SUELEN FEITOZA SILVA

**Ação dos oxisteróis nos processos de proliferação e
morte das células-tronco mesenquimais derivadas de
tecido adiposo**

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

Programa de Ciências Médicas.

Área de Concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da
Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

São Paulo

2017

SUELEN FEITOZA SILVA

**Ação dos oxisteróis nos processos de proliferação e
morte das células-tronco mesenquimais derivadas de
tecido adiposo**

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

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

Programa de Ciências Médicas.

Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Suelen Feitoza

Ação dos oxisteróis nos processos de proliferação e morte das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo / Suelen Feitoza Silva. -- São Paulo, 2017.

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.Oxisterol 2.Células mesenquimais estromais 3.Apoptose 4.Morte celular 5.Hiperpolarização mitocondrial 6.Tecido adiposo

USP/FM/DBD-026/17

DEDICATÓRIA

A minha mãe...

Meu amor, meu exemplo de força e coragem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e pela saúde e por ter dado todas as condições para que eu chegasse até aqui.

A minha mãe Marta pelo amor, pela paciência, pelo seu exemplo, pelo carinho e apoio concedido em todos os momentos da minha vida.

A minha irmã Viviane pelo apoio, pelos conselhos e pela força.

A minha sobrinha Aisha pela sua alegria e carinho.

Ao Dr. Sérgio pela oportunidade e por sua orientação.

A Dr. Débora por sua amizade, companheirismo, colaboração, pela paciência e por me transmitir seus conhecimentos, tão valiosos para minha formação.

As minhas queridas Andrea, Rita e Zenaide pelos ensinamentos, amizade, companheirismo, paciência, dedicação e ajuda.

A Thatiana pelo seu companheirismo e colaboração.

A Cleide e a Luciana pelo acolhimento e carinho.

A Mariana e Giovanna pela amizade e agradável companhia.

Ao Profº Dr. César Isaac e a Silvana do Lim-04 pela colaboração, acolhimento e amizade.

Ao Dr. Alessandro Rodrigues, da Universidade Federal de São Paulo, por sua colaboração e contribuição com os oxisteróis, que possibilitou a realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A toda a equipe de funcionários e alunos do Lim-31, o meu muito obrigado por tudo!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras e tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO.....	2
3	REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA.....	3
3.1	Biologia das células-tronco.....	3
3.2	Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMTA).....	7
3.2.1	Características do tecido adiposo.....	7
3.2.2	Composição celular do tecido adiposo.....	9
3.2.3	Características das CTMTA.....	9
3.3	Homeostase do Colesterol.....	10
3.4	Oxisteróis.....	11
3.4.1	Oxidação não enzimática dos oxisteróis.....	13
3.4.2	Oxidação enzimática dos oxisteróis.....	14
3.4.3	LXR.....	15
3.5	Oxisteróis e vias de morte celular.....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1	Cultura celular.....	20
4.2	Curva de crescimento.....	21
4.3	Análise do estado de indiferenciação por RT-PCR.....	21
4.3.1.	Extração do RNA total pelo método de trizol.....	21
4.3.2.	Tratamento com DNase.....	22
4.3.3.	Síntese do DNA.....	22
4.3.4.	RT-PCR.....	23
4.4	Imunofenotipagem.....	24

4.5	Plasticidade das CTMTA	25
4.5.1	Diferenciação osteogênica.....	25
4.5.2	Diferenciação adipogênica.....	26
4.6	Tratamento das CTMTA com Oxisteróis.....	27
4.6.1	Ensaio de viabilidade celular	28
4.6.2	Detecção de apoptose e necrose	29
4.6.3	Detecção da atividade da caspase 3/7	30
4.6.4	Detecção de Ki67 por imunofluorescência indireta.....	30
4.6.5	Detecção de caspase-3 clivada por imunofluorescência indireta	31
4.6.6	Detecção de LC3b por imunofluorescência indireta	32
4.6.7	Extração da proteína celular e Western blotting para LC3b e caspase-3	32
4.6.8	Medida do potencial transmembrana mitocondrial	34
4.6.9	Avaliação do ciclo celular.....	34
4.6.10	Alteração na organização da F-actina	34
4.7	Análise Estatística	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Citometria de fluxo	36
5.2	Expressão dos genes de indiferenciação	38
5.3	Curva de Crescimento	38
5.4	Diferenciação osteogênica.....	40
5.5	Diferenciação adipogênica.....	41
5.6	Citotoxicidade dos Oxisteróis nas CTMTA.....	42
5.7	Estudo Tipo de Morte Celular Induzida pelos Oxisteróis que Apresentaram Citotoxicidade após 24 horas de Incubação.....	44
5.7.1	Apoptose e Necrose	44
5.7.2	Atividade da caspase 3/7 promovida pelos oxisteróis citotóxicos nas CTMTA.....	46

5.7.3	Presença da caspase-3 clivada no citoplasma das CTMTA após 24 horas de incubação com os oxisteróis	48
5.7.4	Deteção da concentração de caspase-3 clivada nas CTMTA por western blotting.....	49
5.7.5	Estudo da autofagia como mecanismo de morte celular: inibição da morte celular por 3-metiladenina	51
5.7.6	Estudo da presença do autofagossomo no citoplasma celular	52
5.7.7	Estudo da clivagem do LC3b I em LC3bII.....	52
5.8	Estudo do Ciclo Celular das CTMTA após 24 horas de Tratamento com os Oxisteróis	54
5.9	Estudo da Proliferação das CTMTA por KI67 após 24 horas de Tratamento com Oxisteróis.....	56
5.10	Alteração Mitocondrial Promovida pelos Oxisteróis nas CTMTA.....	57
5.11	Alterações na Organização da Actina das CTMTA Promovida pelos Oxisteróis.....	61
6	DISCUSSÃO.....	63
7	CONCLUSÃO	71
8	ANEXO	72
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABCA1	ATP-Binding Cassete Protein A1
ATV	Associação Tripsina e Versene
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
ANOVA	Análise de Variância
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic Acid
CO ₂	Dióxido de Carbono
CT	Célula-Tronco
CTA	Célula-Tronco Adulta
CTE	Célula-Tronco Embrionária
CTM	Célula-Tronco Mesenquimal
CTH	Célula-Tronco hematopoiética
CTMMO	Célula-Tronco de Medula Óssea
CTMTA	Célula-Tronco de Tecido Adiposo
C/EBP	CCAAT-enhancer Binding Protein
CYP450	Cytochrome p450
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Desoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
et al.	e outros
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA

IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50%
INSIG	Insulin Induced Gene
LC3b	Light Chain 3b
LDL protein	Low Density Lipoprotein
LDL _{ox}	LDL oxidada
LXR	Liver X Receptor
M	Molar
ml	Mililitro
mM	Milimolar
Oct-4	Octamer Binding Factor-4
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoeritin
P/S	Penicilina e Estreptomicina
PPAR _γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptory
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RXR	Retinoid X Receptor
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerasechain Reaction
SCAP	SREBP Cleavage-Activating Protein
SFB	Soro Fetal Bovino
SITC	Sociedade Internacional de Terapia Celular
SER	Sterol Regulator Elements
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
SVF	Stromal Vascular Fraction
TRME	Tetramethylrhodamine, ethyl ester

UCP-1	Uncoupling Protein-1
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
μl	Microlitro
μM	Micromolar
%	Porcentagem
Céls.	Células
°C	Grau Celsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Adipogênese	8
Figura 2. Representação da homeostase do colesterol intracelular regulado pelos oxisteróis e receptores LXR e RXR	13
Figura 3. Formação enzimática e não enzimática dos oxisteróis	15
Figura 4. Autofagia	18
Figura 5. Representação em forma de histograma dos marcadores positivos (CD29, CD44, CD90 e CD105) e negativos (CD31, CD34, CD35, CD45, CD80 e CD117)	37
Figura 6. Expressão dos genes de indiferenciação OCT-4, Sox-2, Nanog e GUSB como gene endógeno por RT-PCR.....	38
Figura 7. Representação gráfica da curva de crescimento para cálculo do tempo de dobramento das células.....	39
Figura 8. Diferenciação osteogênica das CTMTA	40
Figura 9. Diferenciação adipogênica das CTMTA	41
Figura 10. Citotoxicidade dos oxisteróis após 24 horas de tratamento com oxisteróis	43
Figura 11. Apoptose das CTMTA após 24 horas de tratamento com Oxisteróis	45
Figura 12. Necrose das CTMTA após 24 horas de tratamento com Oxisteróis	46

Figura 13. Caspase 3/7 nas CTMTA após 24 horas de tratamento com oxisteróis	47
Figura 14. Presença da caspase 3 clivada nas CTMTA após 24 horas de tratamento com colesterol, triol e diol	48
Figura 15. Caspase 3 clivada analisada por Western blot.....	49
Figura 16. Presença de caspase 3 clivada nas CTMTA após 24 horas de tratamento com triol e diol	50
Figura 17. Autofagia nas CTMTA após 24 horas de incubação com oxisteróis. Células tratadas com e sem 3-MA	51
Figura 18. Autofagia nas CTMTA após 24 horas de incubação com oxisteróis. A autofagia determinada usando LC3b como marcador	52
Figura 19. Autofagia nas CTMTA após 24 horas de incubação com colestane-3 α -5 β -6 α -triol (triol) e (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol (diol). Intensidade relativa da banda LC3b-II quantificada por análise densitométrica.....	53
Figura 20. Autofagia nas CTMTA após 24 horas de incubação com colestane-3 α -5 β -6 α -triol (triol), (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol (diol). Imagem representativa do ensaio de western blot	54
Figura 21. Fases do ciclo celular das CTMTA. Efeito após 24 horas de incubação com oxisteróis	55
Figura 22. Proliferação das CTMTA com o marcador Ki67 após 24 horas de incubação com oxisterol	56
Figura 23. Potencial transmembrana mitocondrial das CTMTA após 24	

horas de incubação com oxisteróis 58

Figura 24. Marcação das mitocôndrias das CTMTA com TRME, após 24 horas de tratamento com os oxisteróis colestane-3 α -5 β -6 α -triol, (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol, 5 β -6 β -epoxi-colesterol e colesterol . 60

Figura 25. Alteração na organização da actina das CTMTA após incubação com os oxisteróis colestane-3 α -5 β -6 α -triol, (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol, 5 β -6 β -epoxi-colesterol e colesterol..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers com os tamanhos do produto de PCR e temperatura de anelamento.....	23
Tabela 2. Caracterização imunofenotípica das CTMTA	36
Tabela 3. Tempo de dobramento em dias e horas.....	39

RESUMO

Silva SF. ***Ação dos oxisteróis nos processos de proliferação e morte das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo*** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2017.

As células-tronco mesenquimais são células multipotentes caracterizadas pela capacidade de autorrenovação e diferenciação. Os oxisteróis abrangem um grande grupo heterogêneo derivado do colesterol pela da oxidação enzimática e não enzimática. Os efeitos dos oxisteróis no processo de morte celular, incluindo citotoxicidade e indução de apoptose, foram descritos em diversas linhagens celulares. No entanto, os efeitos dos oxisteróis são pouco conhecidos nas células-tronco mesenquimais. O 7-cetocolesterol (7-KC), um dos mais importantes oxisteróis, foi mostrado ser citotóxico em células-tronco mesenquimais de tecido adiposo. Sendo assim, este estudo descreve os efeitos citotóxicos de curta duração (24 horas) dos oxisteróis colestane-3 α -5 β -6 α -triol, 3,5 colestane-7-ona, (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol, 7-oxocolesterol-5-en-3-beta-il acetato e 5 β -6 β epoxi-colesterol em células-tronco derivadas de tecido adiposo. Os oxisteróis 3,5 colestane-7-ona e 7-oxocolesterol-5-en-3-beta-il acetato não promoveram morte celular e nem afetaram a proliferação celular. Os outros oxisteróis promoveram apoptose, necrose e autofagia, dependendo do tipo de oxisterol e da concentração. O colestane-3 α -5 β -6 α -triol foi o mais efetivo. A inibição da proliferação também foi promovida pelos oxisteróis, porém não foi observada alteração no ciclo celular.

Descritores: oxisterol; células tronco mesenquimais; apoptose; morte celular; hiperpolarização mitocondrial; tecido adiposo.

ABSTRACT

Silva SF. ***Action of oxysterols in proliferation and death processes of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue*** [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells characterized by self-renewal and cellular differentiation capabilities. Oxysterols comprise a very heterogeneous group derived from cholesterol through enzymatic and non-enzymatic oxidation. Potent effects in cell death processes, including cytotoxicity and apoptosis induction, were described in several cell lines. Very little is known about the effects of oxysterols in MSCs. 7-ketocholesterol (7-KC), one of the most important oxysterols, was shown to be cytotoxic to human adipose tissue-derived MSCs. Here, we describe the short-term (24 h) cytotoxic effects of cholestan-3 α -5 β -6 α -triol, 3,5 cholestan-7-one, (3 α -5 β -6 α)-cholestane-3,6-diol, 7-oxocholest-5-en-3-beta-yl acetate, and 5 β -6 β epoxy-cholesterol, on MSCs derived from human adipose tissue. 3,5 cholestan-7-one and 7-oxocholest-5-en-3-beta-yl acetate did not promoted cell death or affect cell proliferation. The other oxysterols led to a complex mode of cell death that could include apoptosis, necrosis and autophagy, depending on the type of oxysterol and concentration. Cholestan-3 α -5 β -6 α -triol was the most effective. Inhibition of proliferation was also promoted by these oxysterols, but no changes in cell cycle were observed.

