

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA**

**JULIANA SAMPAIO SILVA**

**Análise da ação da C6-ceramida em células-tronco  
mesenquimais derivadas de tecido adiposo em cultura**

**São Paulo  
2023**

**JULIANA SAMPAIO SILVA**

**Análise da ação da C6-ceramida em células-tronco mesenquimais derivadas  
de tecido adiposo em cultura**

**Versão Corrigida**

(Resolução CoPGr 6018/11, de 13/10/2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Doutor 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  
2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Juliana Sampaio  
Análise da ação da C6-ceramida em células-tronco  
mesenquimais derivadas de tecido adiposo em cultura  
/ Juliana Sampaio Silva. -- São Paulo, 2023.  
Tese (doutorado) -- 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.Células-tronco mesenquimais  
2.Morte celular 3.Autofagia 4.Apoptose 5.Necrose  
6.Ceramidas 7.Espécies reativas de oxigênio 8.Ciclo  
celular

USP/FM/DBD-321/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

**Nome:** SILVA, Juliana Sampaio

**Título:** Análise da ação da C6-ceramida em células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo em cultura

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

**Aprovado em:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

### **Presidente da banca**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho à minha mãe, Zorilda Sampaio Rocha, às minhas tias, Marinês Sampaio Rocha e Marivalda Sampaio Rocha, a meu tio, José França da Rocha e a minha prima-irmã Natalia França da Rocha, os quais me apoiaram durante a realização desse trabalho e aos pacientes que doaram as amostras.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador e amigo, prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski, agradeço a oportunidade que me foi dada, a chance de aprender e principalmente conviver com o senhor. Agradeço por todos os ensinamentos, momentos compartilhados e a forma como fui acolhida. Aprendi muito com o senhor. Tenho só a dizer meu muito obrigada!

À Dra. Débora Levy, amiga, professora e companheira de trabalho, agradeço o recebimento e acolhimento no laboratório, por cada momento compartilhado, pelos ensinamentos científicos e de vida. Aprendi muito com você, cada aprendizado me levou a amadurecer e crescer como profissional e principalmente como pessoa. Tenho só a dizer meu muito obrigada!

À minha família que me apoiou e acompanhou durante toda a trajetória na realização desse trabalho, em especial as pessoas a quem dedico este trabalho. Tenho só a dizer meu muito obrigada!

À amiga Linah Akemi Fukuya, agradeço a amizade, ensinamentos e todos os momentos compartilhados.

À Gleiciele Alice Vieira Silva, pela amizade, apoio, momentos compartilhados, ensinamentos.

Aos amigos do Grupo de Lípidos, Oxidação e Biologia Celular do Laboratório de Imunologia do Inor HC-FMUSP, Dra. Cadiele Oliana Reichert, Dr. Fábio Alessandro de Freitas, Me. Priscila de Lima Barros e Me. Leonardo Rokita de Rosa, agradeço toda a ajuda, aprendizado, momentos compartilhados, conselhos, apoio e ensinamentos. Tenho só a dizer meu muito obrigada!

Ao Dr. Bruno Butturi, ao Prof. Dr. Marco Kawamura Demange, à Me. Beatriz Araújo Oliveira, agradeço a colaboração na obtenção e caracterização das células-tronco mesenquimais utilizadas neste trabalho.

Às amigas Sandra Maria Monteiro, Simone Regina dos Santos, Andreia Cristina Kazue Kuramoto, por todo apoio, amizade, momentos de descontração e auxílio na realização dos experimentos. Tenho só a dizer meu muito obrigada!

Aos Prof. Dr. Edécio Cunha Neto, Profa. Dra. Verônica Porto Carreiro Vasconcellos Coelho, Dr. João Paulo Nunes pela colaboração com anticorpos e primers para realização dos experimentos deste estudo.

À minha banca de qualificação, composta pela Profa. Dra. Juliana Pereira, Dra. Walcy Paganelli Rosolia Teodoro e Dr. Rodrigo Pinheiro Araldi, agradeço as ideias e sugestões para melhoria deste estudo.

À Zelita Aparecida de Jesus Queiroz e Solange Carrasco agradeço a amizade e por todo ensinamento e conhecimento compartilhados.

À Dra. Thaís Martins de Lima por todo ensinamento e conhecimento compartilhados.

A todos do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunidade Celular e Laboratório de Imunologia Clínica e alergia: Prof. Dr. Jorge Kalil, Profa. Dra. Luiza Guglielmi, Profa. Dra. Keity Souza Santos, Carlos Sérgio Viggiani, Cesar Manuel Remuzgo Ruiz, Samar Freschi de Barros, Selma Aliotti Palácios, Helcio Rodrigues, Olga Emy Morita, Marcelo Gomes Barrocal, Filipe Marques, Claudia Borba Rosales Savioli, Ricardo Zaniratto da Costa Fernandes, Washington Robert da Silva, Greyce Luri Sasahara, Rafael Ribeiro Almeida, Karina Rodrigues Blanez, Raquel Elaine Alencar, Maria Lucia Aparecida Carnevale Marin, Jair Muro Martins, Laila Lima, Renata Pereira de Souza, Suellen Estrada, Fernanda Rosa Alegria, Marici Rached, Lilian Nascimento, Raimunda Maria de Oliveira (*in memoriam*), Elaine Lopes da Silva, Laylson Cardoso Silva, Luiz Roberto M. Mundel, Janaína Baptista Alves, Gerlândia Neres Pontes, Fernanda Castro J. Vilalva, Amanda Rodrigues Fernandes de Camargo, Ivete Ramos, Fernando Ramon Zilinski, Celia Junko Yamaguti, Laylson Cardoso Silva, Ludmila Vieira Sambiase, Lidiane Bispo Cardoso, Michelle Campos de Matos, Sonia Romero da Silva, Viviane Castro de Araújo, André Kenji Honda, Ana Lochabel Soares Moretti e Vivian Leite de Oliveira, Raquel Vieira, Jhosiane Yukari Magawa, Ariane Cesario Lima, Anne Karoline Rocha Medrado Ventura, Safiri de Paiva Alves, Jamille Ramos de Oliveira, Karla Deysiree Alcântara Silva, Giuliana Xavier de Medeiros, Celso Magnun Oliveira, Amanda Melato e Tamires Lopes Silva de Oliviera. Tenho só a dizer meu muito obrigada!

À Profa. Dra. Myrthes Anna Maragna Toledo Barros, ao Prof. Dr. Edécio Cunha Neto e à Dra. Keity Souza Santos agradeço por me aceitarem como aluna do programa de aperfeiçoamento em ensino – PAE da FMUSP e principalmente por todo o aprendizado e conhecimento transmitido durante o período de estágio.

À Angélica Belém de Sousa e Rose Cler Ferreira, secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, agradeço todo o apoio e auxílio durante o doutorado.

Aos pacientes que doaram suas amostras para que esse estudo pudesse ser realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço o financiamento e bolsa de estudos concedidos durante a realização deste estudo.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Medicina Regenerativa (INCT - Regenera) pelo financiamento do projeto.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos (INCT - FCx) pelo financiamento do projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste estudo, minha formação como profissional e pessoa. Muito obrigada!

*Nunca estás sozinho ou desamparado, a força que guia as estrelas guia-te também.*

**Shrii Shrii Anandamurti**

## RESUMO

Silva JS. Análise da ação da C6-ceramida em células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo em cultura [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

As ceramidas são consideradas lipídios bioativos, com mecanismo de ação derivado da ligação lipídio-lipídio ou lipídio-proteína, com capacidade de agir em vias de sinalização. Porém, sua característica hidrofóbica dificulta a sua utilização *in vivo*. A utilização de análogos de cadeia curta solúveis em solventes orgânicos, como a C6-ceramida, a qual a célula é permeável, torna possível sua utilização em estudos celulares. As células-tronco mesenquimais (CTM) são utilizadas como modelos em diversos estudos, como aqueles que investigam os mecanismos de morte celular. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação biológica da C6-ceramida exógena nas células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTMTA), assim como os processos celulares de alguns tipos de morte celular (apoptose, necrose e autofagia) e proteínas envolvidas nessa ação. Foram utilizadas 5 linhagens de CTMTA que foram incubadas com diferentes concentrações de C6-ceramida (10 a 150  $\mu\text{M}$ ) pelo período de 24 horas para avaliação da citotoxicidade. A C6-ceramida levou à morte celular de forma dose-dependente, com IC50 de 62,90  $\mu\text{M}$ . O processo de apoptose foi observado nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$ , (19,87 %), 50  $\mu\text{M}$ , (26,82 %) e 75  $\mu\text{M}$ , (90,51 % das células em apoptose), enquanto que a necrose estava presente em 9,49 % das células na concentração de 75  $\mu\text{M}$ . Houve alteração do ciclo celular, com aumento da quantidade de células na fase G0/G1 na concentração de 50  $\mu\text{M}$  e com aumento de fase S e diminuição da fase G2/M na concentração de 75  $\mu\text{M}$ . Houve perda do potencial transmembranar mitocondrial em concentrações que variaram de 25 a 75  $\mu\text{M}$  e da conformação do citoesqueleto observada pelas proteínas F-actina e vimentina. Outro evento constatado foi a inibição da autofagia em 75  $\mu\text{M}$ . Foi observada a modulação positiva de proteínas que fazem parte da via de bloqueio da autofagia em 50  $\mu\text{M}$ , sendo as proteínas 4EBP1 e Akt, positivas em 27,96 % e 11,04 % das células, respectivamente. Além das proteínas de bloqueio, foram avaliadas proteínas indutoras, Beclin-1 e LC3, que diminuíram com as concentrações de 50 e 75  $\mu\text{M}$  de C6-ceramida. Ao mesmo tempo, foi observado acúmulo de organelas ácidas e da proteína p62. Por fim, houve aumento da produção de ROS e do nível de glutathiona oxidada nas concentrações de 50 e 75  $\mu\text{M}$  de C6-ceramida. Conclui-se que a C6-ceramida aplicada às CTMTA em cultura, pelo período de 24 horas, induziu apoptose e necrose, inibiu a autofagia, levou à perda do potencial transmembranar mitocondrial, além de perturbar o estado redox das células.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais. Morte celular. Autofagia. Apoptose. Necrose. Ceramidas. Espécies reativas de oxigênio. Ciclo celular.

## ABSTRACT

Silva JS. Analysis of the action of C6-ceramide on mesenchymal stem cells derived from adipose tissue in culture [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo”; 2023.

Ceramides are considered bioactive lipids, with a mechanism of action derived from the lipid-lipid or lipid-protein bond, with the ability to act in signaling pathways. However, its hydrophobic characteristic hinders its use *in vivo*. The use of short-chain analogues soluble in organic solvents, such as C6-ceramide, which the cell is permeable, makes its use in cellular studies possible. Mesenchymal stem cells (MSC) are used as models in several studies, such as those investigating the mechanisms of cell death. The present study aimed to evaluate the biological action of exogenous C6-ceramide on adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADSCs), as well as the cellular processes of some types of cell death (apoptosis, necrosis and autophagy) and proteins involved in this action. Five ADSCs strains were used and incubated with different concentrations of C6-ceramide (10 to 150  $\mu\text{M}$ ) for a period of 24 hours to evaluate cytotoxicity. C6-ceramide led to cell death in a dose-dependent manner, with an IC<sub>50</sub> of 62.90  $\mu\text{M}$ . The process of apoptosis was observed at concentrations of 25  $\mu\text{M}$ , (19.87 %), 50  $\mu\text{M}$ , (26.82 %) and 75  $\mu\text{M}$ , (90.51 % of cells undergoing apoptosis), while necrosis was present in 9.49% of cells at a concentration of 75  $\mu\text{M}$ . There was a change in the cell cycle, with an increase in the number of cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase at a concentration of 50  $\mu\text{M}$  and with an increase in the S phase and a decrease in the G<sub>2</sub>/M phase at the concentration of 75  $\mu\text{M}$ . There was loss of mitochondrial transmembrane potential at concentrations ranging from 25 to 75  $\mu\text{M}$  and of the cytoskeletal conformation observed by F-actin and vimentin proteins. Another event observed was the inhibition of autophagy at 75  $\mu\text{M}$ . A positive modulation of proteins that are part of the autophagy blocking pathway was observed in 50  $\mu\text{M}$ , with proteins 4EBP1 and Akt, positive in 27.96% and 11.04% of the cells, respectively. In addition to blocking proteins, inducer proteins, Beclin-1 and LC3, were evaluated, which decreased with concentrations of 50 and 75  $\mu\text{M}$  of C6-ceramide. At the same time, accumulation of acidic organelles and p62 protein was observed. Finally, there was an increase in ROS production and in the level of oxidized glutathione at concentrations of 50 and 75  $\mu\text{M}$  of C6-ceramide. It is concluded that C6-ceramide applied to ADSCs in culture, for a period of 24 hours, induced apoptosis and necrosis, inhibited autophagy, led to loss of mitochondrial transmembrane potential, in addition to disturbing the redox status of cells.

Keywords: Mesenchymal stem cells. Cell death. Autophagy. Apoptosis. Necrosis. Ceramides. Reactive oxygen species. Cell Cycle.

## LISTA DE FIGURAS

Assunto	Pág
<b>Figura 1:</b> Síntese de ceramidas por meio de duas vias: <i>de novo</i> e “ <i>Salvage pathway</i> ”. Adaptado de Kurz <i>et al.</i> , 2019.....	31
<b>Figura 2:</b> Esquema do processo de autofagia. O fagóforo engolfa os componentes que precisam ser degradados e a proteína LC3 participa do alongamento de sua membrana. Após a membrana ser alongada e se fechar ao redor dos componentes temos a formação do autofagossomo. Esse por sua vez se funde com o lisossomo e ocorre a formação do autolisossomo. A proteína LC3 é dissociada e os componentes são degradados. Adaptada de Invitrogen, 2010.....	38
<b>Figura 3:</b> Análise da citotoxicidade da C6-ceramida após 24 horas de incubação. Ensaio realizado por Hoechst 33342 com Iodeto de Propídio. Análise realizado por <i>Curve fit</i> no <i>software GraphPad Prism 8</i> .....	54
<b>Figura 4:</b> Gráfico da porcentagem de CTMTA em apoptose após 24 horas de incubação com C6-ceramida, determinado pela externalização de fosfatidilserina marcada com Anexina-V e núcleos celulares marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por <i>One-Way ANOVA</i> e pós-teste Bonferroni no <i>software GraphPad Prism 8</i> . * $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$ , *** $p < 0.001$ .....	55
<b>Figura 5:</b> Gráfico da porcentagem de CTMTA em necrose após 24 horas de incubação com C6-ceramida, determinado por Iodeto de Propídio e núcleos celulares marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por <i>One-Way ANOVA</i> e pós-teste Bonferroni no <i>software GraphPad Prism 8</i> * $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$ , *** $p < 0.001$ .....	55
<b>Figura 6:</b> Gráfico da porcentagem de CTMTA com caspase 3/7 ativada após 24 horas de incubação com C6-ceramida, determinada por <i>CellEvent Caspase-3/7 Green</i> e núcleos celulares marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por <i>One-Way ANOVA</i> e pós-teste Bonferroni no <i>software GraphPad Prism 8</i> * $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$ , *** $p < 0.001$ .....	56
<b>Figura 7:</b> Gráfico do ciclo celular das CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida, os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por <i>One-Way ANOVA</i> e pós-teste Bonferroni no <i>software GraphPad Prism 8</i> * $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$ , *** $p < 0.001$ .....	57
<b>Figura 8:</b> Gráfico da quantidade de vesículas marcadas com LC3B-FP em CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida, os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por <i>One-Way ANOVA</i> e pós-teste Bonferroni no <i>software GraphPad Prism 8</i> * $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$ , *** $p < 0.001$ .....	58
<b>Figura 9:</b> Fotomicrografias representativas das vesículas marcadas com LC3B-FP (Verde) e núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul) das CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. <b>A:</b> Controle; <b>B:</b> 10 $\mu\text{M}$ ; <b>C:</b> 25 $\mu\text{M}$ ; <b>D:</b> 50 $\mu\text{M}$ de C6-ceramida.....	58

- Figura 10:** Gráfico da porcentagem de CTMTA positivas após 24 horas de incubação com C6-ceramida, determinada pela marcação de LC3B-FP (autofagia), externalização de fosfatidilserina (Anexina-V, apoptose) e núcleos celulares marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ..... 59
- Figura 11:** Fotomicrografias representativas da proteína LC3B-FP (Verde), Anexina-V (Vermelho) e núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul) das CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. **A:** Controle; **B:** 10  $\mu$ M; **C:** 25  $\mu$ M; **D:** 50  $\mu$ M; **E:** 75  $\mu$ M de C6-ceramida..... 60
- Figura 12:** Gráfico da intensidade de fluorescência das organelas ácidas das CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida, determinada pela marcação com corante fluorescente LysoTracker® LC3B-FP e núcleos celulares marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ..... 61
- Figura 13:** Fotomicrografias representativas das organelas ácidas marcadas com corante fluorescente LysoTracker®-FP (Vermelho) e núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul) das CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. **A:** Controle; **B:** 10  $\mu$ M; **C:** 25  $\mu$ M; **D:** 50  $\mu$ M de C6-ceramida..... 61
- Figura 14:** Gráfico da porcentagem de CTMTA positivas para 4EBP1 (pT36/pT45, mTORC1) após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ..... 62
- Figura 15:** Gráfico da porcentagem de CTMTA positivas para Akt (pS473, mTORC2) após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ..... 63
- Figura 16:** Fotomicrografias representativas das proteínas 4EBP1 (pT36/pT45, mTORC1) (Verde) e Akt (pS473, mTORC2) (Vermelho) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul). **A:** Controle com meio de cultura somente; **B:** 10 $\mu$ m; **C:** 25 $\mu$ m; **D:** 50 $\mu$ m de C6-ceramida..... 63
- Figura 17:** Gráfico da intensidade de fluorescência de CTMTA positivas para Beclin-1 após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ..... 64
- Figura 18:** Gráfico da intensidade de fluorescência de CTMTA positivas para Bcl-2 após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8*..... 65
- Figura 19:** Fotomicrografias representativas das proteínas Beclin-1 (Verde) e Bcl-2 (Vermelho) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Núcleos

marcados com Hoechst 33342 (Azul). **A:** Controle com meio de cultura somente; **B:** 10µm; **C:** 25µm; **D:** 50µm de C6-ceramida..... 65

**Figura 20:** Gráfico da intensidade de fluorescência de CTMTA positivas para p62 após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ..... 66

**Figura 21:** Fotomicrografias representativas da proteína p62 (Vermelho) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul). **A:** Controle com meio de cultura somente; **B:** 10 µM; **C:** 25 µM; **D:** 50 µM de C6-ceramida..... 67

**Figura 22:** Gráfico da intensidade de fluorescência nuclear das CTMTA positivas para Survivina após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8*..... 68

**Figura 23:** Gráfico da intensidade de fluorescência citoplasmática de CTMTA positivas para Survivina após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8*..... 68

**Figura 24:** Fotomicrografias representativas da proteína Survivina (Verde) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul). **A:** Controle com meio de cultura somente; **B:** 10 µM; **C:** 25 µM; **D:** 50 µM de C6-ceramida..... 69

**Figura 25:** Gráfico da porcentagem de CTMTA positivas para Survivina após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8*..... 69

**Figura 26:** Fotomicrografias representativas da proteína F-actina (Verde) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul). **A:** Controle com meio de cultura somente; **B:** 10 µM; **C:** 25 µM; **D:** 50 µM de C6-ceramida..... 70

**Figura 27:** Fotomicrografias representativas das proteínas F-actina (Verde) e Vimentina (Vermelho) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul). **A:** Controle com meio de cultura somente; **B:** 10 µM; **C:** 25 µM; **D:** 50 µM de C6-ceramida..... 71

**Figura 28:** Gráfico da intensidade de fluorescência do reagente TMRE nas mitocôndrias das CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ..... 72

- Figura 29:** Fotomicrografias representativas das mitocôndrias coradas com TMRE (Vermelho) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul). **A:** Controle com meio de cultura somente; **B:** 10  $\mu$ M; **C:** 25  $\mu$ M; **D:** 50  $\mu$ M de C6-ceramida..... 72
- Figura 30:** Gráficos da expressão gênica relativa dos genes mitocondriais MFN1, MFN2, OPA1, DRP1, MT-CYTB, MT-ND1 e o gene de referência HPRT1 foram quantificados a partir da mensuração do mRNA das CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA e pós-teste Bonferroni no software GraphPad Prism 8 \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ..... 73
- Figura 31:** Gráfico da porcentagem de CTMTA positivas para produção intracelular de ROS após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ..... 74
- Figura 32:** Gráfico da intensidade de luminescência relativa à quantificação do teor de glutathiona total (GSH+GSSG) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8*..... 75
- Figura 33:** Gráfico da intensidade de luminescência relativa à quantificação do teor de glutathiona oxidada (GSSG) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ..... 76
- Figura 34:** Gráfico da intensidade de luminescência relativa à razão entre a quantidade glutathiona reduzida e glutathiona oxidada (GSH/GSSG) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ..... 76
- Figura 35:** Representação da ação da C6-ceramida nas CTMTA, sendo as setas em cor verde indicam aumento, setas em cor vermelha indicam diminuição e setas em azul modulação positiva da via de sinalização. A C6-ceramida levou o aumento da proteína p62, das organelas ácidas, diminuição de proteínas indutoras (Beclin-1 e LC3) e modulação positiva de proteínas que interagem com outras proteínas associadas com o bloqueio da ativação do processo de autofagia, sendo a mensuração das proteínas 4EBP1 e Akt (envolvidas com as vias de sinalização das proteínas mTORC1 e mTORC2, respectivamente), a soma desses resultados indicam inibição da autofagia. Por outro lado, ocorreu perda do potencial transmembranar mitocondrial, aumento da produção de ROS e de glutathiona oxidada, diminuição da razão entre glutathiona total e oxidada, que mensura a proporção do teor de glutathiona reduzida e aumento de caspase 3/7. Logo, esses dados sugerem indução de apoptose, que pode ter sido atenuada pela formação de canais de ceramida nas membranas, que aumentam sua permeabilidade..... 83

## LISTA DE TABELAS

<b>Assunto</b>	<b>Pág</b>
<b>Tabela 1</b> Anticorpos utilizados para analisar as proteínas por imunofluorescência indireta.....	46
<b>Tabela 2</b> Gene, sequência de iniciadores, eficiência e concentração.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS

- AIF - Fator indutor de apoptose
- AMPK - *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*
- ANOVA - Análise da variância
- Apaf-1 - *Apoptosis Protease Activating Factor-1*
- Atg - *Autophagy-related proteins*
- ATV - Associação de tripsina e versene
- BAK - *Bcl-2 homologous antagonist killer*
- BAX - *Bcl-2-associated X protein*
- Bcl-2 - *B-cell lymphoma*
- BID - *BH3 interacting domain death agonist*
- BIRC5 - *Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Protein Repeat-Containing 5*
- CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio
- CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
- CD - *Cluster of differentiation*
- cDNA - *Complementary DNA*
- CERT - Proteínas transportadoras de ceramida (CERT)
- Cq - *Cycle of quantification*
- CTM – Células-tronco mesenquimais
- CTMTA – Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo
- CTs – Células-tronco
- DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*
- DEPC - Água tratada com dietil-pirocarbonato
- DISC - Complexo Sinalizador Indutor de Morte
- DMEM-LOW - *Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose*
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DPSB - *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

DRP1 - *GTPase dynamin-related protein 1*

FADD - Fas associada com a proteína do domínio de morte

FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*

GCS - Glucosilceramida sintase

GFP - *Green fluorescent protein*

GSH - *Reduced Glutathione*

GSH+GSSG - *Total Glutathione*

GSSG - *Oxidized Glutathione*

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

HOCl - Ácido hipocloroso

*HPRT1 - Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*

IC<sub>50</sub> - *Inhibitory Concentration 50*

iFATS - *The International Fat Applied Technology Society*

iPSC - *Induced Pluripotent Stem Cells*

LC3 - *Protein 1A/1B-light chain 3*

MFN1 - Mitofusina 1

MFN2 - Mitofusina 2

MOMP - *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*

MPTP - *Mitochondrial Permeability Transition Pore*

mRNA – RNA mensageiro

MT-CYTB - *Mitochondrially encoded cytochrome b*

MT-ND1- *Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 1*

mTORC - *Mammalian target of rapamycin*

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NCDD - *Nomenclature Committee on Cell Death*

Neu5Ac - Ácido N-acetilneuramínico

O<sub>2</sub> - Oxigênio

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Superóxido

O<sub>3</sub> - Ozônio

OH<sup>-</sup> - Hidroxila

ONOO<sup>-</sup> - Peroxinitrato

OPA1 - *Mitochondrial dynamin like GTPase*

PBS - Solução Tampão de Fosfatos

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PE - Fosfatidiletanolamina

PI - Iodeto de propídio

PI3KC3 - *Class III phosphatidylinositol (PI)3-kinase*

RLU - *Relative light units*

RNA - Ácido ribonucleico

ROS - *Reactive Oxygen Species*

S1P - Esfingosina-1-fosfato

SPT - Palmitoiltransferase

SVF - *Stroma vascular fraction*

TGF β tipo I - *Transforming Growth Factor-beta Type I*

TMRE - *Tetramethylrhodamine, ethyl ester*

TNFR1 - Receptor do fator de necrose tumoral 1

TNFα - Fator de necrose tumoral alfa

TRADD - Receptor do fator de necrose tumoral tipo 1 associado a proteína do domínio de morte

TRAIL - *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

ULK - *Unc-51-like kinase 1*

Δψ<sub>m</sub> - Potencial transmembranar mitocondrial

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>2.OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3.REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>25</b>
3.1. Células-tronco.....	25
3.1.1. Células-tronco Mesenquimais de tecido adiposo.....	26
3.2. Esfingolipídios.....	28
3.3. Ceramidas.....	30
3.4. Morte celular.....	32
3.4.1. Necrose.....	32
3.4.2. Apoptose .....	33
3.4.3. Autofagia .....	34
3.4.3.1. Proteínas envolvidas na autofagia.....	37
3.5. Espécies reativas de oxigênio e Glutaciona.....	39
<b>4.MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
4.1. Casuística.....	42
4.1.1. Cultura celular.....	42
4.2. Incubação das linhagens com C6-ceramida .....	43
4.3. Viabilidade celular e cálculo do IC50 .....	43
4.4. Análise de Apoptose e Necrose.....	44
4.4.1. Apoptose e Necrose por Anexina-V/PI.....	44
4.4.2. Análise da caspase 3/7 .....	44
4.5. Autofagia.....	45
4.5.1. Quantificação das organelas ácidas por meio do reagente LysoTracker®.....	45
4.6. Detecção de proteínas por imunofluorescência indireta.....	46
4.7. Avaliação do potencial transmembranar mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) por TRME .....	47
4.8. Análise e obtenção do RNA e cDNA das CTMTA após incubação com C6-ceramida.....	48
4.8.1. Extração do RNA total .....	48
4.8.2. Tratamento com DNase.....	49
4.8.3. Síntese do DNA complementar (cDNA) .....	49
4.8.4. Análise dos genes mitocondriais .....	49
4.9. Ensaio de ROS ( <i>Reactive Oxygen Species</i> ) .....	51
4.10. Quantificação da glutaciona celular total e oxidada por luminescência.....	52
4.11. Ciclo Celular.....	53
4.12. Análise Estatística.....	53
<b>5.RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
5.1. Citotoxicidade da C6-ceramida nas CTMTA.....	54
5.2. Apoptose e Necrose.....	54
5.3. Análise de caspase 3/7.....	56
5.4. Ciclo celular.....	56
5.5. Autofagia, marcação com Anexina-V e LysoTracker®.....	57
5.6. Análise da expressão das proteínas 4EBP1 (pT36/pT45, mTORC1) e Akt (pS473, mTORC2) .....	62
5.7. Análise da expressão das proteínas Beclin-1 e Bcl-2.....	64
5.8. Análise da expressão da proteína p62.....	66
5.9. Análise da expressão da proteína Survivina.....	67
5.10. Análise da organização citoplasmática da proteína F-actina e vimentina.....	70
5.11. Avaliação do potencial transmembranar mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) por TRME.....	71

5.12. Análise dos genes mitocondriais <i>MFN1</i> , <i>MFN2</i> , <i>OPA1</i> , <i>DRP1</i> , <i>MT-CYTB</i> e <i>MT-ND1</i> .....	73
5.13. Análise da presença do ROS ( <i>Reactive Oxygen Species</i> ) intracelular.....	73
5.14. Quantificação da glutatona celular total e oxidada por luminescência.....	74
<b>6.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>7.CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>8.TRABALHOS PUBLICADOS.....</b>	<b>85</b>
<b>9.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>
<b>10.ANEXOS.....</b>	<b>98</b>

# 1.INTRODUÇÃO

---

As ceramidas são consideradas lipídios bioativos, com mecanismo de ação por meio da ligação lipídio-lipídio ou lipídio-proteína, tem a capacidade de agir em vias de sinalização e interromper o ciclo celular (HANNUN; OBEID, 2008; KURZ *et al.*, 2019; MEEUSEN *et al.*, 2018). Além disso, são uma parte integral da membrana celular, consideradas essenciais à estabilidade da membrana e pertencentes a uma família de esfingolipídios que apresenta como constituição uma esfingosina ligada de maneira covalente a um ácido graxo com várias funções metabólicas (SUN *et al.*, 2008; KURZ *et al.*, 2019; ZANIERI *et al.*, 2020). É descrito que as ceramidas tem ação antiproliferativa, pró-apoptótica, capacidade de induzir necrose, estresse bioenergético, senescência, crescimento e diferenciação celular e oncogênese (SUN *et al.*, 2008; GUENTHER *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2010; BIKMAN *et al.*, 2011; MENCARELLI; MARTINEZ-MARTINEZ, 2013; ZANIERI *et al.*, 2020). Apesar da variedade de funções celulares que as ceramidas podem apresentar, há algumas propriedades que dificultam seu uso em estudos. Por exemplo, suas características hidrofóbicas; mas, como solução para esse obstáculo há análogos de cadeia curta solúveis em solventes orgânicos, como a C6-ceramida, que é permeável à célula (VILLENA *et al.*, 2008; SUKUMARAN *et al.*, 2013). Assim, a utilização da C6-ceramida vem sendo ampliada em muitas áreas, principalmente na oncológica por sua capacidade de induzir apoptose e mesmo aumentar a sensibilidade aos quimioterápicos em células cancerígenas (KIM *et al.*, 2001; YU *et al.*, 2010; KORBELIK *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2015; QIU *et al.*, 2020). Embora tenham muitos dados envolvidos com a ação da C6-ceramida em câncer, há evidências, também, da sua capacidade em produzir ROS, alterar as mitocôndrias e levar à apoptose em células estromais da córnea humana (RIZVI *et al.*, 2011). Ou seja, a utilização da C6-ceramida deve ser ampliada e explorada em diferentes tipos de células e campos de pesquisa, principalmente aqueles relacionados à engenharia tecidual que utilizam como modelos células-tronco adultas (PARK *et al.*, 2011). Logo, no presente estudo foram utilizadas as células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTMTA) como modelo para avaliar a ação da C6-ceramida.

