foi realizada investigação das características citotóxicas dos oxisteróis nas CTM de pacientes leucêmicos. Estudos realizados anteriormente demonstraram que os oxisteróis exercem funções de regulação do metabolismo do colesterol, na fluidez e na atividade de algumas proteínas da membrana citoplasmática celular (Kloudova *et al.*, 2017). Para isso, foram executados experimentos de citotoxicidade com sete oxisteróis, o 7-cetocolesterol (7-KC), colestane-3 β -5 α -6 β -triol (triol), 3,5 colestane-7-ona (colestona), 3 α -5 β -6 α -colestane-3,6-diol (diol), acetato de colesterol (acetato), 7-oxocolesterol-5-em-3-beta-il-acetato (7-oxo) e 5 β -6 β epoxicolesterol (epoxi) (figura 12 e figura 13).

No ensaio de citotoxicidade celular nas CTM de pacientes portadores de LMA, somente os triol (55,3 μ M) e 7-KC (81,1 μ M) apresentaram citotoxicidade. Quando comparamos o IC₅₀ das CTM de pacientes com LMA e pacientes saudáveis foram observadas diferenças (tabela 5). Sendo assim, a concentração dos oxisteróis teria que ser superior nas CTM de indivíduos saudáveis para obtermos os mesmos efeitos nas CTM leucêmicas. Deste modo, esses efeitos dos oxisteróis tornam um bom candidato à tratamentos terapêuticos, devido a menor toxicidade em células saudáveis. Estudos realizados com 7-KC demonstraram sua capacidade de induzir estresse oxidativo, inflamação e morte celular (Brahmi *et al.*, 2018). Liu e cols (2009) demonstraram que células tratadas com o triol aumentam o nível da produção de ROS intracelular com disfunção mitocondrial.

O efeito citotóxico que os oxisteróis estão exercendo nas CTM pode estar associado com a disfunção no ciclo celular destas células. Na fase G1 do ciclo celular ocorre o processo da síntese das enzimas utilizadas nos mecanismos do ciclo. Os cromossomos são meticulosamente particionados para as células filhas na fase S do ciclo celular. Na fase G2/M ocorre a divisão das células e na fase G0 a célula entra em estado de quiescência (Hopkins *et al.*, 2017). Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o 7-KC na concentração de 50 μ M levou ao aumento da fase S e a diminuição da fase G2/M, ou seja, ocorreu parada da divisão celular (figura 15A). Levy e cols (2014) não encontraram alterações nas fases do ciclo celular quando CTMs de tecido adiposo foram tratadas com 7-KC. Demonstrou-se também que o 7-KC é capaz aumentar a fase G2/M e inibir a fase S na linhagem celular de melanoma murino diferentemente das CTMs de pacientes portadores de LMA (Levy *et al.*, 2018). Além disso, em células de macrófagos humanos (Palozza *et al.*, 2010) e células endoteliais (Chang *et al.*, 2016) foi observado alteração no ciclo celular quando essas células foram tratadas com 7-KC. As alterações que o 7-KC provoca no ciclo celular depende do tipo celular estudado.

Outro oxisterol que apesar de não ser citotóxico e que levou a alterações no ciclo celular foi o diol. Este na concentração de 100 μ M levou ao aumento da fase G0/G1 e da G2/M, com diminuição da fase S (figura 15B). Apesar do triol ter mostrado efeito citotóxico, este não apresentou diferença de fases no ciclo celular. Este mesmo resultado foi obtido pelo nosso grupo de pesquisa, quando avaliado o efeito do triol em CTM derivado de tecido adiposo (Silva *et al.*, 2017). Estudos também demonstraram que células linhagem de câncer de próstata quando tratadas com triol foram capazes de alterar o ciclo celular (Lin *et al.*, 2013).

Durante o ciclo celular, a célula tem um mecanismo de controle conhecido como ponto R (ponto de restrição), que está relacionado à divisão do ciclo celular (Dalton & Coverdell, 2015). Como parte do processo de regulação do ciclo celular, há várias ciclinas que tem um importante papel nesse ajuste do progresso celular (Aref *et al.*, 2006). A ciclina D1 é primordial na progressão celular e sua superexpressão foi encontrada em vários tipos de cânceres (Du *et al.*, 2013). Nós observamos uma diminuição na expressão da proteína ciclina D1 (CCD1), nas células tratadas com as concentrações subtóxicas do 7-KC (figura 26). Quando avaliamos a diminuição da expressão de CCD1 e o resultado do ciclo celular,

contemplamos aumento da fase S e diminuição da fase G2/M. A passagem da fase M para a fase G1 é associada em mudanças na arquitetura nuclear, onde ocorre a descondensação dos cromossomos e seu reposicionamento (Dalton & Coverdell, 2015). Estudos em células de câncer de mama demonstraram que altas expressões da CCD1 induzem a diminuição da fase G1, levando a progressão antecipada para a fase S do ciclo celular, isso faz com que aumente o número de células na fase G1, sugerindo que a CCD1 é essencial para a progressão celular em câncer de mama (John *et al.*, 2017). Desse modo, é provável que os resultados obtidos com o 7-KC no desequilíbrio do ciclo celular estejam atuando na fase G1, pois com a diminuição da CCD1 a célula não consegue completar o ciclo, levando a senescência e consequentemente a morte celular.

A integridade e a funcionalidade da mitocôndria também podem afetar a viabilidade celular. No presente estudo para a avaliação da mitocôndria, foi utilizado o reagente TMRE que é um corante catiônico que se acumula em mitocôndrias vivas, por exemplo, no processo apoptótico tende a diminuir o seu acúmulo. Miguet e cols (2001) demonstraram que células tratadas com oxisterol 7-KC, além de alterar a permeabilidade da membrana celular o tratamento leva despolarização da membrana mitocondrial. Nos resultados demonstrados para a funcionalidade da mitocôndria, somente os oxisteróis 7-KC e triol na concentração de 100 μ M levou a perda do potencial da mitocôndria (figura 16C e figura 16D). Quando avaliado as fotomicrografias das mitocôndrias, foi observado que na concentração de 50 μ M de 7-KC e 25 μ M de triol, a estrutura mitocondrial está disposta de forma perinuclear e de aparência fragmentada (figura 18C e figura 18D).