Descriptors: oxysterol; mesenchymal stem cell; apoptosis; cell death; mitochondrial hyperpolarization; adipose tissue

1. INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTMTA) são células multipotentes que apresentam capacidade de diferenciação e autorrenovação, localizadas na fração estroma vascular do tecido adiposo (Ràfols, 2013). Há muitos estudos que mostram que produtos oxidados do colesterol, conhecidos como oxisteróis, podem exercer efeitos em células tronco mesenquimais, principalmente em relação ao processo de diferenciação (Aghaloo *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2011; Murdolo *et al.*, 2013; Moseti *et al.*, 2016;). No entanto, há poucos relatos na literatura quanto aos efeitos citotóxicos que os oxisteróis podem exercer nas células tronco mesenquimais (CTM). Os oxisteróis são descritos por apresentar efeitos nos processos de morte celular, principalmente por indução de apoptose e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês reactive oxygen species) que é um processo que também está envolvido no processo de morte celular (Panini & Sinensky, 2001; Leonarduzzi *et al.*, 2007). Recentemente, o 7-cetocolesterol mostrou ser citotóxico em CTMTA (Levy *et al.*, 2013). Sendo assim, este estudo foi desenvolvido para investigar os efeitos que os oxisteróis colestane-3 α -5 β -6 α -triol, 3,5 colestane-7-ona, (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol, 7 oxocolesterol-5-en-3-beta-il acetato e 5 β -6 β epoxicolesterol exerceram no processo de proliferação e morte das CTMTA.

2. OBJETIVO

Estudar os efeitos que os oxisteróis colestane-3 α -5 β -6 α -triol, 3,5 colestane-7-ona, (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol, 7 oxocolesterol-5-en-3-beta-il acetato e 5 β -6 β epoxicolesterol exercem nas células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo no tocante a proliferação e morte celular.

3. REVISÃO DA BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biologia das Células-Tronco

As células-tronco (CT) são caracterizadas por serem indiferenciadas e apresentarem capacidade de autorrenovação, isto é, cada “célula filha” pode manter-se indiferenciada ou tornar-se uma célula especializada (Carvalho & Goldenberg, 2012), além de conseguir submeter-se a numerosas divisões celulares e manter a identidade de CT (Arrieta *et al.*, 2011).

De acordo com o grau de plasticidade das CT, ou seja, o seu potencial de diferenciação, podemos classificá-las como: totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As CT totipotentes são capazes de formar todos os tecidos. Formam-se nas primeiras 72 horas após a fecundação do óvulo (Carvalho & Goldenberg, 2012). Correspondem às células do embrião recém-formado (zigoto) e têm potencial para originar até mesmo as células dos folhetos extra-embrionários, que formarão a placenta e os demais anexos responsáveis pelo suporte do embrião. Entretanto, estas células possuem um tempo de vida curto e desaparecem poucos dias após a fertilização (Robey, 2000). As CT pluripotentes apresentam potencial de se diferenciarem em qualquer célula dos três folhetos germinativos (endoderma, mesoderma e ectoderma) (Carvalho & Goldenberg, 2011). As células pluripotentes são capazes de originar qualquer tipo de tecido do organismo, porém, não são capazes de originar um organismo completo, por não gerar a placenta e outros tecidos embrionários de apoio ao feto. Formam a massa celular interna do blastocisto depois do quarto dia de fecundação e participam da formação de todos os tecidos do organismo (Robey, 2000). As CT multipotentes são mais comprometidas com seu tecido

de origem, sendo assim, apresentam capacidade de diferenciação limitada. A principal função dessas células é manter a homeostase do tecido e promover a substituição das células especializadas mortas por envelhecimento, lesão ou doença (Carvalho & Goldenberg, 2012). As CT multipotentes são um pouco mais diferenciadas, presentes no indivíduo adulto, com capacidade de originar apenas um limitado número de tipos teciduais. Estas células são designadas de acordo com o órgão do qual derivam (Gage, 2000).

As CT são divididas de acordo com seu local de origem como as células-tronco embrionárias (CTE), que são derivadas da massa celular interna do blastocisto embrionário, capazes de proliferar indefinidamente e manter-se em estado pluripotente, mesmo *in vitro* (Carvalho & Goldenberg, 2012; Labat, 2001; Nishikawa *et al.*, 2007). Estas células formam agregados chamados de corpos embrionários, os quais, em condições apropriadas de cultivo, conseguem se diferenciar em células dos três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma) (Labat, 2001). Os três fatores de transcrição responsáveis por manter a pluripotência destas células são os genes OCT-3/4, Nanog e SOX-2, que neutralizam moléculas que estão envolvidas nos processos de diferenciação. Entretanto, as CTE apresentam forte expressão de proto-oncogenes responsáveis por promover a formação de teratomas, quando estas células são injetadas em animais e humanos (Nishikawa *et al.*, 2007). Estes teratomas são formados por tipos celulares em estado diferenciado, originados dos três folhetos germinativos (Choumerianou *et al.*, 2008).

As células-tronco adultas (CTA), são aquelas localizadas em estado mais diferenciado em nichos na maioria dos tecidos do organismo adulto (Vogel, 2000). São multipotentes por apresentarem diferenciação restrita ou dirigida de acordo com o tecido de origem, além de menor capacidade de proliferação quando comparadas com as células-tronco embrionárias, o que diminui o risco de formação de tumores (Carvalho & Goldenberg, 2012). No organismo adulto, cada tecido e órgão geralmente contém uma pequena sub-população de células capazes de autorrenovar-se, com potencial proliferativo indefinido, e com capacidade de gerar uma grande família de descendentes com espectro de especialização definido (Poulson *et al*, 2002).

O termo “adultas” é usado para distinguir CTA multipotentes de CTE pluripotentes. Há muitas evidências, a partir de uma variedade de estudos, que células progenitoras de determinado tecido apresentam o potencial de se diferenciar em células comprometidas com outros tecidos (plasticidade). A plasticidade das células progenitoras hematopoiéticas é a mais estudada e entendida entre todas as células tronco adultas. Elas foram isoladas e investigadas primeiramente após o efeito das bombas nucleares em Hiroshima e Nagasaki (Raff, 2003).

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) são isoladas da medula óssea, do cordão umbilical e do sangue periférico, baseado na expressão de CD34 (Conrad & Huss, 2005). As CTH são multipotentes, apresentam a característica de autorrenovação, são capazes de gerar todas as células sanguíneas maduras, além de controlar e manter a homeostase hematopoiética. São responsáveis por gerar aproximadamente 1×10^9 de

glóbulos vermelhos e 1×10^8 de leucócitos por hora, incluindo plaquetas e outras linhagens sanguíneas. As CTH são utilizadas primariamente como forma de tratamento de câncer em células hematológicas como: leucemias, linfomas, talassemias, síndromes mielodisplásicas, mieloma múltiplo, anemia aplástica, entre outras (Copelan, 2006).

Além das CTH, as células-tronco mesenquimais (CTM) outro tipo de CTA, são encontradas em outros tecidos como cordão umbilical (Wang *et al.*, 2004), líquido amniótico (Bydlowski *et al.*, 2009) e tecido adiposo (Ong & Sugii, 2013).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC), uma determinada população de células será classificada como CTM quando apresentar seguintes características:

- Propriedade de adesão seletiva à superfície do material onde são cultivadas (geralmente plástica).
- Expressão dos genes de indiferenciação OCT-4, SOX-2 e Nanog.
- Expressão de antígenos de membrana CD 105, CD 29 e CD44 que tenham uma positividade maior de 90%, e que os marcadores CD34, CD117, CD31, CD45, CD14 e CD80 sejam expressos em menos de 5% das células em cultura.
- Capacidade de as células se diferenciarem em tecido ósseo, gorduroso e cartilaginoso após estímulo (Horwitz, 2005).

3.2 Células-Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo (CTMTA)

3.2.1 Características do tecido adiposo

O tecido adiposo (TA) é didaticamente classificado como tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo branco (TAB), ambos compostos por células que acumulam gordura no citoplasma, denominadas adipócitos. O TAM é mais abundante em recém-nascidos, devido à sua propriedade termogênica e por atuar como regulador-chave na produção de calor pela proteína UCP-1 (do inglês - *Uncoupling Protein-1*), localizada na membrana interna da mitocôndria (Gimble *et al.*, 2013; Ràfols, 2013; Nedergaad *et al.*, 2001). O TAB é mais abundante em adultos e sua função é armazenar energia, promover isolamento térmico e proteção mecânica para os órgãos. É responsável também por secretar hormônios, chamados adipocinas, que regulam diversos processos como pressão arterial, coagulação sanguínea, homeostase glicêmica, angiogênese, entre outros. O processo de incorporação, biossíntese, e armazenamento de energia no TAB é conhecido como lipogênese; por outro lado, quando o organismo necessita de uma demanda energética maior, ocorre o inverso da lipogênese, a lipólise, quando os triglicérides são hidrolisados e liberados em forma de ácidos graxos e glicerol (Bonet *et al.*, 2012).

O tecido adiposo também está presente em outros locais como couro cabeludo, regiões periarticulares, palma das mãos, planta dos pés e órbitas, conhecido como tecido adiposo de sustentação (Berry *et al.*, 2013, Gimble *et al.*, 2007) .

O processo de maturação dos adipócitos, conhecido como adipogênese (figura 1), é regulado principalmente pelo ativador do receptor gama do fator de transcrição peroxissomal (PPAR γ do inglês *peroxisome proliferator activated receptor* γ) e pelas proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (C/EBP do inglês *CCAAT-enhancer-binding proteins*). O PPAR γ pertence a uma superfamília de receptores nucleares e é altamente expresso no tecido adiposo por estimular a transcrição de muitos genes específicos do adipócito. Sendo assim, é responsável pela diferenciação dos adipócitos e pelo armazenamento de lipídios. O C/EBP α tem papel importante na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, e atua sinergicamente com o PPAR γ para promover a adipogênese. O C/EBP β também induz adipogênese por estimular a expressão de PPAR γ (Ong & Sugii, 2013).

Figura 1: Adipogênese. A célula-tronco mesenquimal diferencia-se em lipoblasto (com formação de pequenos vacúolos lipídicos distribuídos pelo citoplasma da célula), que por sua vez transforma-se em um pré – adipócito com um grande e único vacúolo lipídico (VL) que sob o estímulo do PPAR- γ e das proteínas C/EBP, formará uma célula adiposa

3.2.2 Composição celular do tecido adiposo

O tecido adiposo é composto por 50% de adipócitos e 50% de uma população celular heterogênea chamada de fração estroma-vascular (SVF do inglês – *stroma vascular fraction*), que contém diversos tipos celulares como macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, pericitos, células de músculo liso, linfócitos, neutrófilos, pré-adipócitos e CTM (Ràfols, 2013).

3.2.3 Características das CTMTA

As células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMTA) são uma população de CTM encontrada na fração estroma vascular do tecido adiposo e apresentam eficiente capacidade expansão e diferenciação, assim como as células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTMMO), e expressam genes de indiferenciação Oct-4, Nanog e SOX2 (Sachs *et al.*, 2012). As CTMTA apresentam capacidade de se diferenciar *in vitro* em linhagens adipogênicas, osteogênicas, condrogênicas, miogênicas, e também em células endoteliais (Francesco *et al.*, 2015). Além disso, a abundância de TA no corpo e a demonstrada multipotência das CTMTA, mostram que este tecido é um candidato promissor para coleta de CTM, com elevado interesse de seu uso na medicina regenerativa devido a obtenção de elevado número de células (Francesco *et al.*, 2015).

3.3 Homeostase do Colesterol

A síntese do colesterol começa com duas moléculas de acetil-CoA, formando uma única molécula de 3-hidróxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA), que se transforma em mevalonato pela enzima HMG-CoA redutase (Weille *et al.*, 2013). A HMG-CoA redutase está situada no retículo endoplasmático (Menys & Durrington, 2007) e sua atividade é controlada transcripcionalmente via regulação da proteína ligante ao elemento regulador de esteróis, a SREBP (do inglês *sterol regulatory element binding protein*), que regula o gene da HMG-CoA redutase e outros genes envolvidos na síntese do colesterol. A SREBP está localizada no retículo endoplasmático, ligado a uma proteína de membrana, que pode ser clivada pela caspase-3 ou uma proteína ativadora de clivagem da SREBP, a SCAP (do inglês *SREBP cleavage-activating protein*) (Lordan *et al.*, 2009). Os fatores de transcrição SREBP e LXR trabalham juntos para integrar a homeostase do colesterol com o metabolismo de ácidos biliares e a via destes fatores de transcrição podem ser regulados por alguns esteróis e oxisteróis. Em condições de baixo colesterol na célula, SREBP são transportados por proteínas ativadoras de clivagem da SREBP para o complexo de Golgi, onde SREBP é processada proteoliticamente. O domínio amino-terminal compreende um fator de transcrição básico hélice-alça-hélice, que migra para o núcleo onde se liga ao elemento regulador de esterol (SER, do inglês *sterol regulator elements*) no gene-alvo codificador de enzimas requeridas para síntese e captação do colesterol, como a HMG-CoA redutase e o receptor de LDL (do inglês *low density lipoprotein*), que resulta na sua ativação transcripcional. Sob estas condições, os heterodímeros LXR (do inglês

liver X receptor) –RXR (do inglês *retinoid X receptor*) são ativados e reprimem ativamente os genes codificadores de moléculas que medeiam o efluxo do colesterol, como ABCA1 (do inglês *ATP-binding cassette A1*), e de genes responsáveis pela degradação dos receptores de LDL, o que resulta no aumento da concentração intracelular do colesterol. Por outro lado, em condições de excesso de colesterol intracelular, SREBP permanece no retículo endoplasmático (figura 2). O colesterol causa a retenção do complexo SCAP-SREBP, por se ligar a SCAP (Spann & Glass, 2013).