As CTMTA têm características comuns de células-tronco mesenquimais (CTM), que são obtidas, também, a partir de outras fontes como medula óssea, placenta; entre outras, a indiferenciação, autorrenovação e multipotência (BYDLOWSKI *et al.*, 2009; KALRA;

TOMAR 2014; ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019). Essas características favorecem o uso dessas células como modelo de estudos e o tecido adiposo, como fonte, dispõe de grande quantidade (PITTENGER *et al.*, 1999; FRASER *et al.*, 2006). São poucos os dados relacionados à ação da C6-ceramida nas CTMTA, principalmente sua ação biológica envolvida com diferentes processos de morte celular, como apoptose, necrose e autofagia.

Para entender como esses processos ocorrem nas células é fundamental saber os preceitos e características associadas a eles. Como a apoptose, que mantém a homeostase celular e é classificada como morte celular programada, tem sua ação por meio de duas vias chamadas de extrínseca, mediada por receptores de morte, e intrínseca, mediada pela ação da mitocôndria (FINK; COOKSON, 2005; ELMORE, 2007). Já a necrose é um tipo de morte celular causada de forma acidental, de maneira passiva ou ainda pode decorrer de perturbações ambientais que levam à inflamação (FINK; COOKSON, 2005; DE FREITAS *et al.*, 2021). Além dos dois processos celulares já citados, há a autofagia que é ativada pela privação nutricional ou pode agir como mecanismo de sobrevivência das células em resposta a estresse, hipóxia e baixa disponibilidade de fatores de crescimento (JUNG *et al.*, 2010; DALBY *et al.*, 2010; GUMP; THORBURN, 2011; HU *et al.*, 2020). A autofagia conta com as seguintes etapas: sequestro do componente que será degradado, a degradação e geração de aminoácidos e/ou peptídeos resultantes da degradação (MIZUSHIMA, 2007).

Avaliar os mecanismos básicos das células frente a exposição a uma molécula é o ponto inicial de muitas pesquisas *in vitro*, principalmente aquelas com potencial uso terapêutico. Nesse sentido, o presente estudo testou a hipótese de que a C6-ceramida exógena seria capaz de modular respostas associadas à morte celular nas CTMTA. Ou seja, entender os mecanismos envolvidos como resposta diante da exposição das CTMTA com a C6-ceramida.

## **2.OBJETIVOS**

---

Avaliar a ação biológica da C6-ceramida exógena nas células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, e quais processos de morte celular (apoptose, necrose e autofagia) e proteínas correspondentes estão envolvidos com essa ação.

## 3. REVISÃO DA LITERATURA

---

### 3.1. Células-tronco

De acordo com a sua capacidade de diferenciação (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019), as células-tronco (CTs) podem ser classificadas em quatro tipos distintos: 1) totipotentes: podem se diferenciar em qualquer tipo celular embrionário e extraembrionário (exemplo: zigoto) (CONDIC, 2014; ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019); 2) pluripotentes: são capazes de originar todos os tipos celulares, formam os três folhetos germinativos e se diferenciam em quase todos os tipos de tecidos, com exceção dos tecidos extraembrionários (exemplo: massa interna do blastocisto) (TESAR, 2016; KALRA; TOMAR 2014; ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019); 3) multipotentes: são capazes de se diferenciar em poucos tipos celulares, ou seja, já estão comprometidas com uma determinada linhagem celular específica (exemplo: célula hematopoiética diferenciada); 4) unipotentes: apresentam a capacidade de se diferenciar em apenas um tipo celular, sendo essa responsável pela manutenção celular, formando um tipo específico de célula (exemplo: dermatócitos) (KALRA; TOMAR, 2014; ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019). Além disso, dependem de vias de sinalização e sua fonte de origem (embrionária ou adulta) para que se tornem especializadas e tenham a capacidade de autorrenovação.

CTs embrionárias são aquelas encontradas apenas nos embriões na fase de blastocisto, ou seja, na fase de desenvolvimento em que não ocorreu a implantação no útero (AVASTHI *et al.*, 2008). Essas células são classificadas como pluripotentes, já que apresentam alta capacidade de diferenciação e podem dar origem a células pertencentes aos três folhetos embrionários: endoderme, mesoderme e ectoderme, ou seja, originar qualquer tipo celular do corpo (KELLER, 2005; AVASTHI *et al.*, 2008). Porém, não têm a capacidade de formar os tecidos extraembrionários, como a placenta (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019). Na pesquisa, as CTs embrionárias que são diferenciadas *in vitro* para tipos celulares neurais, sofrem mudanças fenotípicas que recapitulam o desenvolvimento embrionário (BIEBERICH, 2011). Por outro lado, é possível promover a indução de células com diferenciação terminal às células pluripotentes novamente (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019). Esse processo de reprogramação direta converte células somáticas diferenciadas em linhagens denominadas de células-tronco pluripotente induzida, do termo em inglês *Induced Pluripotent Stem Cells* (iPSC), que podem ser diferenciadas em todos os tipos celulares de um organismo (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019).

As CTs adultas são encontradas em diversos tecidos após o desenvolvimento embrionário, como, por exemplo, medula óssea, sangue, fígado, cordão umbilical, placenta, polpa dentária, tecido adiposo, etc (KALRA; TOMAR 2014). Ao contrário das CTs embrionárias que tem função de originar os tecidos, as CTs adultas atuam na manutenção celular, repondo células mortas e regenerando tecidos lesionados (KALRA; TOMAR 2014). Logo, as CTs adultas são imprescindíveis para a homeostase tecidual. Devido a essas características, o potencial uso das CTs adultas nas áreas de medicina regenerativa e engenharia de tecidos vem sendo muito estudado (PARK *et al.*, 2011).

As CTs adultas são classificadas como multipotentes e têm a capacidade de autorrenovação limitada, quando comparada com as CTs embrionárias. O processo de divisão dessas células pode ser simétrico ou assimétrico (RAMAIAH *et al.*, 2013), ou seja, uma célula-mãe dá origem a duas células-filhas iguais ou uma célula-mãe dá origem a células-filhas iguais ou diferentes da qual lhes originou, respectivamente (BYDLOWSKI *et al.*, 2009; RAMAIAH *et al.*, 2013). Para que as CTs adultas sejam classificadas como CTM (células-tronco mesenquimais), alguns critérios foram estabelecidos pela *International Society for Cytotherapy* e devem ser seguidos: (i) aderência ao plástico; (ii) capacidade de diferenciação em tipos celulares específicos (osteogênico, adipogênico e condrogênico); (iii) ser positiva para os marcadores CD105, CD73 e CD90 e negativa para os marcadores CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR (BYDLOWSKI *et al.*, 2009; HORWITZ *et al.*, 2005; ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019).

### **3.1.1. Células-tronco Mesenquimais de tecido adiposo**

Uma fonte promissora para obtenção de CTM é o tecido adiposo, cujas células mais abundantes são os adipócitos, especializados no acúmulo de lipídios (RÀFOLS, 2014). Porém, a capacidade de autorrenovação dessa fonte sofre influência da idade e grau de obesidade do doador, entre outros fatores (BUNNELL, 2021).

No corpo, o tecido adiposo pode ser encontrado sob duas formas: tecido adiposo marrom e tecido adiposo branco.

I – O tecido adiposo marrom tem função termogênica e é abundante em recém-nascidos (RÀFOLS, 2014; SHUKLA *et al.*, 2020). Além disso, apresenta vários vacúolos e mitocôndrias no citoplasma (RÀFOLS, 2014; GIMBLE *et al.*, 2013).

II - O tecido adiposo branco é a principal forma de armazenamento de energia no corpo, protege órgãos vitais e funciona como isolante térmico (RÀFOLS, 2014; SHUKLA *et al.*, 2020). O tecido adiposo branco apresenta um único vacúolo grande no citoplasma onde os

lipídios são armazenados para quando ocorrer demanda energética (RÀFOLS, 2014; GIMBLE *et al.*, 2013). Além disso, o tecido adiposo branco é abundantemente encontrado no corpo de adultos em inúmeras regiões: subcutânea (abdômen, coxas, nádegas), intestino, rins, retroperitoneal, gônadas, coração, intramuscular, medula óssea, face, retro-orbital e perivascular (RÀFOLS, 2014; FRIGOLET; GUTIÉRREZ-AGUILAR, 2020).

Em sua composição, podemos encontrar no tecido adiposo, os adipócitos maduros e a fração estroma-vascular (SVF de *stroma vascular fraction*). O SVF é composto por: tecido conjuntivo, células endoteliais, células musculares lisas, fibroblastos, linfócitos B e T, macrófagos, pré-adipócitos, células mieloides, pericitos e células-tronco mesenquimais, ou seja, essa última são células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMTA) (ZUK *et al.*, 2002; YOSHIMURA *et al.*, 2006; GIMBLE *et al.*, 2013). Estas últimas recebem essa denominação de acordo com o estabelecido pela *The International Fat Applied Technology Society* (iFATS) (GATHIER *et al.*, 2016). Além disso, o tecido adiposo é uma fonte rica e de fácil acesso para obtenção das CTMTA, ou seja, com intervenção mínima, como por meio da lipoaspiração, tornando sua utilização promissora na clínica e em terapias baseadas em células (YOSHIMURA *et al.*, 2006; BAER, 2020).

CTMTA primárias são constituídas por subpopulações de células estromais/tronco e células precursoras, ou seja, composta por um grupo misto e heterogêneo de células (BAER, 2020). Essas células são classificadas como CTM multipotentes devido à sua capacidade de diferenciação em vários tipos celulares, como: adipócitos, osteócitos, condrócitos, células neurais, cardiomiócitos, células endoteliais, hepatócitos e células beta do pâncreas (SHUKLA *et al.*, 2020; FRESE *et al.*, 2016). Além disso, as CTMTA podem ser isoladas de forma relativamente rápida e segura a partir do tecido adiposo, o que lhes confere uma vantagem sobre as CTM de medula óssea (SHUKLA *et al.* 2020; GATHIER *et al.*, 2016). Isso porque o processo de isolamento das CTMTA pode ocorrer por meio de centrifugação do lipoaspirado, que será separado em duas frações de células: adipócitos e lipídios, que possuem pouca relevância no caso, e as CTMTA. O tempo de processamento do lipoaspirado para obtenção das CTMTA é de apenas poucas horas, sendo essa uma grande vantagem dessa fonte de células (GATHIER *et al.*, 2016). Além disso, a quantidade de CTM encontradas na medula óssea é estimada entre 0,001-0,01%, enquanto no tecido adiposo estima-se que essa quantidade seja 500 vezes maior, sendo esse outro fator que contribui significativamente para o uso de CTM adquiridas a partir do tecido adiposo (PITTENGER *et al.*, 1999; FRASER *et al.*, 2006). Ou seja, o rendimento com as CTM obtidas de tecido adiposo comparadas com as obtidas de medula óssea é relativamente maior (SABOL *et al.*, 2021).

Em um estudo realizado comparando as CTM de tecido adiposo com medula óssea dos mesmos doadores, foi observado que a proliferação foi maior nas CTM obtidas a partir de tecido adiposo (MOHAMED-AHMED *et al.*, 2018). Porém, as CTMs obtidas de medula óssea apresentaram superioridade quanto a diferenciação osteogênica e condrogênica (MOHAMED-AHMED *et al.*, 2018). Esses resultados, quanto à taxa de proliferação e diferenciação, foram semelhantes aos encontrados por Li e colaboradores (2015) em que foram comparadas CTM de medula óssea e de tecido adiposo humano. Além disso, os pesquisadores observaram que as CTM de tecido adiposo apresentaram efeitos imunomoduladores mais potentes do que as de medula óssea.

### 3.2. Esfingolipídios

Os esfingolipídios são lipídios estruturais das membranas biológicas, sendo componentes ubíquos na membrana celular de mamíferos. Além disso, são moléculas de sinalização intracelular relacionadas com a regulação e sinalização de muitos processos celulares, como proliferação, apoptose, autofagia, tumorigênese, metástase e respostas celulares ao estresse (HOSAIN *et al.*, 2013; FREDI; TINOCO, 2015; SAHU *et al.*, 2019). Estão presentes em vários grupos de seres vivos além dos mamíferos, como plantas, fungos, alguns organismos procaríotos e vírus, onde pode desempenhar a função de constituinte de membrana, lipoproteína ou outras estruturas biológicas (MERRILL *et al.*, 1997).

Nos últimos anos, têm-se observado um aumento exponencial nos estudos relacionados aos esfingolipídios, onde a maioria está nas áreas de Bioquímica, Biologia Celular e Imunologia, destacando a importância dos esfingolipídios como lipídios estruturais e moléculas de sinalização para a saúde humana e vegetal (SAHU *et al.*, 2019).

Os primeiros esfingolipídios foram isolados do cérebro de humanos e de diversos animais por J. L. W. Thudichum em 1884 (MERRILL *et al.*, 1997; FREDI; TINOCO, 2015; HANNUN; OBEID, 2018). Ele introduziu o nome "esfingosina", devido aos "muitos enigmas que apresentava ao pesquisador", como a Esfinge da mitologia grega (HANNUN; OBEID, 2018). Assim, os primeiros esfingolipídios foram denominados de acordo com os tecidos dos quais foram isolados, o que gerou uma falsa interpretação de que esses compostos são encontrados unicamente em tecidos neurais (MERRILL *et al.*, 1997; SAHU *et al.*, 2019).

A regulação dos esfingolipídios é realizada por várias enzimas e através de diferentes metabólitos. Há aproximadamente 40 enzimas presentes em mamíferos que estão envolvidas no metabolismo dos esfingolipídios (HANNUN; OBEID, 2018). Tais enzimas são sintetizadas

por diversos genes, podendo decorrer como variantes de *splicing*, além de apresentarem uma infinidade de modificações pós-traducionais que afetam sua atividade e função enzimática (HANNUN; OBEID, 2018).

Os esfingolípídios podem ser encontrados em todas as células eucarióticas, sendo mais abundantes na membrana plasmática e outras membranas celulares, como a membrana do complexo de Golgi e lisossomos (MERRILL *et al.*, 1997).

Na constituição dos esfingolípídios podemos observar uma base de cadeia longa principal, denominada base esfingóide, ou amina alifática de cadeia longa, a D-eritro-esfingosina, também chamada de esfingosina, sendo essa a mais comum nas células de mamíferos (MERRILL *et al.*, 1997; SAHU *et al.*, 2019). Essa base de cadeia longa é a característica principal dos esfingolípídios, encontrada em mais de 4.000 moléculas distintas (SAHU *et al.*, 2019). Ou seja, é a base estrutural, ou esqueleto, que encontramos em comum entre os esfingolípídios.

Em linhas gerais os esfingolípídeos, em mamíferos, apresentam uma base esfingóide (esfingosina) de cadeia longa, com 18 carbonos (MERRILL *et al.*, 1997; SAHU *et al.*, 2019; QUINVILLE *et al.*, 2021). Quando ocorre a ligação de um ácido graxo a essa base esfingóide forma-se a ceramida, ou seja, a base é N-acilada (QUINVILLE *et al.*, 2021). Logo, para que ocorra a formação de outros esfingolípídeos complexos, o hidrogênio da hidroxila primária terminal presente na ceramida é substituída, por um radical (FREDI; TINOCO, 2015; RAO *et al.*, 2013). Outra base esfingóide encontrada nos mamíferos é a esfinganina, também chamada de diidroesfingosina, cuja diferença da esfingosina deve-se pela presença de uma dupla ligação *trans* no carbono 4 nesta última, e ausente na esfinganina (QUINVILLE *et al.*, 2021). Além disso, a formação da esfingosina é pela via de “*Salvage pathway*” quando ocorre a quebra da ceramida, enquanto que a esfinganina é formada pela via *de novo* (QUINVILLE *et al.*, 2021).

Os esfingolípídios ocupam o quarto lugar da grande classe de lipídios de membrana e não possuem glicerol (NELSON; COX, 2019). Em sua constituição, apresentam uma molécula de aminoálcool, esfingosina, uma molécula de um ácido graxo de cadeia longa e um grupo polar unido por uma ligação glicosídica ou uma ligação fosfodiéster (NELSON; COX, 2019). As bases esfingóides livres tem concentrações baixas nas células, pois a esfinganina biossintetizada *de novo* é rapidamente N-acilada, promovendo a adição de um ácido graxo de cadeia longa, por meio da enzima esfinganina N-aciltransferase, formando a diidro-ceramida (NELSON; COX, 2019). Outra adição subsequente à primeira na estrutura da esfinganina leva a formação da ceramida (N-acil-esfingosina), (MERRILL *et al.*, 1997). Para que ocorra a

formação de esfingolípídios complexos, os grupos polares principais são adicionados na posição 1 da ceramida, tais como gangliosídeo GM3 e esfingomielina (MERRILL *et al.*, 1997).

Dentro do grupo de esfingolípídios ocorre uma divisão em três subclasses das ceramidas e divergentes quanto aos grupos cabeças (polar – hidrofília ou apolar – hidrofóbica): 1) esfingomielinas: constituídas por fosfocolina ou fosfoetanolamina como grupo cabeça polar e muito abundante na mielina; 2) glicolípídeos neutros: não carregados, englobam os cerebrosídeos que possuem um único açúcar ligado às ceramidas e os globosídeos, que são glicoesfingolípídios com dois ou mais açúcares; 3) gangliosídeos: considerados os esfingolípídios mais complexos, possuem oligossacarídeos como grupo cabeça polar e um ou mais resíduos do ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) e um ácido siálico em suas terminações (NELSON; COX, 2019).

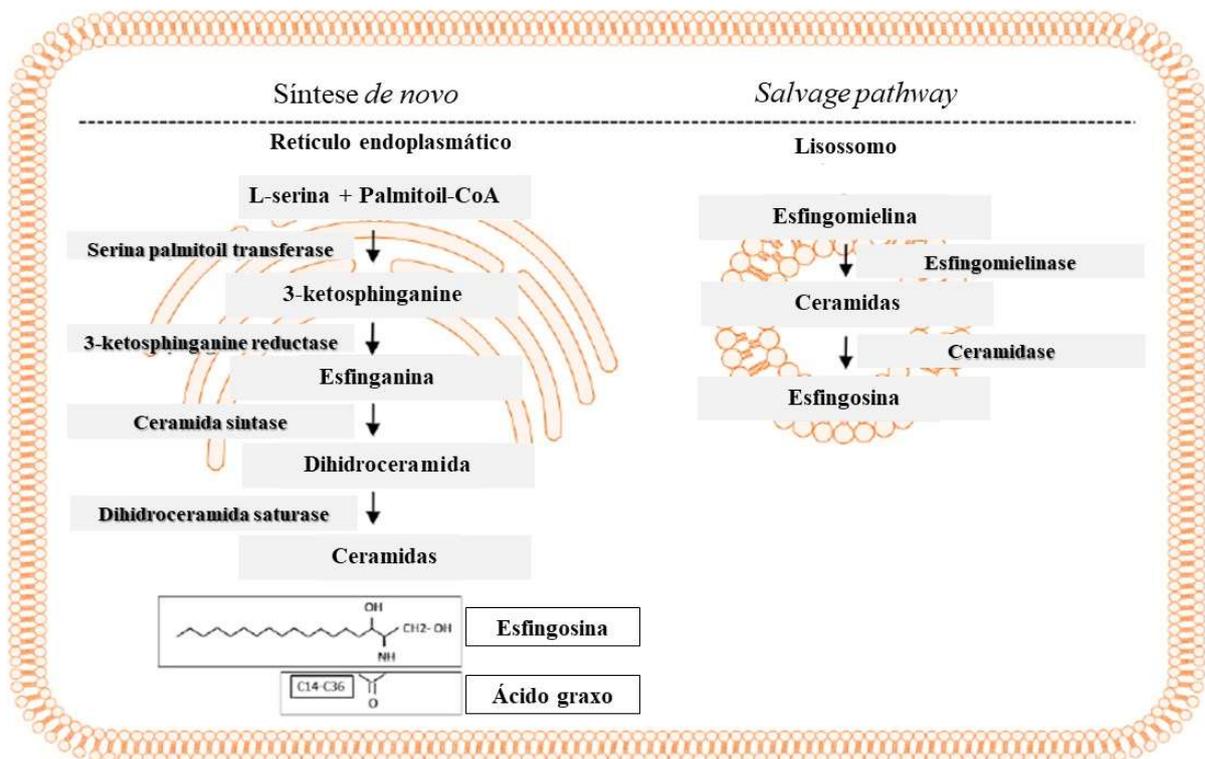
A instabilidade no metabolismo de esfingolípídios pode dificultar de forma significativa a homeostase celular, o que torna o equilíbrio imprecindível entre a síntese e degradação para o correto funcionamento dos processos biológicos (SAHU *et al.*, 2019).

### 3.3. Ceramidas

As ceramidas são uma parte integral da membrana celular de eucariotos (KURZ *et al.*, 2019). Seu núcleo estrutural é a esfingosina da base esfingóide, ou seja, o precursor estrutural de todos os esfingolípídios, cuja síntese ocorre a partir do aminoácido serina e do ácido graxo ativado palmitoil-CoA (BIEBERICH, 2008; NELSON; COX, 2019). Quando ocorre a ligação da amida de um ácido graxo ao  $-NH_2$  no C-2 da esfingosina, ocorre a formação de uma ceramida, que é similar ao diacilglicerol (NELSON; COX, 2019). O que torna as ceramidas diferentes uma das outras são: seu tamanho, hidroxilação e saturação de ambas as porções (esfingóide e de ácido graxo) (MENCARELLI; MARTINEZ-MARTINEZ, 2013). Em mamíferos, há a síntese de mais de 200 tipos de ceramidas devido à combinação de diferentes enzimas, ocorrendo de maneira intracelular por compartimentalização desse lípido hidrofóbico (HANNUN; OBEID, 2011).

A biossíntese intracelular das ceramidas é iniciada e regulada pela enzima serina palmitoiltransferase (SPT), composta por duas subunidades: SPT-1 e SPT-2 (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2007). Sua síntese pode ocorrer de duas formas nas células eucarióticas: *de novo*, quando a síntese das ceramidas ocorre no retículo endoplasmático, ou pela via denominada “*Salvage pathway*”, que ocorre no lisossomo (KURZ *et al.*, 2019). A síntese pela via *de novo* começa pela condensação da L-serina e palmitoil-CoA em 3-cetoesfinganina, por ação da serina palmitoil transferase (KURZ *et al.*, 2019). Esse

intermediário é reduzido a esfinganina pela 3-cetoesfinganina redutase. Na última fase, a ceramida sintase acetila a esfinganina transformando-a em dihidroceramida, que são oxidadas em ceramidas pela ação da enzima dihidroceramida saturase (KURZ *et al.*, 2019). O transporte da ceramida do retículo endoplasmático para outras organelas ocorre por meio de: a) complexo de Golgi: via vesículas ou proteínas transportadora de ceramida (CERT); b) núcleo: via cisternas perinuclear do retículo endoplasmático e c) mitocôndria, também via cisternas do retículo endoplasmático ligados a estas (BIEBERICH, 2008). Já pela via “*Salvage pathway*” a esfingomielina é transformada em ceramidas por ação da enzima esfingomielinase (KURZ *et al.*, 2019). Ainda pode ocorrer ação da enzima ceramidase nas ceramidas, o que leva à síntese de esfingosina (KURZ *et al.*, 2019). A síntese das ceramidas é esquematizada na figura 1, de acordo com o trabalho publicado por Kurz *et al.* em 2019.



**Figura 1:** Síntese de ceramidas por meio de duas vias: *de novo* e “*Salvage pathway*”. Adaptado de Kurz *et al.*, 2019.

A via *de novo* da ceramida gera diferentes cadeias de ácidos graxos que estão associadas com processos inflamatórios, de diferenciação celular e autofágico (JIANG; OGRET MEN, 2014; IESSI *et al.*, 2020). Porém, diferentes níveis intracelulares de ceramidas em alguns tipos de células podem levar a dois processos celulares distintos: citoproteção por autofagia ou morte celular mediada pela autofagia (JIANG; OGRET MEN, 2014). Tais fatores irão depender da localização subcelular da ceramida, como mitocôndria ou retículo endoplasmático, e

comprimento do ácido graxo, o que demonstra a necessidade de mais estudos e técnicas para a compreensão desses processos (JIANG; OGRET MEN, 2014).

As ceramidas tem sua produção como um mecanismo de resposta diante de algum tipo de estresse e têm a capacidade de modular várias respostas bioquímicas e celulares, cujo resultado pode ser interrupção do crescimento, parada do ciclo celular, diferenciação celular, senescência, resposta imune ou apoptose (HANNUN; LUBERTO, 2000; FILLET *et al.*, 2003). Porém, outros fatores como tipo celular, receptores expressos e concentração, exercem influência nas respostas biológicas geradas pelas ceramidas (FILLET *et al.*, 2003).

### **3.4. Morte celular**

A morte celular pode ocorrer devido a estresse no microambiente como mecanismo de manutenção da homeostase ou como mecanismo fisiológico para renovação e manutenção tecidual (GALLUZZI *et al.*, 2018).

Existem diversos mecanismos que culminam na morte celular; portanto, o *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCDD) propôs uma classificação dos diferentes tipos de morte celular, com base nos aspectos moleculares e aqueles fundamentais envolvidos no seu processo (GALLUZZI *et al.*, 2018). Dentre as classificações de morte celular propostas pelo NCDD, há três tipos principais, baseados nas alterações morfológicas que ocorrem nas células: necrose, apoptose e autofagia (ELMORE, 2007; GALLUZZI *et al.*, 2018).

#### **3.4.1. Necrose**

O processo de necrose pode ser definido como morte celular ocasionada de forma acidental, passiva, ou resultante de perturbações ambientais que geram liberação descontrolada de conteúdo celular inflamatório, rompimento da membrana plasmática e o conteúdo das células extravasam para o meio extracelular (FINK; COOKSON, 2005; DE FREITAS *et al.*, 2021).

A necrose leva ao rompimento da membrana plasmática, que leva a liberação do conteúdo celular no meio extracelular, que desencadeia o recrutamento de outras células, como neutrófilos, macrófagos e outros elementos envolvidos com a resposta de inflamação aguda (ROCK; KONO, 2008; STENSON; CIORBA, 2018). Por fim, as células que foram recrutadas eliminam as mortas devido à fagocitose após necrose (ROCK; KONO, 2008).

### 3.4.2. Apoptose

O termo apoptose foi proposto pela primeira vez por Kerr e colaboradores em 1972. A apoptose tem sido definida como uma maneira distinta e importante de morte celular programada, por meio da eliminação de determinadas células (ELMORE, 2007), ou seja, um processo ativo no qual a célula tem a autonomia de se “desmontar” para evitar inflamação (FINK; COOKSON, 2005). Além disso, a apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento, envelhecimento e como um mecanismo homeostático para manter as populações de células dos tecidos, sendo que ao final perde-se a conformação e integridade das células (ELMORE, 2007; DE FREITAS *et al.*, 2021).

A apoptose pode ocorrer por meio de duas vias principais: extrínseca (receptor de morte) e intrínseca (mitocondrial) (ELMORE, 2007). Na via extrínseca a apoptose tem sua ativação iniciada por ação dos receptores localizados na superfície da membrana, tais como: FAS (CD95/APO-1, *Fas Cell Surface Death Receptor*), TNFR1 (receptor do fator de necrose tumoral 1) e o TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Esses receptores são ativados após estímulos por meio de ligantes específicos, ocorrendo a emissão de sinais, denominados apoptóticos (CABRINI *et al.*, 2010). Esses ligantes são, respectivamente: Fas (FasL), TNF $\alpha$  e TRAIL (CABRINI *et al.*, 2010). Os receptores de morte podem se ligar às proteínas adaptadoras, FADD (Fas associada com a proteína do domínio de morte) e TRADD (Receptor do fator de necrose tumoral tipo 1 associado a proteína do domínio de morte), que por sua vez ligam-se as pró-caspases 8 e 10 e juntos formam um complexo multiproteico chamado de DISC (Complexo Sinalizador Indutor de Morte) (PFEFFER; SINGH, 2018). Após a formação desse complexo as caspases 8 e 10 tornam-se ativas e ocorre o processo de apoptose. Ou seja, a caspase 8 cliva as pró-caspases 3 e 7 tornando-as ativas e levando à clivagem de vários componentes celulares e à morte celular, bem como pode clivar o domínio de homologia Bcl-2 3 (BH3) da proteína BID (*BH3 interacting domain death agonist*) que a torna truncada (tBid) e é direcionada para a mitocôndria; assim, há uma ligação entre as duas vias: extrínseca e intrínseca (MADDIKA *et al.*, 2007; PFEFFER; SINGH, 2018; BOCK; TAIT, 2019).

A via intrínseca é ativada por uma diversidade de componentes estressores, como danos no DNA e citoesqueleto, privação do fator de crescimento, estresse no retículo endoplasmático, drogas quimioterápicas e radiação gama (CABRINI *et al.*, 2010). Esses componentes estressores podem ativar o domínio de homologia Bcl-2 3 (BH3) que é responsável por inibir as proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) e ativar as proteínas pró-apoptóticas BAX (*Bcl-2-associated X protein*) e BAK (*Bcl-2 homologous antagonist killer*). Quando ativadas, essas proteínas levam à permeabilização da membrana externa da

mitocôndria (MOMP - *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) (MADDIKA *et al.*, 2007; PFEFFER; SINGH, 2018; BOCK; TAIT, 2019), levando à liberação de proteínas intermembranares da mitocôndria, como o citocromo c, que se liga a proteína Apaf-1 (*Apoptosis Protease Activating Factor-1*), formando o apoptossomo (MADDIKA *et al.*, 2007; PFEFFER; SINGH, 2018) e recrutam a pró-caspase 9 (GALLUZZI *et al.*, 2018). Isso leva a ativação da caspase 9 que por sua vez leva a clivagem e ativação das caspase 3 e 7 (GALLUZZI *et al.*, 2018; PFEFFER; SINGH, 2018).

As caspases são endoproteases que hidrolisam ligações peptídicas dependentes de resíduos catalíticos de cisteína no sítio ativo da caspase, ou seja, levam à clivagem de vários componentes celulares resultando em apoptose (CABRINI *et al.*, 2010; MCILWAIN *et al.*, 2013), como a fragmentação do DNA, exposição da fosfatidilserina e formação de corpos apoptóticos (GALLUZZI *et al.*, 2018). As caspases podem ser classificadas como iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10), ou como caspases efetoras (3, 6 e 7) (CABRINI *et al.*, 2010).

Uma outra via envolvida em apoptose é o sistema de sinalização da esfingomielina, a qual é ativada pelo estresse da esfingomielinase ácida para gerar ceramida; essa, por sua vez, irá atuar como um segundo mensageiro no início da apoptose (HAIMOVITZ-FRIEDMAN *et al.*, 1997). No entanto, muitos estudos focam nas ceramidas indutoras de apoptose e poucos pesquisam outras funções com as quais as ceramidas estão relacionadas (BIEBERICH, 2011). Isso decorre principalmente do fato da pouca disponibilidade de abordagens genéticas para alterar o metabolismo das ceramidas e a ampla especificidade do grupo de análogos e inibidores de biossíntese (BIEBERICH, 2011). Com a inibição da ceramida sintase por meio da fumonisina B1 pode ocorrer a elevação da esfingosina (di-hidrosfingosina), que por si só pode ser tóxica para vários tipos de células (BIEBERICH, 2011). Os autores ressaltam que experimentos que visam a perda de função com o uso de inibidores (miracocina - inibidor da serina palmitoiltransferase e fumonisina B1 - inibidor da ceramida sintases) não identificam de forma exata qual esfingolípido é essencial na apoptose, ou mesmo, em outros efeitos biológicos (BIEBERICH, 2011).