As mitocôndrias são estruturas essenciais para que haja a homeostase da célula, quando ocorre alguma disfunção mitocondrial, são indícios de que possa estar ocorrendo o início da morte celular. Sabe-se que alguns oxisteróis impulsionam a apoptose através da via mitocondrial. Desse modo, a redução do potencial da membrana mitocondrial pode levar a liberação de mediadores para o citoplasma celular, resultando na ativação das caspases efetoras e executoras da via apoptótica (Liu *et al.*, 2009).

Após os ensaios de citotoxicidade dos setes oxisteróis, optamos pela utilização do oxisterol 7-KC para os experimentos relacionados a morte celular. O 7-KC foi escolhido devido à boa atividade biológica e por ser atualmente o oxisterol

mais estudado. Assim sendo, avaliamos a atividade da caspase executora 3/7 como indício da morte celular por apoptose. Demonstrou-se que o 7-KC na concentração de 100 μ M apresentou atividade da caspase 3/7 (figura 23). Avaliamos então a atividade da caspase inicial da via apoptótica, a caspase 8. A regulação e ativação das caspases são imprescindíveis para o funcionamento da via apoptótica, enquanto a ativação da caspase 9 é responsável pela indução da via intrínseca da apoptose, a caspase 8 é o início da via extrínseca da apoptose, após a ligação do ligante nos receptores de membrana (Metz *et al.*, 2016). O tratamento com 100 μ M de 7-KC levou a ativação da caspase 8 (figura 24).

Para demonstrar a ativação da apoptose, além do estudo das caspases, também demonstramos que 7-KC é indutor de apoptose através da externalização da fosfatidilserina na membrana celular através da marcação com o anticorpo anexina V. Demonstramos a ocorrência da apoptose nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M (figura 22A). Também utilizamos um inibidor de pan caspases, o Z-VAD-FMK. As células foram pré-tratadas com o Z-VAD-FMK e posteriormente com o 7-KC. Nas células tratadas com 100 μ M de 7-KC observamos que o inibidor bloqueou a apoptose diminuindo uma parcela da morte celular das CTM de LMA (figura 19). Do mesmo modo, Miguet e cols (2001) em seus experimentos com o 7-KC em linhagem celular de linfoma de não-Hodgkin, obtiveram resultados semelhantes.

Há ainda duas grandes vias de mortes celulares que são as mais estudadas juntamente com a apoptose e podem ser ativadas simultaneamente. A autofagia é um processo de degradação celular, onde os componentes são envoltos por uma vesícula denominada de autofagossomo que se junta com os lisossomos para que haja a degradação dos componentes fagocitados (Wu *et al.*, 2013). A proteína LC3B é essencial na autofagia, ela está situada no citosol e sua localização é utilizada como marcador de vacúolos autofagossômicos (Zhang *et al.*, 2019). Nos ensaios realizados, demonstrou-se a presença da proteína citoplasmática LC3B-GFP nas fotomicrografias e na quantificação do número de células positivas para o LC3B (figura 27 e figura 28). O 7-KC levou ao aumento da presença de vacúolos autofágicos de forma dose dependente. No entanto, quando realizamos os estudos com o inibidor da via de morte autofágica o 3-MA, observamos que o inibidor não foi eficiente no bloqueio da morte por autofagia (figura 20).

Outra via de morte estudada foi a necroptose, que é um mecanismo que envolve a expressão e regulação da RIPK1 (*Protein Kinase 1*), e seu início está associado com ativação do receptor de membrana TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) (Shi *et al.*, 2018). Sendo assim, utilizamos um inibidor específico para esta via de morte a Nec-1, e como demonstrado, não foi efetivo para a inibição da morte celular por necroptose (figura 21). A ausência de necroptose também foi demonstrada nos ensaios de anexina/PI que só demonstrou a presença de apoptose (figura 22B). Um fato curioso, é que a ativação da necroptose ocorre através dos mesmos ligantes da via de morte por apoptose, Fas ou TNF. Esta ativação levará à apoptose ou necroptose, o diferencial para a determinação da via de morte é a ativação da caspase 8, por ser a caspase inicial da via extrínseca da apoptose estabelecendo a morte celular por apoptose (Yamanaka *et al.*, 2014).

Através de vários mecanismos, os oxisteróis tem a capacidade de induzir morte celular nas mais variadas linhagens celulares. Entre os oxisteróis biologicamente ativos, além de características citotóxicas, também é observado características oxidativas (Favero *et al.*, 2018). Dos diversos oxisteróis, o 7-KC é conhecido pela propriedade de indução da morte celular e estresse oxidativo. Sabe-se que o estresse oxidativo é um agente pró-apoptótico, e o acúmulo e níveis elevados da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) resultam na instabilidade genética, dano no DNA, proteínas e membranas celulares (Moloney & Cotter, 2018; Silva *et al.*, 2017). Para comprovarmos a atividade do 7-KC na produção ou não das espécies reativas do oxigênio, utilizamos o NAC (*N-acetyl-L-cysteine*) um inibidor da via de ROS. Esse inibidor age sequestrando os radicais livres, pois atua tanto em espécies reativas do oxigênio como em espécies reativas de nitrogênio (Zhang *et al.*, 2011). Os resultados obtidos mostram que o ROS tem influência na morte celular (figura 30). O NAC demonstrou um efeito protetor nas células quando tratadas com 100 μ M de 7-KC (figura 29). Estes dados demonstram que as espécies reativas de oxigênio estão relacionadas na indução à morte celular.