3.4 Oxisteróis

Os oxisteróis são derivados oxidados do colesterol ou de subprodutos do processo de biossíntese do colesterol e representam uma classe de moléculas regulatórias que atuam no metabolismo de esteróis, na inibição da proliferação celular, na diferenciação celular, na citotoxicidade, aterogenicidade, mutagenicidade e na carcinogenicidade (Baranowski *et al.*, 1982). A grande variedade de oxisteróis surge como intermediários nas vias de conversão do colesterol em ácidos biliares, ou em hormônios esteróides. As modificações do colesterol ocorrem pelo oxigênio, originando diversos tipos de oxisteróis, compostos por radicais hidroxil, ceto, hidropoxi, epoxi e carboxil (Olkkonen *et al.*, 2012). São reguladores da expressão gênica, substratos para síntese de ácidos biliares e mediadores do transporte de esteróis. Como moléculas regulatórias, inibem a produção de fatores de transcrição requeridos para expressão de vários genes das vias de suprimento de colesterol (Higley &

Taylor, 1984). Além disso, os oxisteróis são inativados pela conversão em ácidos biliares e, em algumas instâncias, a necessidade de ácidos biliares pode somente ser suprida pelo metabolismo de oxisteróis (Naseem & Heald, 1987). Sabe-se também que os oxisteróis se ligam aos receptores LXR. Os ligantes mais estudados, e considerados até o momento, os mais potentes ativadores da via do LXR, incluem: 24(S)-hidroxicolesterol, 22(R)-hidroxicolesterol e 24(S), 25-epoxicolesterol (Peet *et al.*, 1998). Os LXR também sofrem influência dos receptores ativadores dos PPAR γ . Os LXR e a proteína reguladora do colesterol SREBP regulam a transcrição do gene transportador de colesterol ABCA1 que, por sua vez, provoca o efluxo do colesterol livre da célula (Accad & Farese Jr, 1998; Wong *et al.*, 2006; Santamarina-Fojo *et al.*, 2001). A clivagem da SREBP é inibida se a SCAP se ligar ao colesterol, 7-cetocolesterol ou a oxisteróis ligados a proteína de membrana Insig-1 e 2 (do inglês *insulin induced gene*) (Weille *et al.*, 2013). Os oxisteróis causam a retenção de SCAP-SREBP por se ligar em proteínas Insig. Os oxisteróis se ligam aos LXR, causando a dissociação dos co-repressores e induzindo o recrutamento de coativadores que induzem a transcrição dos genes alvos que codificam ABCA1 (figura 2), que resulta na diminuição do colesterol intracelular (Spann & Glass, 2013).

Figura 2: Representação da homeostase do colesterol intracelular regulado pelos oxisteróis e receptores LXR e RXR. FONTE: Adaptado de Spann e Glass, *Nature Immunology*, 2013.

3.4.1 Oxidação não enzimática dos oxisteróis

Os oxisteróis estão presentes em vários alimentos ricos em colesterol como leite, laticínios, ovos, manteiga, carnes processadas e peixes enlatados e/ou desidratados. Estes alimentos são suscetíveis à oxidação por estarem expostos a numerosas espécies reativas de oxigênio. Os principais oxisteróis detectados em alimentos processados são 7-cetocolesterol, 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, 5 α ,6 α -epoxicolesterol, 5 β ,6 β -epoxicolesterol, colestane-3 β ,5 α ,6 β -triol, e também 20 α -hidroxicolesterol, 3 β -hidroxi-5 α -colestane-6-ona e 3 β ,5 α -dihidroxi-colestane-6-ona, que estão

presentes em pequenas quantidades. Estes oxisteróis são absorvidos na forma ésteres no trato intestinal e transportados no plasma pelos quilomícrons e pelas lipoproteínas LDL, e em menor quantidade nas VLDL (do inglês *very low density lipoprotein*) e HDL (do inglês *high density lipoprotein*) (Vejux *et al.*, 2008).

A suscetibilidade do colesterol para a oxidação não enzimática é de interesse com relação ao uso dos oxisteróis como marcadores para estudo não invasivo de estresse oxidativo *in vivo*, pois eles podem acumular-se em tecidos específicos em certas doenças, tais como as células espumosas na aterosclerose (Ruiz *et al.*, 2013).

3.4.2 Oxidação enzimática dos oxisteróis

Alguns dos oxisteróis mais importantes fisiologicamente são gerados nas células pelas mitocôndrias ou pelo retículo endoplasmático, por meio das hidroxilases do colesterol que pertencem à família citocromo P450 (CYP do inglês *cytochrome p450*) (Ruiz *et al.*, 2013). O citocromo P450 é um sistema amplamente responsável pela geração enzimática de oxisteróis endógenos, como por exemplo, o 7 α -hidroxicolesterol hepático (catalisada pela CYP7A1) (Vejux *et al.*, 2008). As hidroxilases do colesterol estão presentes em vários tecidos com a função de sintetizar hormônios esteróides e de ácidos biliares no fígado (Weille *et al.*, 2013).

Figura 3: Formação enzimática e não enzimática dos oxisteróis. FONTE: Björkhem, *Journal Clin. Invest.*, 2002.

3.4.3 LXR

Os LXR são uma família de fatores de transcrição que regula o sistema de eliminação de excesso de colesterol nas células. Os receptores LXR α são expressos em altos níveis no fígado, tecido adiposo, intestino, rins e macrófagos, enquanto que os LXR β estão expressos em níveis relativamente estáveis em todos os tecidos. Os LXRs formam heterodímeros com RXR e são ativados pela ligação dos oxisteróis em concentrações fisiológicas. Os oxisteróis 27- hidroxicolesterol, 24(S)- hidroxicolesterol e 24(S),25-epoxicolesterol são ligantes do LXR na ativação de genes envolvidos no efluxo

de esteróis da células (colesterol ou oxisteróis), incluindo os genes ABCA1 e ABCG1 (Ruiz *et al.*, 2013).

3.5 Oxisteróis e Vias de Morte Celular

Os oxisteróis são capazes de induzir apoptose por duas vias: extrínseca e intrínseca. A via extrínseca ocorre por meio da sinalização do receptor de morte que precede a apoptose pela ativação da caspase-8. Este receptor é conhecido como *Fas*, descoberto em células endoteliais, células de músculo liso e macrófagos. A segunda via pela qual os oxisteróis podem induzir apoptose é a via intrínseca pela via mitocondrial, que pode ocorrer pela liberação do citocromo c que resulta na ativação da caspase -9. Uma vez liberado pela mitocôndria, o citocromo c se liga à proteína Apaf-1 (do inglês *apoptotic protease activating factor-1*). A presença de ATP media uma mudança conformacional da Apaf-1, promovendo sua oligomerização e formação do apoptossoma, que se liga a caspase-9 ativando-a, a qual cliva e ativa a caspase-3. O começo da cascata proteolítica leva à digestão das proteínas estruturais citoplasmáticas, degradação do DNA cromossômico e ativação da fagocitose celular (Leonarduzzi *et al.*, 2007).

Os reguladores imediatos da liberação do citocromo c são os membros da família Bcl que são divididos em dois grupos, os antiapoptóticos como Bcl-2 e Bcl-x, e os pró-apoptóticos que são Bad, Bim e Bax. Alterações no potencial transmembrana mitocondrial, em resposta a vários fatores, resultam na produção de espécies reativas de oxigênio ou na permeabilização da

membrana mitocondrial. Esta permeabilização pode ser induzida pelas proteínas pró-apoptóticas Bax, que resulta na liberação das moléculas citocromo c, fator indutor de apoptose (AIF, do inglês *apoptosis inductor factor*) e endonuclease G, ativando tanto vias de morte celular dependentes de caspase como não dependentes de caspase. A diminuição do potencial de membrana mitocondrial e a liberação do citocromo c em células tratadas com oxisteróis têm sido documentadas em muitos estudos. A iniciação da via apoptótica mitocondrial é o resultado da ativação das proteínas pró-apoptóticas Bax e concomitante inativação da família de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-x (Olkkonen *et al.*, 2012). A maioria das proteínas Bcl-2 está funcionalmente e fisiologicamente associada com a mitocôndria, a qual produz a maioria de ROS celular como bioproduto da respiração mitocondrial. As proteínas Bcl-2 modulam a produção de ROS mitocondrial. De fato, a capacidade das proteínas Bcl-2 de regular a produção de ROS tem sido bem entendida nas condições de apoptose, durante a qual Bax promove a produção de ROS por induzir a permeabilidade mitocondrial, um processo que pode ser bloqueado pelos membros da família Bcl-2. As proteínas Bcl-2 também podem regular a produção de ROS em células não apoptóticas. Entretanto, o modo de regulação neste contexto é oposto daquele nas células apoptóticas, pois mais promovem do que suprimem a produção de ROS nestas células. Os níveis de ROS induzidos pelo aumento da expressão de genes relacionados à sobrevivência das células são relativamente baixos, não sendo suficientes para induzir morte celular (Um, 2015) e são necessários para manter a estabilidade genômica e ativar as vias de reparo de DNA (Li & Marbán, 2010). Por isso, supõe-se que concentrações baixas ou moderadas de geradores de ROS

podem aumentar as taxas de proliferação, a migração, o potencial regenerativo das CTM, e altas concentrações podem causar apoptose (Park *et al.*, 2011). A produção de ROS pode desempenhar um papel de mensageiro secundário de indução de apoptose por oxisteróis (Panini & Sinensky, 2001).

A autofagia (conforme ilustrado na figura 4) é um processo celular conservado em todas as células eucarióticas para degradar organelas com perda da função. As células possuem um sistema responsável pela limpeza, após um processo de destruição em seu interior, sendo que na autofagia, porções da matriz citoplasmática e suas organelas danificadas são envolvidas por membranas celulares para formar os autofagossomos, que subsequentemente se fundem com os lisossomos. Após a fusão do autofagossomo com o lisossomo, um autolisossomo é formado, dentro do qual os constituintes celulares são degradados (Dunn *et al.*, 2015).

Figura 4: Autofagia. FONTE: Phadwal e Watson, Cell Mol. Life Sci, 2013.

A proteína associada ao microtúbulo 1 de cadeia leve-3B (LC3B, do inglês *microtubule-associated protein 1 light chain-3B*) é recrutada a partir do citosol e associada com a membrana do fagóforo na autofagia (Modernelli *et.*

al., 2015). A conversão do LC3B-I (forma citosólica) para LC3B-II (forma lipídica) está correlacionada com a indução de autofagia e a formação do autofagossomo.

A necrose é caracterizada por inchaço das células e suas organelas, e consequente aumento da permeabilidade celular (Vejux *et al.*, 2008; Majno & Joris, 1995).

Neste estudo foram investigados os efeitos *in vitro* dos oxisteróis colestane-3 α -5 β -6 α -triol (triol), 3,5 colestane-7-ona (coestanona), (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol (diol), 7 oxocolesterol-5-en-3-beta-il acetato (acetato) e 5 β -6 β epoxicoolesterol (epoxi) para verificar o potencial citotóxico destes oxisteróis nas CTMTA quanto à inibição da proliferação e à indução de morte celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas CTMTA do biorrepositório do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM-31) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.1 Cultura Celular

As CTMTA criopreservadas com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 20% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Brasil) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) (Sigma-Aldrich®, EUA) em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium *low glucose* (DMEM *low glucose*) (Sigma-Aldrich®, EUA) e armazenadas em ultrafreezer -80 foram descongeladas rapidamente por imersão em água em banho-maria a 37°C, e cultivadas em meio DMEM *low glucose*, suplementado com 20% de SFB e 1% de P/S, em incubadora a 37 °C com atmosfera de 5% de 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 a cada dois dias. 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 (associação de tripsina e versene) (Instituto Adolfo Lutz, Brasil), para expansão das células.

4.2 Curva de Crescimento

A curva de crescimento foi feita para investigar a capacidade de proliferação e tempo de dobramento das células. As CTMTA foram plaqueadas em triplicata com um inóculo inicial de 1×10^4 por poço, em placa de seis poços (sc-204443- Santa Cruz), com meio de cultura DMEM *low glucose* suplementado com 20% SFB e 1% de P/S. A cada dia as células foram lavadas com PBS, dissociadas enzimaticamente com ATV, e contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico. Ao final do período de 10 dias, o número de células foi extrapolado para um gráfico linear (dias x número de células), e o valor do tempo de dobramento foi obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism.

4.3 Análise do Estado de Indiferenciação por RT-PCR

4.3.1 Extração do RNA total pelo método de trizol

Após a dissociação enzimática, as células foram contadas para obter 1×10^6 células. Estas foram centrifugadas a $1000 \times g$ por 20 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante (meio de cultura) foi descartado e adicionado 1 ml de trizol nas células. A mistura foi homogeneizada e coletada com o auxílio de uma pipeta e transferida para um microtubo de 1,7 ml. Foi adicionado 200 μ l de clorofórmio às amostras, seguido de agitação vigorosa e incubação por 3 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a $12000 \times g$, a 4°C . Na seguinte

etapa à extração, foi realizada a precipitação do RNA, utilizando-se para cada tubo 500 µl de álcool isopropílico gelado. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, foi feita a centrifugação por 10 minutos à 12.000 x g na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se ao RNA precipitado, 1 ml de etanol a 75%. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado, e em cada amostra foi acrescentado 20 µl de água DEPC para ressuspender o RNA total extraído.

4.3.2 Tratamento com DNase

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

4.3.3 Síntese do cDNA

Com o RNA tratado, foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese do cDNA com o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems™) com os seguintes componentes: as bases nitrogenadas (dNTPs), primers e a enzima transcriptase reversa, possuindo como condições

ideais para as reações a temperatura de 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos. Para as incubações foi utilizado o termociclador PTC-200® (Peltier Engine, EUA).