### **3.4.3. Autofagia**

A autofagia é uma via catabólica, ou um mecanismo de autodigestão, que busca um equilíbrio entre a síntese, degradação e reciclagem de componentes celulares, como organelas, lipídios e proteínas. A autofagia atua no crescimento, desenvolvimento e homeostase celular (MORGAN-BATHKE *et al.*, 2013; NAZIO *et al.*, 2019; DE FREITAS *et al.*, 2021). A ativação

da autofagia pode ocorrer devido a indisponibilidade de nutrientes, presença de espécies reativas de oxigênio, danos ao DNA, entre outros (PAN *et al.*, 2013).

O termo autofagia foi proposto por Christian de Duve, que também descobriu os lisossomos e peroxissomos, e estabeleceu a ação dos lisossomos no processo autofágico (KLIONSKY, 2008). Já o mecanismo básico envolvido na autofagia foi descoberto por Yoshinori Ohsumi em modelo de leveduras, garantindo-lhe o Prêmio Nobel de medicina em 2016 (KIRKIN, 2020). Esses achados possibilitaram a identificação e caracterização dos genes e proteínas envolvidos na autofagia, os quais receberam o nome de Atg (*Autophagy-related proteins*) e estão presentes nas etapas de nucleação, iniciação e expansão dos autofagossomos (vesícula com dupla membrana) (KIRKIN, 2020).

A autofagia pode ser classificada em três tipos: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia e macroautofagia. A autofagia mediada por chaperonas (CMA) é uma via onde ocorre a proteólise lisossomal e degradação seletiva das proteínas citosólicas solúveis, que são reconhecidas por uma chaperona específica nos lisossomos (ZHENG *et al.*, 2019). As chaperonas são proteínas que auxiliam no dobramento de outras proteínas e na montagem de complexos multiproteicos de maneira co-translacional ou pós-translacional (NATURE, 2019). A CMA é um tipo de autofagia que não forma vesículas ou invaginações na membrana para que ocorra o direcionamento de determinados substratos ao lisossomo (ZHENG *et al.*, 2019).

A microautofagia ocorre em células de leveduras e é chamada de “microautofagia endossomal” (ZHENG *et al.*, 2019). Neste caso ocorre a invaginação da superfície da membrana do lisossomo ou do vacúolo (ZHENG *et al.*, 2019). Os componentes citosólicos são absorvidos diretamente pelo próprio lisossomo por meio da invaginação formada na superfície da membrana (GLICK *et al.*, 2010). O mecanismo molecular subjacente a este processo de entrega de carga permanece pouco claro (ZHENG *et al.*, 2019).

A macroautofagia ocorre pela fusão dos autofagossomos com os endossomos tardios ou lisossomos, formando os autolisossomos (ZHENG *et al.*, 2019). Os componentes citoplasmáticos podem ser degradados pela macroautofagia de forma aleatória ou por meio de reconhecimento mediado por receptores (ZHENG *et al.*, 2019).

A autofagia é essencial nos estágios iniciais da embriogênese, pois desempenha um papel importante no controle de componentes celulares. Além disso, sua ausência em CTs embrionárias pode levar ao acúmulo de componentes tóxicos às células (GUAN *et al.*, 2013). Em células somáticas, a autofagia é fundamental na degradação de proteínas e organelas defeituosas, ou seja, funciona como um controle de qualidade desses componentes (PAN *et al.*, 2013).

A autofagia é um processo importante nas CTs embrionárias, atuando na diferenciação celular e no desenvolvimento normal do embrião (GUAN *et al.*, 2013). Porém, as evidências disponíveis na literatura não deixam claros os mecanismos envolvidos nos processos autofágicos nas CTs (GUAN *et al.*, 2013; PAN *et al.*, 2013). O que é sabido no momento é que a autofagia desempenha um papel importante no controle dos componentes celulares e que sua ausência em CTs pode levar ao acúmulo de componentes prejudiciais durante a embriogênese, diferenciação e autorrenovação (GUAN *et al.*, 2013; PAN *et al.*, 2013). Também foi demonstrado que em CTMs a autofagia é elevada, inibe sua morte e é importante para a manutenção dessas células (PAN *et al.*, 2013).

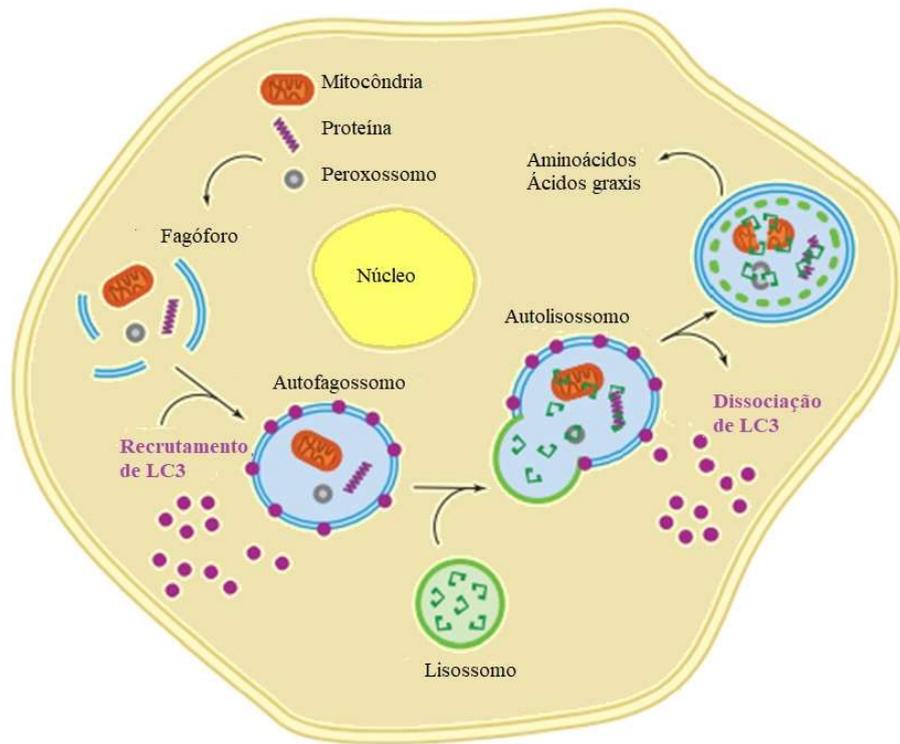
Boya e colaboradores (2018) destacaram que a autofagia nas CTs leva à remodelagem celular, para manutenção de fatores de “stemness” (capacidade de autorrenovação e diferenciação celular); ao reparo celular, que confere um controle de qualidade imprescindível à homeostase celular; e por fim, ao metabolismo celular, que mantém a homeostase energética e reprogramação metabólica, necessárias para as atividades celulares, que incluem indução da diferenciação, manutenção da quiescência e autorrenovação (BOYA *et al.*, 2018). Em contrapartida, quando ocorre falhas no processo autofágico, podem ocorrer alterações na pluripotência, reprogramação, morte celular, exaustão, senescência e quiescência (BOYA *et al.*, 2018).

A maioria dos estudos realizados com autofagia em CTs embrionárias foram feitos com camundongos (GUAN *et al.*, 2013). Porém, em um experimento com CTs embrionárias humanas, que expressam GFP-LC3 (marcador fluorescente para o autofagossomo), conseguiu-se estudar o processo autofágico durante a diferenciação dessas células (TRA *et al.*, 2011), estabelecendo uma associação entre eventos de diferenciação celular precoce e autofagia em CTs embrionárias (TRA *et al.*, 2011). As CTs embrionárias humanas foram induzidas à diferenciação e observou-se um aumento de GFP-LC3, quando comparadas com as CTs embrionárias indiferenciadas, por meio de imagens fluorescentes e *western blot* (TRA *et al.*, 2011). A diferenciação ocorreu por meio da privação dos fatores secretados por MEF (*Mouse Embryonic Fibroblasts*), uma camada de fibroblasto sobre a qual as células são cultivadas e auxiliam na manutenção da pluripotência, e pelo tratamento com SB431542, um inibidor de TGF  $\beta$  tipo I (importante em vias de sinalização celular associadas com a manutenção da pluripotência de CTs embrionárias) (TRA *et al.*, 2011).

### 3.4.3.1. Proteínas envolvidas na autofagia

O termo autofagia aqui descrito refere-se à macroautofagia. A autofagia é essencial para homeostase celular e envolve diversas vias de sinalização para que o processo ocorra. Deve haver um equilíbrio entre a ativação e bloqueio do processo autofágico, tanto que nas CTM a ativação da autofagia é mantida em níveis basais para a manutenção da homeostase e inibição da morte celular (PAN *et al.*, 2013).

Para que ocorra ativação da autofagia, a célula geralmente está em privação de nutrientes. Logo, irá ocorrer uma cascata de vias de sinalização intracelular para que o processo autofágico tenha início. Tal processo dar-se-á pelas seguintes etapas: iniciação, nucleação, alongamento e fusão (TAVAKOL *et al.* 2019). Quando há privação de nutrientes a célula precisa se manter viva, com isso há a ativação do complexo ULK, que recruta proteínas ATG e PI3KC3, caracterizando o processo de iniciação (DENG *et al.*, 2020; TAVAKOL *et al.* 2019). Logo, o fagóforo terá a sua membrana alongada para que ocorra engolfamento dos componentes que serão degradados (DENG *et al.*, 2020). Por conseguinte, a proteína ATG12 se liga à ATG5 por ação das proteínas ATG7 e ATG10 (DENG *et al.*, 2020). Esse complexo que se forma com a união de ATG12-ATG5 se liga à ATG16L, cuja função é participar do alongamento da membrana do fagóforo (DENG *et al.*, 2020). Simultaneamente, ocorre a catalização de LC3-I com PE, porém, para que esse processo aconteça é necessária a ação das seguintes proteínas: ATG4-ATG7-ATG3 (DENG *et al.*, 2020). Essas levam à união de LC3-I com PE, que resulta na formação de LC3-II, que por sua vez, também age no alongamento da membrana do fagóforo (DENG *et al.*, 2020). Depois que toda essa cascata de sinalização ocorre e a membrana do fagóforo se fecha em volta do substrato que será degradado, temos uma estrutura denominada autofagossomo. Por fim, na última etapa de fusão, o autofagossomo se une ao lisossomo e forma o autolisossomo, que degrada o substrato que foi engolfado (DENG *et al.*, 2020). Para melhor entendimento, o processo de autofagia foi esquematizado na figura 2.



**Figura 2:** Esquema do processo de autofagia. O fagóforo engloba os componentes que precisam ser degradados e a proteína LC3 participa do alongamento de sua membrana. Após a membrana ser alongada e se fechar ao redor dos componentes temos a formação do autofagossomo. Esse por sua vez se funde com o lisossomo e ocorre a formação do autolisossomo. A proteína LC3 é dissociada e os componentes são degradados. Adaptada de Invitrogen, 2010

Outra proteína importante no processo de autofagia é Beclin-1, cuja função é participar da formação do autofagossomo (XU; QIN, 2019). Além disso, o bloqueio de sua atividade deve-se a sua interação com Bcl-2, proteína anti-apoptótica que regula a atividade de Beclin-1 (XU; QIN, 2019). Em outras palavras, deve haver um balanço entre a interação dessas duas proteínas para que ocorra a homeostase celular, onde um desequilíbrio desse balanço pode levar a célula à apoptose (XU; QIN, 2019). A perda de Beclin-1 leva a uma diminuição dos níveis normais de autofagia, resultando na morte celular devido à privação de nutrientes e outras condições de estresse celular. Por outro lado, a perda de Bcl-2 levará a um aumento da atividade autofágica, cujo resultado também será a morte celular (XU; QIN, 2019).

As proteínas defeituosas são selecionadas por meio da ligação com uma proteína denominada p62 (*Sequestosome 1*), que interage com o complexo LC3, que direciona essas proteínas à degradação (KOMATSU; ICHIMURA, 2010). Porém, o p62 é, também, degradado junto, pois seu acúmulo na célula é citotóxico e pode levar ao desenvolvimento de doenças hepáticas (KOMATSU; ICHIMURA, 2010; ITAKURA; MIZUSHIMA, 2011.). Embora o acúmulo de p62 relacionado à diminuição do processo autofágico tenha sido relatado em outros

tecidos (miocárdio, musculoesqueléticas e células  $\beta$  do pâncreas), mais estudos são necessários para determinar qual o efeito que esse acúmulo pode resultar (KOMATSU; ICHIMURA, 2010).

Outra proteína que participa da cascata de sinalização da autofagia é a proteína survivina, também chamada de *Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Protein Repeat-Containing 5* (BIRC5), pertencente à família das proteínas inibidoras de apoptose (LIN *et al.*, 2020). Foi demonstrado que a survivina pode agir como um modulador negativo na estabilidade da proteína ATG7 e pode se ligar ao complexo ATG12-ATG5, fazendo com que não ocorra a formação do complexo ATG12-ATG5-ATG16, ação crucial para o alongamento da membrana do fagóforo (LIN *et al.*, 2020).

O processo autofágico deve ser bloqueado na abundância de nutrientes. Um complexo proteico que bloqueia o início da sinalização autofágica é a mTORC (*mammalian target of rapamycin*), em especial a mTORC1, que fosforila o complexo ULK e impede o início da autofagia (DENG *et al.* 2020; SAXTON; SABATINI, 2017). O complexo mTORC1 está relacionado com: autofagia, metabolismo, proliferação e crescimento celular. Já o mTORC2, embora não esteja relacionado diretamente à sinalização do processo autofágico, está ligado a vias que fazem parte da cascata de sinalização e está relacionado com a sobrevivência e conformação do citoesqueleto das células (DENG *et al.*, 2020; SAXTON; SABATINI, 2017). Para que o mTORC1 seja bloqueado ocorre a ativação do complexo AMPK, que fosforila mTORC1 e faz com que ocorra a autofagia devido ao déficit de nutrientes (SAXTON; SABATINI, 2017; TAVAKOL *et al.* 2019).

Na autofagia em CTMs indiferenciadas ocorre uma interrupção antes da junção do autofagossomo com o lisossomo, apresentando altas concentrações de autofagossomo (NUSCHKE *et al.*, 2014). Isso sugere que a autofagia desempenha um papel importante durante o processo de diferenciação, ou seja, leva a acreditar que sua modulação pode otimizar o processo de diferenciação com foco no uso terapêutico das CTM (NUSCHKE *et al.*, 2014).

### 3.5. Espécies reativas de oxigênio e Glutathiona

As espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês *Reactive Oxygen Species*) são uma classe de moléculas provenientes do metabolismo do oxigênio ( $O_2$ ) e são caracterizadas por alta reatividade química. Podem ter como produtos: a) radicais livres, tais como: superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila ( $OH^-$ ), peroxinitrato ( $ONOO^-$ ); b) não radicais livres, como: peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ozônio ( $O_3$ ) e ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (ZHOU *et al.*, 2013). As ROS são consideradas tradicionalmente como subprodutos tóxicos do metabolismo, pois causam danos aos lipídios, membranas, proteínas e ácidos nucleicos (ZHOU *et al.*, 2013). Porém, com os avanços das

pesquisas, tem-se demonstrado que concentrações moderadas de ROS estão envolvidas com diversos processos celulares importantes, como sinalização, regulação homeostática e indução de morte (ZHOU *et al.*, 2013; CIEŚLAR-POBUDA *et al.*, 2017). Quando ocorre a sinalização mediada por radicais livres, a transdução desse sinal é chamada de “sinalização Redox” envolvendo modificações reversíveis das vias de sinalização por intermédio de reações de oxirredução (ZHOU *et al.*, 2013). Além disso, as mitocôndrias possuem enzimas redox, que por meio da fosforilação oxidativa e da cadeia transportadora de elétrons produzem ATP; porém, a ineficiência no processo de fosforilação oxidativa e a disfunção mitocondrial podem resultar na geração de ROS (FEDERICO *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2019) que, por sua vez, pode agir negativamente na expressão gênica mitocondrial e proteínas e lipídios que interferem na função bioenergética das mitocôndrias (SINGH *et al.*, 2019).

Quando ocorre o acúmulo excessivo de ROS nas células ocorre a ação de mecanismos antioxidantes, a exemplo tem a glutathiona. Esta que é um tripeptídeo de baixo peso molecular e importante antioxidante que leva a desativação de ROS, ou seja, ocorre a manutenção da homeostase redox (LAVRENTIADOU *et al.*, 2001; SINHA; DABLA, 2015; FORMAN *et al.*, 2009; NUHU; BHANDARI, 2018). Além disso, a glutathiona é sintetizada no citosol das células, mas pode ser encontrada em compartimentos subcelulares em baixas concentrações nos eucariotos (FORMAN *et al.*, 2009; OESTREICHER; MORGAN, 2019).

As ROS são produzidas em resposta a vários estímulos, como fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, hipóxia, entre outros (ZHOU *et al.*, 2013). Apesar das ROS estarem envolvidas em diversos processos biológicos, ainda são poucos os estudos que investigam sua interação com a CTs (CIEŚLAR-POBUDA *et al.*, 2017). O que se sabe é que ROS podem aumentar a diferenciação em CTs e facilitar a reprogramação em iPSCs, porém isso pode resultar em envelhecimento prematuro (CIEŚLAR-POBUDA *et al.*, 2017).

Ji *et al.* (2010a) observaram que as ROS aceleraram o processo de diferenciação celular em CTs embrionárias humanas. No entanto, as CTs diferenciadas por ROS podem apresentar defeitos no DNA, gerando sérias consequências devido à contínua exposição ao estresse oxidativo (CIEŚLAR-POBUDA *et al.*, 2017).

Quando expostas ao estresse oxidativo as CTs apresentam uma maquinaria endógena antioxidante, que responderá de forma adaptativa (CHEN *et al.*, 2017). Em condições de estresse moderado, as CTs regulam principalmente a expressão gênica relacionada à apoptose, atividade de enzimas antioxidantes e vias de transdução defensivas para suprir as necessidades antioxidantes (CHEN *et al.*, 2017). Assim, os mecanismos envolvidos com a integridade genômica da CTs mediante estresse oxidativo deve ser melhor estudado, para evitar processos

indesejados induzidos por ROS, como: mutações, instabilidade genômica e diferenciação (CIEŚLAR-POBUDA *et al.*, 2017).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1. Casuística

Projeto realizado conforme aprovação emitida pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número: 47363121.3.0000.0068 (anexo 1).

As amostras de tecido adiposo para isolamento das CTM foram obtidas após consentimento livre e esclarecido dos pacientes. As CTMTA (Células-tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo) foram isoladas de 5 doadoras entre as idades de 27 e 44 anos, que foram submetidas a lipoaspiração eletiva do abdômen. Todos os procedimentos de lipoaspiração foram realizados pelo mesmo cirurgião plástico. Todas as doadoras estavam dentro da faixa normal quanto ao índice de massa corporal (20-25kg / m<sup>2</sup>).

As amostras utilizadas pertencem ao Biorepositório do Grupo de Lípidos, Oxidação e Biologia Celular do Laboratório de Imunologia (LIM – 19), Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram caracterizadas previamente no laboratório (SILVA *et al.*, 2017) e armazenadas em ultrafreezer -80 °C (Sanyo, Japan) ou em nitrogênio líquido.

#### 4.1.1. Cultura celular

O descongelamento das CTMTA foi realizado em banho-maria a 37° C. Em seguida, as células foram transferidas para tubo plástico de fundo cônico de 15 mL, contendo 10 mL de meio cultura *DMEM-LOW* (*Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose* - Sigma-Aldrich®, EUA), suplementado com 20 % de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, SP, Brasil), penicilina (100 UI/mL) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, MO, EUA). Esse tubo foi centrifugado a 250 X g por 7 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o botão celular ressuspensionado em 15 mL de meio *DMEM-LOW* 20 %. Por fim, a suspensão celular foi transferida para uma garrafa de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> ou 182 cm<sup>2</sup>.

As células foram mantidas em incubadora a 37 °C com atmosfera úmida e 5 % de CO<sub>2</sub> (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). As culturas foram acompanhadas diariamente, para observação e registro morfológico das células. A substituição do meio *DMEM LOW* 20 % ocorreram após 24 horas da transferência da suspensão celular para a garrafa de cultura celular

e a posteriormente a substituição do meio de cultivo foi realizada a cada três dias. Quando as células atingiram a confluência de 80 %, foi feita a dissociação destas células, realizando a lavagem com PBS (Solução tampão de Fosfatos), seguida de centrifugação a 250 X g por 7 minutos à temperatura ambiente e posterior procedimento enzimático padrão com ATV (associação de tripsina e versene) (Instituto Adolfo Lutz, SP, Brasil). Por conseguinte, foi feito o descarte do sobrenadante, o botão celular ressuspendido em 1 mL de meio *DMEM LOW* 20 %, feita uma alíquota com a qual foi realizada a coloração com *Trypan blue* na proporção de 1:1 para avaliar a viabilidade celular e a contagem realizada em câmara de *Neubauer*. Essas células foram utilizadas para expansão das culturas ou na execução dos experimentos. Todos os experimentos foram realizados com as células na quarta passagem (p4). As células não foram armazenadas novamente.

#### **4.2. Incubação das linhagens com C6-ceramida**

A C6-ceramida foi adquirida da Avanti Polar Lipids (Ref 860506P, AL, EUA). A solução estoque foi preparada na concentração de 5000  $\mu\text{M}$  em etanol absoluto.

Para a realização dos experimentos, as células foram transferidas para microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (3603-Corning, NY, EUA) com  $5 \times 10^3$  células/poço em duplicata. Após a transferência as células foram aderentes ao plástico e ao atingirem a confluência de 80 - 90 %, foram incubadas com C6-ceramida individualmente nas concentrações 10, 25, 50, 75, 100 e 150  $\mu\text{M}$  por 24 horas. As células do grupo controle e representadas pelo valor de zero nos resultados não receberam nenhuma adição de C6-ceramida.

#### **4.3. Viabilidade celular e cálculo do IC50**

As células foram transferidas para microplacas pretas de fundo chato com 96 poços com  $5 \times 10^3$  células/poço em duplicata. Após a transferência as células foram aderentes ao plástico e quando atingiram a confluência de 80-90 %, foram incubadas com diferentes concentrações de C6-ceramida, conforme especificado acima.

Duas horas antes do fim do período de incubação com C6-ceramida, que foi de 24 horas totais, os núcleos das células foram corados com 0,1  $\mu\text{g/mL}$  de Hoechst 33342 (H1399-Molecular Probes, OR, EUA), para que ocorresse a internalização do corante e não ultrapassasse o período de incubação. Por fim, foi acrescentado 1  $\mu\text{l}$  de iodeto de propídio (PI) (P3566- Molecular Probes, OR, EUA) de uma solução de 50  $\mu\text{g/mL}$  antes da aquisição das imagens.

Foi utilizado o sistema *ImageXpress Micro High Content Screening System* (Molecular Devices, CA, EUA) para avaliar o número de células vivas e células mortas, por meio da aquisição de cinco sítios por poço e dois poços por concentração testada. As células coradas somente com Hoechst 33342 foram consideradas viáveis, as células coradas com Hoechst 33342 e PI foram consideradas não viáveis. O programa *Cell Scoring MetaXpress* (Molecular Devices, CA, EUA) foi utilizado para analisar o número de células e a viabilidade celular. Os cálculos de IC<sub>50</sub> foram avaliados por meio de uma curva de ajuste de inclinação variável no programa estatístico GraphPad Prism 8 (GradPad Software, CA, EUA).

#### **4.4. Análise de Apoptose e Necrose**

##### **4.4.1. Apoptose e Necrose por Anexina-V/PI**

Foi utilizado o kit de detecção de apoptose, *Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit II* (556420-BD Biosciences, NJ, EUA), como descrito pelo fabricante. As células foram incubadas pelo período de 15 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz com 1 µL de Anexina-V marcada com FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*), 2 µL de PI (50 µg/mL) (P3566-Molecular Probes, OR, EUA) e 10 µL Tampão Annexina-V 10 X concentrado (0,1 M de HEPES/NaOH (pH 7,4), 1,4 M de NaCl, 25 mM de CaCl<sub>2</sub>). Os núcleos foram marcados com 0,1 µg/mL de Hoechst 33342, cuja adição ocorreu 2 horas antes do período de 24 horas para que o tempo não fosse ultrapassado. A presença de apoptose foi analisada em no máximo 1 hora após a marcação pelo sistema *ImageXpress Micro High Content Screening* (Molecular Devices, CA, EUA). Cinco sítios por poços e dois poços por concentração testada foram adquiridos. A porcentagem (%) de apoptose foi determinada pelo programa *Cell Health MetaXpress* (Molecular Devices, CA, EUA). As células marcadas somente com Hoechst 33342 (H1399-Molecular Probes, OR, EUA) foram consideradas células vivas. O processo apoptótico foi definido pela presença de Hoechst 33342 com Anexina-V ou Anexina-V/PI, onde células positivas somente para Anexina-V estavam em apoptose inicial. Já a coloração positiva para Anexina-V e PI indicou que as células estavam na fase final de apoptose. O processo necrótico foi definido pela presença de Hoechst 33342 com o reagente PI.

##### **4.4.2. Análise da caspase 3/7**

Dois horas antes do período de incubação com C6-ceramida, que totaliza 24 horas, os núcleos celulares foram marcados com 0,1 µg/mL de Hoechst 33342 (H1399 - Molecular Probes, OR, EUA), para que o tempo de 24 horas não fosse ultrapassado. Após o período de 24 horas de incubação foi adicionado 2 µL do substrato da caspase 3/7 (CellEvent Caspase-3/7

Green - Invitrogen, CA, EUA) em cada poço. Em seguida, a placa foi incubada em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub> por 30 minutos. A fluorescência foi analisada pelo sistema *ImageXpress Micro High Content Screening System* (Molecular Devices, CA, EUA). Cinco sítios por poços e dois poços por concentração testada foram adquiridos. A ativação da caspase 3/7 foi analisada com o uso do programa *Cell Scoring MetaXpress* (Molecular Devices, CA, EUA).

#### 4.5. Autofagia

Para a detecção da autofagia foi utilizado o kit *Premo™ Autophagy Sensors* (LC3B-FP) \*BacMam 2.0\* (P36235 – Molecular Probes®, OR, EUA). Por meio de sua utilização foi determinada a porcentagem de células autofágicas, como descrito pelo fabricante. Acrescentou-se, 16 horas antes da aquisição das imagens do experimento, 3 µL do reagente LC3B-FP nos poços controles e nos poços tratados com C6-ceramida. Foi adicionado 0,2 µL do reagente cloroquina difosfato no controle autofágico e adicionado 1 µL do reagente controle LC3B(G120A)-FP nos poços controles da reação. As células foram transduzidas com vetores baculovirais não replicantes. Os núcleos foram marcados com 0,1 µg/mL Hoechst 33342 (H1399 - Molecular Probes, OR, EUA). A placa foi incubada em estufa úmida a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> por 16 horas. A presença de autofagia foi analisada por meio da utilização do sistema *ImageXpress Micro High Content Screening System* (Molecular Devices, CA, EUA). Cinco sítios por poços e dois poços por concentração testada foram adquiridos. A porcentagem (%) de autofagia foi determinada usando o programa *Transfluor MetaXpress* (Molecular Devices, CA, EUA).

##### 4.5.1. Quantificação das organelas ácidas por meio do reagente LysoTracker®

Uma hora antes de finalizar o período de 24 horas de incubação foi adicionado 1 µL do reagente LysoTracker®Probes (Molecular Probes, Life Technologies, CA, EUA) conforme descrito pelo fabricante. As células foram mantidas em estufa úmida a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub>. Os núcleos foram marcados com 0,1 µg/mL de Hoechst 33342 (H1399- Molecular Probes, OR, EUA). Após o período de incubação foi retirado o meio de cultura e adicionado PBS. A análise da intensidade de fluorescência das organelas ácidas marcadas pelo LysoTracker®Probes (Molecular Probes, Life Technologies, CA, EUA) foi determinada usando o programa *ImageXpress Micro High Content System* (Molecular Devices, CA, USA). Cinco sítios por poços e dois poços por concentração testada foram adquiridos. O número de células positivas

para LysoTracker®Probes foi determinado usando o programa *Cell Scoring MetaExpress* (Molecular Devices, CA, EUA).

#### 4.6. Detecção de proteínas por imunofluorescência indireta

Após o período de 24 horas de incubação foi realizada lavagem com 100 µL de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*), seguida da fixação em 4 % de paraformaldeído (P-6148 - Sigma Aldrich, MO, EUA) por 2 horas a 4 °C. Após o período de incubação foram realizadas duas lavagens em cada poço das placas, sendo cada uma realizada com 100 µL de DPBS. Por fim, as placas foram armazenadas com 200 µL de DPBS a 4 °C até a realização da imunofluorescência indireta.

A imunofluorescência indireta consistiu em três etapas: permeabilização da membrana celular, bloqueio de sítios inespecíficos e marcação com os anticorpos (Tabela 1). Na primeira etapa as células foram permeabilizadas com 0,1 % da solução de Triton X-100 (93443-Sigma Aldrich, MO, EUA) a 4 °C por 15 minutos, seguida de uma lavagem com 100 µL de DPBS. Por conseguinte, foi feito o bloqueio com BSA (A9418- Sigma Aldrich, MO, EUA) a 5 % por 40 minutos em temperatura ambiente sob agitação moderada. Por fim, na etapa final do experimento, as células foram incubadas por 14-16 horas com os anticorpos primários diluídos em BSA a 5 % a 4 °C sob agitação constante durante todo o período. Após a incubação com anticorpo primário, os poços foram lavados com 100 µL de DPBS duas vezes, seguida da adição do anticorpo secundário.

**Tabela 1:** Anticorpos utilizados para analisar as proteínas por imunofluorescência indireta

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Marca</b>	<b>Catálogo</b>
Beclin-1	1:100	Abcam	ab118148
p62	1:100	Abcam	ab56416
Survivina	1:500	Cell Signaling	71G4B7
F-actina	1:500	Molecular Probes	A12379
Vimentina (SP20)	1:500	Abcam	ab16700
Mouse anti-4EBP1 (pT36/pT45)	1:10	BD Biosciences	560287
Mouse anti-Akt (pS473)	1:10	BD Biosciences	560378
Bcl-2	1:50	BD Biosciences	556535
<i>Donken anti-mouse AlexaFluor 488</i>	1:1000	Abcam	ab150105
<i>Anti-mouse R-phycoerythrin</i>	1:500	Molecular Probes	P852
<i>Anti-rabbit AlexaFluor 488</i>	1:500	Molecular Probes	A-11008
<i>Anti-rabbit AlexaFluor 568</i>	1:500	Thermo Fisher Scientific	A11011

As células incubadas com o anticorpo primário Beclin-1 foram incubadas por 2 horas com anticorpo secundário donken anti-mouse AlexaFluor 488 diluído em DPBS com 0,1 µg/mL de Hoechst 33342 (H1399 - Molecular Probes, OR, EUA). As células incubadas com o anticorpo primário p62 foram incubadas por 2 horas com anticorpo secundário anti-mouse *R-phycoerythrin* diluído em DPBS com 0,1 µg/mL de Hoechst 33342 (H1399- Molecular Probes, OR, EUA). Após incubação com o anticorpo primário survivina as células foram incubadas por 2 horas com anticorpo secundário anti-rabbit AlexaFluor 488 diluído em DPBS e com 0,1 µg/mL de Hoechst 33342 (H1399 - Molecular Probes, OR, EUA). Por fim, seguida da incubação com o anticorpo primário vimentina as células foram incubadas por 2 horas com anticorpo secundário anti-rabbit AlexaFluor 568 diluído em DPBS e com 0,1 µg/mL de Hoechst 33342 (H1399- Molecular Probes, OR, EUA).