Conforme discutido anteriormente, a mitocôndria tem um importante papel no equilíbrio celular, e como observado nos experimentos a mitocôndria é danificada quando as células recebem o tratamento com 7-KC. Em vista disso, avaliamos a expressão do gene Bcl-2, que faz parte da família de proteínas Bcl-2 que são responsáveis pelo controle da permeabilização da membrana mitocondrial. O Bcl-2 é

uma proteína com função anti-apoptótica da via intrínseca da apoptose (Rieusset, 2018). Nós realizamos o tratamento nas CTM de LMA com doses subtóxicas do 7-KC, para a realização do experimento da expressão do Bcl-2. Foi observado que em todas as concentrações testadas levou ao aumento da expressão da proteína Bcl-2 quando comparamos com as células controle (figura 25). Lizard e cols (1997) e Harada e cols (1997) demonstraram que a superexpressão do Bcl-2 não foi eficiente para que houvesse a inibição da apoptose de células tratadas com 7-KC. Deste modo, os resultados encontrados neste estudo, em que o aumento da expressão de Bcl-2 nas CTM de pacientes com LMA tratadas com 7-KC, pode estar associado como um mecanismo de defesa contra a morte celular.

Em virtude dos efeitos do 7-KC nas diversas linhagens celulares, e o envolvimento de um complexo de morte celular, foi observada uma produção de ROS, apresentou características qualitativas do processo autofágico e pode simultaneamente induzir a morte apoptótica. Monier e cols (2003) sugeriram um termo para este processo realizado pelo 7-KC que é a oxiaoptofagia (OXIdação, APOPTOse, autoFAGIA), que os nossos resultados em CTM de pacientes portadores de LMA confirmam.

Além disso, avaliamos um gene essencial no crescimento, homeostase e diferenciação celular, o *Sonic Hedgehog* (SHh) (Bariwal *et al.*, 2018). Ativações e mutações da via SHh está associado com o desenvolvimento tumoral, metastase e sua via pode estar relacionado com a biologia das células-tronco cancerígenas e com resistência de múltiplas drogas (MDR) (Bariwal *et al.*, 2018; Corcoran & Scott, 2006). Nós observamos que o SHh está expresso em todas as concentrações inclusive no controle (figura 32B). Todavia, o tratamento com a concentração de 70 μ M de 7-KC levou a diminuição da expressão do SHh, além do mais observamos que 38,77% das células perderam a positividade para o SHh (figura 32A). Pesquisas do *clinicaltrials.gov* demonstraram que pequenas moléculas foram capazes de realizar a inibição da via Hedgehog contra tumores de pulmão, pele, cérebro, pâncreas e próstata (Nachtergaele *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que a sinalização do SHh é fundamental para a manutenção das células-tronco cancerígenas em leucemia mielóide crônica e câncer de mama e a inibição de sua via leva a diminuição da renovação das células-tronco (Rimkus *et al.*, 2016). O início da via SHh ocorre quando a proteína se liga na proteína de membrana *Patched1*

(Ptch1). Quando há ausência do ligante na proteína Ptch1 ocorre a inibição da proteína Smo (*Smoothed*) e consequentemente a inibição dos fatores de transcrição Gli (Myers *et al.*, 2013).

Contudo, sabe-se que a proteína Smo pode ser ativada mesmo que não haja a ativação do SHh. Sabe-se que somente moléculas naturais como os oxisteróis são capazes de efetuarem esta sinalização do Smo e que esta ativação ocorre alostericamente através de um sítio secundário da proteína (Nedelcu *et al.*, 2013). Em cultura de células de meduloblastoma, oxisteróis sintéticos tem a capacidade de se ligar ao domínio extracelular N-terminal do Smo rico em cisteína (CRD), esta ligação leva o acúmulo de Smo nos cílios fazendo com que haja ativação da via *Hedgehog* e consequentemente a estimulação do crescimento destas células (Raleigh *et al.*, 2018). Todavia, não observamos alterações na ativação do Smo quando as células foram tratadas com 7-KC, por outro lado o 7-KC foi capaz de inibir a via SHh na concentração de 70 μ M (figura 34A e figura 34B).

Os oxisteróis também atuam no transporte reverso do colesterol, onde ativam os fatores de transcrição do receptor X do fígado (LXR), e consequentemente ativando a família dos transportadores de membrana ABC (*ATP-binding cassetes*), como ABCA1, ABCG1, ABCG5/ABCG8, responsáveis pela remoção de xenobióticos nas células (Soccio & Breslow, 2004). Dois desses transportadores de membrana, o ABCA1 e ABCG1 tem como função o efluxo de colesterol, esfingolípídeos, fosfolípídeos, vitaminas, tal como o efluxo de oxisteróis (Aye *et al.*, 2010). Observamos que o tratamento com oxisterol 7-KC não alterou a expressão dos transportadores ABCA1 e ABCG1 (figura 35A e figura 35B).

Portanto, com todos os resultados obtidos com o 7-KC, demonstrando o efeito citotóxico, capacidade de induzir o estresse oxidativo, alteração do ciclo celular, com a presença da morte celular por oxiapoptofagia e tendo efeito na diminuição da expressão de *Sonic Hedgehog*, que está relacionado no desenvolvimento tumoral. O 7-KC poderá no futuro ser utilizado como um possível adjuvante anti-tumoral no processo quimioterápico.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo, este trabalho permite sugerir que:

- Os oxisteróis 3,5 colestane-7-ona, 3 α -5 β -6 α -colestane-3,6-diol, acetato de colesterol, 7-oxocholesterol-5-em-3-beta-il-acetate, e 5 β -6 β epoxicolesterol não levam a morte celular quando realizado o tratamento nas concentrações testadas em CTM de pacientes com LMA.
- O tratamento com oxisterol 7-KC nas CTM de LMA é capaz de alterar o ciclo celular através da diminuição de uma das proteínas reguladoras do ciclo, a CCD1;
- Observou-se uma mudança conformacional das mitocôndrias, esse fato pode ter ocorrido devido à produção de ROS com o tratamento do 7-KC;
- É provável que o 7-KC esteja atuando na via extrínica da apoptose, devido à ativação da caspase 8;
- Foi mostrado que pode ocorrer autofagia com características de dose dependência.
 - Em conjunto, os resultados dos experimentos na avaliação do efeito exercido pelo oxisterol 7-KC, sugerem que a morte celular ocorra através da oxiaoptofagia, devido aos complexos processos de morte celular. O tratamento com o 7-KC demonstra um potencial adjuvante terapêutico, visto que tende a reduzir a expressão da proteína *Sonic Hedgehog* que é essencial na sobrevida tumoral.