4.3.4 RT-PCR

Para determinar o estado de indiferenciação das CTM-TA, foi realizada a análise da expressão gênica a partir do RNA total extraído das culturas celulares, utilizando-se a técnica da reação em cadeia polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR), com kit Platinum® *Taq* DNA Polimerase (Invitogen, Brasil) para verificação dos genes OCT-4, Sox-2 e Nanog. O gene GUSB foi utilizado como controle endógeno da reação de RT-PCR.

Tabela 1: Primers com os tamanhos do produto de PCR e temperatura de anelamento

GENE	PRIMERS	PRODUTO
GUSB	5´- gaa aat acg tgg ttg gag agc tac tt -3´ 5´- ccg agt gaa gat ccc ctt ttt a -3´	101pb
OCT-4	5´- cgt gaa gct gga gaa gga gaa gct g – 3´ 5´- caa ggg ccg cag ctt aca cat gtt c – 3´	247 pb
SOX-2	5´- cct ccg gga cat gat cag – 3´ 5´- ttc tcc ccc ctc cag tcc – 3´	178 pb
NANOG	5´- cat gag tgt gga tcc agc ttg – 3´ 5´- cct gaa taa gca gat cca tgg – 3´	191Pb

4.4 Imunofenotipagem

A caracterização da população das CTMTA foi determinada pela análise de proteínas de membrana pelo método de citometria de fluxo. A identificação dos antígenos foi realizada pela utilização de diferentes anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e ficoeritina (PE, do inglês *phycoeritin*). Controles de marcações inespecíficas foram utilizados para adequada calibração do aparelho, análise dos resultados e definição da positividade da amostra. Após a dissociação celular, as células foram quantificadas e foram distribuídas 3×10^5 células em tubos específicos para citometria (Becton Dickinson, EUA). Em cada tubo foi adicionado 1 ml de PBS para retirar o meio, e posteriormente foi feita centrifugação por 5 minutos à 153 x G. Posteriormente, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais CD29 (CD2004- RPE), CD44 (MHCD4401-FITC), CD105 (MHCD10504RPE), CD34 (CD34-581-01), CD117 (CD11704-RPE), CD31 (MHCD3101-4), CD45 (MHCD4504R-PE), CD14 (MHCD1404- RPE) e CD80 (MHCD8001- FITC) (Invitrogen, USA) na diluição 1:100, seguida por um período de 30 minutos em campo escuro à temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 1 ml de PBS e feita centrifugação a 153 x G por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular homogeneizado e ressuspenso em 500 µl de solução de paraformaldeído (Sigma-Aldrich, EUA) diluído a 1% em PBS. Por fim, as amostras foram estocadas em geladeira, ao

abrigo da luz, até o momento da leitura no citômetro de fluxo, sendo este tempo para a análise de no máximo 24 horas.

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

4.5 Plasticidade das CTMTA

4.5.1 Diferenciação osteogênica

Foi utilizado meio indutor de diferenciação osteogênica (Gibco, Brasil). Foram plaqueadas $0,5 \times 10^3$ células em placas de 96 poços para realização da diferenciação osteogênica. O protocolo foi iniciado no momento em que as culturas atingiram aproximadamente 70-80% de confluência, e nesta ocasião, todo o meio de cultura foi substituído por um meio de indução próprio para diferenciação osteogênica; os controles de indiferenciação eram somente incubados com meio de cultura DMEM com 20% de SFB e 1% penicilina/estreptomicina. A placa foi mantida em estufa úmida a 37° C com 5% de CO₂ por 21 dias, sendo o meio trocado duas vezes por semana. Para visualizar a produção de íons cálcio pelas células tratadas e confirmar o protocolo de diferenciação óssea foi realizado o método de coloração por

Vermelho de Alizarina (Sigma-Aldrich, EUA). A solução de Alizarina foi preparada com a dissolução de 2g de corante em 100ml de água destilada sob agitação. O pH da solução foi ajustado a 4,2 com solução 1% de hidróxido de amônio.

Após 21 dias de incubação, o meio de diferenciação osteogênica foi removido e as células foram submetidas a duas lavagens com DPBS. Em seguida foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4% por 30 minutos. Após esta etapa, foram realizadas duas lavagens com DPBS e, posteriormente, as células foram coradas com a solução de Alizarina Red S (ph 4,2) por 3 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas por 3 vezes com DPBS, para posterior visualização e captura de imagens.

4.5.2 Diferenciação adipogênica

Foi utilizado meio indutor de diferenciação adipogênica (Gibco,Brasil). As células-tronco mesenquimais de tecido adiposo foram plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^3$ céls/poço em placas de 96 poços, e cultivadas até atingirem aproximadamente 70-80% de confluência. Após este período, foram incubadas por 7 dias em meio indutor próprio para diferenciação adipogênica. O meio de cultura foi trocado 2 vezes por semana. A diferenciação adipogênica foi confirmada pelo acúmulo de vacúolos lipídicos citoplasmáticos neutros pela coloração Oil Red O (Sigma-Aldrich, EUA).

Após o período de diferenciação, o meio indutor foi descartado, as células foram lavadas por duas vezes com DPBS e fixadas com

paraformaldeído 4%. Em seguida, as células foram coradas com a solução de Oil Red O por 15 minutos em temperatura ambiente. Foi feita a lavagem das culturas com DPBS por duas vezes a fim retirar o excesso de coloração. Em seguida, as placas de culturas foram visualizadas em microscópio de inversão. A solução estoque do corante foi preparada com 0,5 g de Oil Red O dissolvidos em 100 ml de isopropanol seguido de filtração. No momento das colorações foi preparada a solução de trabalho que consiste na mistura de 20 ml da solução estoque mais 30 ml de água destilada seguido de filtração.

4.6 Tratamento das CTMTA com os Oxisteróis

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

Cada oxisterol tinha pureza de aproximadamente 98% detectada por meio de GS/MS. Para todos os experimentos, uma solução estoque foi preparada a uma concentração de 10000 μ M em etanol absoluto. As concentrações usadas nos experimentos foram de 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M e 10 μ M.

Para os experimentos, as CTMTA foram plaqueadas em uma densidade de $1,5 \times 10^3$ células/cm² em triplicata, em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (3603- Corning, MA, USA) e incubadas nas concentrações de oxisteróis descritas acima. As concentrações de cada oxisterol foram diluídas no meio de cultura, seguido de incubação por 24 horas. Como controle positivo de morte celular (100% de morte) adicionou-se ao meio 30% de DMSO e como controle negativo foi adicionado apenas meio de cultura. No final do período experimental, vários parâmetros foram determinados.

4.6.1 Ensaio de viabilidade celular

As CTMTA foram plaqueadas em uma densidade de $1,5 \times 10^3$ células/cm² em triplicata, em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (3603- Corning, USA) e incubadas nas concentrações 100µM, 50µM, 25µM e 10µM. Após 24 horas, as células foram tratadas com 3-metiladenina (2249-25, BioVision, USA) em uma concentração de 10 mM por 2 horas em triplicata. Depois que a 3-metiladenina foi removida, os oxisteróis foram adicionados nas diferentes concentrações, e incubados por 24 horas. As CTMTA sem tratamento com 3-metiladenina foram submetidas a tratamento com oxisteróis por 24 horas. Após esta etapa, as células foram incubadas com 0,1 µg/mL Hoechst 33342 (H1399- Molecular Probes, USA) e 0,5 µl de iodeto de propídio (PI) (P3566- Molecular Probes, USA) por 15 minutos. O programa ImageXpress Micro high content screening system (Molecular Devices, USA) foi usado para determinar o número de células vivas e células mortas. Nove sítios por poço e

três poços por tratamento foram adquiridos. O programa Cell Scoring MetaXpress foi usado para analisar o número de células e a viabilidade celular. Para o cálculo do IC_{50} , os dados de sobrevivência foram avaliados por uma curva de ajuste com inclinação variável com o programa estatístico GraphPad Prism (GradPad Software, USA).

4.6.2 Detecção de apoptose e necrose

Para este ensaio, foi utilizado o kit Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit I (556420-BD Biosciences, USA). Foram utilizados 1 μ l de FITC Annexina V, 1 μ l de iodeto de propídio (PI) e 10X Tampão Annexina contendo 0,1 M HEPES/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM $CaCl_2$ que foi diluído em nove partes de água destilada. O procedimento experimental consistiu em lavar as células, com DPBS gelado, duas vezes e depois acrescentar o Tampão de Annexina V diluído 1x. Foi adicionada a mistura de Annexina V/PI nos poços da placa que, posteriormente, foi incubada a temperatura ambiente no escuro por 15 minutos. A análise foi realizada por Image X Press Micro High Content (Molecular Devices, USA), em no máximo 1 hora. Nove sítios por poço e três poços por tratamento foram adquiridos. O software Cell health MetaExpress foi utilizado para analisar a porcentagem de células em apoptose. As células coradas com Hoechst 33342 foram consideradas como células vivas. O processo apoptótico foi definido pela presença de anexina V ou anexina V/PI. As células marcadas apenas com PI foram consideradas como células necróticas.

4.6.3 Detecção da atividade da caspase 3/7

Em cada poço foi adicionado 0,5µl de substrato de caspase 3/7 (30029 - Biotium USA) e 0,1 µg/mL de Hoechst 33342, seguido de incubação a temperatura ambiente em campo escuro por 30 minutos. A fluorescência foi determinada usando ImageXpress. Foram adquiridos nove sítios por poço e três poços por tratamento. A atividade da caspase-3/7 foi determinada usando o software de contagem celular MetaXpress.

4.6.4 Detecção de Ki67 por imunofluorescência indireta

Para a realização do ensaio de imunofluorescência indireta para detecção de Ki67, primeiramente foi realizada a fixação das células para posteriormente realizar o processo de permeabilização das células. Para isso, foi retirado 100µl de meio de cultura de cada poço, seguido por duas lavagens de 100µl de DPBS. Em seguida, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% (P-6148 Sigma-Aldrich, USA) por 2 horas à 4°C. Após as células serem lavadas com DPBS, foi realizada a permeabilização das mesmas com solução de Triton X-100 à 0,1% (93443-SigmaAldrich, USA) a 4°C por 15 minutos, e bloqueada com 5% de BSA (A9418- Sigma Aldrich, USA) por 40 minutos a temperatura ambiente. Para investigar o processo de proliferação, as células foram incubadas “*overnight*” com o anticorpo Ki67-FITC na diluição 1:500 (560791- BD Biosciences, USA). Após esta etapa, o núcleo foi marcado com 0,1µg/mL de Hoechst 33342. A presença de células positivas para Ki67 foi determinada usando ImageXpress. Nove sítios por poço e três poços por

tratamento foram adquiridos. As células positivas para KI67 foram determinadas usando o software MetaXpress e analisadas pelo CellScoring.

4.6.5 Detecção de caspase 3 clivada por imunofluorescência indireta

Para realização do ensaio de imunofluorescência indireta para detecção da caspase-3 clivada, foi feita a fixação das células, que se iniciou pela retirada de 100µl de meio de cultura de cada poço, seguido por duas lavagens de 100µl de DPBS. Foram fixadas em paraformaldeído a 4% (P-6148 Sigma-Aldrich, USA) por 2 horas a 4°C. Após as células serem lavadas com DPBS, foi realizada a permeabilização das mesmas com solução de Triton X-100 a 0,1% (93443-SigmaAldrich, USA) a 4°C por 15 minutos, e bloqueada com 5% de BSA (A9418- Sigma Aldrich, USA) por 40 minutos a temperatura ambiente. Para investigar o processo de apoptose, as células foram incubadas “*overnight*” com o anticorpo caspase-3 clivada na diluição 1:500 (9664-Cellsignaling, USA). Após a incubação com caspase-3 clivada, foi feita uma nova incubação das células por 1 hora com um anticorpo secundário AlexaFluor 488 na diluição 1:1000 (A-11008- Molecular Probes, USA). Após esta etapa, o núcleo foi marcado com 0,1µg/mL de Hoechst 33342. A presença de células positivas para caspase-3 clivada foi determinada usando ImageXpress. Nove sítios por poço e três poços por tratamento foram adquiridos. As células positivas para, caspase-3 clivada foram determinadas usando o software MetaXpress.

4.6.6 Detecção de LC3b por imunofluorescência indireta

No ensaio de imunofluorescência indireta para detecção de LC3b, também foi realizada a fixação retirando os 100µl de meio de cultura de cada poço, seguido por duas lavagens de 100µl de DPBS, e fixação com paraformaldeído a 4% (P-6148 Sigma-Aldrich, USA) por 2 horas a 4°C. Após as células serem lavadas com DPBS, foi realizada a permeabilização das mesmas com solução de Triton X-100 à 0,1% (93443-SigmaAldrich, USA) à 4°C por 15 minutos, e bloqueada com 5% de BSA (A9418- Sigma Aldrich, USA) por 40 minutos a temperatura ambiente. Para investigar o processo de autofagia, as células foram incubadas “*overnight*” com os anticorpos LC3b diluídos a 1:200 (L10382-Molecular Probes, USA). Após a incubação com LC3b, foi feita uma nova incubação das células por 1 hora com um anticorpo secundário AlexaFluor 488 na diluição 1:1000 (A-11008- Molecular Probes, USA). Após esta etapa, o núcleo foi marcado com 0,1µg/mL de Hoechst 33342. As células tratadas com 40 µM de difosfato de cloroquina foram usadas como controle de autofagossomo. A presença de LC3b foi determinada usando ImageXpress. Nove sítios por poço e três poços por tratamento foram adquiridos. As células positivas para LC3b foram determinadas usando o software MetaXpress.