Os anticorpos F-actina e 4EBP1 já são marcados com AlexaFluor 488, assim como os anticorpos Akt e Bcl-2 já são marcados com PE. Todos os anticorpos que já continham a marcação fluorescente tiveram as células incubadas com 0,1 µg/mL de Hoechst 33342 (H1399- Molecular Probes, OR, EUA) por 2 horas.

Passado o período de incubação de cada anticorpo foi realizada a lavagem, por 2 vezes, das células com 100 µL DPBS cada e as intensidades de fluorescência foram determinadas com a utilização do *ImageXPress Micro High Content System* (Molecular Devices, CA, EUA). Cinco sítios por poço e dois poços por concentração testada foram adquiridos. A intensidade de fluorescência das células e a porcentagem de células positivas foram determinadas por meio do software *Cell Scoring MetaExpress* (Molecular Devices, CA, EUA).

#### **4.7. Avaliação do potencial transmembranar mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) por TRME**

Foi adicionado 50 nM de TMRE (*tetramethylrhodamine, ethyl ester* 87917 - Sigma Aldrich, MO, EUA) antes de completar o período de 24 horas de incubação. As células foram incubadas por 40 minutos a 37 °C com esse corante para avaliação do potencial transmembranar mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). O TMRE é utilizado para marcar mitocôndrias ativas; as mitocôndrias despolarizadas ou inativas têm um potencial de membrana diminuído e não conseguem sequestrar o TMRE. A fluorescência do TMRE foi determinada usando o sistema *ImageXPress Micro High Content System* (Molecular Devices, CA, EUA). Cinco sítios por poço e dois poços por concentração testada foram adquiridos. O potencial transmembranar mitocondrial foi determinado por meio do software *Cell Scoring MetaExpress* (Molecular Devices, CA, EUA).

#### **4.8. Análise e obtenção do RNA e cDNA das CTMTA após incubação com C6-ceramida**

As células foram transferidas para placas de 6 poços de fundo chato com  $1 \times 10^5$  células/poço em duplicatas, foram aderentes ao plástico e quando atingiram a confluência de 80 - 90 %. Em seguida, foram incubadas com as concentrações de 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de C6-ceramida mais os controles pelo período de 24 horas, com o intuito de observar se ocorriam alterações gênicas que não resultassem em morte celular. Passado o período de incubação os poços foram lavados duas vezes com 2 mL de PBS cada um. Por conseguinte, foi adicionado 1 mL de trizol em cada poço da duplicata, as amostras foram transferidas para microtubos de 2 mL e armazenadas em freezer  $-20^\circ\text{C}$  até o momento da extração do RNA total.

##### **4.8.1. Extração do RNA total**

Os microtubos com as amostras mantidas em trizol foram descongelados à temperatura ambiente pelo período de no mínimo 15 minutos ou até o descongelamento total. Após o descongelamento foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (Merck, MO, EUA) em cada amostra, os microtubos foram agitados vigorosamente e mantidos a temperatura ambiente por 3 minutos. Depois desse período as amostras foram centrifugadas a  $12.000 \times g$  por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , que resultou na separação das amostras em três fases com cores distintas: rosa (proteínas), branca (DNA) e incolor ou aquosa (RNA). A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo estéril e livre de RNase, a fim de evitar a degradação do RNA por ação dessas enzimas.

Para que ocorresse a precipitação do RNA, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  álcool isopropílico (Merck, MO, EUA) gelado e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a  $12.000 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Em seguida, cada microtubo foi invertido cuidadosamente para descarte do sobrenadante e o RNA precipitado recebeu a adição de 1 mL de etanol (Merck, MO, EUA) a 75 % que foi diluído com água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich, MO, EUA), cuja preparação ocorreu momentos antes do uso. Cada amostra foi homogeneizada e centrifugada a  $7.500 \times g$  por 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente, o sobrenadante foi mais uma vez descartado, os microtubos foram mantidos a temperatura ambiente até que o RNA ficasse seco. Por fim, foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de água DEPC para ressuspender o RNA até a síntese do cDNA.

#### 4.8.2. Tratamento com DNase

As amostras de RNA que foram ressuspensas em água DEPC foram quantificadas no equipamento NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 (Thermo Fisher Scientific, DE, EUA). Além disso, o grau de pureza foi determinado como aceito com valores acima ou igual a 1,6 para cada amostra; esses valores foram obtidos por meio da razão da absorbância das medidas de 260 e 280 nanômetros. Após obter os valores de pureza e concentração de cada amostra, foi realizada a diluição para 1000 ng de RNA com volume final de 8  $\mu$ L com água DEPC. Posteriormente, foi adicionada à diluição 1  $\mu$ L da enzima RQ1 *RNAse-Free DNase* 1UI/ $\mu$ L (Promega, WI, EUA) e 1  $\mu$ L de *Reaction Buffer* 1 X (Promega, WI, EUA). As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C durante 30 minutos no termociclador PTC-200® (Peltier Engine, CA, EUA). Por fim, para inativação da enzima foi adicionado 1  $\mu$ L de *Stop Solution* (Promega, Madison, WI, EUA) e as amostras permaneceram no termociclador PTC-200® (Peltier Engine, CA, EUA) pelo período de 10 minutos a 65 °C.

#### 4.8.3. Síntese do DNA complementar (cDNA)

O RNA tratado com DNase foi utilizado para fazer a síntese do DNA complementar por meio do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems™, MA, EUA). Para a síntese foi preparado um mix que continha os seguintes componentes: 0,8  $\mu$ L de bases nitrogenadas (dNTPs: 4 mM de cada dNTP); 2  $\mu$ L de iniciadores aleatórios (20 pM); 1  $\mu$ L de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 2,0  $\mu$ L RT *buffer* e 3,2  $\mu$ L de água DEPC. Foram adicionados 9  $\mu$ L desse mix em cada amostra de RNA tratado pela DNase. O volume final da reação foi de 20  $\mu$ L, 11  $\mu$ L do RNA tratado e 9  $\mu$ L do mix preparado com o kit para síntese de cDNA. Após as amostras serem homogeneizadas, foram colocadas no termociclador PTC-200® (Peltier Engine, CA, EUA) para a reação de transcrição reversa. Para isso, as amostras passaram por variações de temperaturas que consistiram nas seguintes: 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85 °C por 5 minutos. Ao final desse processo, foram adicionados 180  $\mu$ L de água DEPC, cujo volume final foi de 200  $\mu$ L e as amostras armazenadas a 4 °C até que fosse feita a PCR em tempo real.

#### 4.8.4. Análise dos genes mitocondriais

A avaliação das expressões relativas dos genes mitocondriais (*MFN1*, *MFN2*, *OPA1*, *DRP1*, *MT-CYTB* e *MT-ND1*) e de gene endógeno (*HPRT1*) foram avaliadas por meio da

técnica de PCR em tempo real, cujas sequências de cada iniciador foram adquiridas da Applied Biosystems™. Na tabela 2 constam as sequências senso (*Forward*) e antisenso (*Reverse*) dos iniciadores analisados. O sistema de detecção de sequências utilizado para avaliar a expressão dos genes estudados foi o *SYBR® Green I* (Applied Biosystem, MA, EUA).

As amostras foram avaliadas em duplicatas e a variação do valor de Cq (*Cycle of quantification*) entre as duplicatas foi igual ou inferior a 0,5 de Cq. Foram utilizados controles de amplificação em todos os ensaios, onde foi adicionada apenas água DEPC para essas amostras. Além disso, a expressão do RNA mensageiro foi normatizada em relação ao gene endógeno, ou seja, o gene de referência utilizado na reação, ou seja, o gene *HPRT1*. O equipamento utilizado no experimento de PCR em tempo real foi *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, MA, EUA).

Foi preparada uma solução de PCR composta por 3 µL de cDNA, e 5 µL de Mastermix (*SYBR Green Master Mix* - Applied Biosystem, MA, EUA). Porém, o volume de cada iniciador variou devido às diferentes concentrações de uso (Tabela 1) e à quantidade final de água DEPC. Além disso, o volume final da reação foi de 10 µL. Após junção e homogeneização do Mastermix, água DEPC e iniciadores foram adicionados 7 µL em cada poço da placa de 96 poços para PCR (Scientific Specialities Inc, CA, EUA), seguida da adição de 3 µL de cDNA. Ao final desse processo, a placa foi selada com adesivo óptico *MicroAmp™* (Applied Biosystems, MA, EUA) e centrifugada a 250 X g pelo período de 2 minutos a temperatura ambiente.

No equipamento para PCR em tempo real, a placa com as amostras foi mantida por 20 segundos a 50 °C, seguido de aumento da temperatura para 95 °C por 10 minutos; isso permitiu que ocorresse a primeira desnaturação do cDNA. Seguidas de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um período de 60 segundos. Finalizados os ciclos, foi avaliada a temperatura de *melting*.

**Tabela 2.** Gene, sequência de iniciadores, eficiência e concentração

Primer	Número de acesso	Sequência de Iniciadores (5' - 3')	Amplicon	Eficiência (%)	Concentração (nM)
MFN1	NM_033540.2	F: TCCGCCTTTAACTTCTCGGG R: GCCATTATGCTAAGTCTCCGC	97	102.17	400
MFN2	NM_014874.3	F: AATCTGAGGCGACTGGTGAC R: CTCCACCAGTCTGACTTCAC	131	104.85	200
OPA1	NM_015560.2	F: AGCCCTTCTAGTTCAGAAGA R: TCTCCGGAGAACCTGAGGTAA	125	98.88	600
DRP1	NM_012062.4	F: GGGAGTAAGCCCTGAACCAAT R: CCTACAGGCACCTTGGTCAT	99	103.67	600
MT-ND1	NC_012920.1	F: ATACCCATGGCCAACCTCCT R: GGGCCTTTGCGTAGTTGTAT	110	102.83	200
MT-CYTB	NC_012920.1	F: ACCCCCTAGGAATCACCTCC R: GCCTAGGAGGTCTGGTGAG	134	102.52	200
HPRT1	NM_000194.3	F: ATGACCTTGATTTATTTGCATACCT R: AAGACGTTTCAGTCTGTCCAT	98	97.77	200

A aquisição e análise dos resultados foram realizadas por meio do *software 7500 softwares v2.0.5* (Applied Biosystem, MA, EUA). É estabelecido como biologicamente relevante a expressão relativa como igual e/ou superior e/ou inferior a 2 vezes a quantificação relativa (RQ: *relative quantification*). A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada com base na fórmula aritmética de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  descrita por Livak *et al.* (2001) e os controles utilizados foram as células que não receberam tratamento.

#### 4.9. Ensaio de ROS (*Reactive Oxygen Species*)

A determinação de ROS foi avaliada por meio do kit DCFDA / H2DCFDA – *Cellular ROS Assay Kit* (ab113851 Abcam, Cambridge, UK). Após o período experimental, as células foram incubadas com 10  $\mu$ M de DCFH-DA em meio de cultura por 45 minutos. Ao final desse período, as células foram lavadas com o tampão proveniente do kit e foram suspendidas com PBS. Foi utilizado peróxido de hidrogênio - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 % (7722-84-1 Sigma Aldrich, MO, EUA) como controle da reação, cujos poços continham somente células e o meio de cultura. Os núcleos foram marcados com 0,1  $\mu$ g/mL de Hoechst 33342 (H1399- Molecular Probes, OR, EUA), sendo adicionado 2 horas antes do período final de 24 horas, a fim de não ultrapassar o tempo. Para determinar a produção de ROS intracelular, foi utilizado o sistema *ImageXPress Micro High Content System* (Molecular Devices, CA, EUA). Cinco sítios por poços e dois poços por concentração testada foram adquiridos. O número de células positivas para ROS foi determinado por meio do programa *Cell Scoring MetaExpress* (Molecular Devices, CA, EUA).

#### 4.10. Quantificação da glutatona celular total e oxidada por luminescência

A quantificação de glutatona celular foi realizada por meio do kit comercial *GSH/GSSG-Glo™ Assay* (Promega Corporation, RU), de acordo com as instruções do fabricante, mas com algumas alterações. O kit permite avaliar por luminescência a quantidade de glutatona total (GSH+GSSG) e glutatona oxidada (GSSG). Além disso, ao obter esses dois parâmetros é possível, de maneira indireta, avaliar a glutatona reduzida, por meio do cálculo da razão entre glutatona total e glutatona oxidada. Abaixo é descrita a metodologia experimental e como é feito o cálculo de GSH/GSSG.

Em microplacas brancas de fundo chato (Corning Costar, NY, EUA) foi adicionada a quantidade de  $5 \times 10^3$  células/poço em duplicatas, mantidas em 37 °C com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> e foram aderentes ao plástico. Após atingirem a confluência de 80 - 90 %, foram incubadas com as concentrações de 25, 50 e 75 µM de C6-ceramida mais os controles pelo período de 24 horas em 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Passado o período de incubação com C6-ceramida o meio de cultura foi removido e cada poço foi lavado duas vezes com 100 µL de PBS em temperatura ambiente.

Para quantificação da glutatona total foi adicionado em cada poço com células e no poço controle da reação sem células, 50 µL do reagente de lise celular, que foi composto por: 1,0 µL de luciferina-NT, 10 µL de *Passive Lise Buffer (5X)* e 39 µL de água DEPC. Já para a quantificação da glutatona oxidada foi adicionado em cada poço com células e no poço controle da reação sem células, 50 µL do reagente de lise celular que foi composto por: 1,0 µL de luciferina-NT, 0,5 µL de NEM (25 mM), 10 µL de *Passive Lise Buffer (5X)* e 38,5 µL de água DEPC. Para ambas as quantificações o mix de reagentes foi preparado e utilizado em até 30 minutos.

A placa com as amostras e reagentes de lise foi mantida sob agitação moderada a temperatura ambiente pelo período de 10 minutos. Após esse período, foi adicionado o reagente de geração de luciferina, que foi composto por: 1,25 µL de DTT (100 mM), 3,0 µL de Glutaciona-S-transferase e 45,75 µL do *Buffer* de reação para glutatona, cujo volume de reação foi de 100 µL. Por conseguinte, a placa com os reagentes ficou sob agitação moderada por 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de permanência em repouso por 20 minutos a temperatura ambiente.

Ao final do processo de geração de luciferina, foram adicionados 100 µL do reagente de detecção de luciferina, que foi composto por: solução tampão de reconstituição de esterase e luciferina liofilizada. Ou seja, o volume final da reação após a adição de todos os reagentes totalizou 200 µL. Após adicionar o reagente de detecção, a placa foi mantida sob agitação

moderada a temperatura ambiente por 5 minutos, seguido de repouso absoluto para equilíbrio por 15 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz.

Passado o período de repouso foi realizada a leitura da luminescência com tempo de integração de 0,3 segundos por poço na plataforma *GloMax® Discover* (Promega Corporation, WI, EUA). Após a leitura, os dados obtidos da luminescência foram expressos em unidades relativas de luz (RLU - *Relative light units*). Nesse sentido, foi preciso diminuir o valor de RLU dos poços controles da reação sem células, ou seja, o branco, tanto para glutathiona total quanto glutathiona oxidada. Depois de obter esses valores foi calculada a razão entre glutathiona total e glutathiona oxidada (GSH/GSSG) por meio da fórmula:

$$(RLU \text{ de glutathiona total} - RLU \text{ de GSSG}) / [RLU \text{ de GSSG}/2]$$

#### 4.11. Ciclo Celular

Duas horas antes de completar o período de incubação (24 horas) com C6-ceramida, os núcleos das células foram corados com 0,1 µg/mL de Hoechst 33342 (H1399- Molecular Probes, OR, EUA), para que ocorresse a internalização do corante e não ultrapassasse o período de incubação. Para determinação do ciclo celular, foi utilizado o sistema *ImageXpress Micro High Content System* (Molecular Devices, CA, EUA). Cinco sítios por poços e dois poços por concentração testada foram adquiridos. O software *Cell cycle MetaXpress* (Molecular Devices, CA, EUA) foi utilizado para analisar as diferentes fases do ciclo celular.

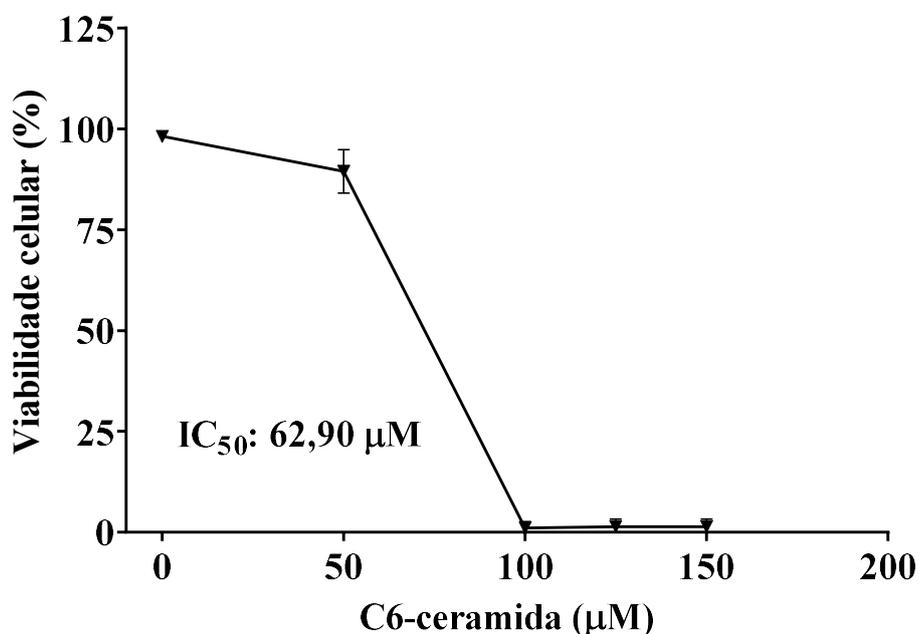
#### 4.12. Análise Estatística

A verificação de diferenças estatísticas significativas entre os parâmetros analisados das CTMTA com C6-ceramida e de controles sem adição de C6-ceramida, foi realizada por meio da análise da variância amostral - ANOVA uma-via e ANOVA duas vias, com comparações múltiplas de Bonferroni, com uso do pacote estatístico *GraphPad Prism 8* (GradPad Software, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média ± DP de dois diferentes experimentos realizados em duplicata considerando um valor de  $P < 0,05$  como estatisticamente significativo.

## 5.RESULTADOS

### 5.1. Citotoxicidade da C6-ceramida nas CTMTA

O presente estudo buscou estabelecer doses que não fossem citotóxicas e causassem morte celular. Nesse sentido, foi avaliada a citotoxicidade da C6-ceramida durante o período de 24 horas nas CTMTA, com as seguintes concentrações: 50, 75, 100, 125 e 150  $\mu\text{M}$  a fim de avaliar os efeitos biológicos. Logo, foi estabelecido que a C6-ceramida levou a morte celular de forma dose dependente, com o  $\text{IC}_{50}$  de 62,90  $\mu\text{M}$  (figura 3). Na concentração de 100  $\mu\text{M}$  observou-se 100 % de morte celular.

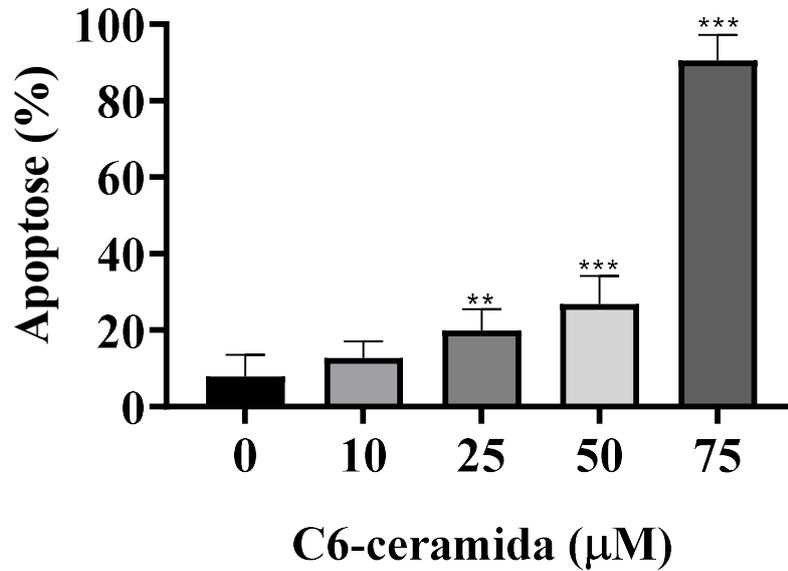


**Figura 3:** Análise da citotoxicidade da C6-ceramida após 24 horas de incubação. Ensaio realizado por Hoechst 33342 com Iodeto de Propídio. Análise realizado por *Curve fit* no *software GraphPad Prism 8*.

### 5.2. Apoptose e Necrose

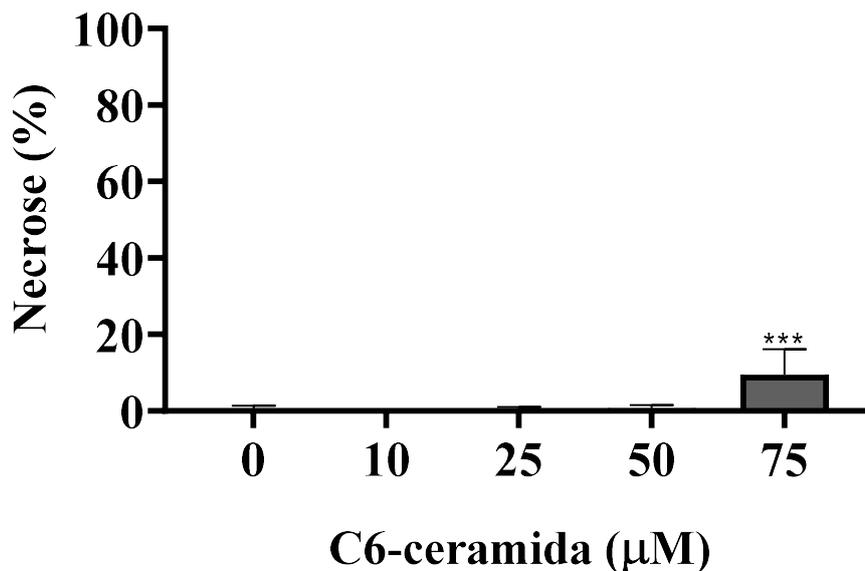
Para entender os tipos de morte que a C6-ceramida poderia causar nas CTMTA em 24 horas, foram avaliados os processos de apoptose e necrose.

A C6-ceramida causou apoptose nas CTMTA após 24 horas de incubação nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$ , em 19,87 % das células, 50  $\mu\text{M}$ , em 26,82 % das células e 75  $\mu\text{M}$ , com 90,51 % das células em apoptose (figura 4). Na concentração de 10  $\mu\text{M}$  não se observou diferença significativa estatisticamente quando comparado com controle que não recebeu nenhum tipo de adição de C6-ceramida.



**Figura 4:** Gráfico da porcentagem de CTMTA em apoptose após 24 horas de incubação com C6-ceramida, determinado pela externalização de fosfatidilserina marcada com Anexina-V e núcleos celulares marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8*. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Em 9,49 % das células foi observado o processo necrose na concentração de 75 µM. Porém as demais concentrações testadas não causou morte celular significativa em decorrência do processo de necrose (figura 5).

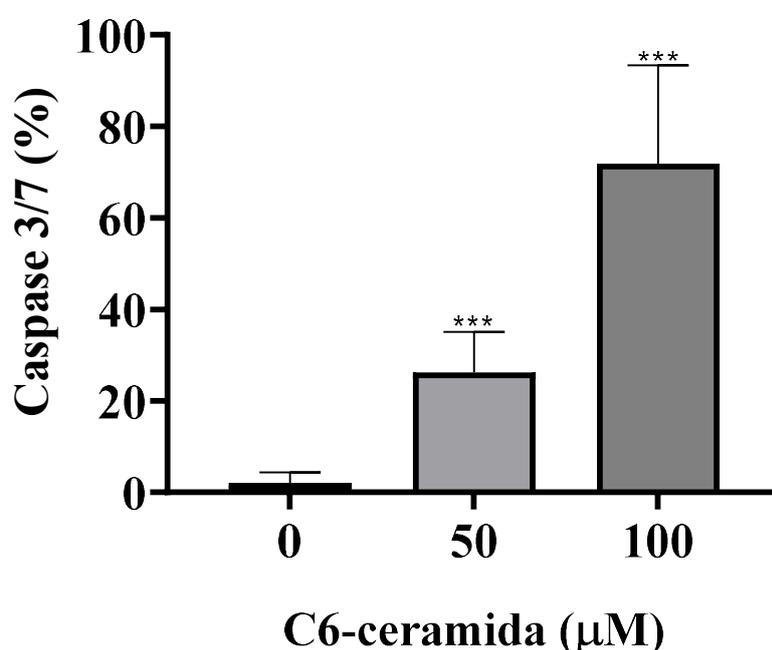


**Figura 5:** Gráfico da porcentagem de CTMTA em necrose após 24 horas de incubação com C6-ceramida, determinado por Iodeto de Propídio e núcleos celulares marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8*. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 5.3. Análise de caspase 3/7

O presente estudo avaliou se o mecanismo de morte celular por apoptose decorrente da ação da C6-ceramida nas CTMTA foi capaz de ativar a caspase 3/7.

Nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  após 24 horas a C6-ceramida ativou a caspase 3/7 (figura 6). Logo, foi observado que na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , 26,16 % células foram positivas e na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , 71,85 % das células apresentaram caspase 3/7 ativada. Esse resultado corrobora a apoptose observada nos ensaios com Anexina-V em que ocorre a externalização da fosfatidilserina.



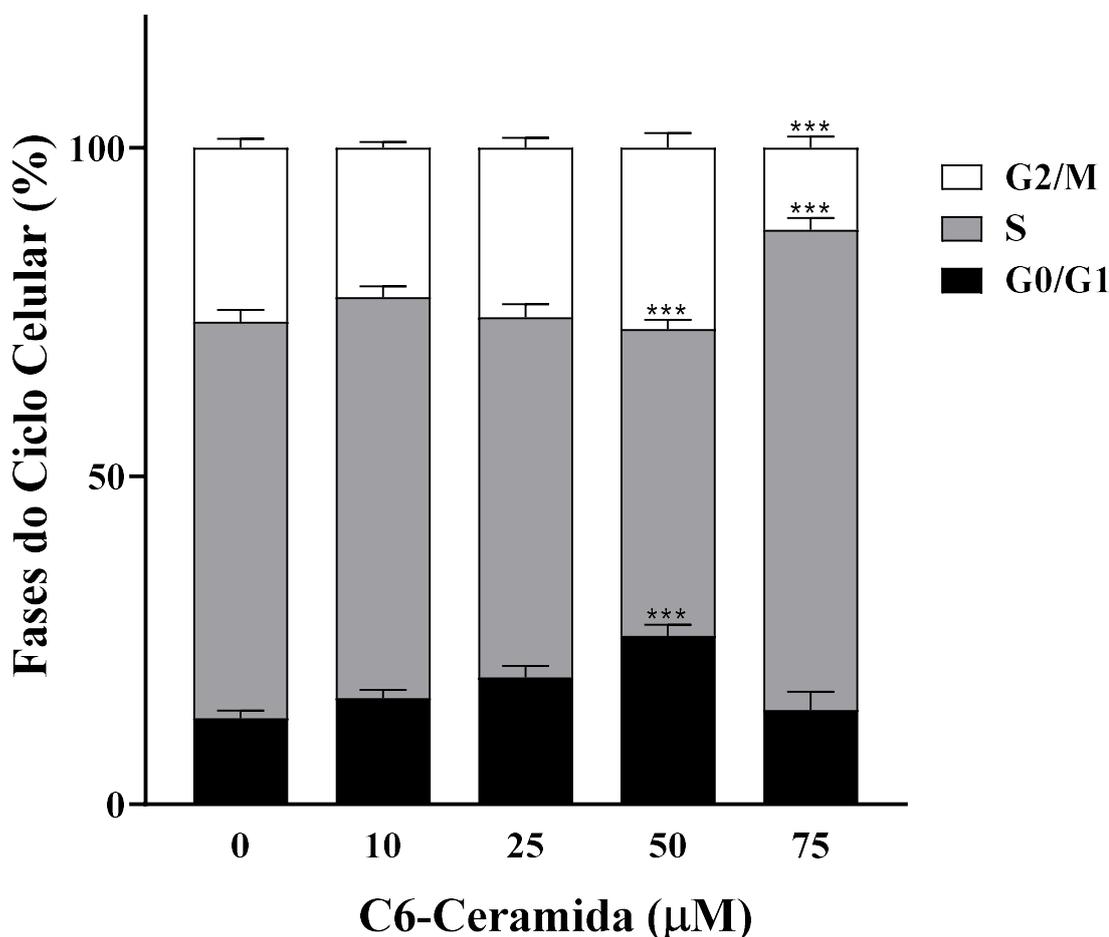
**Figura 6:** Gráfico da porcentagem de CTMTA com caspase 3/7 ativada após 24 horas de incubação com C6-ceramida, determinada por *CellEvent Caspase-3/7 Green* e núcleos celulares marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way ANOVA* e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 5.4. Ciclo celular

Para entender se a C6-ceramida exercia influência na proliferação e divisão celular o ciclo celular foi analisado.

O ciclo celular das CTMTA foi avaliado após 24 horas de incubação com C6-ceramida e foi observado aumento da quantidade de células na fase G0/G1 na concentração de 50  $\mu\text{M}$  com significância estatística, ou seja, sugestivo que possa estar agindo no estado quiescente das células. Além disso, ocorreu aumento da quantidade de células na fase S na concentração de 75  $\mu\text{M}$  com significância estatística, sugestivo de que a C6-ceramida possa influenciar na

replicação do DNA. Em contrapartida, ocorreu redução de células na fase G2/M na concentração de 75  $\mu\text{M}$ , com significância estatística, o que sugere possível diminuição do crescimento celular (figura 7).