7. ANEXOS

Anexo A

cells

Article

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

Jessica Liliane Paz¹, Debora Levy¹ , Beatriz Araujo Oliveira¹, Thatiana Correia de Melo¹, Fabio Alessandro de Freitas¹ , Cadiele Olíana Reichert¹, Alessandro Rodrigues² , Juliana Pereira³ and Sergio Paulo Bydlowski^{1,3,4,*}

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

² Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo, Diadema 09972-270, SP, Brazil; alessandro.rodrigues@unifesp.br

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

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

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

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

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

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

ARTICLE IN PRESS

Biochemistry and Biophysics Reports xxx (xxxx) xxx-xxxx

ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Biochemistry and Biophysics Reports

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

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

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

^a Laboratory of Genetics and Molecular Hematology (LIM31), Department of Hematology, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil

^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Regenerativa (INCT-Regenera), CNPq, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Oxysterol
Apoptosis
Cancer
ABC transporters
Sonic hedgehog
LXR α

ABSTRACT

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

Cell internalization of 7-ketocholesterol-containing nanoemulsion through LDL receptor reduces melanoma growth *in vitro* and *in vivo*: a preliminary report

Giovani M. Favero^{1,2}, Jessica L. Paz¹, Andréia H. Otake^{3,4}, Durvanei A. Maria⁵, Elia G. Caldini⁶, Raphael S.S. de Medeiros^{3,4}, Debora F. Deus⁷, Roger Chammas^{3,4}, Raul C. Maranhão^{7,8} and Sergio P. Bydlowski¹

¹Laboratory of Genetics and Molecular Hematology (LIM31), Department of Hematology, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

²Department of General Biology, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil

³Centro de Investigação Translacional em Oncologia (LIM24), Departamento de Radiologia e Oncologia, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁴Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), SP, Brazil

⁵Biochemistry and Biophysics Laboratories, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

⁶Laboratory for Cell Biology, Department of Pathology, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁷Laboratory of Metabolism and Lipids, Heart Institute (InCor), Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁸Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence to: Sergio P. Bydlowski, email: spbydlow@usp.br

Keywords: 7-ketocholesterol; nanoemulsion; melanoma; cell death; LDL receptor

Received: October 29, 2017 Accepted: January 25, 2018 Epub: February 04, 2018 Published: March 06, 2018

Copyright: Favero et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Oxysterols are cholesterol oxygenated derivatives which possess several biological actions. Among oxysterols, 7-ketocholesterol (7KC) is known to induce cell death. Here, we hypothesized that 7KC cytotoxicity could be applied in cancer therapeutics. 7KC was incorporated into a lipid core nanoemulsion. As a cellular model the murine melanoma cell line B16F10 was used. The nanoparticle (7KCLDE) uptake into tumor cells was displaced by increasing amounts of low-density-lipoproteins (LDL) suggesting a LDL-receptor-mediated cell internalization. 7KCLDE was mainly cytostatic, which led to an accumulation of polyploid cells. Nevertheless, a single dose of 7KCLDE killed roughly 10% of melanoma cells. In addition, it was observed dissipation of the transmembrane potential, evidenced with flow cytometry; presence of autophagic vacuoles, visualized and quantified with flow cytometry and acridine orange; and presence of myelin figures, observed with ultrastructural microscopy. 7KCLDE impaired cytokinesis was accompanied by changes in cellular morphology into a fibroblastoid shape which is supported by cytoskeletal rearrangements, as shown by the increased actin polymerization. 7KCLDE was injected into B16 melanoma tumor-bearing mice. 7KCLDE accumulated in the liver and tumor. In melanoma tumor 7KCLDE promoted a >50% size reduction, enlarged the necrotic area, and reduced intratumoral vasculature. 7KCLDE increased the survival rates of animals, without hematologic or liver toxicity. Although more pre-clinical studies should be performed, our preliminary results suggested that 7KCLDE is a promising novel preparation for cancer chemotherapy.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allahyari H, Heidari S, Ghamgosha M, Saffarian P, Amani J. Immunotoxin: A new tool for câncer therapy. *Tumor Biology*. Feb 2017: 1-11. Doi: 10.1177/1010428317692226.

Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation; research in biological diversity*. 2016 Jul-Aug;92(1-2):41-51. Doi:10.1016/j.diff.2016.02.005.

American Cancer Society, USA, revisado em 21 de agosto de 2018. Acute myeloid leukemia (AML) in adults, Early detection, Diagnosis, and Types, **Acute Myeloid Leukemia (AML) Subtypes and Prognostic Factors**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/detection-diagnosis-staging/how-classified.html>>. Acessado em 08 de março de 2019.

Aupeix K, Weltin D, Mejla JE, Christ M, Marchal J, Freyssinet JM, Bischoff P. Oxysterol-Induced Apoptosis in Human Monocytic Cell Lines. *Immunobiology*. 1995 Nov;194(4-5):415-28.

Aref S, Mabed M, El-Sherbiny M, Selim T, Metwaly A. Cyclin D1 expression in acute leukemia. *Hematology*. 2006 Feb;11(1):31-4. Doi: 10.1080/10245330500322321.

Aye IL, Waddell BJ, Mark PJ, Keelan JA. Placental ABCA1 and ABCG1 transporters efflux cholesterol and protect trophoblasts from oxysterol induced toxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Sep;1801(9):1013-24. Doi:10.1016/j.bbalip.2010.05.015.

Bariwal J, Kumar V, Dong Y, Mahato RI. Design of Hedgehog pathway inhibitors for cancer treatment. *Med Res Rev*. 2018;1-68. Doi: 10.1002/med.21555.

Basilico S, Göttgens B. Dysregulation of haematopoietic stem cell regulatory programs in acute myeloid leukaemia. *Journal of molecular medicine*. 2017 Jul;95(7):719-727. Doi: 10.1007/s00109-017-1535-3.

Behrmann L, Wellbrock J, Fiedler W. Acute Myeloid Leukemia and the Bone Marrow Niche – Take a Closer Look. *Front. Oncol*. 8:444. (2018) doi: 10.3389/fonc.2018.00444

Blau O. Bone marrow stromal cells in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Frontiers in Bioscience*. 19, 171-180, Jan 1, 2014.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*. 1997 Jul;3(7):730-7.