4.6.7 Extração de proteína celular e western blotting para LC3b e caspase-3

As CTMTA (1×10^6) foram tratadas com, (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol (diol) e colestane-3 α -5 β -6 α -triol (triol) nas concentrações onde foi demonstrado o processo de indução de apoptose (25 μ M, 50 μ M e 100 μ M) e o processo autofágico (50 μ M e 100 μ M). O difosfato de cloroquina (40 μ M) foi usado como controle de autofagia. Após 24 horas de tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e lisadas em 300 μ l de tampão de lise de fosfoproteínas (4mM de pirofosfato de sódio), 50 mM HEPES, 100 mMNaCl, 10 mM EDTA, 10 mMNaF, 2 mM NaVO₄ com 1 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, 5 μ g/ml leupeptina e 5 μ g/ml aprotinina). Após a sonicação por 15 segundos, as amostras foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos e centrifugadas a 15.230 x G a 4°C por 10 minutos. O lisado foi separado por SDS–PAGE (3 horas, 70 V) e eletrotransferência (2 horas, 100 V) para uma membrana Immobilon-P (IPVH00010- Millipore, USA) com o sistema de eletroforese Mini Protean II (Bio-Rad, USA) como descrito previamente por Xavier e colaboradores (2009). Os blots foram bloqueados em 1,0% de leite livre de gordura e marcados com os seguintes anticorpos policlonais que são: anti- β -actina (#4967) diluído 1:1000 e anti-LC3A/B (#12741) diluída 1:1000, (ambos da Cell Signaling Technology, USA) por 1 hora, a temperatura ambiente. O anticorpo β -actina foi usado como controle. O anticorpo secundário Amersham ECL com IgG marcado com a enzima peroxidase, foi adquirido por meio da GEhealthcare life sciences (NA934, USA) e diluído 1:2000. A imunoreatividade foi detectada

usando o software ImageQuant LAS 4000 (GEhealthcare life sciences, USA) e analisado com ImageQuant TL(GEhealthcare life sciences, USA).

4.6.8 Medida do potencial transmembrana mitocondrial

As CTMTA foram plaqueadas a uma densidade de $1,5 \times 10^3$ células/cm² em triplicata e tratadas com oxisteróis por 24 horas. Ao final do período experimental, as células tratadas foram incubadas com 50 nM TMRE (87917-Sigma Aldrich, USA) por 30 minutos a 37°C. O TMRE é um indicador de morte potenciométrico e catiônico, que se acumula preferencialmente na mitocôndria não energizada. O núcleo da célula foi corado com 0,1 µg/mL Hoechst 33342. A fluorescência do TMRE foi determinada usando ImageXpress. Nove sítios por poço e três poços por tratamento foram adquiridos. O potencial transmembranico mitocondrial foi determinado usando o software cell scoring MetaXpress.

4.6.9 Avaliação do ciclo celular

As células tratadas com os oxisteróis foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos. Após duas lavagens com DPBS, as células foram incubadas com 0,1µg/mL Hoechst 33342 por 15 min. O software ImageXpress foi usado para determinar o ciclo celular. Nove sítios por poço e três poços por tratamento foram adquiridos. O software Cell cycle MetaXpress foi usado para analisar as diferentes fases do ciclo celular.

4.6.10 Alteração na organização da F-actina

As alterações na organização da actina foram investigadas usando faloidina da Alexa Fluor 568 (A12380- Molecular Probes, USA). As células tratadas foram fixadas em uma solução de paraformaldeído a 4% por 2 horas. Após duas lavagens com DPBS, as células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,1% (93443–SigmaAldrich, USA) a 4°C por 10 minutos; em seguida foi feita uma incubação com 3 U/mL de faloidina Alexa Fluor 568 (A12380 - Molecular Probes, USA) em DPBS por 30 minutos. Após a lavagem com DPBS, o núcleo da célula foi marcado com 0,1 µg/mL Hoechst 33342. As placas foram lavadas duas vezes com DPBS e analisadas usando ImageXpress. Nove sítios por poço e três poços por tratamento foram adquiridos.

4.7 Análise Estatística

Os resultados são expressos como média $\pm$ DP de pelo menos três experimentos independentes, de cada amostra. As médias foram comparadas por análise de variância usando ANOVA, seguida do teste de Bonferrone post-hoc no programa estatístico GraphPad Prism (GradPad Software, EUA). Os valores de $p \leq 0.05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Citometria de fluxo

As CTMTA foram analisadas por citometria de fluxo com o intuito de caracterização imunofenotípica (figura 5). Conforme a tabela 2, as CTMTA apresentaram expressão acima de 90% para CD29, CD44 e CD105, exceto CTMTA-4, 8 e 9 (68,18%, 73.62% e 65,21 para CD44 respectivamente). Para os marcadores CD34, CD117, CD31, CD45, CD14 e CD80 a expressão dos antígenos foi abaixo de 5%, exceto CTMTA-1 (7,9% para CD31) e CTMTA-8 (8.78% para CD45). Desta forma foram utilizadas para os experimentos as linhagens CTMTA-1, 3, 5, 6 e 7.

Tabela 2: Caracterização imunofenotípica das CTMTA.

CTM	CD29	CD44	CD105	CD34	CD117	CD31	CD45	CD14	CD80
TA	%	%	%	%	%	%	%	%	%
1	96,6	100,0	99,0	0,7	0,6	7,9	4,6	0,7	0,5
3	96,2	97,7	93,9	0,7	0,7	1,3	1,4	0,5	0,7
4	94.86	68.18	93.34	0.87	0.77	0.93	1.38	0.48	0.51
5	99,5	97,9	99,7	1,5	1,8	1,9	1,8	1,7	1,2
6	99,8	97,7	99,9	1,3	1,5	2,0	3,8	1,2	1,2
7	99,1	90,4	99,7	1,0	1,3	1,4	0,9	1,6	0,6
8	88.82	73.62	97.64	1.66	3.04	2.12	8.78	1.71	1.72
9	93.05	65,21	95.18	0.85	0.97	1.04	1.42	0.46	0.58

Figura 5: Representação em forma de histograma dos marcadores positivos (CD29, CD44, CD90 e CD105) e negativos (CD31, CD34, CD35, CD45, CD80 e CD117)

5.2. Expressão dos genes de indiferenciação

Todas as CTMTA foram positivas na expressão dos genes de indiferenciação Oct-4, Sox-2 e Nanog pela técnica de RT-PCR (figura 6).

Figura 6: Expressão dos genes de indiferenciação OCT-4, Sox-2, Nanog e GUSB como gene endógeno por RT-PCR

5.3. Curva de crescimento

As células apresentaram um tempo médio de dobramento, isto é, o período que as células levaram para duplicar sua população, de 3,4 dias ou 82 ± 2 horas (figura 7) (tabela 3), sendo que a linhagem CTMTA-2 teve o menor tempo (2,2 dias).

Tabela 3: Tempo de dobramento em dias e horas.

Células	Dias	Horas
CTMTA-1	3,1	74,4
CTMTA-3	4,4	105,6
CTMTA-5	4	96
CTMTA-6	3,5	84
CTMTA-7	2,2	51,8
MÉDIA	3,4	82,4
DESVIO PADRÃO	0,7	18,6

Figura 7: Representação gráfica da curva de crescimento para cálculo do tempo de dobramento das células.

5.4. Diferenciação osteogênica

As células submetidas à incubação apenas com o meio de cultivo não apresentaram coloração avermelhada com Alizarina Red S (figura 8A), enquanto que as células tratadas com meio indutor de diferenciação osteogênica e fixadas e coradas com Alizarina Red S, apresentaram os depósitos de cálcio visualizados pela coloração vermelho intensa (figura 8B).

Figura 8: Diferenciação osteogênica das CTMTA. **A-** células cultivadas com meio DMEM contendo 20% de SFB e 1% de P/S coradas Alizarina Red S após 21 dias de incubação ; **B-** células cultivadas com meio indutor de diferenciação osteogênica coradas com Alizarina Red S após 21 dias de incubação com formação de depósitos de cálcio.

5.5. Diferenciação adipogênia

As células submetidas à incubação apenas com meio de cultivo não apresentaram coloração pelo Oil Red O (figura 9A), ao passo que as células incubadas com o 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: Diferenciação adipogênica das CTMTA. **A-** células cultivadas com meio DMEM contendo 20% de SFB e 1% de P/S coradas Oil red O após 7 dias de incubação ; **B-** células cultivadas com meio indutor de diferenciação adipogênica coradas com Oil Red O após 7 dias de incubação

5.6 Citotoxicidade dos Oxisteróis nas CTMTA

Os oxisteróis colestane-3 α -5 β -6 α -triol (triol), 3,5 colestane-7-ona (colestona), (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol (diol), 7 oxocolesterol-5-en-3-beta-il acetato (acetato) e 5 β -6 β epoxicoolesterol (epoxi) foram testados para citotoxicidade por 24 horas, utilizando o colesterol como controle, nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 μ M. O colesterol (figura 10A), colestona (figura 10B) e acetato (figura 10C) não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas.

O Epoxi apresentou citotoxicidade nas células CTMTA somente na maior concentração testada (100 μ M) de aproximadamente 10%. O IC 50 calculado pelo GraphPrism foi 258,62 μ M (figura 10D).

O diol também apresentou citotoxicidade, porém a partir da concentração de 50 μ M. Somente 25% das células estavam vivas quando utilizou-se 100 μ M. O IC₅₀ para o diol foi 76,95 μ M (figura 10E).

O oxisterol mais citotóxico entre os testados foi o Triol. Ele apresentou morte celular já na concentração de 25 μ M. Quando testado com 50 μ M apresentou 20% de viabilidade. Na concentração de 100 μ M somente 9% das células permaneciam vivas (figura 10F). O IC 50 para o triol foi 38,68 μ M.

Figura 10: Citotoxicidade dos oxisteróis após 24 horas de tratamento. Ensaio realizado por Hoerchst 33342 com PI. **A** - Colesterol controle; **B** - 3,5 colestane-7-ona (colestona); **C** - 7 oxocolesterol-5-en-3-beta-il acetato (acetato); **D** - 5β-6β epoxicoolesterol (epoxi); **E** - (3α-5β-6α)-colestane-3,6-diol (diol); **F** -colestane-3α-5β-6α-triol (triol). Análise realizado por Curve fit no GraphPad Prism

5.7 Estudo do Tipo de Morte Celular Induzida pelos Oxisteróis que Apresentaram Citotoxicidade após 24 horas de Incubação

5.7.1 Apoptose e necrose

O efeito do triol, diol e epoxi no tipo de morte celular foi avaliado usando o colesterol como controle. O processo de apoptose e necrose foi testado por meio do ensaio anexina V e PI, com o núcleo contrastado com Hoechst 33342, para a localização no sistema de imagem.

O colesterol e o epóxi não induziram apoptose e nem necrose (figura 11A e 11B).

O triol não promoveu apoptose nas concentrações 10 e 25 μ M; no entanto, em altas concentrações (50 μ M e 100 μ M), 49% e 26% das células estavam apoptóticas, respectivamente ($p < 0.001$) (figura 11C). O diol também não promoveu apoptose nas concentrações 10 e 25 μ M. Porém, nas concentrações de 50 e 100 μ M, houve apoptose (figura 11D).

Figura 11: Apoptose das CTMTA após 24 horas de tratamento com oxisteróis. Porcentagem das células com apoptose determinada pela externalização de fosfatidilserina. **A-** Colesterol como controle; **B-** 5β-6β-epoxi-colesterol (epoxi); **C-** colestane-3α-5β-6α-triol (triol); **D-** (3β,5α,6α)-colestane-3,6-diol (diol). Análise realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism

A necrose foi demonstrada pela presença de células marcadas com iodeto de propídio e ausência de marcação de Anexina V. O oxisteróis triol e diol na concentração de 100μM levou à presença de 34% (figura 12A) e 29% (figura 12B) de células necróticas, respectivamente ($p < 0.001$).

Outras concentrações e os outros oxisteróis não promoveram necrose.

Figura 12: Necrose das CTMTA após 24 horas de tratamento com oxisteróis. Porcentagem de células com necrose determinada pelo iodeto de propídio. **A-** colestane-3 α -5 β -6 α -triol (triol); **B-** (3 β ,5 α ,6 α)-colestane-3,6-diol. Análise realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism

5.7.2 Atividade da caspase 3/7 promovida pelos oxisteróis citotóxicos nas CTMTA

Para examinar melhor o mecanismo de citotoxicidade promovido pelos oxisteróis em CTMTA, foi investigada a atividade da caspase 3/7. A atividade da caspase-3/7 não foi alterada com o colesterol (figura 13A) e nem com o epoxi (figura 13B).

Figura 13 : Caspase 3/7 nas CTMTA após 24 horas de tratamento com oxisteróis. Porcentagem de células que apresentaram atividade de caspase 3/7. **A-** Colesterol controle; **B-** 5β-6β-epoxi-colesterol (epoxi); **C-** colestane-3α-5β-6α-triol (triol); **D-** (3β,5α,6α)-colestane-3,6-diol. Análise realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism

O triol levou à ativação da caspase 3/7 nas concentrações de 50μM e 100μM (figura 13C), enquanto que o mesmo efeito foi parecido com o diol a 100μM (figura 13D).

5.7.3 Presença da caspase-3 clivada no citoplasma das CTMTA após 24 horas de incubação com oxisteróis

A presença da caspase 3 clivada foi analisada apenas no triol e diol, uma vez que estes foram os oxisteróis que apresentaram atividade da caspase 3/7. Para isso foram utilizadas duas estratégias.

Primeiro, a presença da caspase 3 clivada nas células foi testada usando imunofluorescência. Para este experimento, o colesterol foi usado como controle e as concentrações testadas foram 10, 25, 50 e 100 μ M.

O colesterol não apresentou a presença de caspase 3 clivada em nenhuma concentração testada. O triol apresentou um aumento significativo de caspase 3 clivada apenas a 50 μ M ($p < 0.001$) e diol teve expressão aumentada a 100 μ M ($p < 0.001$) (figura 14).