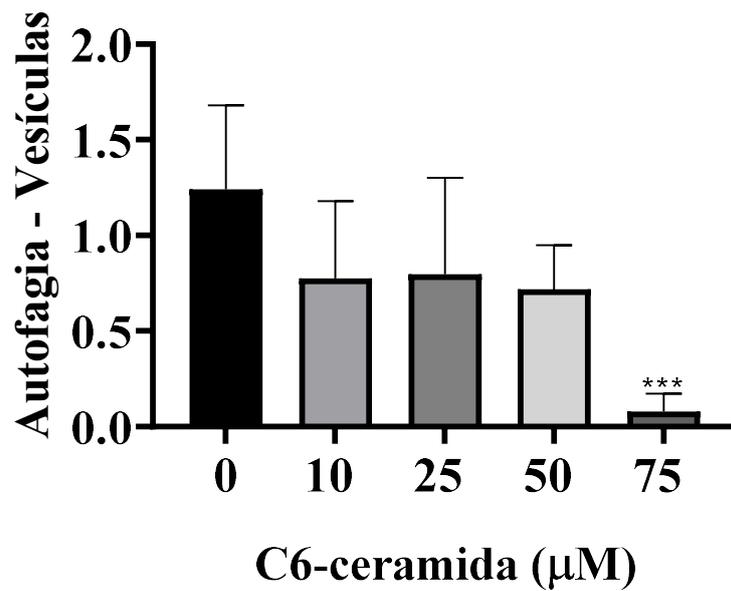


**Figura 7:** Gráfico do ciclo celular das CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida, os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way ANOVA* e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

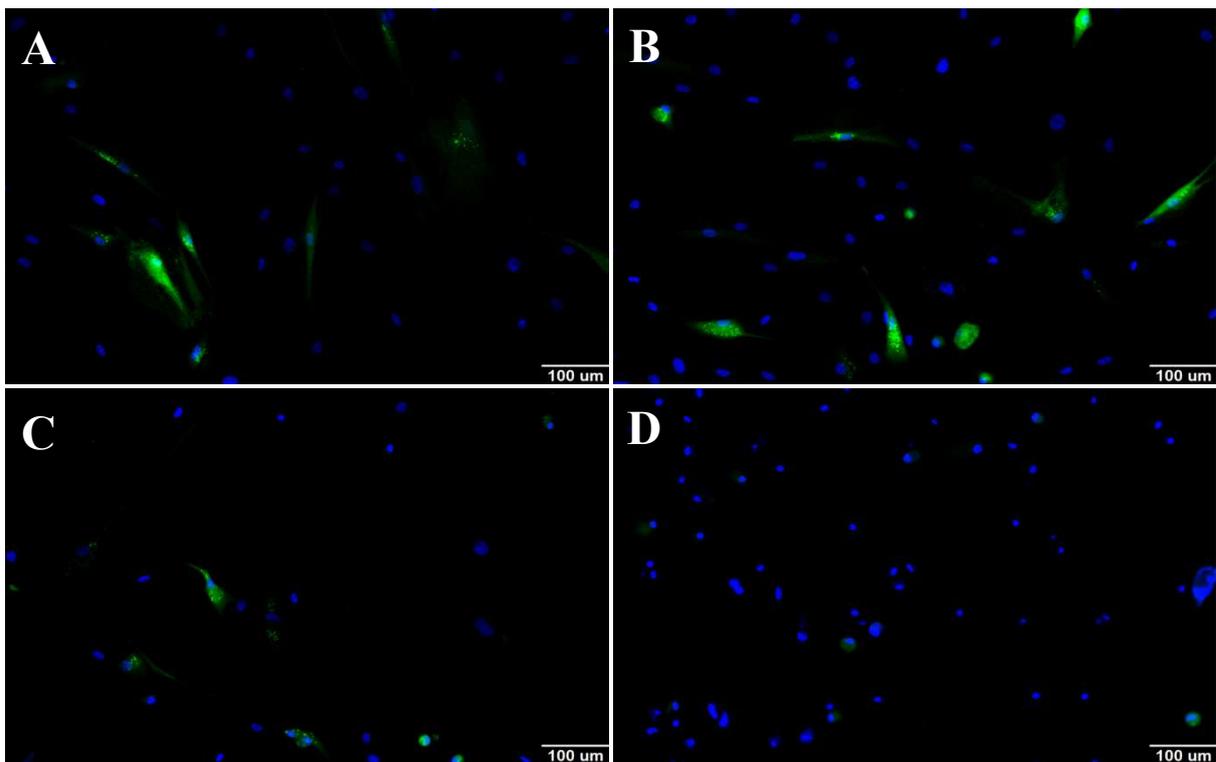
### 5.5. Autofagia, marcação com Anexina-V e LysoTracker®

O processo de autofagia que pode levar à sobrevivência ou morte celular foi avaliado por meio do kit de detecção LC3B-FP.

A proteína LC3B foi visualizada após a transfecção com a quimera LC3B-FP, que torna possível a marcação da proteína na cor verde e permite sua visualização em vesículas fluorescentes. Após 24 horas de incubação com C6-ceramida as CTMTA apresentaram diminuição da presença das vesículas marcadas com LC3B-FP em todas as concentrações. Porém, só foi estatisticamente significativo na concentração de 75  $\mu\text{M}$  (figura 8). Além disso, é possível visualizar a diminuição da marcação das vesículas nas imagens (figura 9).



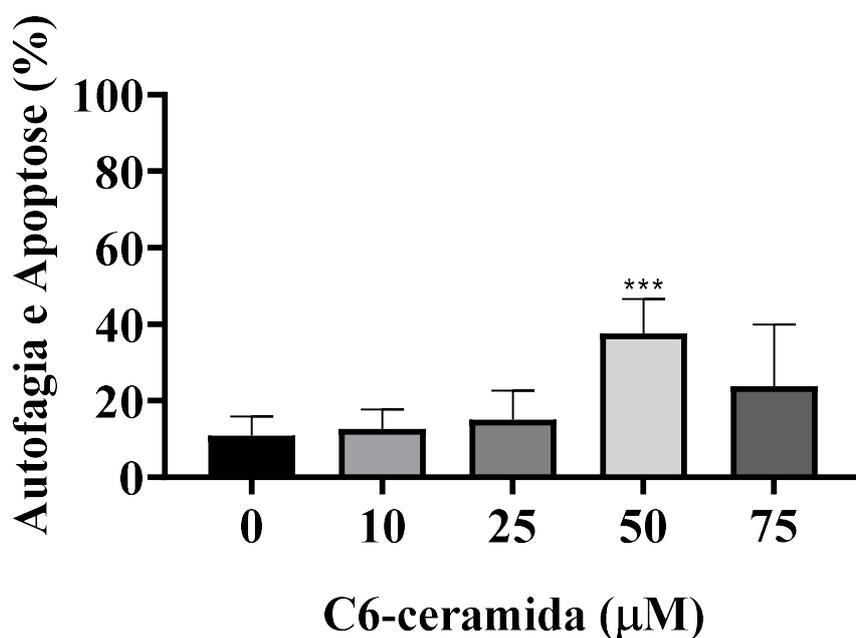
**Figura 8:** Gráfico da quantidade de vesículas marcadas com LC3B-FP em CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida, os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way ANOVA* e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



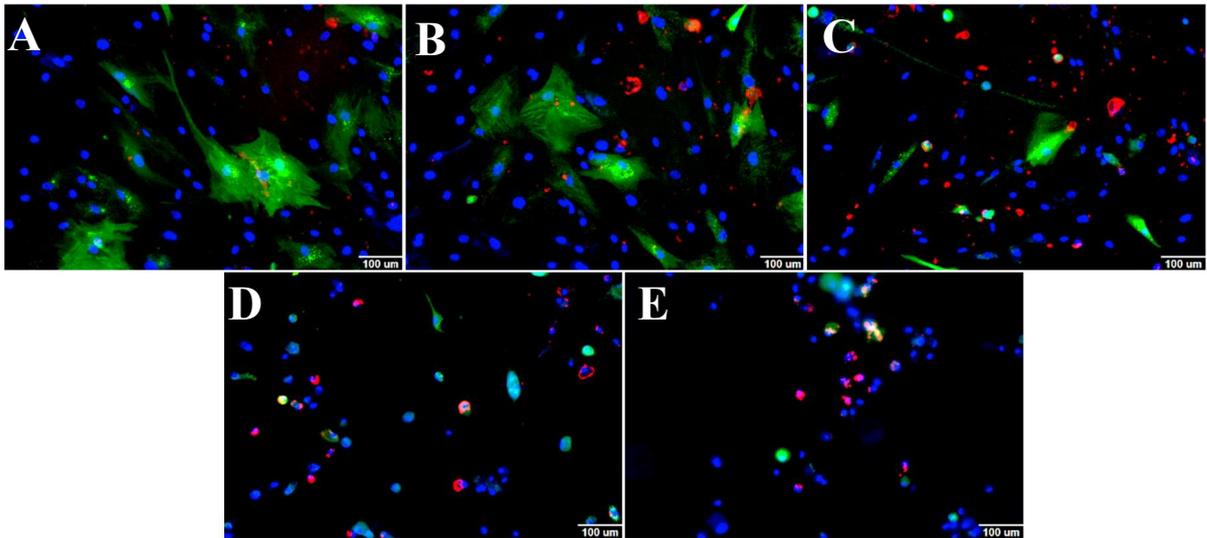
**Figura 9:** Fotomicrografias representativas das vesículas marcadas com LC3B-FP (Verde) e núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul) das CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. **A:** Controle; **B:** 10 µM; **C:** 25 µM; **D:** 50 µM de C6-ceramida.

Foi realizada, também, a dupla marcação para autofagia (LC3B-FP) e apoptose (Anexina-V), com o intuito de observar se as CTMTA apresentavam ambos os eventos concomitantemente. Após 24 horas de incubação com C6-ceramida ocorreu aumento na

porcentagem de CTMTA marcadas para os dois eventos, autofagia e apoptose, 37,58 %, na concentração de 50  $\mu\text{M}$  (figura 10). Quanto às demais concentrações testadas os resultados não foram estatisticamente significantes. Além disso, é possível observar nas imagens a dupla marcação das CTMTA (figura 11), onde é possível visualizar a dispersão do LC3B-FP, em verde, no citoplasma e sua diminuição conforme aumenta a concentração de C6-ceramida. Enquanto a marcação com Anexina-V, em vermelho, aumenta sua intensidade nas maiores concentrações e fica localizada mais próxima ao núcleo.

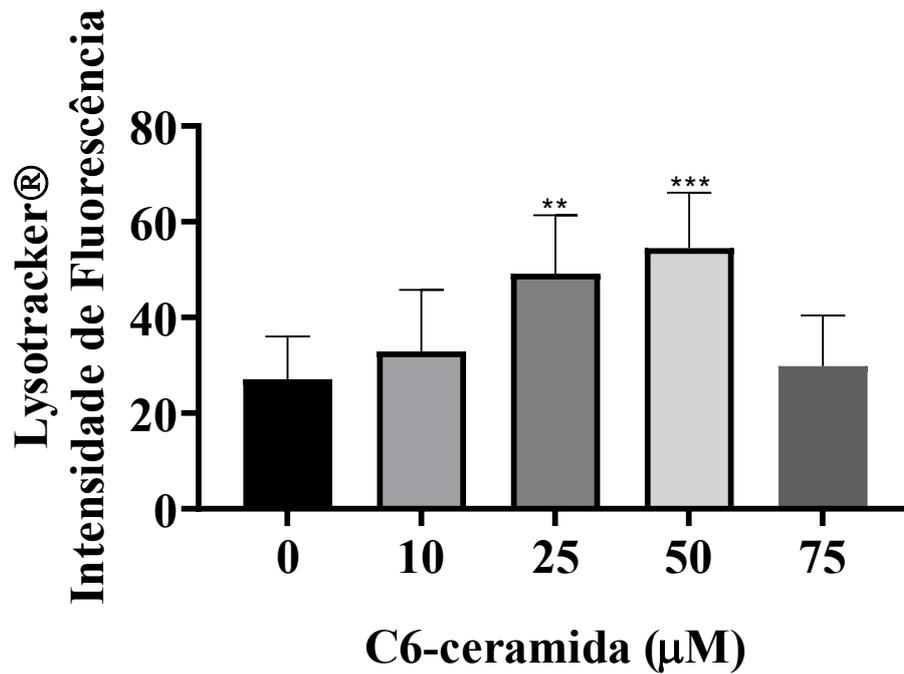


**Figura 10:** Gráfico da porcentagem de CTMTA positivas após 24 horas de incubação com C6-ceramida, determinada pela marcação de LC3B-FP (autofagia), externalização de fosfatidilserina (Anexina-V, apoptose) e núcleos celulares marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

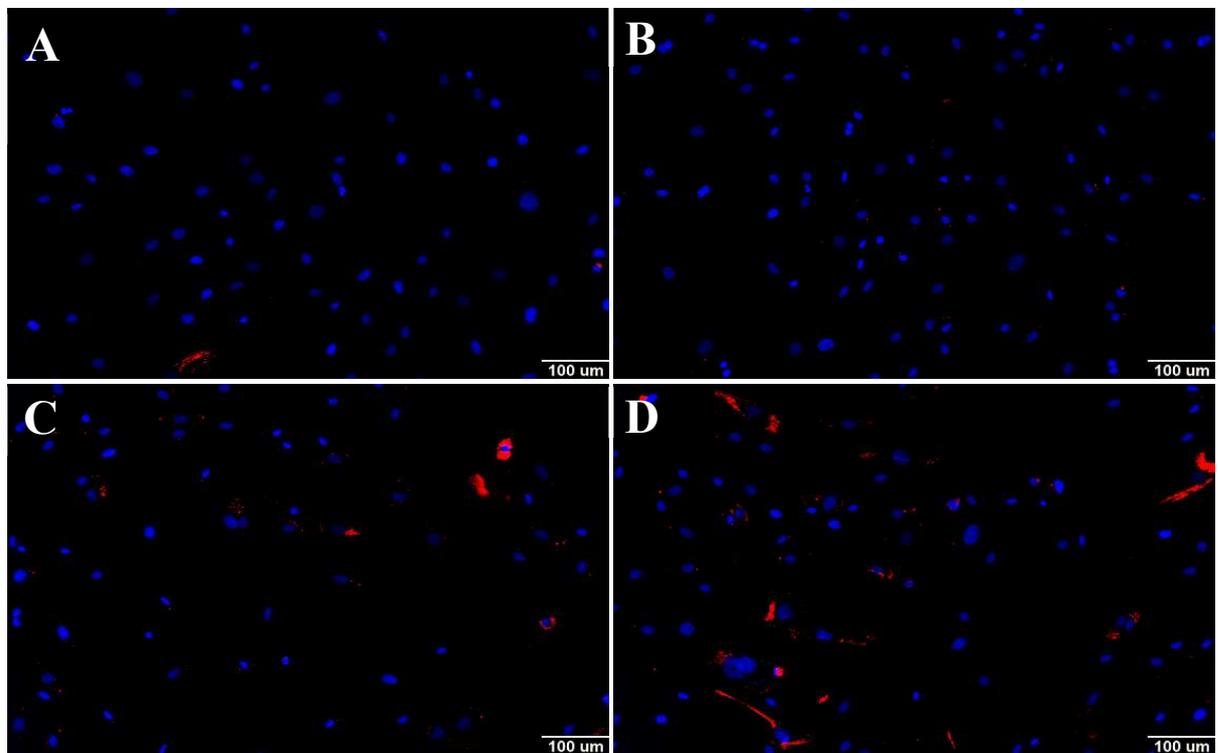


**Figura 11:** Fotomicrografias representativas da proteína LC3B-FP (Verde), Anexina-V (Vermelho) e núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul) das CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. **A:** Controle; **B:** 10  $\mu\text{M}$ ; **C:** 25  $\mu\text{M}$ ; **D:** 50  $\mu\text{M}$ ; **E:** 75  $\mu\text{M}$  de C6-ceramida.

Outro método para avaliar o processo de autofagia das CTMTA incubadas com C6-ceramida após 24 horas foi a marcação das organelas ácidas com o corante LysoTracker®. Esse corante fluorescente tem afinidade por organelas ácidas e ocorre seu acúmulo dentro desses compartimentos. Após o período de incubação foi observado aumento estatisticamente significativo nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  (figura 12). Também é possível visualizar aumento da intensidade de fluorescência nas imagens em maiores concentrações de C6-ceramida (figura 13). Ou seja, esses dados sugerem que a autofagia foi interrompida e resultou em aumento da concentração dessas organelas ácidas devido não seguirem para a via de degradação do processo autofágico, sendo essa uma possível explicação para seu aumento.



**Figura 12:** Gráfico da intensidade de fluorescência das organelas ácidas das CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida, determinada pela marcação com corante fluorescente Lysotracker® LC3B-FP e núcleos celulares marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

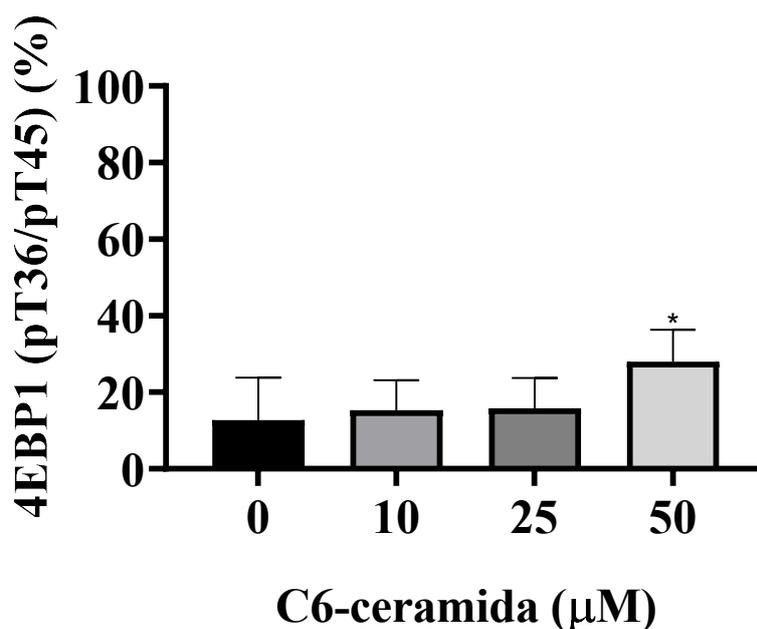


**Figura 13:** Fotomicrografias representativas das organelas ácidas marcadas com corante fluorescente Lysotracker®-FP (Vermelho) e núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul) das CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. A: Controle; B: 10 μM; C: 25 μM; D: 50 μM de C6-ceramida.

### 5.6. Análise da expressão das proteínas 4EBP1 (pT36/pT45, mTORC1) e Akt (pS473, mTORC2)

Nessa metodologia, quantificamos por imunofluorescência indireta a proteína 4EBP1, por meio do anticorpo Alexa Fluor® 488 Mouse anti-4EBP1 (pT36/pT45) que marca a proteína 4EBP1 fosforilada nas treoninas T26 e T45. A proteína Akt foi quantificada indiretamente pela marcação da proteína Akt fosforilada, por meio do anticorpo PE Mouse anti-Akt (pS473) que reconhece a porção C-terminal na serina 473 fosforilada. Além disso, sabe-se que a proteína 4EBP1 faz parte da via de sinalização da proteína mTORC1 e a proteína Akt faz parte da via de sinalização da proteína mTORC2.

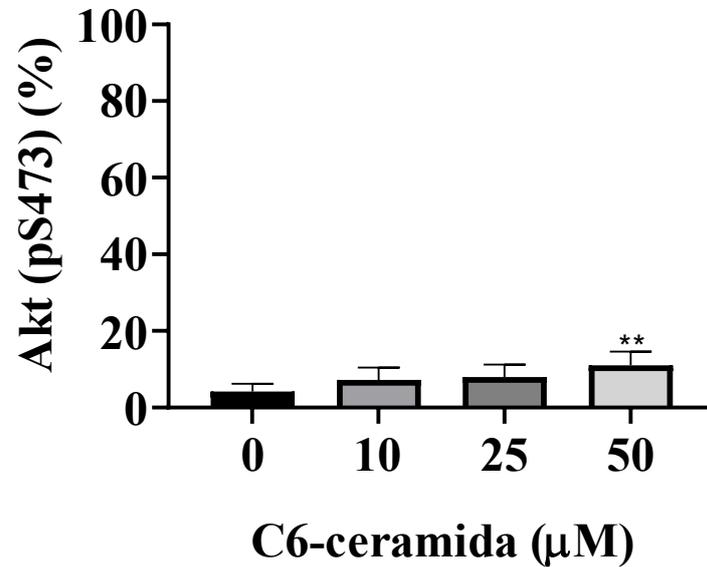
Houve um aumento significativo da expressão da proteína 4EBP1, ou seja, é possível inferir indiretamente que ocorreu modulação positiva da via da proteína mTORC1, nas concentrações 50  $\mu$ M com 27,96 % das células positivas (figura 14). Porém, não foi observada diferença significativa nas demais concentrações testadas.



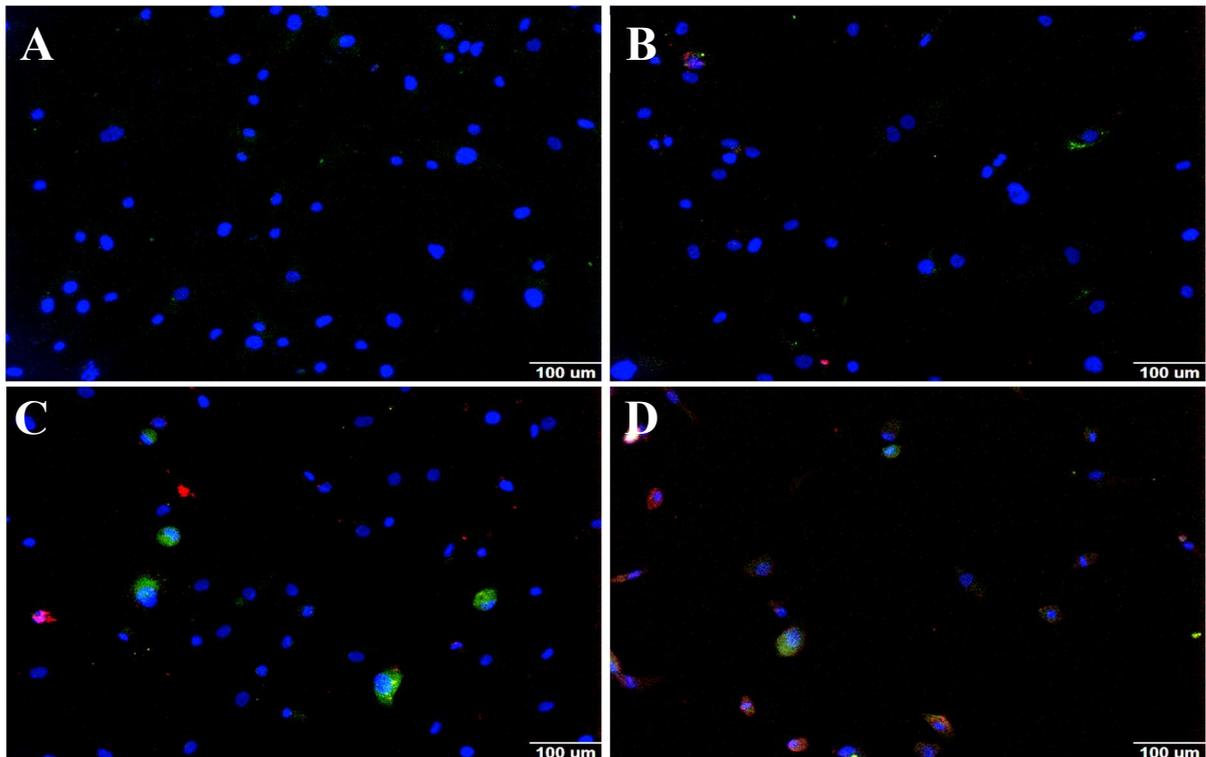
**Figura 14:** Gráfico da porcentagem de CTMTA positivas para 4EBP1 (pT36/pT45, mTORC1) após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way ANOVA* e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Para a proteína Akt (pS473, mTORC2) observou-se aumento significativo da expressão na concentração de 50  $\mu$ M com 11,04 % das células positivas (figura 15). Nas demais concentrações não se observou diferença significativa. Ou seja, é possível inferir indiretamente que ocorreu modulação positiva da via da proteína mTORC2. Além disso, nas imagens é

possível observar o aumento da expressão das proteínas analisadas na concentração de 50  $\mu\text{M}$  de C6-ceramida (figura 16).



**Figura 15:** Gráfico da porcentagem de CTMTA positivas para Akt (pS473, mTORC2) após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way ANOVA* e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

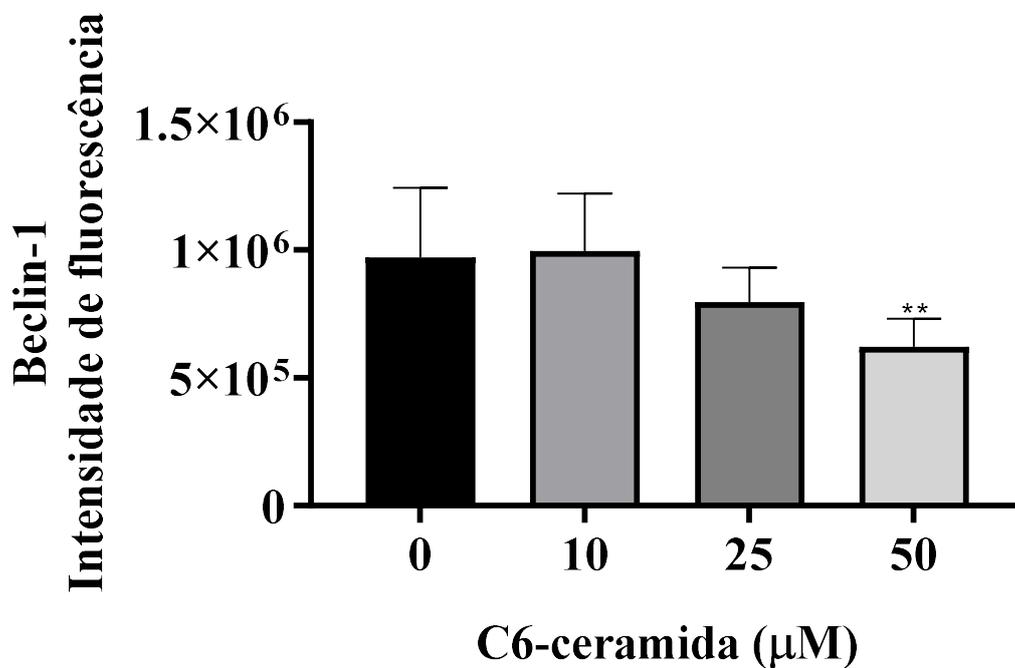


**Figura 16:** Fotomicrografias representativas das proteínas 4EBP1 (pT36/pT45, mTORC1) (Verde) e Akt (pS473, mTORC2) (Vermelho) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul). A: Controle com meio de cultura somente; B: 10 $\mu\text{M}$ ; C: 25 $\mu\text{M}$ ; D: 50 $\mu\text{M}$  de C6-ceramida.

### 5.7. Análise da expressão das proteínas Beclin-1 e Bcl-2

Foi realizada a marcação das proteínas Beclin-1 e Bcl-2, sendo a primeira uma proteína que participa da formação do autofagossomo na autofagia e a segunda bloqueia a atividade da primeira para que haja um equilíbrio quanto a homeostase celular. A técnica utilizada foi a imunofluorescência indireta para a quantificação dessas proteínas.

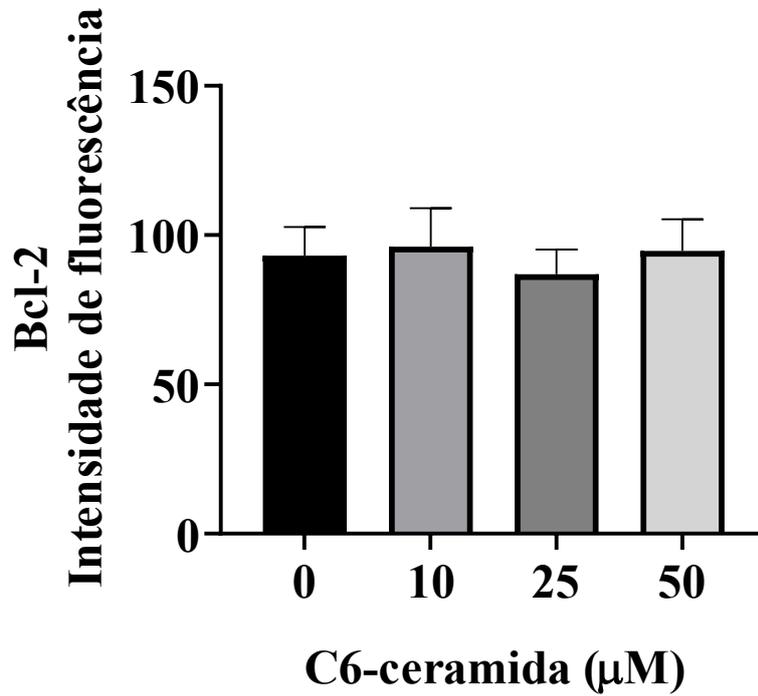
Para a análise da proteína Beclin-1 foi quantificada sua intensidade de fluorescência nas CTMTA incubadas com C6-ceramida durante 24 horas. É possível observar no gráfico que ocorreu redução da intensidade de fluorescência com significância estatística apenas na concentração de 50  $\mu\text{M}$  (figura 17).



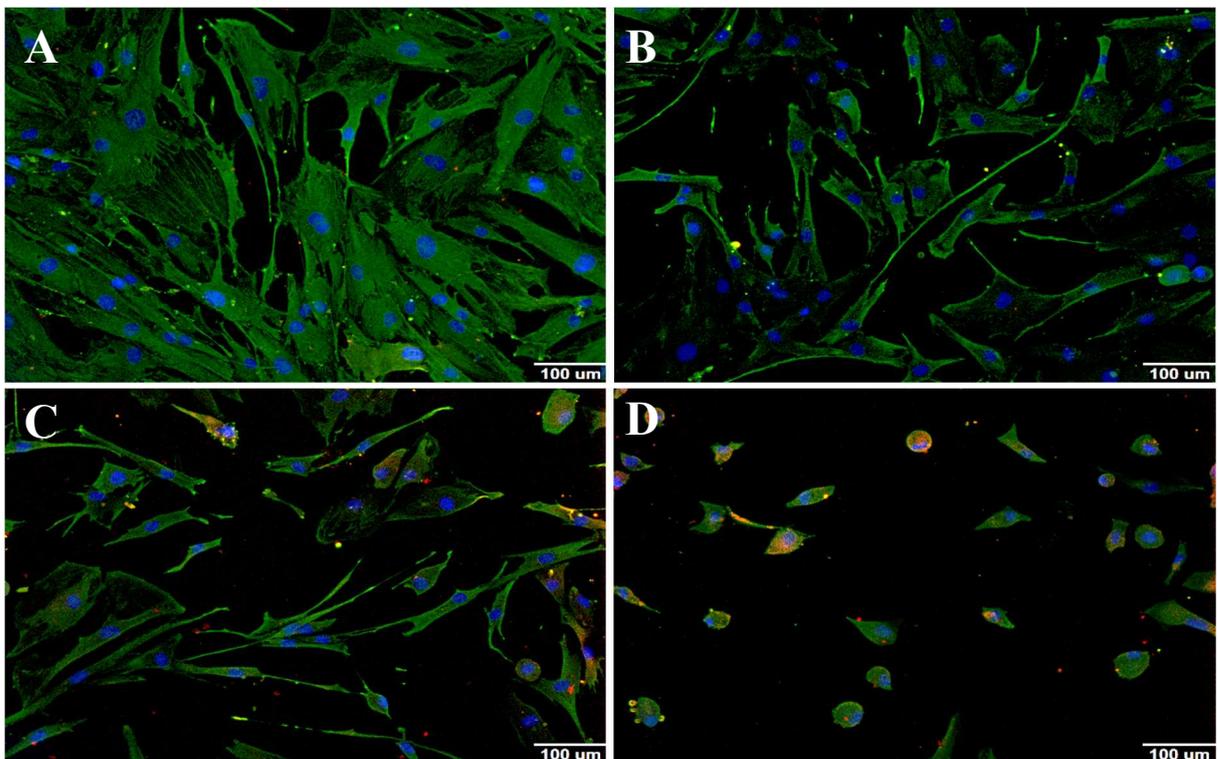
**Figura 17:** Gráfico da intensidade de fluorescência de CTMTA positivas para Beclin-1 após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

A proteína Bcl-2 não apresentou diferença de expressão em nenhuma das diferentes concentrações testadas de C6-ceramida (figura 18).