Boyd AL, Reid JC, Salci KR, Aslostovar L, Benoit YD, Shapovalova Z, Nakanishi M, Porras DP, Almakadi M, Campbell CJV, Jackson MF, Ross CA, Foley R, Leber B, Allan DS, Sabloff M, Xenocostas A, Collins TJ, Bhatia M. Acute myeloid leukaemia disrupts endogenous myelo-erythropoiesis by compromising the adipocyte bone marrow niche. *Nature Cell Biol.* 2017 Nov;19(11):1336-1347. Doi: 10.1038/ncb3625.

Brahmi F, Vejux A, Sghaier R, Zarrouk A, Nury T, Meddeb W, Rezig L, Namsi A, Sassi K, Yammine A, Badreddine I, Vervandier-Fasseur D, Madani K, Boulekbache-Makhlouf L, Nasser B, Lizard G. Prevention of 7-ketocholesterol-induced side effects by natural compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2018 Oct. Doi: 10.1080/10408398.2018.1491828.

Carballo GB, Honorato JR, Lopes GPF, Sampaio e Spohr TCL. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Communication and Signaling.* (2018) 16:11. Doi: 10.1186/s12964-018-0220-7.

Carpenter RL, Ray H. Safety and Tolerability of Sonic Hedgehog Pathway Inhibitors in Cancer. *Springer Nature Switzerland.* Jan, 2019. Doi:10.1007/s40264-018-0777-5.

Carvalho JF, Silva MM, Moreira JN, Simoes S, Sa EMM. Selective cytotoxicity of oxysterols through structural modulation on rings A and B. Synthesis, in vitro evaluation, and SAR. *J Med Chem.* 2011, Sep 22;54(18):6375-93. Doi: 10.1021/jm200803d.

Cassier PA, Castets M, Belhabri A, Vey N. Targeting apoptosis in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Cancer.* 2017 Oct 10;117(8):1089-1098. Doi: 10.1038/bjc.2017.281.

Castelli G, Pelosi E, Testa U. Emerging Therapies for Acute Myelogenous Leukemia Patients Targeting Apoptosis and Mitochondrial Metabolism. *Cancers (Basel).* 2019 Feb 22;11(2). Pii. E260. Doi:10.3390/cancers11020260.

Chandran P, Le Y, Li Y, Sabloff M, Mehic J, Rosu-Myles M, Allan DS. Mesenchymal stromal cells from patients with acute myeloid leukemia have altered capacity to expand differentiated hematopoietic progenitors. *Leukemia Research.* 2015 Apr;39(4): 486-493. Doi: 10.1016/j.leukres.2015.01.013.

Chang MC, Chen YJ, Liou EJ, Tseng WY, Chan CP, Lin HJ, Liao WC, Chang YC, Jeng PY, Jeng JH. 7-Ketocholesterol induces ATM/ATR, Chk1/Chk2, PI3K/Akt signaling, cytotoxicity and IL-8 production in endothelial cells. *Oncotarget.* 2016 Nov 15;7(46)74473-74483. Doi: 10.18632/oncotarget.12578.

Chen Q, Yuan Y, Chen T. Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients. *Molecular Medicine Reports*. 2014 Jan;9(1):293-8. Doi: 10.3892/mmr.2013.1789.

Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of cellular physiology*. 1999 Oct;181(1):67-73.

Corradi G, Baldazzi C, Očadlíková D, Marconi G, Parisi S, Testoni N, Finelli C, Cavo M, Curti A, Ciciarello M. Mesenchymal stromal cells from myelodysplastic and acute myeloid leukemia patients display in vitro reduced proliferative potential and similar capacity to support leukemia cell survival. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Oct 25;9(1):271. Doi: 10.1186/s13287-018-1013-z.

Corcoran RB, Scott MP. Oxysterol stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *PNAS*. 2006 May 30;103 (22): 8408-8413. Doi: 10.1073/pnas.0602852103.

Dalton S, Coverdell PD. Linking the Cell Cycle to Cell Fate Decisions. *Trends Cell Biol*. 2015 Oct;25(10):592-600. Doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.007.

Davis JR, Benjamin DJ, Jonas BA. New and emerging therapies for acute myeloid leukaemia. *J Investig Med Epub*. 24 July 2018. Doi: 10.1136/jim-2018-000807

Du Z, Tong X, Ye X. Cyclin D1 promotes cell cycle progression through enhancing NDR1/2 kinase activity independent of cyclin-dependent kinase 4. *J Bio Chem*. 2013 Sep 13;288(37):26678-87. Doi: 10.1074/jbc.M113.

Favero GM, Paz JL, Otake AH, Maria DA, Caldine EG, de Medeiros RSS, Deus DF, Chammas R, Maranhão RC, Bydlowski SP. Cell internalization of 7-ketocholesterol-containing nanoemulsion through LDL receptor reduces melanoma growth *in vitro* and *in vivo*: a preliminary report. *Oncotarget*. 2018 Feb 4;9(18):14160-14174.

Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annual review of Immunology*. 2013;31:285-316.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science Washington DC*. 2000, 287:1433-1438.

Gamet-Payraastre L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S, Gasc N, Tulliez J, Tercé F. Sulforaphane, a Naturally occurring isothiocyanate, Induces cell

cycle arrest and apoptosis in HT29 Human Colon Cancer Cells. *Cancer Research*. 2000 Mar 1;60(5):1426-1433.

Harada K, Ishibashi S, Miyashita T, Osuga J, Yaquy H, Ohashi K, Yazaki Y, Yamada N. Bcl-2 protein inhibits oxysterol-induced apoptosis through suppressing CPP32-mediated pathway. *FEBS Lett*. 1997 Jul 7;411(1):63-6.

Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Research International*. 2014 Doi: 10.1155/2014/150845.

He C, Zhu H, Zhang W, Okon I, Wang Q, Li H, Le Y-Z, Xie Z. 7-Ketocholesterol Induces Autophagy in Vascular Smooth Muscle Cells through Nox4 and Atg4B. *The American Journal of Pathology*. 2013 Aug;183(2):626-37. Doi: 10.1016/j.ajpath.2013.04.028.