Figura 14: Presença da caspase 3 clivada nas CTMTA após 24 horas de tratamento com colesterol, triol e diol. Porcentagem de células com a presença de caspase 3 clivada nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 μ M pelo ensaio de imunofluorescência. . Análise realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism

5.7.4 Detecção da concentração de caspase-3 clivada nas CTMTA por western blotting

A segunda estratégia foi quantificar a caspase 3 clivada por western blot (figura 15). Para este experimento, células não tratadas foram usadas como controle e as concentrações de 25, 50 e 100 μ M foram usadas. O triol a 25 e 50 μ M apresentou alta expressão de caspase 3 clivada ($p<0.001$) e a 100 μ M, assim como na imunofluorescência, as células apresentaram níveis basais de caspase 3 clivada. O diol teve um aumento significativo da caspase 3 clivada apenas na concentração de 100 μ M ($p<0.001$) (figura 16).

Figura 15: Caspase 3 clivada analisada por Western blot.

Figura 16: Presença de caspase 3 clivada nas CTMTA após 24 horas de tratamento com triol e diol. Relação entre caspase 3 clivada e β -actina das células tratadas com triol e diol nas concentrações 10, 25, 50 e 100 μ M pelo ensaio de Western blot. Análise realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism.

5.7.5 Estudo da autofagia como mecanismo de morte celular: inibição da morte celular por 3-Metiladenina

A morte celular por autofagia também foi investigada. Para demonstrar a morte celular por autofagia, o colesterol, triol e o diol nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 μM foram testados com e sem 3-Metiladenina (3-MA). O colesterol não levou à morte celular (figura 17A) enquanto que o triol levou à diminuição da morte celular com o tratamento de 3-MA na concentração de 50 μM ($p < 0.001$) (figura 17B) que indica morte celular por autofagia. O 3-MA não alterou a morte celular no tratamento das células com diol (figura 17C).

Figura 17: Autofagia nas CTMTA após 24 horas de incubação com oxisteróis. Células tratadas com e sem 3-MA por 2 horas e posteriormente com os oxisteróis nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 μM por 24 horas. A citotoxicidade foi avaliada por Hoechst 33342/Iodeto de propídio. **A-** colesterol controle; **B-** colestane-3 α -5 β -6 α -triol; **C-** (3 β ,5 α ,6 α)-colestane-3,6-diol (diol). Análise realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism.

5.7.6 Estudo da presença do autofagossomo no citoplasma celular

O anticorpo LC3b foi usado e a presença do autofagossomo foi medida nas concentrações de 10, 25 e 50 μM . O difosfato de cloroquina foi usado como controle de autofagia. Não foi observada a presença do anticorpo LC3b em células tratadas com colesterol e epoxi. O triol e o diol promoveram a formação do autofagossomo na concentração de 50 μM (36% e 15% das células, respectivamente – $p < 0.001$) (figuras 18A e 18B).

Figura 18: Autofagia nas CTMTA após 24 horas de incubação com oxisteróis. A autofagia foi determinada usando LC3b como marcador nas células tratadas com oxisteróis nas concentrações de 10, 25 e 50 μM por 24 horas. A citotoxicidade foi avaliada por Hoechst 33342/Iodeto de propídio. **A-** colestane-3 α -5 β -6 α -triol; **B-** (3 β ,5 α ,6 α)-colestane-3,6-diol (diol). Análise realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism

5.7.7 Estudo da clivagem do LC3b-I em LC3b-II

O triol e o diol induziram à transição de LC3B. O triol induziu um aumento da proporção de LC3b-II:LC3b-I na concentração de 50 μM , enquanto que o diol foi capaz de aumentar a 100 e 50 μM ($p < 0,001$).

Para interpretar os resultados corretamente, a conversão de LC3B-I para LC3B-II foi determinada na presença da cloroquina, um agente lisomotrópico (Modernelli *et. al.*, 2015). A cloroquina induziu um aumento nos níveis de LC3B-II no tratamento com 50 μ M de triol e 100 μ M de Diol ($p < 0.001$). Em conjunto, estes resultados demonstram que o triol e o diol promoveram um aumento da ativação do fluxo autofágico (figuras 19 e 20).

Figura 19: Autofagia nas CTMTA após 24 horas de incubação com colestane-3 α -5 β -6 α -triol (triol) e (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol (diol). Intensidade relativa da banda LC3b-II quantificada por análise densitométrica após o tratamento das células com triol e diol nas concentrações de 50 e 100 μ M por 24 horas. Análise realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism

Figura 20: Autofagia nas CTMTA após 24 horas de incubação com cholestan-3 α -5 β -6 α -triol (triol), (3 α -5 β -6 α)-cholestane-3,6-diol (diol). Imagem representativa do ensaio de western blot.

5.8 Estudo do Ciclo Celular das CTMTA após 24 horas de Tratamento com Oxisteróis

O ciclo celular foi avaliado pela intensidade de fluorescência do núcleo fixado com Hoechst 33342. O ciclo celular não foi afetado pelo tratamento com o colesterol (figura 21A), epoxi (figura 21B), triol (figura 21C) e diol (figura 21D), em nenhuma concentração testada.

Figura 21: Fases do ciclo celular das CTMTA. Efeito após 24 horas de incubação com oxisteróis. As fases do ciclo celular foram examinadas por Hoechst 33342. **A-** colesterol controle; **B-** 5 β -6 β -epoxi-colesterol (epóxi); **C-** colestane-3 α -5 β -6 α -triol (triol); **D-** (3 β ,5 α ,6 α)-colestane-3,6-diol (diol). Análise realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism

5.9 Estudo da Proliferação das CTMTA por Ki67 após 24 horas de Tratamento com Oxisteróis

A proliferação celular foi avaliada pela da expressão do Ki67 o qual não foi afetado pelo tratamento com o colesterol (figura 22A).

Figura 22: Proliferação das CTMTA com o marcador Ki67 após 24 horas de incubação com oxisterol. **A-** colesterol controle; **B-** 5β-6β-epoxi-colesterol (epoxi); **C-** colestane-3α-5β-6α-triol (triol); **D-** (3β,5α,6α)-colestane-3,6-diol (diol). Análise realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism

O triol, o diol e o epoxi promoveram a redução da expressão celular de Ki67 ($p < 0.001$). O triol foi o mais efetivo, por inibir a proliferação a baixas

concentrações (25 μ M) (figura 22C), seguido por diol (50 μ M) (figura 22D) e o epoxi (100 μ M) (figura 22B).

5.10 Alteração Mitochondrial Promovida pelos Oxisteróis nas CTMTA

O TMRE é um corante fluorescente catiônico e permeabilizante, que se acumula em mitocôndrias inativas, devido ao potencial negativo da membrana interna. Este corante não se acumula em mitocôndrias energizadas como aquelas das células apoptóticas. Este método foi usado para explorar os efeitos dos oxisteróis na dinâmica mitocondrial e também na disfunção mitocondrial das CTMTA. O potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi$ foi medido pela análise da intensidade do TRME nestas células.

O colesterol (figura 23A), epóxi (figura 23B) e o diol (figura 23D) não promoveram alteração mitocondrial ($\Delta\Psi$) em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 23: Potencial transmembrana mitocondrial das CTMTA após 24 horas de incubação com oxisteróis. O potencial transmembrana mitocondrial foi avaliado pelo TRME. **A-** colesterol controle; **B-** 5β-6β-epoxi-colesterol; **C-** colestane-3α-5β-6α-triol (triol); **D-** (3β,5α,6α)-colestane-3,6-diol. Análise realizada por Two-Way ANOVA no GraphPad Prism

O triol não alterou o potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$) nas concentrações de 10 e 25μM; no entanto, a 50 e 100μM, o triol promoveu uma despolarização mitocondrial, a qual é compatível com o tipo de morte celular causada pela apoptose ($p < 0.001$) (figura 23C).

No tocante à morfologia mitocondrial das CTMTA, o colesterol não promoveu alterações nas concentrações testadas, pois a mitocôndria

apresentou sua estrutura normal, alongada e tubular (figuras 24A, 24B, 24C e 24D)

O triol promoveu colorações alteradas nas mitocôndrias mesmo nas menores concentrações (10 e 25 μM) (figuras 24E e 24F); aumentou o número de mitocôndrias menores com estruturas marcadas na concentração de 50 μM (figura 24G) na maioria das células que perderam a coloração; e as células que permaneceram apresentaram mitocôndrias com manchas brilhantes; com 100 μM a mitocôndria não apresentou coloração (figura 24H). O diol e o epoxi não afetaram a mitocôndria nas concentrações de 10 μM (figura 24I e 24M) e de 25 μM (figuras 24J e 24N).

Com o diol a 50 μM (figura 24K) algumas mitocôndrias apresentaram alteração da coloração, mais intensa na concentração de 100 μM (figura 24L), nas concentrações de 100 e 50 μM o epóxi levou à presença de estruturas mitocondriais fragmentadas (figura 24O e 24P).

Figura 24: Marcação das mitocôndrias das CTMTA com TRME, após 24 horas de tratamento com os oxisteróis colestane-3 α -5 β -6 α -triol, (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol, 5 β -6 β -epoxi-colesterol e colesterol. Colesterol A-10 μ M, B-25 μ M, C-50 μ M e D-100 μ M; Colestane-3 α -5 β -6 α -triol E-10 μ M, F-25 μ M, G-50 μ M e H-100 μ M; (3 β ,5 α ,6 α)-Colestane-3,6-diol I-10 μ M, J-25 μ M, K-50 μ M e 100 μ M; 5 β -6 β -epoxi-colesterol M-10 μ M, N-25 μ M, O-50 μ M e P-100 μ M

5.11 Alterações na Organização da Actina das CTMTA promovidas pelos Oxisteróis

O grupo controle e as CTMTA tratadas apenas com o colesterol foram caracterizadas pela distribuição homogênea e alinhamento das fibras de actina. As células foram coradas uniformemente, mostrando a típica estrutura fibroblastóide (figura 25E, F, G e H).

As células tratadas com triol apresentaram uma estrutura citoplasmática, com bordas brilhantes e parecidas com a lamellipodia. Essas alterações passaram a ser mais evidentes com o aumento da concentração do triol (figura 25I, J, K e L), pois a área do citoplasma aumentou com a elevada fluorescência nas bordas da membrana. Outra característica interessante foi a diminuição da interação entre a membrana e as células, que se tornaram ainda mais distantes quando a concentração do triol foi aumentada.

O diol também alterou a morfologia das células (figuras 25M, N, O e P), pois a área citoplasmática aumentada e as células perderam a morfologia fibroblastóide.

A principal alteração promovida pelo epoxi foi o acúmulo de actina nas membranas. As células passaram a ser maiores, mas permaneceram em contato umas com as outras (figuras 25Q, R, S e T). Na concentração de 50 μ M (figura 25S), as células passaram a ser grandes e o acúmulo de actina próxima à membrana foi máximo.

Figura 25: Alteração na organização da actina das CTMTA após incubação com os oxisteróis colestane-3 α -5 β -6 α -triol, (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol, 5 β -6 β -epoxi-colesterol e colesterol. Controle A-10 μ M, B-25 μ M, C-50 μ M e D-100 μ M; Colesterol E-10 μ M, F-25 μ M, G-50 μ M e H-100 μ M; colestane-3 α -5 β -6 α -triol I-10 μ M, J-25 μ M, K-50 μ M e L-100 μ M; (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol M-10 μ M, N-25 μ M, O-50 μ M e P-100 μ M; 5 β -6 β -epoxi-colesterol Q-10 μ M, R-25 μ M, S-50 μ M e T-100 μ M

6 DISCUSSÃO

As CTMTA exibiram todas as características de células-tronco mesenquimais determinadas pela SITC, como aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, expressão dos genes de indiferenciação Oct-4, Sox-2 e Nanog, expressão dos marcadores CD29, CD44 e CD105 e expressão negativa para marcadores de membrana presentes em células-tronco hematopoiéticas (CD34 e CD117), células endoteliais (CD31) e leucócitos (CD45, CD14). As CTMTA-4, 8 e 9 apresentaram fraca expressão dos marcadores CD29, CD44, CD105; por isso, foram excluídas do estudo, porque não podiam ser consideradas populações homogêneas.

As CTMTA também apresentaram capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica. Em um estudo comparativo, Zhu *et al.* (2012) mostraram que as CTMTA apresentaram melhor taxa de proliferação do que as CTMMO, e ambas apresentaram potencial de diferenciação condrogênica, osteogênica, adipogênica, neurogênica e miogênica, além de se diferenciarem também em outras linhagens como cardiomiócitos, células progenitoras hematopoiéticas e endoteliais (Strem *et al.* 2005). A morte celular por apoptose em células-tronco mesenquimais pode desencadear danos progressivos ao tecido causando uma incapacidade de reparo no mesmo (Park *et al.*, 2011). Embora a proliferação e a diferenciação das células tronco mesenquimais tenham sido amplamente estudadas, há poucas informações sobre os mecanismos de morte celular e estresse oxidativo e como estes fatores podem interferir no potencial regenerativo destas células. O estresse oxidativo é

conhecido como um fator chave pró-apoptótico, que resulta de um excessivo acúmulo de ROS, o qual danifica diretamente a membrana, as proteínas e o DNA das células (Xu *et al.*, 2012). Entretanto, um estudo desenvolvido por Valle-Prieto e Conget (2010) mostrou que células-tronco mesenquimais de medula óssea apresentaram resistência ao estresse oxidativo. Por outro lado, algumas substâncias, sejam elas já utilizadas na medicina convencional ou em fase de investigação, foram descritas como exercendo citotoxicidade e estresse oxidativo nas CTMTA, como a fluoxetina, que é uma substância utilizada no tratamento da depressão (Sun *et al.*, 2015), e o quimioterápico paclitaxel (Choron *et al.*, 2015).