É possível observar pelas imagens a dupla marcação das CTMTA para as duas proteínas e visualizar suas expressões, nas diferentes concentrações de incubação com C6-ceramida após 24 horas (figura 19). Onde a proteína Beclin-1 está dispersa no citoplasma e diminui sua expressão conforme ocorre aumento da concentração de C6-ceramida. Enquanto a proteína Bcl-2 torna-se evidente nas concentrações mais altas e fica próximo ao núcleo apesar de não ser significativo estatisticamente.



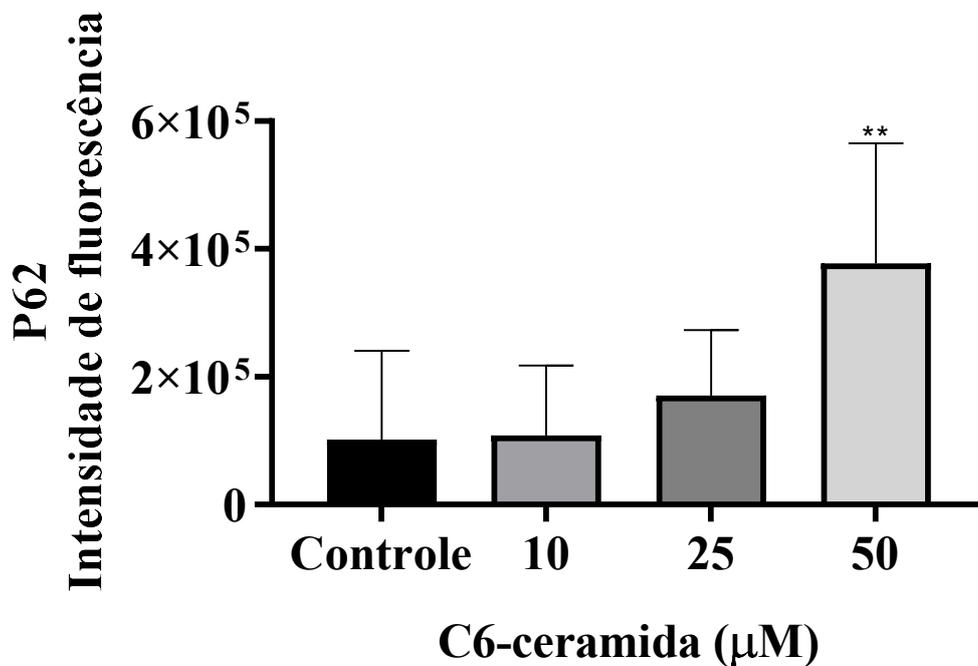
**Figura 18:** Gráfico da intensidade de fluorescência de CTMTA positivas para Bcl-2 após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way ANOVA* e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8*.



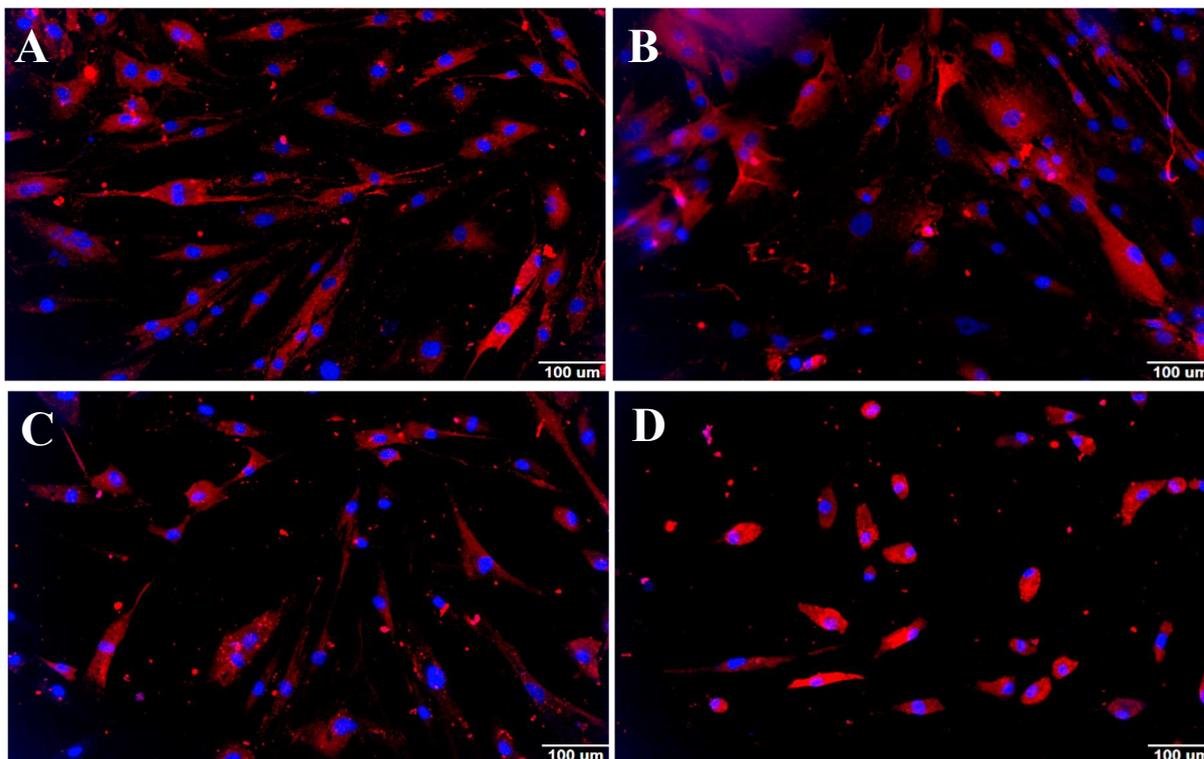
**Figura 19:** Fotomicrografias representativas das proteínas Beclin-1 (Verde) e Bcl-2 (Vermelho) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul). A: Controle com meio de cultura somente; B: 10µm; C: 25µm; D: 50µm de C6-ceramida.

### 5.8. Análise da expressão da proteína p62

Outra proteína que participa do processo de autofagia é a p62. Nesse sentido, foi realizada a marcação da proteína p62 por meio da técnica de imunofluorescência indireta para sua quantificação. Essa proteína é importante para o direcionamento de outras proteínas durante a autofagia para que sejam degradadas. Foi possível observar que na concentração de 50  $\mu\text{M}$  (figura 20) houve aumento estatisticamente significativo da expressão da proteína p62. Porém, nas demais concentrações testadas não se observou diferença significativa. Além disso, é perceptível nas imagens aumento da intensidade da proteína p62 (figura 21), em que sua expressão ocorre de maneira dispersa no citoplasma, ficando mais concentrada próximo ao núcleo nas maiores concentrações de C6-ceramida, possivelmente devido a um remodelamento do citoplasma.



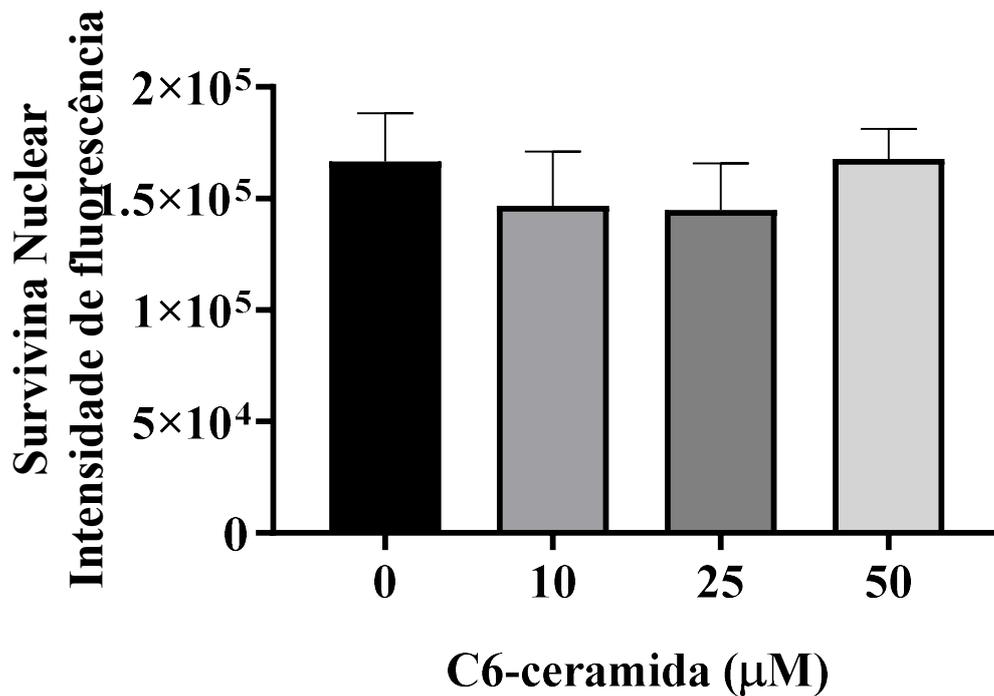
**Figura 20:** Gráfico da intensidade de fluorescência de CTMTA positivas para p62 após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way ANOVA* e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



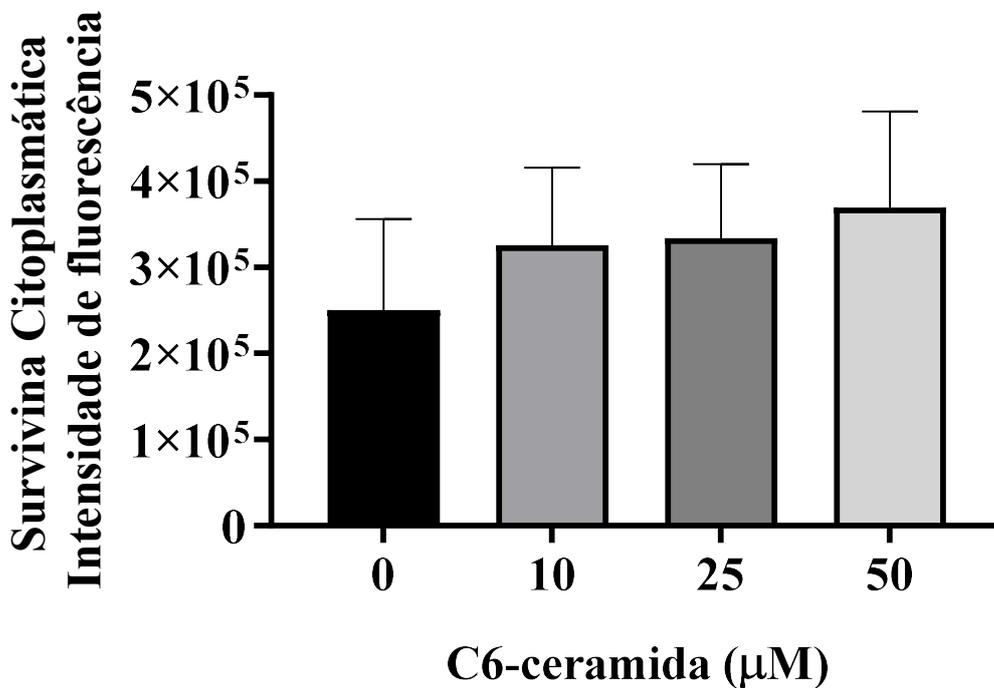
**Figura 21:** Fotomicrografias representativas da proteína p62 (Vermelho) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul). A: Controle com meio de cultura somente; B: 10  $\mu$ M; C: 25  $\mu$ M; D: 50  $\mu$ M de C6-ceramida.

### 5.9. Análise da expressão da proteína Survivina

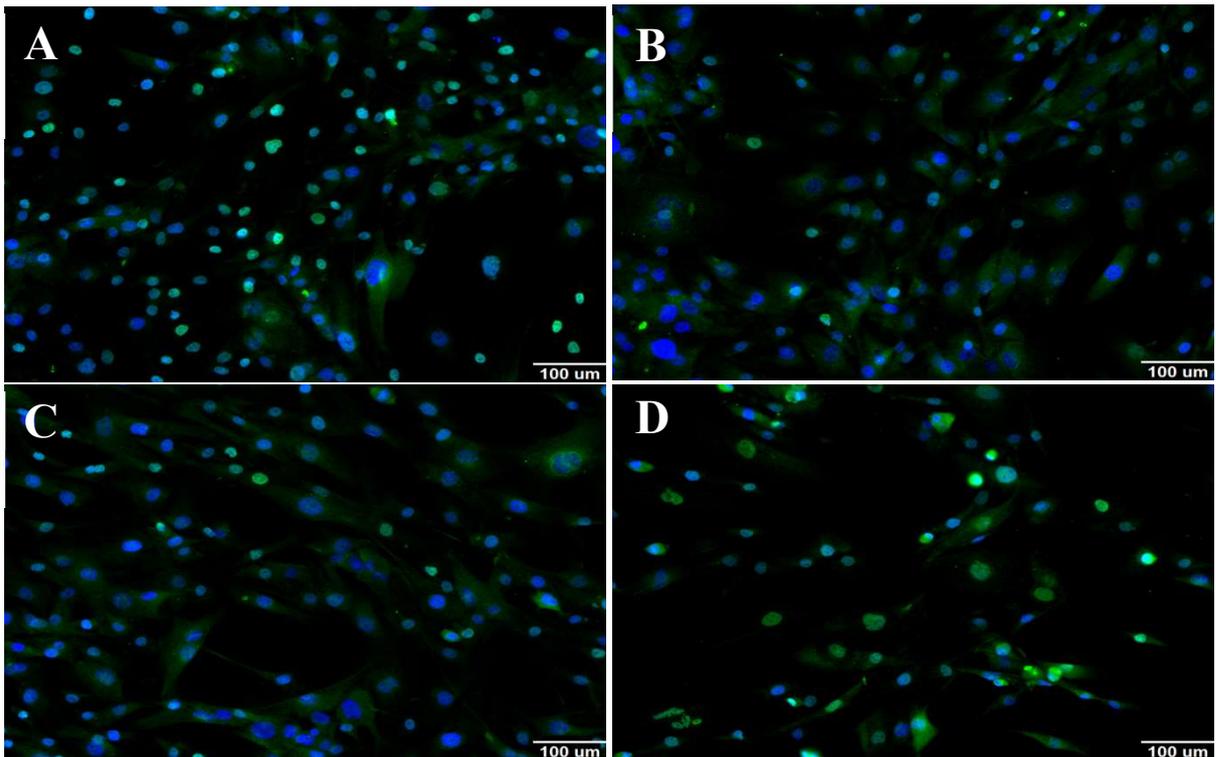
A proteína survivina pode agir como um modulador negativo da autofagia; no núcleo, participa da divisão celular, e no citoplasma tem ação citoprotetora (STAUBER *et al.*, 2007). Assim, foi realizada a quantificação da intensidade de fluorescência nuclear e citoplasmática dessa proteína por meio da técnica de imunofluorescência indireta. Logo, não foi observada diferença significativa no núcleo ou citoplasma (figuras 22 e 23). Além disso, as imagens obtidas demonstram que não ocorreu diferença quanto a marcação por imunofluorescência indireta da proteína survivina (figura 24). Além disso, avaliamos a porcentagem de células positivas para marcação dessa proteína que está presente nas CTMTA em todas as concentrações (figura 25).



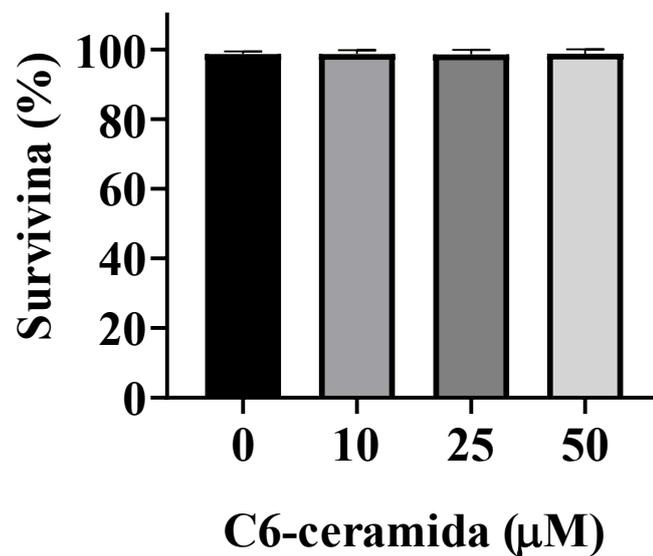
**Figura 22:** Gráfico da intensidade de fluorescência nuclear das CTMTA positivas para survivina após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way ANOVA* e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism8*.



**Figura 23:** Gráfico da intensidade de fluorescência citoplasmática de CTMTA positivas para Survivina após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way ANOVA* e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8*.



**Figura 24:** Fotomicrografias representativas da proteína Survivina (Verde) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul). **A:** Controle com meio de cultura somente; **B:** 10  $\mu$ M; **C:** 25  $\mu$ M; **D:** 50  $\mu$ M de C6-ceramida.

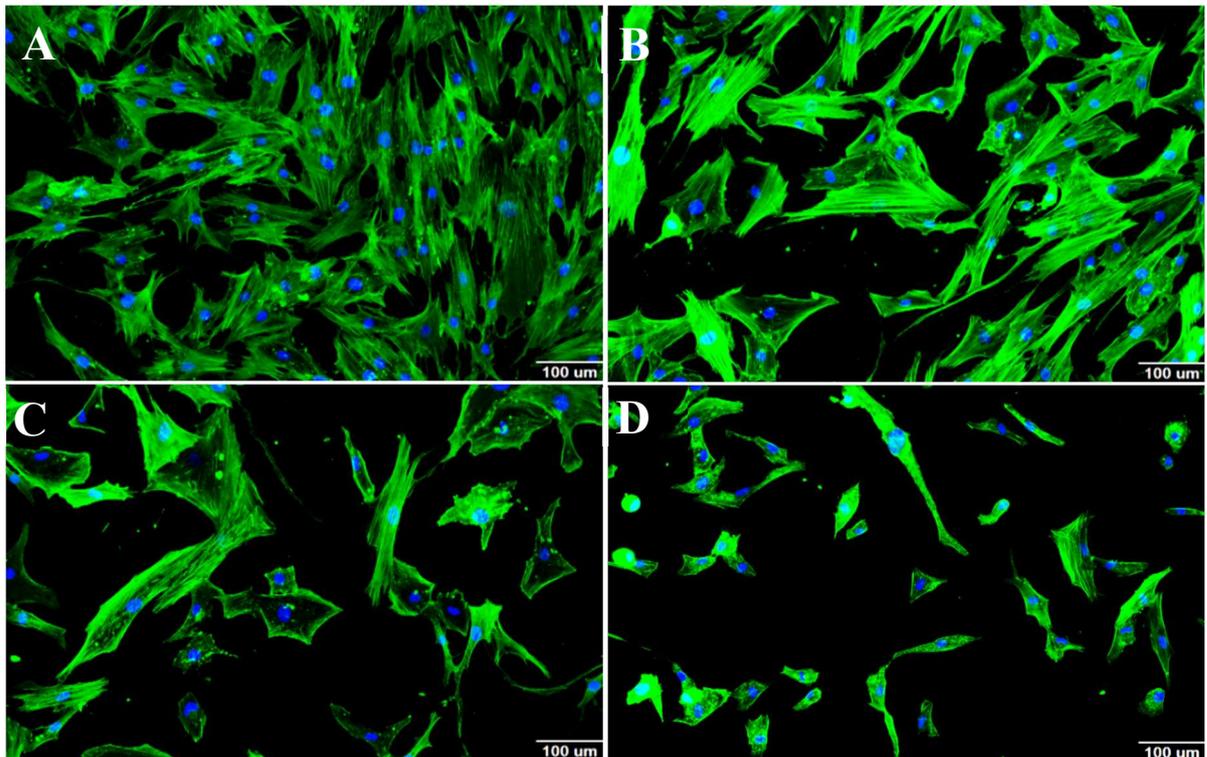


**Figura 25:** Gráfico da porcentagem de CTMTA positivas para Survivina após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way ANOVA* e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8*.

### 5.10. Análise da organização citoplasmática da proteína F-actina e vimentina

Foi realizada a marcação da proteína F-actina por meio da técnica de imunofluorescência indireta e a análise de sua organização no citoplasma das CTMTA após 24 horas de incubação em C6-ceramida. Os núcleos foram marcados com Hoechst 33342.

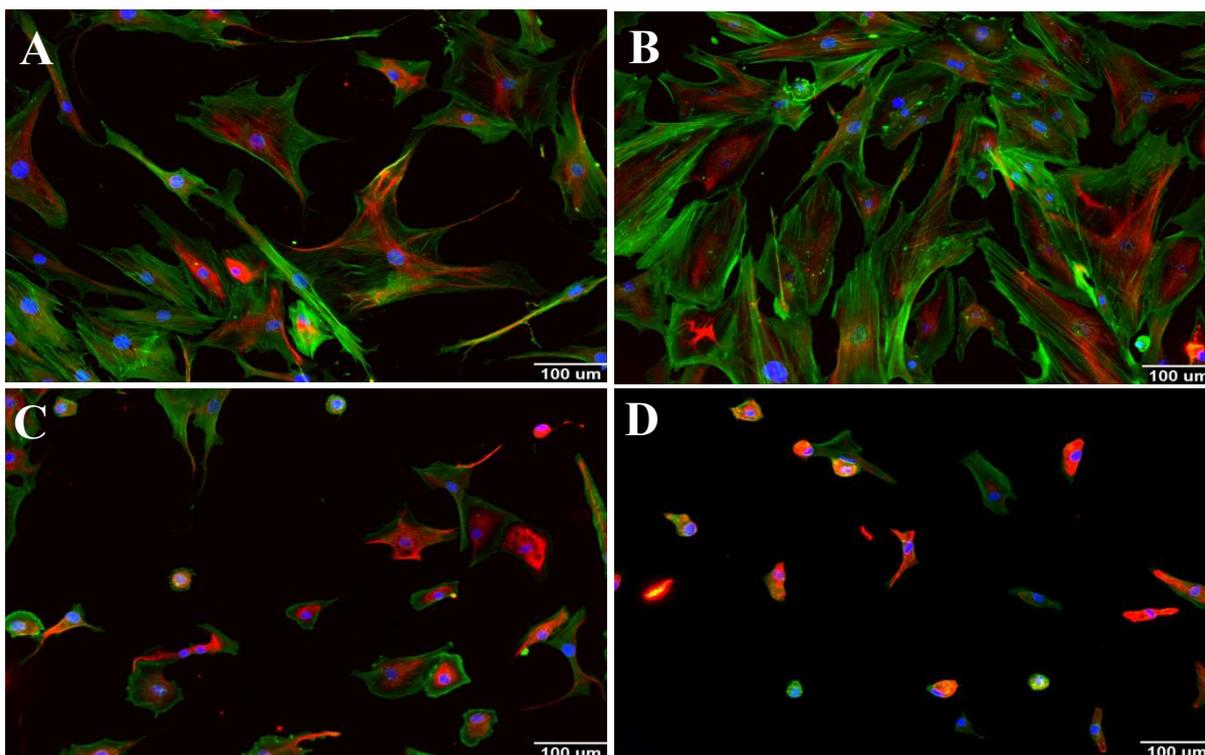
A análise foi realizada por meio de fotomicrografias, onde é possível observar que a proteína se apresenta arranjada em fibras longas, em sua maioria situadas paralelamente nas células e com adesões focais. Além disso, observa-se um aumento de fibras na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , seguida de dispersão dessas fibras no citoplasma, com localização próxima a membrana plasmática e perda da arquitetura conformacional de acordo com aumento das concentrações de C6-ceramida (figura 26), que resulta em células com um citoplasma menor e com maior intensidade de fluorescência.



**Figura 26:** Fotomicrografias representativas da proteína F-actina (Verde) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul). **A:** Controle com meio de cultura somente; **B:** 10  $\mu\text{M}$ ; **C:** 25  $\mu\text{M}$ ; **D:** 50  $\mu\text{M}$  de C6-ceramida.

A proteína vimentina foi comarcada em conjunto com a proteína F-actina por meio da técnica de imunofluorescência indireta e realizada a análise da organização dos filamentos no citoplasma das CTMTA após 24 horas de incubação em C6-ceramida. Os núcleos foram marcados com Hoechst 33342.

A análise foi realizada por meio de fotomicrografias, onde é possível observar que ambas as proteínas estão dispersas no citoplasma, sendo que nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  a proteína vimentina fica localizada próximo ao núcleo e perdem a arquitetura conformacional de acordo com aumento das concentrações de C6-ceramida (figura 27). Ou seja, isso resulta em células com um citoplasma menor, cujo encolhimento deixa a marcação fluorescente mais intensa.

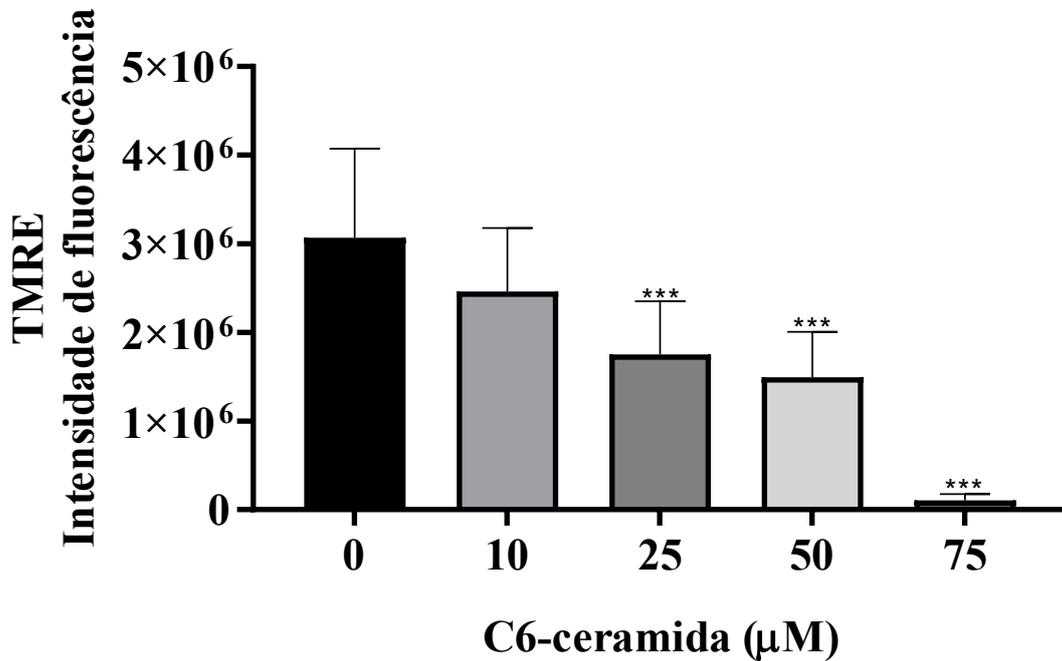


**Figura 27:** Fotomicrografias representativas das proteínas F-actina (Verde) e vimentina (Vermelho) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul). A: Controle com meio de cultura somente; B: 10  $\mu\text{M}$ ; C: 25  $\mu\text{M}$ ; D: 50  $\mu\text{M}$  de C6-ceramida.

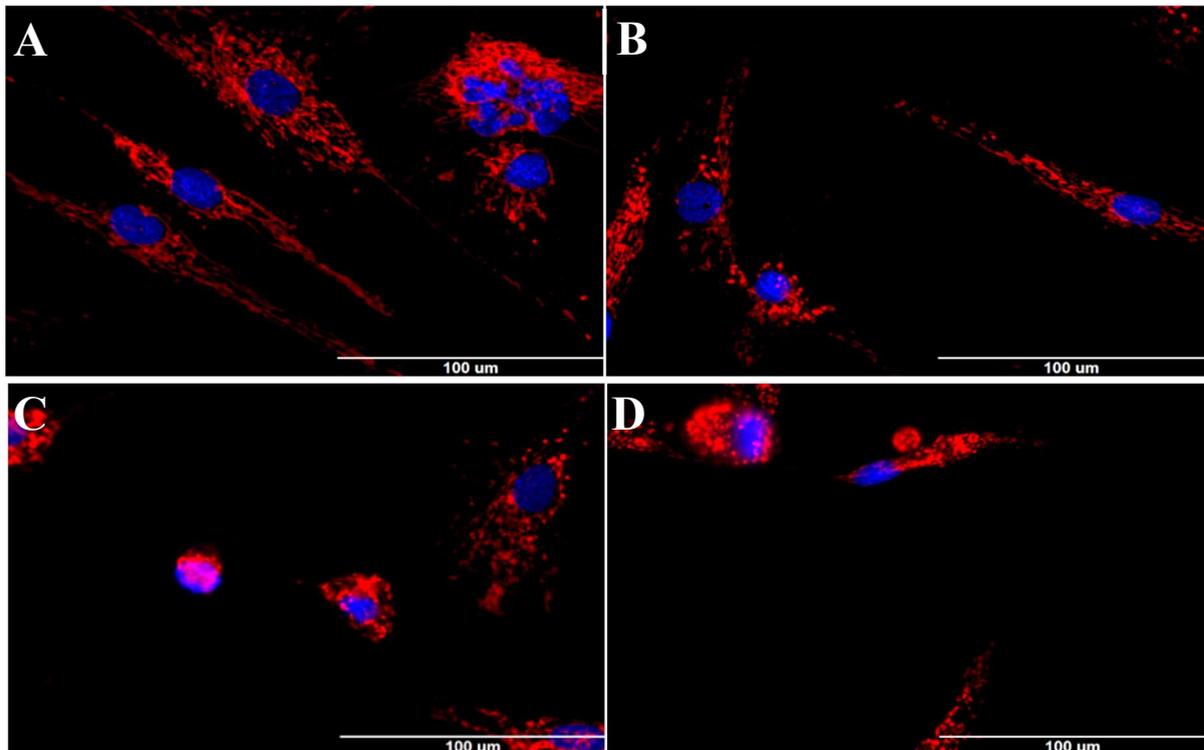
### 5.11. Avaliação do potencial transmembranar mitocondrial ( $\Delta\psi\text{m}$ ) por TRME

O TMRE é um reagente catiônico e permeável em mitocôndrias ativas por conta do potencial negativo da membrana interna. Esse método foi utilizado para análise dos efeitos da C6-ceramida na dinâmica e disfunção mitocondrial. Foi observado que ocorreu diminuição do potencial de membrana mitocondrial nas concentrações de 25 a 100  $\mu\text{M}$ , com diferenças estatisticamente significativas (figura 28). Além disso, foram analisadas as imagens das mitocôndrias marcadas com TMRE, que tornaram possíveis a observação de sua estrutura normal e alongada no controle (figura 29A) e concentração de 10 $\mu\text{M}$  (figura 29B) de C6-ceramida. Porém, nas maiores concentrações de 25  $\mu\text{M}$  (figura 29C) e 50  $\mu\text{M}$  (figura 29D) a mitocôndria perde essa conformação, cujo aspecto são de pontos e próximas ao núcleo, o que

indica a possível fragmentação dessas organelas. Na concentração de 75 $\mu$ M as células estavam mortas e não foi possível obter as imagens das mitocôndrias.