Hochedlinger K, Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development (Cambridge, England)*. 2009 Feb;136(4):509-23. Doi: 10.1242/dev.020867.

Hopkins M, Tyson JJ, Novák B. Cell-cycle transitions: a common role for stoichiometric inhibitors. *Molecular Biology of the Cell*. 2017 Nov 7;28(23):3437-3446. Doi: 10.1091/mbc.E17-06-0349.

Huang Z, Wu T, Liu AY, Ouyang G. Differentiation and transdifferentiation potentials of cancer stem cell. *Oncotarget*. 2015 Nov 24;6(37):39550-63.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>> Acesso em: 03 de fevereiro de 2018.

Isidori A, Salvestrini V, Ciciarello M, Loscocco F, Visani G, Parisi S, et al. The role of the immunosuppressive microenvironment in acute myeloid leukemia development and treatment. *Expert Rev Hematol*. (2014) 7:807–18. doi: 10.1586/17474086.2014.958464

Invitrogen, Molecular Probes, USA. Documents, Manuals & protocols, revisado em 27 de maio de 2010. **Premo Autophagy Sensors (LC3B-FP)**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fmp36235.pdf&title=UHJlbW8qQXV0b3BoYWd5IFNlbnNvcnMgKExDM0ltRIAp>>. Acessado em 10 de março de 2019.

Janz, F.L. Leite, H.D. Bydlowski, S.P. The Main Molecules Involved in Human Mesenchymal Stem Cells Immunomodulation. *Biomedical Science and Engineering*, vol 3, no. 1 (2015): 4-8. Doi: 10.12691/bse-3-1-2.

Januchowski R, Wojtowiec K, Zabel M. The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2013 Sep;67(7): 669-680. Doi: 10.1016/j.biopha.2013.04.005.

John RR, Malathi N, Ravindran C, Anandan S. Mini review: Multifaceted role played by cyclin D1 in tumor behavior. *Indian J Dent Res*. 2017 Mar-Apr;28(2):187-192. Doi: 10.4103/ijdr.IJDR_697_16.

Kloudova A, Guengerich FP, Soucek P. The role of oxysterols in human cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2017 July;28(7): 485-496. Doi: 10.1016/j.tem.2017.03.002.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009 January; 16(1): 3-11. Doi: 10.1038/cdd.2008.150.

Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC, Gansler TS, Holland JF, Frei E. *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6th edition. BC Decker; 2003.

Kulig W, Cwiklik L, Jurkiewicz P, Rog T, Vattulainen I. Cholesterol oxidation products and their biological importance. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2016 Sep;199: 144-160. Doi: 10.1016/j.chemphyslip.2016.03.001.

Kumar B, Garcia M, Weng L, Jung X, Murakami JL, Hu X, McDonald T, Lin A, Kumar AR, DiGiusto DL, Stein AS, Pullarkat VA, Hui SK, Carlesso N, Kuo YH, Bhatia R, Marcucci G, Chen CC. Acute myeloid leukemia transforms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion. *Leukemia*. 2018 Mar;32(3):575-587. Doi: 10.1038/leu.2017.259.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins & Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2010.

Leoni V, Nury T, Vejux A, Zarrouk A, Caccia C, Debbabi M, Fromont A, Sghaier R, Moreau T, Lizard G. Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with α -tocopherol: Impacts on the cellular profile of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty acids, oxysterols, cholesterol and cholesterol precursors. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2017 May;169: 96-110. Doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.03.029.

Levy D, De Melo TC, Ohira BY, Fidelis ML, Ruiz JLM, Rodrigues A, Bydlowski SP. Oxysterols selectively promote short-term apoptosis in tumor cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (2018) Doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.008.

Lin C-Y, Huo C, Kuo L-K, Hiipakka RA, Jones RB, Lin H-P, Hung Y, Su L-C, Tseng J-C, Kuo Y-Y, Wang Y-L, Fukui Y, Kao Y-H, Kokontis JM, Yeh C-C, Chen L, Yang S-D, Fu H-H, Chen Y-W, Tsai KKC, Chang J-Y, Chuu C-P. Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol Suppresses Proliferation, Migration, and Invasion of Human Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE*. 8(6): e65734. Doi: 10.1371/journal.pone.0065734.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. Doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Liu H, Wang T, Huang K. Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol-induced reactive oxygen species production promotes mitochondrial dysfunction in isolated mice liver mitochondria. *Chemico-Biological Interactions*. 179 (2009) 81-87. Doi: 10.1016/j.cbi.2008.12.003.

Liu T, Bao YH, Wang Y, Jiang JY. The role of necroptosis in neurosurgical diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2015 Apr; 48(4): 292-298. Doi: 10.1590/1414-431X20144310.

Lizard G, Lemaire S, Monier S, Gueldry S, Néel D, Gambert P. Induction of apoptosis and of interleukin-1 β secretion by 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol: partial inhibition by Bcl-2 overexpression. *FFBS Lett*. 1997 Dec 15;419(2-3):276-80.

Lordan S, Mackrill JJ, O'Brien NM. Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2009 May;20(5): 321-336. Doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.01.001.

Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 1999 Sep 30;341(14):1051-62. Doi: 10.1056/NEJM199909303411407.

Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Griffin M, Khan WS. Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell Surface Characterization – A Systematic Review of the Literature. *The Open Orthopaedics Journal*. 2011;5(Supp1 2):253-260. Doi: 10.2174/1874325001105010253.

Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, de Jong S, Samali A. TRAIL receptor signaling and modulation: Are we on the right TRAIL?. *Cancer Treat Rev*. 2009 May;35(3):280-8. Doi: 10.1016/j.ctrv.2008.11.006.

Medyouf H. The microenvironment in human myeloid malignancies: emerging concepts and therapeutic implications. *Blood*. 2017 Mar 23;129(12):1617-1626. Doi: 10.1182/blood-2016-11-696070.

Metz GE, Galindo I, Abeyá MM, Echeverría MG, Alonso C. Intrinsic, extrinsic and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in RK13 cells infected with equine arteritis virus. *Virus Research*. 213 (2016) 219-223. Doi: 10.1016/j.virusres.2015.12.010.