Algumas biomoléculas também são descritas na literatura como promotores de efeitos citotóxicos em células tronco. As ceramidas, que são moléculas que também apresentaram capacidade de indução de morte celular em células neoplásicas, diminuem a viabilidade celular, aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio, promovem o rompimento do potencial de membrana mitocondrial, induzem a liberação do citocromo c e promovem a ativação da caspase-3 em CTMTA (Park *et al.*, 2011). Em células progenitoras multipotentes de medula óssea de ratos adultos, o tratamento com LDL oxidada (LDLox) de modo dependente da dose e do tempo de tratamento, resultou na redução da população celular pela combinação da diminuição da proliferação e da apoptose das células (Chu *et al.*, 2011). Portanto, a LDLox inibiu a autorrenovação, umas das características mais marcantes das células-tronco. Por outro lado, a pré-incubação de células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos com HDL aumentou a viabilidade das células, reduziu o

índice de apoptose e diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio (Xu *et al.*, 2012).

Na apoptose induzida por LDLox, a hiperpolarização da membrana mitocondrial representa um evento necessário; a ativação da caspase-3 é o último evento. Isto foi previamente proposto em células linfóides e células intestinais Caco-2 (Giovannini *et al.*, 2002). A LDLox também induz apoptose mediada pela mitocôndria em células tumorais por provocar um aumento no potencial mitocondrial, seguido pela apoptose associada a despolarização (Sun *et al.*, 2013).

Dentre os componentes tóxicos da LDLox estão incluídos os oxisteróis (Yang *et al.*, 2012), que exibem numerosas atividades biológicas como inibição da proliferação celular e citotoxicidade, associada à indução de apoptose como descrito em um estudo em células progenitoras hematopoiéticas (Gregorio-King *et al.*, 2002). Diferentes oxisteróis podem ter efeitos citotóxicos e oxidativos, ou nenhum destes efeitos (Vejux *et al.*, 2008). Há muitas evidências que os oxisteróis contribuem na regulação de numerosas atividades biológicas como na diferenciação, na proliferação e no processo de morte celular (Nury *et al.*, 2013). Em células cancerígenas, os oxisteróis inibem a proliferação e induzem morte celular, embora eles tenham pouco ou nenhum efeito em células senescentes (Weille *et al.*, 2013). De fato, quando a frequência mitótica das células cancerígenas é reduzida, estas células diminuem a resposta aos efeitos dos oxisteróis, sugerindo que a toxicidade dos oxisteróis está relacionada à proliferação das células (Hwang, 1992).

Alguns oxisteróis são capazes de induzir a diferenciação das células tronco mesenquimais em linhagens específicas de osteoblastos. Estes oxisteróis, além de inibir a diferenciação adipogênica por diminuir a expressão de transcritos adipogênicos como o PPAR- γ , direcionam as células para a diferenciação osteogênica (Murdolo *et al.*, 2013; Moseti *et al.*, 2016). Naturalmente os oxisteróis osteogênicos, como o 22(S)-hidroxicolesterol e 20(S)-hidroxicolesterol, têm sido descritos por desencadear eventos que levam à diferenciação osteoblástica *in vitro* e formação óssea *in vivo* (Aghaloo *et al.*, 2007). Estes oxisteróis específicos também apresentam efeitos anti-adipogênicos (Johnson *et al.*, 2011). Entretanto, o colestane -3 β ,5 α ,6 β -triol promove apoptose em células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos e inibe a diferenciação adipogênica (Liu *et al.*, 2011). A combinação de oxisteróis pode aumentar a diferenciação osteoblástica das células (Kha *et al.*, 2004). Levando em consideração estes resultados, é claro que os efeitos dos oxisteróis na diferenciação osteoblástica são específicos e variam com diferentes oxisteróis.

Entre os oxisteróis que são biologicamente ativos, o 7-cetocolesterol é conhecido por induzir estresse oxidativo e morte celular. Um estudo desenvolvido por Leonarduzzi *et al.* (2006) mostrou que o oxisteról 7-cetocolesterol induziu apoptose em macrófagos, promovendo a ativação da caspase-3 e superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS). Este oxisterol está presente em altos níveis na LDLox, envolvida em vários processos fisiopatológicos. Os efeitos do 7-cetocolesterol em CTMTA foi descrito por Levy *et al.* (2013) onde o 7-cetocolesterol diminuiu a viabilidade

celular sem alterar o ciclo celular e promoveu aumento da apoptose, sendo que este modo de morte celular foi observado apenas em altas concentrações, sem alteração na atividade da caspase 3/7.

Neste trabalho foram descritos os efeitos do colestane-3 α -5 β -6 α -triol, do 3,5 colestane-7-ona, do (3 α -5 β -6 α)-colestane-3,6-diol, do 7 oxocolesterol-5-en-3-beta-il acetato e do 5 β -6 β epoxicoolesterol colestane-triol, na proliferação e morte celular das CTMTA. O colestona e o acetato não induziram morte celular e não afetaram a proliferação das células em nenhuma das concentrações testadas. O triol foi o mais efetivo promotor de morte celular (IC₅₀: 38.68 mM), seguido do diol (IC₅₀: 76.95 mM). A morte celular promovida por epoxi foi relativamente menor na última concentração testada (IC₅₀: 258.62 mM). Na literatura, o triol é conhecido por ser genotóxico (Cheng *et al.*, 2005), induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (Liu *et al.*, 2009), inibir a diferenciação osteoblástica e promover apoptose de células estromais de medula óssea (Liu *et al.*, 2005). O estudo desenvolvido por Ryan *et al.* (2005) mostrou que os oxisteróis 7 β -hidroxicoolesterol e colesterol-5 β ,6 β -epoxi induziram apoptose por via mitocondrial em células de linhagem monocítica U937. Dugas *et al.* (2009) mostraram que os oxisteróis 7 β -hidroxicoolesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicoolesterol apresentam efeitos citotóxicos, oxidativos, inflamatórios e angiogênicos em células retina ARPE-19. Além da apoptose, a geração de ROS mitocondrial também pode promover autofagia nas células. A autofagia pode ser induzida para ativar vias de sobrevivência ou morte, em resposta ao estresse oxidativo (Faroogi *et al.*, 2014). A oxiapoptofagia é uma definição utilizada por Nury e colaboradores para definir um complexo modo de

morte celular induzida por 7-cetocolesterol em células U937 e oligodendróцитos murinos, os quais incluem estresse oxidativo, apoptose e autofagia. Em estudo desenvolvido em monócitos, Nury *et.al.* (2013) mostrou que o 7-cetocolesterol induziu superprodução de ROS intracelular, diminuição do potencial transmembrana mitocondrial, ativação da caspase-3, condensação e/ou fragmentação do núcleo da célula, além de promover a conversão da proteína associada ao microtúbulo de cadeia leve 3 (LC3-I) para LC3-II que é característica de autofagia. Entretanto, 4 β -hidroxicoolesterol e 4 α -hidroxicoolesterol não apresentaram efeitos citotóxicos em oligodendróцитos, astrócitos, células de glioma e neuroblastoma, e nos oligodendróцитos e células de glioma mostraram efeitos citostáticos (Nury *et al.*, 2013). Além disso, outro estudo realizado por Nury e colaboradores (2015), mostrou que 7-cetocolesterol, 7 β -hidroxicoolesterol e 24(S)-hidroxicoolesterol induziram a diminuição da proliferação de oligodendróцитos, aumento da super-produção de ROS, ativação da caspase-3, redução de Bcl-2, condensação e fragmentação do núcleo e conversão de LC3-I para LC3-II.

A autofagia apresenta um papel crítico no controle da homeostase da função das células-tronco durante o envelhecimento, regeneração tecidual e reprogramação celular. A autofagia pode também participar do processo de proliferação e diferenciação celular (Pan *et al.*, 2013). Este tipo de morte celular tem sido observado como dependente do tipo de oxisterol e das concentrações testadas. O epóxi não aumentou apoptose e a necrose nas células-tronco de tecido adiposo. O triol e o diol levaram à ativação da caspase 3/7 e apoptose

das CTMTA em altas concentrações. Além disso, a necrose e a autofagia também foram observadas nestas células.

No presente estudo, a hiperpolarização da mitocôndria foi promovida pelo triol nas concentrações de 50 e 100 μ M, enquanto que as alterações na morfologia da mitocôndria apareceram em todas as concentrações. Os outros oxisteróis não afetaram a polarização da mitocôndria. Também foi descrito que a concentração aumentada do 7-cetocolesterol promoveu uma gradual alteração na morfologia das células-tronco derivadas de tecido adiposo, começando com uma diminuição da largura unidirecional das células, também nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, além de promover a diminuição na organização da actina e diminuir o contato intracelular (Levy et al., 2013). Estas alterações também foram descritas em células de músculo liso de ratos. O epoxi, o triol e o diol promoveram alterações na morfologia das células-tronco de tecido adiposo, por aumentar o volume do citoplasma deixando-a distante da morfologia fibroblastóide, além de promover alterações na organização da actina, que foram observadas mais pela ação do triol. A autorrenovação é uma das principais características das células-tronco mesenquimais. Isto envolve a proliferação acompanhada pela manutenção da multipotência. Para iniciar a autorrenovação, as células devem entrar no ciclo celular e se dividir. O triol foi o mais efetivo na diminuição da proliferação celular, seguido por diol e epoxy. Entretanto, não houve alteração no ciclo celular. Apesar de o triol inibir o processo de proliferação das células, ele não promoveu alteração no ciclo celular. Um estudo desenvolvido por Lim *et al.* (2003) mostrou que os oxisteróis 7 β -hidroxicoolesterol e 25-hidroxicoolesterol promoveram alteração no

ciclo celular das células THP-1 somente após 48 horas de tratamento, e com 72 horas essa alteração foi mais evidente. Neste estudo, o triol e o diol promoveram a inibição da proliferação das células sem, no entanto, alterar o ciclo celular, após tratamento de 24 horas; possivelmente esta alteração poderia ser verificada após uma incubação de 48 ou até 72 horas.

Estes resultados ajudam a entender o processo de morte celular promovidos pelos oxisteróis em células-tronco mesenquimais, além de contribuir no campo da medicina regenerativa, por elucidar como determinadas substâncias, moléculas e biomoléculas como os oxisteróis, podem promover alterações significativas nestas células, por promover a inibição da proliferação e provocar a indução de morte celular.

7 CONCLUSÃO

Com estes resultados, conclui-se que:

1. Os oxisteróis colestona e acetato não apresentaram citotoxicidade nas CTMTA.
2. O epoxi não induziu morte celular, no entanto inibiu a proliferação das CTMTA na maior concentração testada (100 μ M).
3. O triol foi oxisterol mais citotóxico e mais efetivo na indução de morte celular.
4. O diol também apresentou citotoxicidade e indução de morte celular, porém com menor intensidade quando comparado ao triol.
5. O triol e o diol apresentaram efetiva capacidade de inibir a proliferação celular nas concentrações de 50 e 100 μ M, porém o triol também promoveu este efeito na concentração de 25 μ M.
6. Os oxisteróis testados não promoveram alteração no ciclo celular, em nenhuma concentração testada.
7. O triol foi o único oxisterol que induziu alterações significativas nas mitocôndrias nas concentrações de 50 e 100 μ M.
8. O triol, diol e epoxi promoveram alterações morfológicas nas fibras de actina das CTMTA.

Os oxisteróis são capazes de promover um complexo modo de morte celular em CTMTA, incluindo apoptose, necrose, autofagia, além de diminuir a proliferação celular. Estes efeitos dependem do tipo de oxisterol e da sua concentração.

8. ANEXOS

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: AÇÃO DOS OXISTERÓIS NOS PROCESSOS DE PROLIFERAÇÃO, MORTE E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO.

Pesquisador Responsável: Sergio Paulo Bydlowski

Versão: 1

Pesquisador Executante: Suelen Feitoza Silva

CAAE: 51015315.2.0000.0068

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Orientador: Sergio Paulo Bydlowski

Instituição: HCFMUSP

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 14371

Número do Parecer: 1.348.935

Data da Relatoria: 02/12/15

Apresentação do Projeto: O projeto apresenta questões relevantes sobre a utilização e viabilidade de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo.

Objetivo da Pesquisa: O objetivo é claramente estipulado como teste dos efeitos dos oxisteróis sobre a diferenciação, proliferação e morte de células tronco mesenquimais originadas de tecido adiposo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os procedimentos experimentais utilizarão células em cultivo, que já se encontram em biorrepositório, não havendo novas intervenções em participantes de pesquisa nessa fase.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa tem condições de atingir seus objetivos sem intercorrências de natureza ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: A dispensa de TCLE é possível, havendo previsão de usos futuros do material do biorrepositório no TCLE inicial aplicado no momento da coleta, que deve ser apresentado juntamente com esse novo projeto que dele fará uso.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Recomendações: O pesquisador deve anexar ao presente projeto cópia do TCLE aplicado quando da coleta do material que ora se encontra no biorrepositório do LIM 31, conforme o artigo 15º da resolução 441.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Aprovado.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante o CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 07 de Dezembro de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accad M, Faraese RVJr, Cholesterol homeostasis: a role for oxysterols. *Current Biol.*, 1998, 8(7): 601-604.
- Aghaloo TL, Amantea CM, Cowan CM, Richardson JA, Wu BM, Parhami F, Tetradis S. Oxysterols enhance osteoblast differentiation in vitro and bone healing in vivo, *J. Orthop. Res.*, 2007, 25: 1488–1497.
- Arrieta CN, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cell. *Nature*, 2011, 12: 126-131.
- Baranowski A, Adams CW, High OB, Bowyer DB. Connective tissue responses to oxysterols. *Atherosclerosis*, 1982, 41(2-3): 255-266.
- Berry DC, Stenesen D, Zeve D, Graff JM. The developmental origins of adipose tissue. *Developmental*, 2013, 140(19): 3939-3949.
- Bonet ML, Ribot J, Palou A. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochem. Et Biophys. Acta*, 2012, 1821(1): 177-189.
- Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009, 31: 25-35.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987, 15;47(4):936-42.
- Carvalho ACC, Goldenberg RCS. Células-tronco mesenquimais: conceitos, métodos de obtenção e aplicações. São Paulo, Editora Atheneu, 2012.