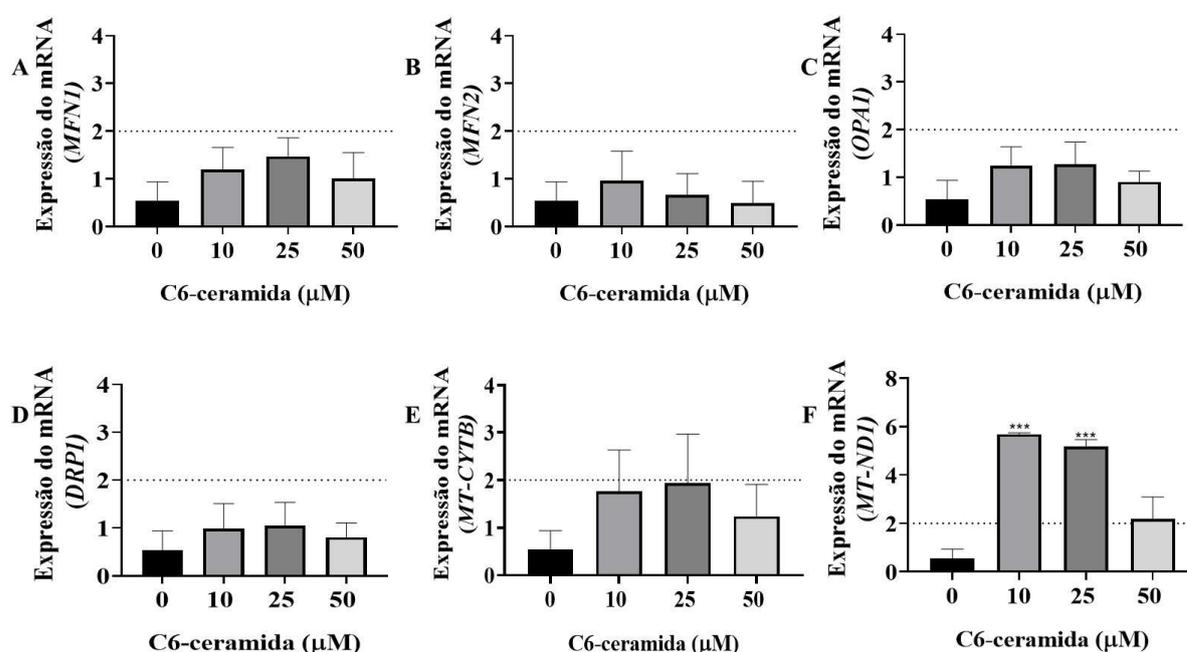
**Figura 28:** Gráfico da intensidade de fluorescência do reagente TMRE nas mitocôndrias das CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way ANOVA* e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 29:** Fotomicrografias representativas das mitocôndrias coradas com TMRE (Vermelho) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Núcleos marcados com Hoechst 33342 (Azul). A: Controle com meio de cultura somente; B: 10  $\mu$ M; C: 25  $\mu$ M; D: 50  $\mu$ M de C6-ceramida.

### 5.12. Análise dos genes mitocondriais *MFN1*, *MFN2*, *OPA1*, *DRP1*, *MT-CYTB* e *MT-ND1*

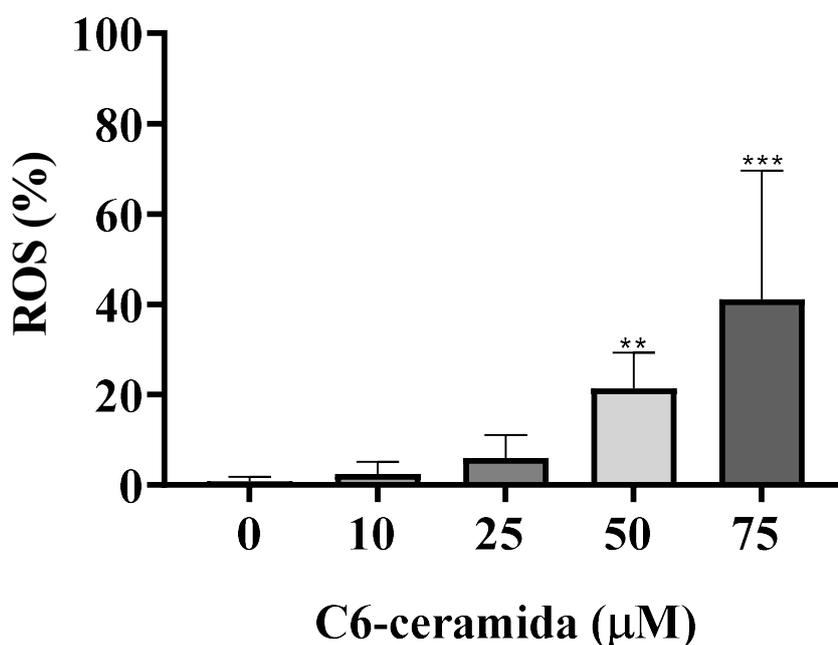
Foi realizada a avaliação dos genes mitocondriais nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Ou seja, foram analisados genes que estão associados aos processos de fusão e fissão das mitocôndrias e aqueles relacionados a cadeia transportadora de elétrons. Apenas o gene *MT-ND1* (figura 30F) apresentou significância estatística nas concentrações de 10 e 25  $\mu\text{M}$  quanto a quantificação de sua expressão relativa, cuja função está associada à cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Nenhum dos demais genes avaliados (*MFN1*, *MFN2*, *OPA1*, *DRP1*, *MT-CYTB*) apresentaram diferença em sua expressão relativa quando comparados com o controle (figuras 30A, 30B, 30C, 30D, 30E).



**Figura 30:** Gráficos da expressão gênica relativa dos genes mitocondriais *MFN1*, *MFN2*, *OPA1*, *DRP1*, *MT-CYTB*, *MT-ND1* e o gene de referência *HPRT1* foram quantificados a partir da mensuração do mRNA das CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Análise estatística foi realizada por *One-Way ANOVA* e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 5.13. Análise da presença do ROS (*Reactive Oxygen Species*) intracelular

Na literatura é estabelecido que a C6-ceramida tem a capacidade de produzir ROS nas células, por exemplo as tumorais. Nesse sentido, para avaliação da produção de ROS intracelular foi utilizado o kit de detecção DCFDA / H2DCFDA – *Cellular ROS Assay Kit*. Após 24 horas de incubação com C6-ceramida as CTMTA apresentaram aumento da produção de ROS e significância estatística nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  com 21,34 % das células positivas e 75  $\mu\text{M}$  com 41,11 % das células positivas (figura 31). Nas demais concentrações testadas, de 10 e 25  $\mu\text{M}$ , não houve produção significativa de ROS.



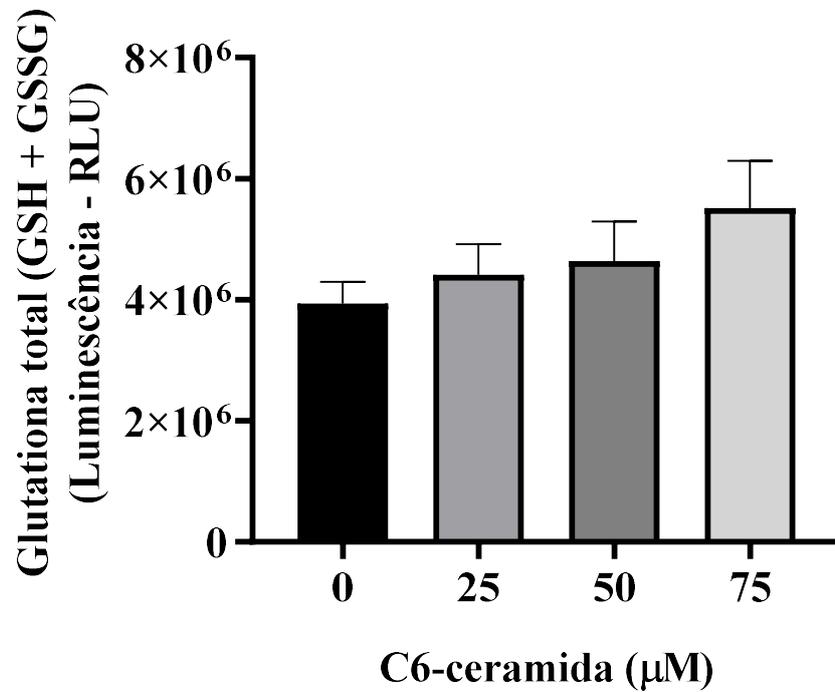
**Figura 31:** Gráfico da porcentagem de CTMTA positivas para produção intracelular de ROS após 24 horas de incubação com C6-ceramida e os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 5.14. Quantificação da glutathiona celular total e oxidada por luminescência

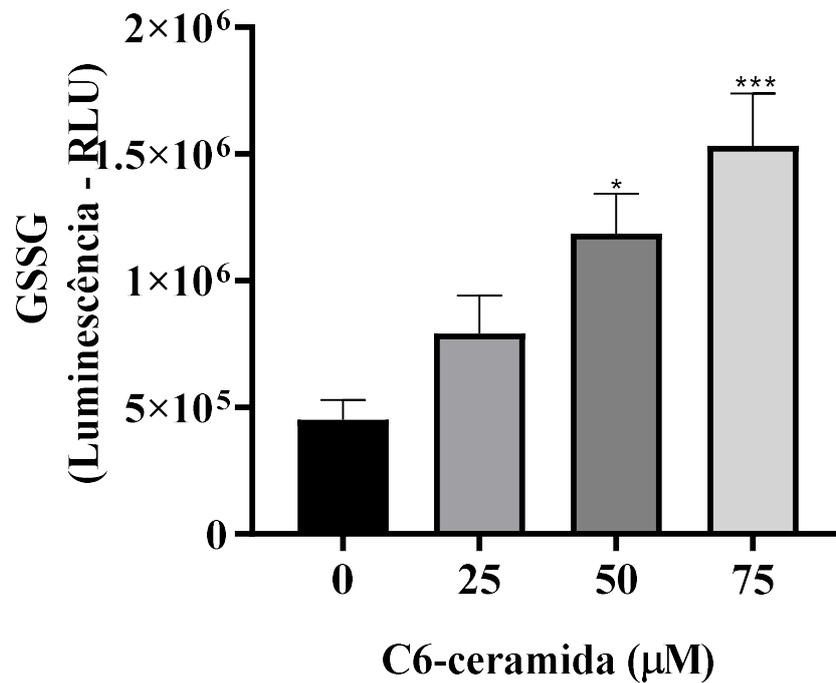
A célula possui mecanismos antioxidantes para reduzir a concentração de ROS nas células; conseqüentemente, minimiza o estresse oxidativo. Nesse sentido, foi realizada a quantificação do teor de glutathiona nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. A glutathiona é um peptídeo com funções antioxidantes nas células, cuja metodologia empregada permite quantificar a teor de glutathiona total e oxidada, e inferir a proporção de glutathiona reduzida obtida por meio da razão entre a total e oxidada presente nas células. Os dados são obtidos por luminescência e estabelecida a unidade de medida em RLU - *relative light units*.

A quantidade do teor celular de glutathiona total não apresentou nenhuma diferença significativa em nenhuma das concentrações de C6-ceramida testada nas CTMTA (figura 32). Porém, ocorreu aumento significativo da quantidade do teor de glutathiona oxidada (GSSG) nas concentrações de 50 e 75 µM de C6-ceramida após 24 horas (figura 33). Por fim, foi realizada mensuração da proporção da quantidade do teor de glutathiona reduzida, obtida pela razão entre glutathiona total e oxidada (GSH/GSSG) e observada redução nas concentrações de 25, 50 e 75 µM de C6-ceramida após 24 horas (figura 34). Ou seja, a razão foi determinada por meio de

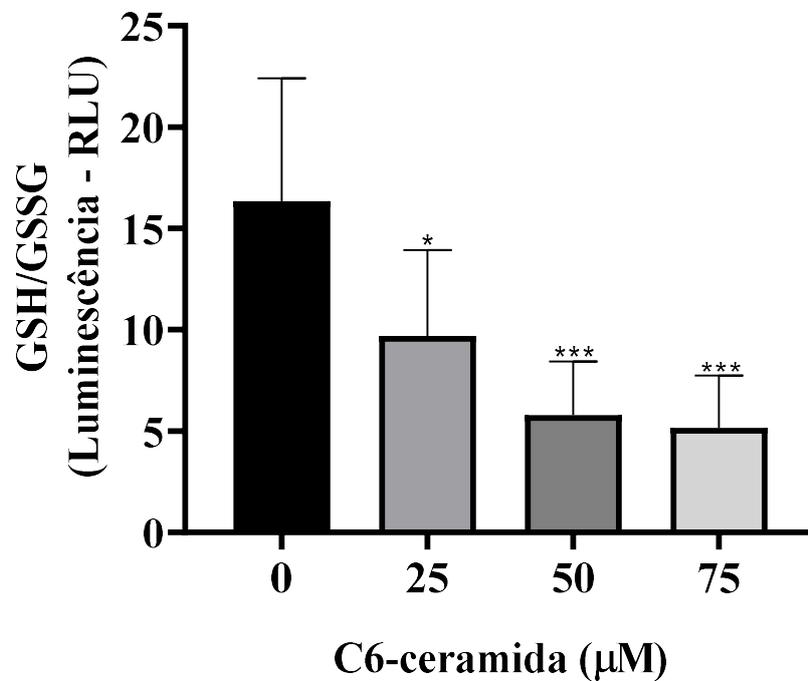
fórmula estabelecida pelo fabricante, que demonstra a mensuração da proporção de glutathiona reduzida.



**Figura 32:** Gráfico da intensidade de luminescência relativa à quantificação do teor de glutathiona total (GSH+GSSG) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Análise estatística foi realizada por *One-Way ANOVA* e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8*.



**Figura 33:** Gráfico da intensidade de luminescência relativa à quantificação do teor de glutathiona oxidada (GSSG) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 34:** Gráfico da intensidade de luminescência relativa à razão entre a quantidade glutathiona reduzida e glutathiona oxidada (GSH/GSSG) nas CTMTA após 24 horas de incubação com C6-ceramida. Análise estatística foi realizada por *One-Way* ANOVA e pós-teste Bonferroni no *software GraphPad Prism 8* \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 6.DISSCUSSÃO

---

A ceramida é o eixo central da biossíntese e catabolismo dos esfingolipídios, ou seja, isso demonstra sua importância na síntese dos esfingolipídios e como lipídio bioativo que medeia várias sinalizações celulares (HANNUN; OBEID, 2008), tem fácil detecção e é transportada por lipoproteínas (KURZ *et al.*, 2019; MEEUSEN *et al.*, 2018). Além disso, a ceramida desempenha um papel importante na resposta celular diante de estresse (HANNUN; LUBERTO, 2000; FILLET *et al.*, 2003). Nesse sentido, muitos estudos têm utilizado análogos de cadeia curta para entender como esses mecanismos acontecem nas células, como a C6-ceramida (VILLENA *et al.*, 2008; SUKUMARAN *et al.*, 2013).

A C6-ceramida é um tipo de ceramida exógena de cadeia curta que tem a capacidade de induzir apoptose em uma variedade de células cancerígenas, como células de carcinoma adenoide cístico salivar (QIU *et al.*, 2020). Além disso, foi demonstrado que, em células de carcinoma de cólon e ovário humano, a C2-ceramida e C6-ceramida foram capazes de ativar caspase e liberar o citocromo c mitocondrial, que resultou em apoptose nessas células (FILLET *et al.*, 2003). Outro estudo demonstrou que, em células de câncer de mama humano, a C6-ceramida em conjunto com outra molécula chamada *DMI02 [(2R,3Z)-N-(1-hydroxyoctadec-3-en-2-yl) pivalamide]* foram citotóxicas e levaram à apoptose, que foi evidenciada pela ativação de caspase 3/7 e aumento de células positivas para anexina V (FLOWERS *et al.*, 2012). Os autores também observaram aumento de ROS e despolarização da membrana mitocondrial (FLOWERS *et al.*, 2012). Em estudo que utilizou células HepG2, linhagem celular de hepatoma humano, a C6-ceramida foi capaz de induzir a apoptose e a ativação de caspase 3, sendo a citotoxicidade dependente do tempo e dose (GENTIL *et al.*, 2003). Já em um estudo feito por Park *et al.* (2011) foi observado que a C2-ceramida foi capaz de levar as CTMTA à apoptose por ativação de caspases, através da liberação do citocromo c, e mediada pela geração de ROS. Além disso, os autores sugeriram que a apoptose em CTMs pode retardar o reparo tecidual (PARK *et al.*, 2011). Em adição, um outro estudo observou em células de leucemia mielóide humana U937, que a C6-ceramida levou à produção de peróxido de hidrogênio e alteração do potencial transmembranar mitocondrial (QUILLET-MARY *et al.*, 1997).

Na linhagem de células de linfoma A20 B, a C6-ceramida, em concentrações que variaram de 5 a 100  $\mu\text{M}$  após 16 horas, levou a morte celular de maneira dose-dependente, sendo que em 50  $\mu\text{M}$  já havia mais de 50% de morte celular (VILLENA *et al.*, 2008). Já em

outro estudo que utilizou linfomas cutâneos de células T foi observada redução da viabilidade celular com 25  $\mu\text{M}$  de C6-ceramida, testadas nas concentrações entre 1 e 100  $\mu\text{M}$  por 24 horas (WILHELM *et al.*, 2021).

Em células de melanoma foi evidenciada que a adição de C6-ceramida deixou as células mais sensíveis à apoptose induzida por curcumina (YU *et al.*, 2010). Ou seja, de acordo com os autores, isso decorre pela via mitocondrial de apoptose, tanto que quando essa via foi inibida, a citotoxicidade pelo tratamento combinado de C6-ceramida e curcumina foi reprimida (YU *et al.*, 2010). Em outro estudo com células de osteossarcoma humano, os autores encontraram resultados semelhantes, em que C6-ceramida foi capaz de sensibilizar essas células e aumentar a apoptose e citotoxicidade causada por pemetrexede (ZHU *et al.*, 2014). Nesse sentido, muitos estudos com diferentes linhagens cancerígenas têm encontrado resultados semelhantes quanto à capacidade da C6-ceramida em sensibilizar as células e potencializar a citotoxicidade, apoptose e necrose causadas por diferentes tratamentos (JI *et al.*, 2010b; CHEN *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2016). Inúmeros estudos têm evidenciado a ampla ação biológica da C6-ceramida em diferentes tipos de células. No presente estudo a C6-ceramida foi capaz de induzir a morte celular por apoptose nas CTMTA nas concentrações de 25, 50 e 75  $\mu\text{M}$ . Além disso, os dados da literatura demonstram que células tumorais são mais sensíveis a ação da C6-ceramida do que as CTMTA, cujo IC50 encontrado foi de 62,90  $\mu\text{M}$ .

A ativação do processo de apoptose dá-se por meio de duas vias: extrínseca, cujos sinais são captados pelos receptores presentes na membrana plasmática, ou pela via intrínseca, ativada pelo citocromo c e caspases efetoras (3, 6 e 7) ou iniciadoras (2, 8, 9 e 10) (ELMORE, 2007; CABRINI *et al.*, 2010). Outras proteínas que podem ser ativadas são: o domínio de homologia Bcl-2 3 (BH3), que inibi proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 e ativa proteínas próapoptóticas BAX e BAK, que tornam a membrana externa da mitocôndria permeável, isso leva a liberação de outras proteínas, como o citocromo c (CABRINI *et al.*, 2010; MADDIKA *et al.*, 2007; NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013; PFEFFER; SINGH, 2018; BOCK; TAIT, 2019). Logo, é demonstrada a ligação e interdependência entre a mitocôndria e ativação do processo de apoptose. Além disso, foi demonstrado que a C6-ceramida é capaz de causar disfunção mitocondrial e geração de ROS em fibroblastos do estroma da córnea humana (RIZVI *et al.*, 2011). Ou seja, ROS é um subproduto do metabolismo do oxigênio, seu acúmulo em excesso é tóxico às células, ou seja, deve ocorrer um equilíbrio entre formação e eliminação dos radicais livres, sendo que há mecanismos antioxidantes de defesa que regulam os níveis intracelulares, como a glutathiona (LAVRENTIADOU *et al.*, 2001; SINHA; DABLA, 2015). A glutathiona reduzida (GSH) sofre oxidação e fica na forma oxidada (GSSG) isso resulta na

desativação de ROS (NUHU; BHANDARI, 2018), sendo que a forma reduzida é comumente encontrada no citosol (FORMAN *et al.*, 2009).

As mitocôndrias têm um papel importante na morte celular decorrente de apoptose ou necrose, principalmente devido à presença do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP do inglês *Mitochondrial Permeability Transition Pore*) (HALESTRAP *et al.*, 2002). Esse poro permite a passagem de moléculas de < 1,5 kDa, cuja abertura ocorre na membrana interna da mitocôndria decorrente da elevação de Ca<sup>2+</sup> na matriz, principalmente quando também há estresse oxidativo (HALESTRAP *et al.*, 2002; HALESTRAP, 2006). Além disso, a abertura de MPTP causa inchaço nas mitocôndrias, a membrana externa é rompida e ocorre a liberação de componentes indutores de apoptose (HALESTRAP *et al.*, 2002). Porém, se os poros permanecem abertos, as células não conseguem manter os níveis de ATP e o resultado é a necrose (HALESTRAP, 2006). Anteriormente foi observado em células linfóides o processo de necrose desencadeado após diminuição dos níveis de ATP em decorrência da ação da C6-ceramida (VILLENA *et al.*, 2008).

O estresse oxidativo gerado na mitocôndria pode contribuir com a perda do potencial de membrana mitocondrial (LEVRAUT *et al.*, 2003). Ou seja, a presença de MPTP em conjunto com produção de ROS podem contribuir significativamente com a perda do potencial de membrana mitocondrial. Foi observado em estudo com células de câncer de mama, após a administração de C6-ceramida em conjunto com docetaxel, diminuição do potencial de membrana mitocondrial, aumento da concentração de ROS, ou seja, estresse oxidativo, liberação do citocromo c e clivagem da caspase 3 (YANG *et al.*, 2015). Logo, os autores sugeriram que a abertura do MPTP seguida da produção de ROS são mediadores importantes da citotoxicidade em células de câncer de mama após administração de C6-ceramida com docetaxel (YANG *et al.*, 2015).

Foi relatado que a ceramida teria a capacidade de liberar o citocromo c (GHAFOURIFAR *et al.*, 1999), mas em contrapartida foi demonstrado que a ceramida pode formar canais que levam ao aumento da permeabilidade da membrana externa das mitocôndrias; isso permite a passagem do citocromo c (SISKIND *et al.*, 2002). Em adição a esses achados, a C6-ceramida foi capaz de aumentar a permeabilidade de células endoteliais pulmonares microvasculares humanas (LINDNER *et al.*, 2005). Nesse sentido, foi observado, no presente estudo, a diminuição do potencial transmembranar mitocondrial das CTMTA após adição de C6-ceramida e observada perda significativa conforme foi aumentava a concentração. Ou seja, uma possível explicação quanto à perda do potencial transmembranar mitocondrial observado nas CTMTA após incubação com C6-ceramida é a formação de canais, possivelmente MPTP,

que possibilita o aumento da permeabilidade das células e leva à ativação das caspases e apoptose. Além disso, esse processo pode estar sendo atenuado pela produção de ROS, que aumentou nas CTMTA após incubação com C6-ceramida. Bem como, foi observado aumento do teor de glutathiona oxidada nas CTMTA, isso sugere que ocorre uma conversão da forma reduzida para a oxidada, ou seja, perturbação do estado redox das CTMTA que foi observada por meio da razão entre GSH/GSSG.

Em células de câncer cervical positivas para o papilomavírus humano o efeito da C6-ceramida resultou em apoptose, perda do potencial de membrana mitocondrial, geração de ROS e diminuição da concentração de glutathiona reduzida (GUTIÉRREZ *et al.*, 2007). Ou seja, dados que corroboram os encontrados nesse estudo.

Os dados descritos sugerem que a ceramida tem a capacidade de agir nas membranas das células, como a membrana mitocondrial, o que poderia explicar a manutenção dos níveis de expressão de praticamente todos os genes mitocondriais avaliados, exceto o gene mitocondrial *MT-ND1* que está associado a cadeia transportadora de elétrons. Ou seja, há possibilidade de que a mitocôndria tenha sofrido danos que levou ao aumento da expressão do gene mitocondrial *MT-ND1*, pois há uma susceptibilidade intrínseca do DNA mitocondrial sofrer danos devido à geração de ROS (AKOUCHEKIAN *et al.*, 2011).

Muitos estudos tem abordado a análise das ceramidas indutoras de apoptose e poucos exploram outras funções com as quais elas podem estar associadas (BIEBERICH, 2011). Assim, nossos achados sugerem que a C6-ceramida em CTMTA tem a capacidade de inibir a autofagia. Ainda mais, por ser observado no presente estudo diminuição de proteínas indutoras de autofagia (Beclin-1, LC3B), modulação positiva de proteínas associadas com vias de sinalização de bloqueio (4EBP1 e Akt) da autofagia. Além disso, observou-se aumento da concentração citoplasmática de proteínas (p62) que direcionam componentes a serem degradados pela via da autofagia.

Em um estudo com células-tronco/progenitoras hematopoiéticas humanas tratadas com TNF $\alpha$  e ceramida, a autofagia foi inibida; isso resultou em comprometimento da eritropoiese e indução da mielopoiese, ou seja, demonstra o papel essencial da autofagia na diferenciação e destino as células hematopoiéticas (ORSINI *et al.*, 2019).

A autofagia é uma via catabólica ativada devido a estresse, déficit nutricional ou infecções por patógenos, em que ocorre o engolfamento desses componentes citoplasmáticos, para degradação e reciclagem, por meio de lisossomos em células animais ou vacúolos em células de plantas ou leveduras (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011; MARQUEZ; XU, 2012; GALLUZZI *et al.*, 2017; CECCARIGLIA *et al.*, 2020). Além disso, a autofagia tem a

capacidade de levar a célula à sobrevivência ou à sua morte (MARQUEZ; XU, 2012). Ou seja, há uma linha tênue entre a sobrevivência e morte celular que pode ser rompido quando não há um equilíbrio, principalmente no complexo formado entre as proteínas Beclin-1 e Bcl-2. Aqui, podemos observar a ligação entre a apoptose e autofagia. Nesse sentido, deve ocorrer um equilíbrio entre a interação das proteínas Beclin-1 e Bcl-2, pois o aumento de um ou outro pode resultar em morte celular (XU; QIN, 2019). Nos achados do presente estudo foi observada a diminuição da intensidade de fluorescência da proteína Beclin-1, sugestivo de inibição da autofagia, porém não é observada nenhuma alteração na intensidade de fluorescência da proteína Bcl-2 que se manteve praticamente estável entre as diferentes concentrações de C6-ceramida.

A proteína survivina foi analisada e não apresentou diferença estatística na sua marcação no núcleo ou citoplasma. É sabido que essa proteína é inibidora de apoptose e tem a capacidade de modular negativamente a proteína ATG7, importante na autofagia (LIN *et al.*, 2020).

Outro dado sugestivo de inibição da autofagia observada foi a redução da marcação da proteína LC3B-FP nas maiores concentrações de C6-ceramida. A proteína LC3-I catalisa com PE e formará LC3-II, que tem a função de alongar a dupla membrana do fagóforo no início da autofagia (DENG *et al.*, 2020). Em adição a esse achado, foi observado aumento da quantidade da marcação de organelas ácidas e da proteína p62. Esses dois fenômenos podem ser explicados pela inibição da autofagia, onde não ocorre a formação do autolissomo, resultado da fusão do autofagossomo com lisossomo, e a não degradação do p62 que se liga a proteínas defeituosas que serão degradadas, juntamente com sua degradação durante o processo, devido seu acúmulo ser citotóxico (KOMATSU; ICHIMURA, 2010; ITAKURA; MIZUSHIMA, 2011; DENG *et al.*, 2020).

Dados adicionais observados que corroboram a inibição da autofagia foi o aumento da porcentagem de CTMTA para as proteínas 4EBP1 (pT36/pT45) e Akt (pS473), onde foi significante na concentração de 50  $\mu$ M de C6-ceramida para ambas as proteínas.

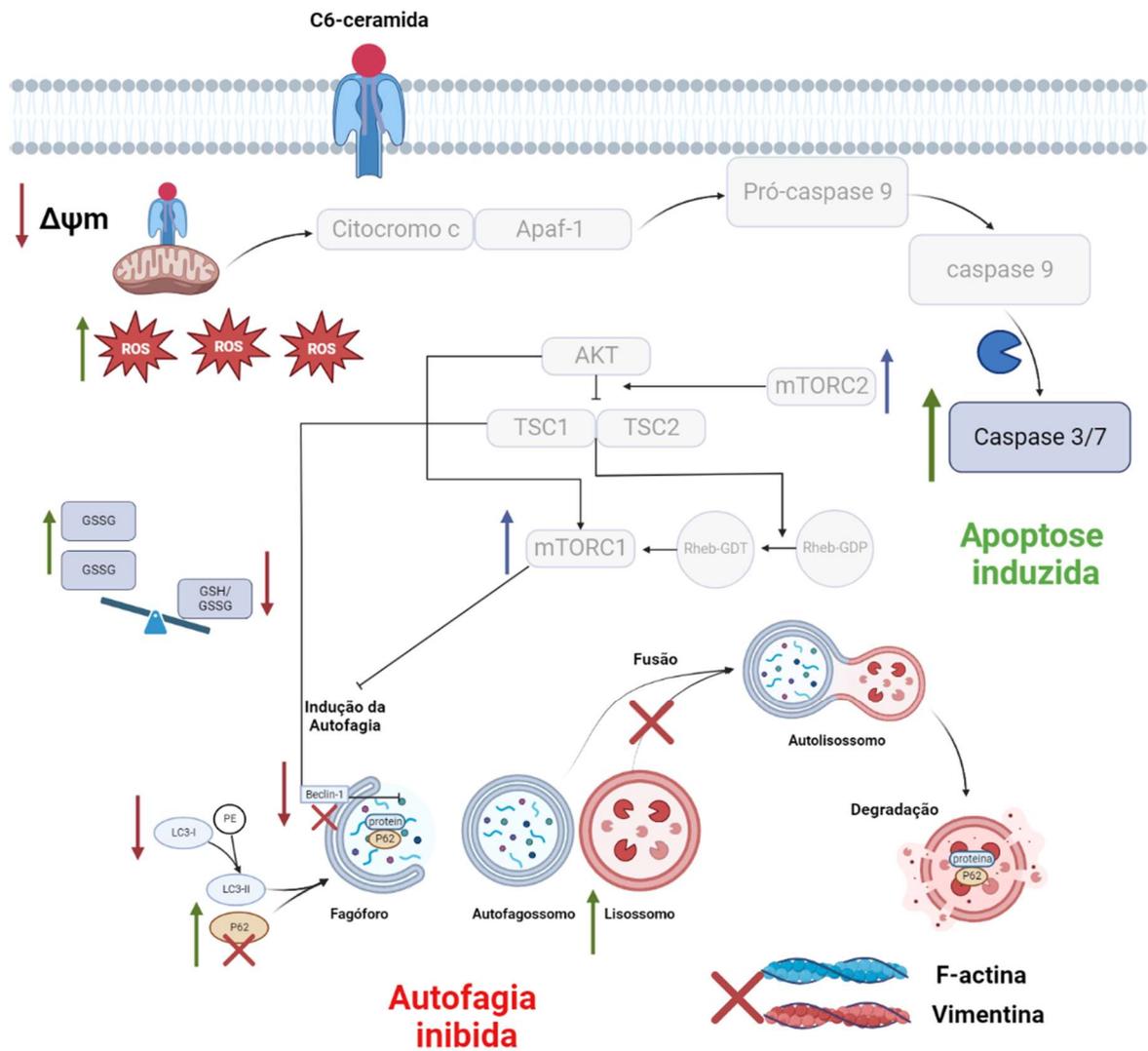
Para que ocorra a divisão celular deve haver aumento de componentes, tais como proteínas, lipídios e nucleotídeos; porém, para que esses processos ocorram deve haver um equilíbrio entre catabolismo e anabolismo, onde mTORC1 desempenha um papel fundamental nesse controle (SAXTON; SABATINI, 2017). Além disso, mTORC1 regula tradução do RNA mensageiro, o que tem implicação direta sobre a síntese proteica, por meio de mecanismo dos quais fazem parte a fosforilação da proteína de ligação com fator de iniciação eucariótico 4E

(4EBP1), que permanece inativa (WU *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2021). Quando inativada, a 4EBP1 não age sobre o complexo eIF4E, o que permite que ocorra a tradução do RNA mensageiro dependente de 5' cap, pois eIF4E reconhece a estrutura 5' cap do mRNA e recruta outras proteínas para o processo de tradução (HARA *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2021; MARACCI *et al.*, 2022).