Miguet C, Monier S, Bettaieb A, Athias A, Bessède G, Laubriet A, Lemaire S Néel D, Gambert P, Lizard G. Ceramide generation occurring during 7 β -hydroxycholesterol- and 7-ketocholesterol-induced apoptosis is caspase independent and is not required to trigger cell death. *Cell Death and Differentiation*. 2001 Jan;8(1): 83-99. Doi: 10.1038/sj.cdd.4400792.

Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 80 (2018) 50-64. Doi:10.1016/j.semcdb.2017.05.023.

Monier S, Samadi M, Prunet C, Denance M, Laubriet A, Athias A, Berthier A, Steinmetz E, Jürgens G, Nègre-Salvayre A, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Néel D, Gambert P, Lizard G. Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Apr 11;303(3):814-24.

Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014 January 16; 505(7483): 327-334. doi:10.1038/nature12984.

Myers B, Sever N, Chong YC, Kim J, Belani JD, Rychnovsky S, Bazan F, Beachy PA. Hedgehog Pathway Modulation by Multiple Lipid Binding Sites on the Smoothed Effector of Signal Response. *Dev Cell*. 2013 Aug 26; 26(4): 346-357. Doi: 10.1016/j.devcel.2013.07.015.

Nachtergaele S, Mydock LK, Krishnan K, Rammohan J, Schlesinger PH, Covey DF, Rohatgi R. Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothed. *Nat Chem Biol*. 2012 Aug 01; 8(2): 211-220. Doi: 10.1038/nchembio.765.

Naoum GE, Buchsbaum DJ, Tawadros F, Farooqi A, Arafat WO. Journey of TRAIL from Bench to Bedside and its Potential Role in Immuno-Oncology. *Oncol Rev*. 2017 Apr 28;11(1):332. Doi: 10.4081/oncol.2017.332.

Nedelcu D, Liu J, Xu Y, Jao C, Salic A. Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothed in Hedgehog signaling. *Nat Chem Biol*. 2013 Sep;9(9):557-64. Doi:10.1038/nchembio.1290.

NIH Stem Cell Information Home Page. In *Stem Cell Information* [World Wide Web site]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2016. Disponível em: < <https://stemcells.nih.gov/info/basics/4.htm> >. Acessado em 19 Maio de 2018.

Nishiyama Y, Saikawa Y, Nishiyama N. Interaction between the immune system and acute myeloid leukemia: A model incorporating promotion of regulatory T cell expansion by leukemic cells. *BioSystems*. 2018 Mar; 165: 99-105. Doi: 10.1016/j.biosystems.2018.01.006.

Olkkonen VM, Béaslas O, Nissilä E. Oxysterols and their cellular effectors. *Biomolecules*. 2012 Feb 15;2(1):76-103. Doi: 10.3390/biom2010076.

Palozza P, Simone R, Catalano A, Boninsegna A, Böhm V, Fröhlich K, Mele MC, Monego G, Ranelletti FO. Lycopene prevents 7-ketocholesterol-induced oxidative stress, cell cycle arrest and apoptosis in human macrophages. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 21 (2010) 34-46. Doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.10.002.

Pando A, Reagan JL, Quesenberry P, Fast LD. Extracellular vesicles in leukemia. *Leukemia research*. 2018 Jan;64:52-60. Doi: 10.1016/j.leukres.2017.11.011.

Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A target for anticancer therapy. *Int. J. Mol. Sci*. 2018, 19, 448; Doi:10.3390/ijms19020448.

Papaliagkas V, Anogianaki A, Anogianakis G, Ilonidis G. The proteins and the mechanisms of apoptosis: A mini-review of the fundamentals. *Hippokratia*. 2007; 11 (3): 108-113.

Pereira, L.V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2008 Jan-Feb;13(1):7-14.

Raleigh DR, Sever N, Choksi PK, Sigg MA, Hines KM, Thompson BM, Elnatan D, Jaishankar P, Bisignano P, Garcia-Gonzalo FR, Krup AL, Eberl M, Byrne EFX, Siebold C, Wong SY, Renslo AR, Grabe M, McDonald JG, Xu L, Beachy PA, Reiter

JF. Cilia-Associated Oxysterols Activate Smoothed. *Molecular Cell*. 2018 Oct 18;72(2):316-327.e5. Doi:10.1016/j.molcel.2018.08.034.

Rieusset J. Mitochondria-associated membranes (MAMs): Na emerging platform connecting energy and immune sensing to metabolic flexibility. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 500 (2018) 35-44. Doi:10.1016/j.bbrc.2017.06.097.

Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo HW. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers*. 2016, 8, 22; Doi: 10.3390/cancers8020022.

Robey PG. Stem cells near the century mark. *J. Clin Invest Thorofare*. 2000 Jun;105(11): 1489-1491. Doi: 10.1172/JCI10256.

Romão, C.M. Expressão da P-gp, MRP1 e LRP em células-tronco mesenquimais humanas derivadas do líquido amniótico e medula óssea. Dissertação apresentada para o título de mestre em Ciências pela Faculdade de Medicina – FMUSP. p. 176. 2012.

Ruiz JL, Fernandes LR, Levy D, Bydlowski SP. Interrelationship between ATP-binding cassette transporters and oxysterols. *Biochem Pharmacol*. 2013 Jul 1;86(1):80-8. Doi: 10.1016/j.bcp.2013.02.033.

Salvador JA, Carvalho JF, Neves MA, Silvestre SM, Leita AJ, Silva MM, Sa e Melo ML. Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. *Nat Prod Rep*. 2013 Feb;30(2): 324-374. Doi: 10.1039/c2np20082a.

Satyavarapu EM, Das R, Mandal C, Mukhopadhyay A, Mandal C. Autophagy-independent induction of LC3B through oxidative stress reveals its non-canonical role in anoikis of ovarian cancer cells. *Cell Death and Disease*. (2018)9:934 . Doi: 10.1038/s41419-018-0989-8

Shafat MS, Gnaneswaran B, Bowles KM, Rushworth SA. The bone marrow microenvironment – Home of the leukemic blasts. *Blood Reviews*. 2017 Sep;31(5): 277-286. Doi: 10.1016/j.blre.2017.03.004.