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, 5: 46375-6393.

Choron RL, Chang S, Khan S, Villalobos MA, Zhang P, Carpenter JP, Tulenko TN, Liu Y. Paclitaxel impairs adipose stem cell proliferation and differentiation, *J Surg Res.*, 2015,196(2):404-15.

Choumerianou DM, Dimitriou H, Kalmanti M. Stem cells: promises versus limitations, *Tissue Engineering*, 2008, 14(1): 53-60.

Conrad C, Huss R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *J. of Surgical Res.*, 2005, 124(2): 201-208.

Copelan EA. Hematopoietic stem cell transplantation. *N. Engl. J. Med.*, 2006, 354: 1813-1826.

Chu L, Hao H, Luo M, Huang Y, Chen Z, Lu T, Zhao X, Verfaillie CM, Zweier JL, Liu Z. Ox-LDL modifies the behaviour of bone marrow stem cells and impairs their endothelial differentiation via inhibition of Akt phosphorylation, *J. Cell. Mol. Med.*, 2011, 15: 423–432.

Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*, 2015, 6:472-485.

Dugas B, Charbonnier S, Baarine M, Ragot K, Delmas D, Ménétrier F, Lherminier J, Malvitte L, Khalfaoui T, Bron A, Creuzot-Garcher C, Latruffe N, Lizard G. Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: cytoprotective

effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. *Eur J Nutr.*, 2010;49(7):435-446.

Farooqi AA, Fayyaz S, Hou MF, Li KT, Tang JY, Chang HW. Reactive oxygen species and autophagy modulation in non-marine drugs and marine drugs. *Mar Drugs*. 2014;12(11):5408-24

Francesco DF, Ricci G, Andrea F, Nicoletti GF, Ferraro GA. Human adipose stem cell: from bench to bed-side. *Tissue Engineering*, 2015, 0: 1-13.

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

Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.*, 2007, 100(9): 1249-1260.

Gimble JM, Bunnell BA, Frazier T, Rowan B, Shah F, Porch CT, Wu X. Adipose-derived stromal/ stem cells. *Organogenesis*, 2013, 9(1): 3-10.

Giovannini C, Matarrese P, Scazzocchio B, Sanchez M, Masella R, Malorni W. Mitochondria hyperpolarization is an early event in oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in Caco-2 intestinal cells, *FEBS Lett.*, 2002 523: 200–206.

Gregorio King CC, Collier FM, Bolton KA, Ferguson M, Hosking JB, Collier GR, Kirkland MA. Effect of oxysterols on hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.*, 2002, 30(7): 670-678.

Higley NA, Taylor SL. The steatotic and cytotoxic effects of cholesterol oxides in cultured L cells. *Biochem. Int.*, 1987, 14(1): 71-84.

Horwitz EM, Le Blanck K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2005, 7(5): 393-395.

Hwang PL. Inhibitors of protein and RNA synthesis block the cytotoxic effects of oxygenated sterols. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1136: 5–11

Johnson JS, Meliton V, Kim WK, Lee KB, Wang JC, Nguyen K, Yoo D, Jung ME, Atti E, Tetradis S, Pereira RC, Magyar C, Nargizyan T, Hahn TJ, Farouz F, Thies S, Parhami F. Novel oxysterols have pro-osteogenic and antiadipogenic effects in vitro and induce spinal fusion in vivo. *J. Cell Biochem.*, 2011, 112: 1673–1684.

Labat ML, Stem cells and the promise of eternal youth: embryonic versus adult stem cells. *Biomed. Pharmacother*, 2001, 55: 179-185.

Leonarduzzi G, Poli G, Sottero B, Biasi F. Activation of the mitochondrial pathway of apoptosis by oxysterols, *Frontiers in Bioscience*, 2007, 12: 791-799.

Leonarduzzi G, Vizio B, Sottero B, Verde V, Gamba P, Mascia C, Chiarpotto E, Poli G, Biasi F. Early involvement of ROS overproduction in apoptosis induced by 7-ketocholesterol. *Antioxid. Redox Signal*, 2006, 8(3-4): 375-380.

Levy D, Ruiz JL, Celestino AT, Silva SF, Ferreira AK, Isaac C, Bydlowski SP. Short-term effects of 7-ketocholesterol on human adipose tissue mesenchymal stem cells in vitro, *Biochem Biophys Res Commun.*, 2014, 446(3):720-5.

Li TS e Marbán E. Physiological levels of reactive oxygen species are required to maintain genomic stability in stem cell. *Stem Cells*, 2010, 28(7): 1178-85.

Lim HK1, Kang HK, Yoo ES, Kim BJ, Kim YW, Cho M, Lee JH, Lee YS, Chung MH, Hyun JW. Oxysterols induce apoptosis and accumulation of cell cycle at G(2)/M phase in the human monocytic THP-1 cell line. *Life Sci.*, 2003, 72(12):1389-99.

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, *Chem. Biol. Interact.*, 2009, 179: 81-87.

Liu H, Yuan L, Xu S, Wang K, Zhang T, Cholestane -3 β , 5 α , 6 β -triol inhibits osteoblastic differentiation and promotes apoptosis of rat bone marrow stromal cells, *J. of Cellular Biochem.*, 2005, 98: 198-208.

Liu J, Cao L, Finkel T. Oxidants, metabolism, and stem cell biology. *Free Radic. Biol. Med.*, (2011) 51: 2158–2162.

Lordan S, Mackrill JJ, O'Brien NM. Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. *J. Nutrit. Biochem*, 2009, 20: 321-336.

Majno G and Joris I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. *Amer. J. of Pathol.*, 1995, 146(1): 3-15.

Modernelli A, Naponelli V, Troglio MG, Bonacini M, Ramazzina I, Bettuzzi S, Rizzi F, EGCG antagonizes Bortezomib cytotoxicity in prostate cancer cells by an autophagic mechanism, *Sci Rep*, 2015, 5: 15270.

Moseti D, Regassa A, Kim WK. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, 17, 1-24.

Murdolo G, Bartolini D, Tortoioli C, Piroddin M, Luliano L, Galli F. Lipokines and oxysterols: Novel adipose-derived lipid hormones linking adipose dysfunction and insulin resistance. *Free Radical Biology and Med.*, 2013, 65: 811–820.

Naseem SM, Heald FP. Cytotoxicity of cholesterol oxides and their effects on cholesterol metabolism in cultured human aortic smooth muscle cells. *Biochem. Int.*, 1987, 14(1): 71-84.

Nedergaard J, Golozoubova V, Mathias A, Asadi A, Jacobson A, Cannon B. UCP-1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochym. et Biophys. Acta (BBA) – Bioenerg.*, 2001, 1504(1): 82-106.

Nishikawa SI, Jakt LM, Era T. Embryonic stem-cell culture as tool for developmental cell biology, *Nature*, 2007, 8: 502-507.

Nury T, Zarrouk A, Mackrill JJ, Samadi M, Durand P, Riedinger JM, Doria M, Vejux A, Limagne E, Delmas D, Prost M, Moreau T, Hammami M, Delage-Mourroux R, O'Brien NM, Lizard G. Induction of oxiaapoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7 β -hydroxycholesterol-, or 24(S)-hydroxycholesterol: Protective effects of α -tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3) *Steroids*. 2015 ;99:194-203.

Nury T, Samadi M, Zarrouk A, Riedinger JM, Lizard G. Improved synthesis and in vitro evaluation of the cytotoxic profile of oxysterols oxidized at C4 (4 α - and 4 β - hydroxycholesterol) and C7 (7-ketocholesterol, 7 α - and 7 β -hydroxycholesterol) on cells of the central nervous system. *Europ. J. Med. Chem.*, 2013, 70: 558-567.

Nury T, Zarrouk A, Vejux A, Doria M, Riedinger JM, Delage-Mourroux R, Lizard G. Induction of oxiaapoptophagy, a mixed mode of cell death associated with oxidative stress, apoptosis and autophagy, on 7-ketocholesterol-treated 158N murine oligodendrocytes: impairment by α -tocopherol. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2014, 446(3):714-719.

Olkkonen VM, Béaslas O, Nissila E. Oxysterols and their cellular effectors, *Biomolecules*, 2012, 76-103.

Ong WK and Sugii S, Adipose-derived stem cells: Fatty potentials for therapy. *The Inter. J. of Biochemistry and Cell Biology*, 2013, 45: 1063-1086.

Pan H, Cai N, Li M, Liu GH, Belmonte JCI. autophagic control of cell 'stemness'. *EMBO Mol. Med.*, 2013, 5: 327–331.

Panini SR, Sinensky MS. Mechanisms of oxysterol-induced apoptosis, *Current Opin. In Lipidol.*, 2001, 12: 529-533.

Park JY1, Kim MJ, Kim YK, Woo JS. Ceramide induces apoptosis via caspase-dependent and caspase-independent pathways in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Arch Toxicol.*, 2011, 85(9):1057-65.

Park SG, Kim JH, Xia Y, Sung JH, Generation of reactive oxygen species in adipose-derived stem cells: friend or foe? *Expert Opin Ther Targets*, 2011, 15(11): 1297-1306.

Peet DJ, Janowski BA, Mangelsdorf DJ. The LXRs: a new class of oxysterols receptors. *Current Opin. Genet. Dev.*, 1998, 8(5): 571-575.

Poulson R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. *J. of Pathology*, 2002, 197: 441-456.

Raff M. Adult stem cell plasticity: Fact or Artifact? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2003, 19: 1-22.

Ràfols ME, Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol. Y Nutri.*, 2013, 922(3), 1-13.

Ryan L, O'Callaghan YC, O'Brien NM. The role of the mitochondria in apoptosis induced by 7 β -hydroxycholesterol and cholesterol-5 β ,6 β -epoxide, *Br J Nutr.*, 2005, 94(4):519-25.

Robey PG. Stem cells near the century mark. *J. Clin Invest Thorofare*. 2000. 105(11): 1489-1491.

Ruiz JLM, Fernandes LR, Levy D, Bydlowski SP, Interrelationship between ATP-binding cassette transporters and oxysterols, *Biochemical Pharmacology*, 2013, (86): 80-88.

Sachs PC, Francis MP, Zhao M, Brumelle J, Rao RR, Elmore LW, Holt SE. Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites, *Cell Tissue Res.* , 2012, 349(2): 505-515.

Salvador JA, Carvalho JF, Neves MA, Silvestre SM, Leitao AJ, Silva MM, Sa e Melo ML, Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds, *Nat Prod Rep*, 2013, 30: 324-374.

Santamaria-Fojo S, Remaley AT, Neufeld EB, Brewer HBJr. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J. Lipid Res.*, 2001, 49(9): 1339-1345.

Spann NJ, Glass CK, Sterols and oxysterols in immune cell function, *Nature Immunology*, 2013, 14(9): 893-900.

Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells, *Keio J. Med.*, 2005, 54(3): 132-141.

Sun K, Deng W, Zhang S, Cai N, Jiao S, Song J, Wei L. Paradoxical roles of autophagy in different stages of tumorigenesis: protector for normal or cancer cells. *Cell Biosci.*, 2013, 3: 35.

Sun BK, Kim JH, Choi JS, Hwang SJ, Sung JH. Fluoxetine Decreases the Proliferation and Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Int J Mol Sci.*, 2015,16(7):16655-68.

Kha HT, Basseri B, Shouhed D, Richardson J, Tetradis S, Hahn TJ, Parhami F. Oxysterols regulate differentiation of mesenchymal stem cells: pro-bone and anti-fat, *J. Bone Miner. Res.*, 2004, 19: 830–840.

Um HD. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. *Oncotarget*, 2015, 7(5): 5193-5203.

Valle-Prieto A, Conget PA, Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cell Dev.*, 2010, 19(12): 1885-1893.

Vejux A, Malvitte L, Lizard G, Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis, *Braz. J. of Med. And Biologic. Res.*, 2008, 41: 545-556.

Vogel G. Can old cells learn new tricks? *Science Washington*. 2000. 287: 1418-1419.

Wang LD, Waggars A. Dynamic niches in the origination and differentiation of hematopoietic stem cells, *Nature*, 2011, 12: 643-655.

Weille J, Fabre C, Bakalara N. Oxysterols in cancer cell proliferation. *Biochem. Pharmacol.*, 2013, 86: 154-160.

Wong J, Quinn CM, Brown AJ, SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR. *Biochem. J.*, 2006, 400: 485-491.

Xavier CP, Lima CF, Preto A, Seruca R, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C, Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells, *Cancer Lett*, 2009, 281: 162-170.

Xu J, Qian J, Xie X, Lin L, Zou Y, Fu M, Huang Z, Zhang G, Y. Su Y, Ge J, High density lipoprotein protects mesenchymal stem cells from oxidative stress-induced apoptosis via activation of the PI3 K/Akt Pathway and suppression of reactive oxygen species, *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, 17104–17120.

Yang H, Mohamed AS, Zhou SH. Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. *Lipids Health Dis.*, 2012, 11: 85.

Zhu X, Du J, Liu G, The comparison of multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived mesenchymal stem cell, *Clin. Lab.*, 2012, 58(9-10): 897-903.