Shi G, Jia P, Chen H, Bao L, Feng F, Tang H. Necroptosis occurs in osteoblasts during tumor necrosis factor- α stimulation and caspase-8 inhibition. *Braz J Med Biol Res*. 2018 Nov 23;52(1):e7844. Doi: 10.1590/1414-431X20187844.

Shields BJ, Jackson JT, Metcalf D, Shi W, Huang Q, Garnham AL, Glaser SP, Beck D, Pimanda JE, Boque CW, Smyth GK, Alexander WS, McCormack MP. Acute

myeloid leukemia requires Hhex to enable PRC2-mediated epigenetic repression of Cdkn2a. *Genes & Development*. 2016 Jan 1;30(1):78-91. Doi: 10.1101/gad.268425.115.

Silva SF, Levy D, Ruiz JLM, de Melo TC, Isaac C, Fidelis ML, Rodrigues A, Bydlowski SP. Oxysterols in adipose tissue-derived mesenchymal stem cell proliferation and death. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017 May;169:164-175. Doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.04.017.

Sison EAR, Brown P. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. *Expert Rev Hematol*. 2011 June; 4(3): 271-283. Doi: 10.1586/ehm.11.30.

Sivagnanam U, Palanirajan SK, Gummadi SN. The role of human phospholipid scramblases in apoptosis: An overview. *BBA-Molecular Cell Research*. 2017 Dec;1864(12):2261-2271. Doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.08.008.

Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadi S, Aval FS. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran*. 2017 Jan;55(1):6-23.

Soccio RE, Breslow JL. Intracellular Cholesterol Transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jul;24(7):1150-1160. Doi: 10.1161/01.ATV.0000131264.66417.d5.

Soltanian S, Matin MM. Cancer stem and cancer therapy. *Tumor Biol*. 2011 Jun;32(3): 425-440. Doi: 10.1007/s13277-011-0155-8.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1964;51(1): 29-36.

Vejux A, Malvitte L, Lizard G. Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008 Jul;41(7): 545-556.

Von der Heide EK, Neumann M, Vosberg S, James AR, Schroeder MP, Ortiz-Tanchez J, Isaakidis K, Schlee C, Luther M, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Mochmann LH, Nowak D, Hofmann WK, Greif PA, Baldus CD. Molecular alterations

in bone marrow mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2017 May;31(5):1069-1078. Doi: 10.1038/leu.2016.324.

Xu J, Wu Y, Lu G, Xie S, Ma Z, Chen Z, Shen HM, Xia D. Importance of ROS-mediated autophagy in determining apoptotic cell death induced by physapubescin B. *Redox Biology*. 2017 Aug;12:198-207. Doi: 10.1016/j.redox.2017.02.017.

Yamanaka K, Saito Y, Yamamori T, Urano Y, Noguchi N. 24(S)-Hydroxycholesterol Induces Neuronal Cell Death through Necroptosis, a Form of Programmed Necrosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011 Jul 15; 286(28):24666-73. Doi: 10.1074/jbc.M111.236273.

Yamanaka K, Urano Y, Takabe W, Saito Y, Noguchi N. Induction of apoptosis and necroptosis by 24(S)-hydroxycholesterol is dependent on activity of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1. *Cell Death and Disease*. 2014 Jan 9;5:e990. Doi:10.1038/cddis.2013.524.

Yehudai-Resheff S, Attias-Turgeman S, Sabbah R, Gabay T, Musallam R, Fridman-Dror A, Zuckerman T. Abnormal morphological and functional nature of bone marrow stromal cells provides preferential support for survival of acute myeloid leukemia cells. *Int J Cancer*. 2019 May 1;144(9):2279-2289. Doi: 10.1002/ijc.32063.

Yuan X-M, Sultana N, Siraj N, Ward LJ, Ghafouri B, Li W. Autophagy Induction Protects Against 7-Oxysterol-induced Cell Death via Lysosomal Pathway and Oxidative Stress. *Journal of Cell Death* 2016:91-7. Doi: 10.4137/JCD.837841.

Wang W, Bochtler T, Wuchter P, Manta L, He H, Eckstein V, Ho AD, Lutz C. Mesenchymal stromal cells contribute to quiescence of therapy-resistant leukemic cells in acute myeloid leukemia. *European Journal of Hematology*. 2017 Nov: 99(5):392-398.

WHO (World Health Organization). Disponível em: <<http://www.who.int/features/factfiles/cancer/en/>> e <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acesso em: 03 de fevereiro de 2018.

Wu H, Medeiros LJ, Young KH. Apoptosis signaling and BCL-2 pathways provide opportunities for novel targeted therapeutic strategies in hematologic malignances. *Blood Reviews*. 2018 Jan;32(1):8-28. Doi: 10.1016/j.blre.2017.08.004.

Wu Y, Wang X, Guo H, Zhang B, Zhang XB, Shi ZJ, Yu L. Synthesis and screening of 3-MA derivatives for autophagy inhibitors. *Autophagy*. 2013 Apr;9(4):595-603. Doi: 10.4161/auto.23641.

Zhang F, Lau SS, Monks TJ. The Cytoprotective Effect of N-acetyl-L-cysteine against ROS-Induced Cytotoxicity Is Independent of Its Ability to Enhance Glutathione Synthesis. *Toxicological Sciences*. 120(1), 87-97 (2011). Doi:10.1093/toxsci/kfq364.

Zhang L, Qiang P, Yu J, Miao Y, Chen Z, Qu J, Zhao Q, Chen Z, Liu Y, Yao X, Liu B, Cui L, Jing H, Sun G. Identification of compound CA-f as a novel late-stage autophagy inhibitor with potent anti-tumor effect against non-small cell lung cancer. *Autophagy*. 2019 Mar;15(3):391-406. Doi: 10.1080/15548627.2018.1511503.

Zeng X, Ju D. Hedgehog Signaling Pathway and Autophagy in Cancer. *Int J Mol Sci*. 19(8), 2279. 2018. Doi: 10.3390/ijms19082279.