No presente estudo foi feita a marcação da proteína 4EBP1 fosforilada, sendo que esta proteína faz parte da via de sinalização da proteína mTORC1, cujo resultado observado foi aumento da porcentagem de células positivas. Ou seja, uma modulação positiva da via de sinalização. Além disso, observamos que ocorre um aumento de células durante o ciclo celular nas fases G0/G1 e S, onde é necessário a síntese proteica para a divisão celular e o mRNA é fundamental para que isso ocorra. No entanto, em células leucêmicas humanas a C6-ceramida levou à parada do ciclo celular na fase G0/G1 e apoptose (JAYADEV *et al.*, 1995). Ou seja, isso sugere que a C6-ceramida pode agir de maneira distinta em diferentes tipos celulares.

No presente estudo para marcação por imunofluorescência indireta da proteína Akt fosforilada, sendo que esta faz parte da via de sinalização da mTORC2, e observado aumento da porcentagem de células positivas. Ou seja, uma modulação positiva da via de sinalização. A proteína Akt quando fosforilada é capaz de fosforilar outras moléculas de sinalização, as quais estão associadas ao crescimento, proliferação, metabolismo ou morte celular (BUERGER, 2018). Dentre essas moléculas a PRAS40, quando inativada, leva à liberação da mTORC1 (BUERGER, 2018), ou seja, Akt ativa indiretamente a mTORC1 (WANG; PROUD, 2016), com a capacidade de agir como regulador negativo da autofagia, pois bloqueia reguladores negativos de mTORC1 e Beclin-1 (BUERGER, 2018; SARBASSOV *et al.*, 2005; RABANAL-RUIZ; KOROLCHUK, 2018; BALLESTEROS-ÁLVAREZ; ANDERSEN, 2021). Isso demonstra como as vias das duas proteínas estão conectadas.

A C6-ceramida em CTMTA, após 24 horas de incubação, além dos achados citados anteriormente, levou à desorganização da proteína F-actina e dos filamentos de vimentina presentes no citoesqueleto das células. Ou seja, mostra um efeito citotóxico da C6-ceramida nas CTMTA. Em especial na concentração de 50  $\mu$ M, em que a maioria dos eventos observados apresentaram significância estatística para CTMTA tratadas com C6-ceramida, onde todos os eventos foram ilustrados de maneira resumida abaixo (figura 35).



**Figura 35:** Representação da ação da C6-ceramida nas CTMTA, sendo as setas em cor verde indicam aumento, setas em cor vermelha indicam diminuição e setas em azul modulação positiva da via de sinalização. A C6-ceramida levou o aumento da proteína p62, das organelas ácidas, diminuição de proteínas indutoras (Beclin-1 e LC3) e modulação positiva de proteínas que interagem com outras proteínas associadas com o bloqueio da ativação do processo de autofagia, sendo a mensuração das proteínas 4EBP1 e Akt (envolvidas com as vias de sinalização das proteínas mTORC1 e mTORC2, respectivamente), a soma desses resultados indicam inibição da autofagia. Por outro lado, ocorreu perda do potencial transmembranar mitocondrial, aumento da produção de ROS e de glutatona oxidada, diminuição da razão entre glutatona total e oxidada, que mensura a proporção do teor de glutatona reduzida e aumento de caspase 3/7. Logo, esses dados sugerem indução de apoptose, que pode ter sido atenuada pela formação de canais de ceramida nas membranas, que aumentam sua permeabilidade.

## 7.CONCLUSÕES

---

Em conclusão, as CTMTA incubadas com C6-ceramida exógena pelo período de 24 horas foi capaz de induzir apoptose e necrose, perturbar o estado redox das células e gerar alterações mitocondriais. Além disso, a C6-ceramida inibiu a autofagia, levou ao acúmulo de lisossomos e proteínas citotóxicas no citosol, decorrente da inibição do processo autofágico e perda da arquitetura conformacional do citoesqueleto. Assim, a C6-ceramida é um potencial agente farmacológico para modulação da autofagia em CTMTA. Porém, mais estudos são necessários para entender os mecanismos envolvidos, principalmente no que diz respeito à modulação da inibição da autofagia que pode ou não favorecer a diferenciação celular, além de averiguar o quanto esse mecanismo poderá ser benéfico à medicina regenerativa.

## 8. TRABALHOS PUBLICADOS

---

LEZIROVITZ, K.; VIEIRA-SILVA, G. A.; BATISSOCO, A. C.; LEVY, D.; KITAJIMA, J. P.; TROUILLET, A.; OUYANG, E.; ZEBARJADI, N.; **SAMPAIO-SILVA, J.**; PEDROSO-CAMPOS, V.; NASCIMENTO, L. R.; SONODA, C. Y.; BORGES, V. M.; VASCONCELOS, L. G.; BECK, R. M. O.; GRASEL, S. S.; JAGGER, D. J.; GRILLET, N.; BENTO, R. F.; MINGRONI-NETTO, R. C.; OITICICA, J. A rare genomic duplication in 2p14 underlies autosomal dominant hearing loss DFNA58. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 1520-1536, Jun. 2020.

REICHERT, C. O.; DE FREITAS, F. A.; **SAMPAIO-SILVA, J.**; ROKITA-ROSA, L.; BARROS, P. L.; LEVY, D.; BYDLOWSKI, S. P. Ferroptosis Mechanisms Involved in Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 22, p. 8765, Nov. 2020.

BUENO, A. S.; NUNES, K.; DIAS, A. M. M.; ALVES, L. U.; MENDES, B. C. A.; **SAMPAIO-SILVA, J.**; SMITS, J.; YNTEMA, H. G.; MEYER, D.; LEZIROVITZ, K.; MINGRONI-NETTO, R. C. Frequency and origin of the c.2090T>G p.(Leu697Trp) MYO3A variant associated with autosomal dominant hearing loss. **European Journal of Human Genetics**, Basel, v. 30, n. 1, p. 13-21, Jan. 2022.

BATISSOCO, A. C.; PEDROSO-CAMPOS, V.; PARDONO, E.; **SAMPAIO-SILVA, J.**; SONODA, C. Y.; VIEIRA-SILVA, G. A.; DA SILVA DE OLIVEIRA LONGATI, E. U.; MARIANO, D.; HOSHINO, A. C. H.; TSUJI, R. K.; JESUS-SANTOS, R.; ABATH-NETO, O.; BENTO, R. F.; OITICICA, J.; LEZIROVITZ, K. Molecular and genetic characterization of a large Brazilian cohort presenting hearing loss. **Human Genetics**, Berlin, v. 141, n. 3-4, p. 519-538, Apr. 2022.

## 9.REFERÊNCIAS

---

AKOUCHEKIAN, M.; HOUSHMAND, M.; AKBARI, M. H.; KAMALIDEHGHAN, B.; DEHGHAN, M. Analysis of mitochondrial ND1 gene in human colorectal cancer. **Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, Isfahan, v. 16, n. 1, p. 50-55, Jan. 2011.

AVASTHI, S.; SRIVASTAVA, R. N.; SINGH, A.; SRIVASTAVA, M. Stem cell: past, present and future--a review article. **Internet Journal of Medical Update**, India, v. 3, n. 1, p. 22-31, Jan. 2008.

BAER, P. C. Adipose-Derived Stromal/Stem Cells. **Cells**, Basel, v. 9, n. 9, p. 1997, Aug. 2020.

BALLESTEROS-ÁLVAREZ, J.; ANDERSEN, J. K. mTORC2: The other MtoR in autophagy regulation. **Aging Cell**, Oxford, v. 20, n. 8, e13431, Jul. 2021.

BIEBERICH, E. Ceramide in stem cell differentiation and embryo development: novel functions of a topological cell-signaling lipid and the concept of ceramide compartments. **Journal of lipids**, Cairo, v. 2011, n. ID 610306, p. 1-11, Dec. 2011.

BIEBERICH, E. Ceramide signaling in cancer and stem cells. **Future Lipidology**, London, v. 3, n. 3, p. 273-300, Jun. 2008.

BIKMAN, B. T.; SUMMERS, S. A. Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 121, n. 11, p. 4222-4230, Nov. 2011.

BOCK, F. J.; TAIT, S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 21, n. 2, p. 85-100, Feb. 2019.

BOYA, P.; CODOGNO, P.; RODRIGUEZ-MUELA, N. Autophagy in stem cells: repair, remodelling and metabolic reprogramming. **Development**, Cambridge, v. 145, n. 4, pii: dev146506, Feb. 2018.

BUERGER, C. Epidermal mTORC1 Signaling Contributes to the Pathogenesis of Psoriasis and Could Serve as a Therapeutic Target. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 30, n. 9, p. 2786-2792, Nov. 2018.

BUNNELL, B. A. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Cells**, Basel, v. 10, n. 6, p. 3433, Dec. 2021.

BYDŁOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 31, supl. 1, p. 25-35, Mai. 2009.

CABRINI, M.; NAHMOD, K.; GEFNER, J. New insights into the mechanisms controlling neutrophil survival. **Current opinion in hematology**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 31-35, Jan. 2010.

CECCARIGLIA, S.; CARGNONI, A.; SILINI, A. R.; PAROLINI, O. Autophagy: a potential key contributor to the therapeutic action of mesenchymal stem cells. **Autophagy**, Georgetown, v. 16, n. 1, p. 28-37, Jan. 2020.

CHEN, M. B.; JIANG, Q.; LIU, Y. Y.; ZHANG, Y.; HE, B. S.; WEI, M. X.; LU, J. W.; JI, Y.; LU, P. H. C6 ceramide dramatically increases vincristine sensitivity both in vivo and in vitro, involving AMP-activated protein kinase-p53 signaling. **Carcinogenesis**, New York, v. 36, n. 9, p. 1061-1070, Jun. 2015.

CHEN, F.; LIU, Y.; WONG, N. K.; XIAO, J.; SO, K. F. Oxidative Stress in Stem Cell Aging. **Cell Transplantation**, New York, v. 26, n. 9, p. 1483-1495, Sep. 2017.

CIEŚLAR-POBUDA, A.; YUE, J.; LEE, H. C.; SKONIECZNA, M.; WEI, Y. H. ROS and Oxidative Stress in Stem Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 2017, ID 5047168, Sep. 2017.

CONDIC, M. L. Totipotency: what it is and what it is not. **Stem Cells and Development**, New York, v. 23, n. 8, p. 796-812, Apr. 2014.

DALBY, K. N.; TEKEDERELI, I.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; OZPOLAT, B. Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. **Autophagy**, Georgetown, v. 6, n. 3, p. 322-329, Apr. 2010.

DE FREITAS, F. A.; LEVY, D.; ZARROUK, A.; LIZARD, G.; BYDŁOWSKI, S. P. Impact of Oxysterols on Cell Death, Proliferation, and Differentiation Induction: Current Status. **Cells**, Basel, v. 10, n. 9, p. 2301, Sep. 2021.

DENG, J.; ZHONG, L.; ZHOU, Z.; GU, C.; HUANG, X.; SHEN, L.; CAO, S.; REN, Z.; ZUO, Z.; DENG, J.; YU, S. Autophagy: a promising therapeutic target for improving mesenchymal stem cell biological functions. **Molecular and Cellular Biochemistry**, New York, v. 476, n. 2, p. 1135-1149, Feb. 2020.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, Newark, v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun. 2007.

FEDERICO, A.; CARDAIOLI, E.; DA POZZO, P.; FORMICHI, P.; GALLUS, G. N.; RADI, E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. **Journal of The Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 322, n. 1-2, p. 254-262, Jun. 2012.

FILLET, M.; BENTIREZ-ALJ, M.; DEREGOWSKI, V.; GREIMERS, R.; GIELEN, J.; PIETTE, J.; BOURS, V.; MERVILLE, M. P. Mechanisms involved in exogenous C2- and C6-ceramide-induced cancer cell toxicity. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 65, n. 10, p. 1633-1642, May 2003.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 4, p. 1907-1916, Apr. 2005.

FLOWERS, M.; FABRIÁS, G.; DELGADO, A.; CASAS, J.; ABAD, J. L.; CABOT, M. C. C6-ceramide and targeted inhibition of acid ceramidase induce synergistic decreases in breast cancer cell growth. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v. 133, n. 2, p. 447-458, Jun. 2012.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 30, n. 1-2, p.1-12, Feb.-Apr. 2009.

FRASER, J. K.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; HEDRICK, M. H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 150-154, Apr. 2006.

FREDI, A. R. O.; TINOCO, L. W. Esfingolípídios: Metabólitos Bioativos e Modelos para o Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 4, p. 1384-1401, Mai. 2015.

FRESE, L.; DIJKMAN, P. E.; HOERSTRUP, S. P. Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, Basel, v. 43, n. 4, p. 268-274, Jul. 2016.

FRIGOLET, M. E.; GUTIÉRREZ-AGUILAR, R. The colors of adipose tissue. **Gaceta Médica de México**, México, v. 56, n. 2, p. 142-149, Sep. 2020.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 36, n. 13, p. 1811-1836, Jul. 2017.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; AARONSON, S. A.; ABRAMS, J. M.; ADAM, D.; AGOSTINIS, P.; ALNEMRI, E. S.; ALTUCCI, L.; AMELIO, I.; ANDREWS, D. W.; ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M.; ANTONOV, A. V. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 25, n. 3, p. 486-541, Mar. 2018.

GATHIER, W.; TÜRKTAŞ, Z.; DUCKERS, H. J. (2016) Chapter 10 - Adipose-Derived Stem Cells. *In*: Perin, E. C.; MILLER, L. W.; TAYLOR, D. A.; WILLERSON, J. T. **Stem Cell and Gene Therapy for Cardiovascular Disease**. Academic Press: Houston, 2016, p. 119-135.

GENTIL, B; GRIMOT, F.; RIVA, C. Commitment to apoptosis by ceramides depends on mitochondrial respiratory function, cytochrome c release and caspase-3 activation in Hep-G2 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, New York, v. 254, n. 1-2, p. 203-210, Dec. 2003.

GHAFOURIFAR, P.; KLEIN, S. D.; SCHUCHT, O.; SCHENK, U.; PRUSCHY, M.; ROCHA, S.; RICHTER, C. Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. Importance of mitochondrial redox state. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 10, p. 6080-6084, Mar. 1999.

GIMBLE, J. M.; BUNNELL, B. A.; FRAZIER, T.; ROWAN, B.; SHAH, F.; THOMAS-PORCH, C.; WU, X. Adipose-derived stromal/stem cells: a primer. **Organogenesis**, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 3-10, Jan.-Mar. 2013.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of pathology**, London, v. 221, n. 1, p. 3-12, May 2010.

GUAN, J. L.; SIMON, A. K.; PRESCOTT, M.; MENENDEZ, J. A.; LIU, F.; WANG, F.; WANG, C.; WOLVETANG, E.; VAZQUEZ-MARTIN, A.; ZHANG, J. Autophagy in stem cells. **Autophagy**, Philadelphia, v. 9, n. 6, p. 830-849, Jun. 2013.

GUENTHER, G. G.; EDINGER, A. L. A new take on ceramide: starving cells by cutting off the nutrient supply. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 8, n. 8, p. 1122-1126, Apr. 2009.

GUMP, J. M.; THORBURN, A. Autophagy and apoptosis: what is the connection? **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 21, n. 7, p. 387-392, May 2011.

GUTIÉRREZ, G.; MENDOZA, C.; MONTAÑO, L. F.; LÓPEZ-MARURE, R. Ceramide induces early and late apoptosis in human papilloma virus+ cervical cancer cells by inhibiting reactive oxygen species decay, diminishing the intracellular concentration of glutathione and increasing nuclear factor-kappaB translocation. **Anticancer Drugs**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 149-159, Feb. 2007.

HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A.; KOLESNICK, R. N.; FUKS, Z. Ceramide signaling in apoptosis. **British Medical Bulletin**, London, v. 53, n. 3, p. 539-553, 1997.

HALESTRAP, A. P.; MCSTAY, G. P.; CLARKE, S. J. The permeability transition pore complex: another view. **Biochimie**, Paris, v. 84, n. 2-3, p. 153-166, Feb.-Mar. 2002.

HALESTRAP, A. P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 34, Pt. 2, p. 232-237, Apr. 2006.

HANNUN, Y. A.; LUBERTO, C. Ceramide in the eukaryotic stress response. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 73-80, Feb. 2000.

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 9, n. 2, p. 139-150, Feb. 2008.

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Many ceramides. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 32, p. 27855-27862, Aug. 2011.

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. **Nature reviews. Molecular cell biology**, London, v. 19, n. 3, p. 175-191, Mar. 2018.

HARA, K.; MARUKI, Y.; LONG, X.; YOSHINO, K.; OSHIRO, N.; HIDAYAT, S.; TOKUNAGA, C.; AVRUCH, J.; YONEZAWA, K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. **Cell**, Cambridge, v. 110, n. 2, p. 177-189, Jul. 2002.

HORWITZ, E. M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S.; KEATING, A.; INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR THERAPY. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.

HOSAIN, S. B.; HILL, R. A.; LIU, Y. Y. (2013) The Role of Sphingolipids in Modulating Pluripotency of Stem Cells. *In*: Resende R., Ulrich H. (eds) **Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research**. Springer: Dordrecht, 2013, p. 167-191.

HU, C.; HE, Y.; FANG, S.; TIAN, N.; GONG, M.; XU, X.; ZHAO, L.; WANG, Y.; HE, T.; ZHANG, Y.; BI, Y. Urine-derived stem cells accelerate the recovery of injured mouse hepatic tissue. **American Journal of Translational Research**, Madison, v. 12, n. 9, p. 5131-5150, Sep. 2020.

IESSI, E.; MARCONI, M.; MANGANELLI, V.; SORICE, M.; MALORNI, W.; GAROFALO, T.; MATARRESE, P. On the role of sphingolipids in cell survival and death. **International review of cell and molecular biology**, Amsterdam, v. 351, p. 149-195, 2020.

INVITROGEN™, Molecular Probes, USA. Documents, Manuals & protocols, revisado em 27 de maio de 2010. **Premo Autophagy Sensors (LC3B-FP)**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/document-connect/documentconnect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFSAssets%2FSLSG%2Fmanuals%2Fmp36235.pdf&title=UHJlbW8gQXV0b3BoYWd5IFNlbnNvcnMgKExDM0ItRIAp>>. Acesso em: 14 de out. 2021.

ITAKURA, E.; MIZUSHIMA, N. p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 192, n. 1, p. 17-27, Jan. 2011.

JAYADEV, S.; LIU, B.; BIELAWSKA, A. E.; LEE, J. Y.; NAZAIRE, F.; PUSHKAREVA, M. Y.; OBEID L. M.; HANNUN, Y. A. Role for ceramide in cell cycle arrest. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, n. 5, p. 2047-2052, Feb. 1995.

JI, A. R.; KU, S. Y.; CHO, M. S.; KIM, Y. Y.; KIM, Y. J.; OH, S. K.; KIM, S. H.; MOON, S. Y.; CHOI, Y. M. Reactive oxygen species enhance differentiation of human embryonic stem cells into mesendodermal lineage. **Experimental & molecular medicine**, United States, v. 42, n. 3, p. 175-186, 2010. (a)

JI, C.; YANG, B.; YANG, Y. L.; HE, S. H.; MIAO, D. S.; HE, L.; BI, Z. G. Exogenous cell-permeable C6 ceramide sensitizes multiple cancer cell lines to Doxorubicin-induced apoptosis by promoting AMPK activation and mTORC1 inhibition. **Oncogene**, Basingstoke, v. 29, n. 50, p. 6557-6568, Dec. 2010. (b)

JIANG, W.; OGRETMEN, B. Autophagy paradox and ceramide. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1841, n. 5, p. 783-792, May 2014.

JUNG, C. H.; RO, S. H.; CAO, J.; OTTO, N. M.; KIM, D. H. mTOR regulation of autophagy. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 584, n. 7, p. 1287-1295, Apr. 2010.

KALRA, K.; TOMAR, P. Stem Cell: Basics, Classification and Applications. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, India, v. 2, n. 7, p. 919-930, 2014.

KELLER, G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. **Genes & Development**, New York, v. 15, n. 10, p. 1129-1155, May 2005.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, London, v. 26, n. 4, p. 239-257, Aug. 1972.

KIM, H. J.; MUN, J. Y.; CHUN, Y. J.; CHOI, K. H.; KIM, M. Y. Bax-dependent apoptosis induced by ceramide in HL-60 cells. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 505, n. 2, p. 264-268, Sep. 2001.

KIRKIN, V. History of the Selective Autophagy Research: How Did It Begin and Where Does It Stand Today? **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 432, n. 1, p. 3-27, Jan. 2020.

KLIONSKY, D. J. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. **Autophagy**, Philadelphia, v. 4, n. 6, p. 740-743, Aug. 2008.

KOMATSU, M.; ICHIMURA, Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 584, n. 7, p. 1374-1378, Apr. 2010.

KORBELIK, M.; ZHANG, W.; SEPAROVIC, D. Amplification of cancer cell apoptosis in photodynamic therapy-treated tumors by adjuvant ceramide analog LCL29. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 43, n. 7, p. 614-620, Sep. 2011.

KRISHNAMURTHY, K.; WANG, G.; SILVA, J.; CONDIE, B. G.; BIEBERICH, E. Ceramide regulates atypical PKC $\zeta$ /lambda-mediated cell polarity in primitive ectoderm cells. A novel function of sphingolipids in morphogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 5, p. 3379-3390, Feb. 2007.

KURZ, J.; PARNHAM, M. J.; GEISLINGER, G.; SCHIFFMANN, S. Ceramides as Novel Disease Biomarkers. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 20-32, Jan. 2019.

LAVRENTIADOU, S. N.; CHAN, C.; KAWCAK, T.; RAVID, T.; TSABA, A.; VAN DER VLIET, A.; RASOOLY, R.; GOLDKORN, T. Ceramide-mediated apoptosis in lung epithelial cells is regulated by glutathione. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, v. 25, n. 6, p. 676-684. Dec. 2001

LEE, B. J. *et al.* Selective inhibitors of mTORC1 activate 4EBP1 and suppress tumor growth. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 17, n. 10, p. 1065-1074, Oct. 2021.

LEVRAUT, J.; IWASE, H.; SHAO, Z. H.; VANDEN HOEK, T. L.; SCHUMACKER, P. T. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 284, n. 2, p. H549-558, Feb. 2003.

LI, C. Y.; WU, X. Y.; TONG, J. B.; YANG, X. X.; ZHAO, J. L.; ZHENG, Q. F.; ZHAO, G. B.; MA, Z. J. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. **Stem Cell Research & Therapy**, London, v. 6, n. 1, p. 55, Apr. 2015.

LINDNER, K.; UHLIG, U.; UHLIG, S. Ceramide alters endothelial cell permeability by a nonapoptotic mechanism. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 145, n. 1, p. 132-140, May 2005.

LIN, T. Y.; CHAN, H. H.; CHEN, S. H.; SARVAGALLA, S.; CHEN, P. S.; COUMAR, M. S.; CHENG, S. M.; CHANG, Y. C.; LIN, C. H.; LEUNG, E.; CHEUNG, C. H. A. BIRC5/Survivin is a novel ATG12-ATG5 conjugate interactor and an autophagy-induced DNA damage suppressor in human cancer and mouse embryonic fibroblast cells. **Autophagy**, Philadelphia, v. 16, n. 7, p. 1296-1313, Jul. 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods: A Companion to Methods in Enzymology**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.

MADDIKA, S.; ANDE, S. R.; PANIGRAHI, S.; PARANJOTHY, T.; WEGLARCZYK, K.; ZUSE, A.; ESHRAGHI, M.; MANDA, K. D.; WIECHEC, E.; LOS, M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, Edinburgh, v. 10, n. 1-2, p. 13-29, Feb.-Apr. 2007.

MARACCI, C.; MOTTA, S.; ROMAGNOLI, A.; COSTANTINO, M.; PEREGO, P.; DI MARINO, D. The mTOR/4E-BP1/eIF4E Signalling Pathway as a Source of Cancer Drug Targets. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 29, n. 20, p. 3501-3529, 2022.

MARQUEZ, R.T.; XU, L. Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. **American Journal of Cancer Research**, Madison, v. 2, n. 2, p. 214-221, Feb. 2012.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, New York, v. 7, n. 4, pii: a026716, Apr. 2013.

MEEUSEN, J. W.; DONATO, L. J.; BRYANT, S. C.; BAUDHUIN, L. M.; BERGER, P. B.; JAFFE, A. S. Plasma Ceramides. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 38, n. 8, p. 1933-1939, Aug. 2018.

MENCARELLI, C.; MARTINEZ-MARTINEZ, P. Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, Basel, v. 70, n. 2, p. 181-203, Jan. 2013.

MERRILL, A. H. Jr.; SCHMELZ, E. M.; DILLEHAY, D. L.; SPIEGEL, S.; SHAYMAN, J. A.; SCHROEDER, J. J.; RILEY, R. T.; VOSS, K. A.; WANG, E. Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 142, n. 1, p. 208-225, Jan. 1997.

MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes & Development**, New York, v. 21, n. 22, p. 2861-2873, Nov. 2007.

MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. **Cell**, Cambridge, v. 147, n. 4, p. 728-741, Nov. 2011.

MOHAMED-AHMED, S.; FRISTAD, I.; LIE, S. A.; SULIMAN, S.; MUSTAFA, K.; VINDENES, H.; IDRIS, S. B. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. **Stem Cell Research & Therapy**, London, v. 9, n. 1, p. 168, Jun. 2018.

MORGAN-BATHKE, M.; LIN, H. H.; CHIBLY, A. M.; ZHANG, W.; SUN, X.; CHEN, C. H.; FLODBY, P.; BOROK, Z.; WU, R.; ARNETT, D.; KLEIN, R. R.; ANN, D. K.; LIMESAND, K. H. Deletion of ATG5 shows a role of autophagy in salivary homeostatic control. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 92, n. 10, p. 911-917, Oct. 2013.

NATURE. Springer Nature Publishing AG, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/subjects/chaperones>>. Acesso em: 31 de mai. 2019.

NAZIO, F.; BORDI, M.; CIANFANELLI, V.; LOCATELLI, F.; CECCONI, F. Autophagy and cancer stem cells: molecular mechanisms and therapeutic applications. **Cell death and differentiation**, London, v. 26, n. 4, p. 690-702, Mar. 2019.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7a ed. Porto Alegre: Artmed; 2019. Cap.10, p. 361-373. Lipídeos.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1833, n. 12, p. 3448-3459, Dec. 2013.

NUHU, F.; BHANDARI, S. Oxidative Stress and Cardiovascular Complications in Chronic Kidney Disease, the Impact of Anaemia. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 11, n. 4, p. 103, Oct. 2018.

NUSCHKE, A.; RODRIGUES, M.; STOLZ, D. B.; CHU, C. T.; GRIFFITH, L.; WELLS, A. Human mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells consume accumulated autophagosomes early in differentiation. **Stem Cell Research & Therapy**, London, v. 5, n. 6, p. 140-152, Dec. 2014.

OESTREICHER, J.; MORGAN, B. Glutathione: subcellular distribution and membrane transport 1. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 97, n. 3, p. 270-289, Jun. 2019.

ORSINI, M.; CHATEAUVIEUX, S.; RHIM, J.; GAIGNEAUX, A.; CHEILLAN, D.; CHRISTOV, C.; DICATO, M.; MORCEAU, F.; DIEDERICH, M. Sphingolipid-mediated inflammatory signaling leading to autophagy inhibition converts erythropoiesis to myelopoiesis in human hematopoietic stem/progenitor cells. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 26, n. 9, p. 1796-1812, Sep. 2019.

PAN, H.; CAI, N.; LI, M.; LIU, G. H.; IZPISUA BELMONTE, J. C. Autophagic control of cell 'stemness'. **EMBO Molecular Medicine**, Chichester, v. 5, n. 3, p. 327-331, Mar. 2013.

PARK, J. Y.; KIM, M. J.; KIM, Y. K.; WOO, J. S. Ceramide induces apoptosis via caspase-dependent and caspase-independent pathways in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. **Archives of Toxicology**, New York, v. 85, n. 9, p. 1057-1065, Sep. 2011.

PFEFFER, C. M.; SINGH A. T. K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, n. 2, p. 448-458, Feb. 2018.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, New York, v. 284, n. 5411, p. 143-147, Apr. 1999.

QIU, L.; LIU, Z.; WU, C.; CHEN, W.; CHEN, Y.; ZHANG, B.; LI, J.; LIU, H.; HUANG, N.; JIANG, Z.; WU, Y.; LI, L. C6-ceramide induces salivary adenoid cystic carcinoma cell apoptosis via IP3R-activated UPR and UPR-independent pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 525, n. 4, p. 997-1003, May 2020.

QUILLET-MARY, A.; JAFFRÉZOU, J. P.; MANSAT, V.; BORDIER, C.; NAVAL, J.; LAURENT, G. Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 34, p. 21388-21395, Aug. 1997.

QUINVILLE, B. M.; DESCHENES, N. M.; RYCKMAN, A. E.; WALIA, J. S. A Comprehensive Review: Sphingolipid Metabolism and Implications of Disruption in Sphingolipid Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 11, p. 5793, May 2021.

RÀFOLS, M. E. Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. **Endocrinología y nutrición: órgano de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición**, Barcelona, v. 61, n. 2, p. 100-112, Feb. 2014.

RABANAL-RUIZ, Y.; KOROLCHUK, V. I. MtorC1 and Nutrient Homeostasis: The Central Role of the Lysosome. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, n. 3, p. 818, Mar. 2018.

RAMAIAH, L.; BOUNOUS, D. I.; ELMORE, S. A (2013). Chapter 50 - Hematopoietic System. *In*: HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G; WALLIG, M. A (eds). **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology** (3rd). Academic Press: Houston, 2013, p. 1863-1933.

RAO, R. P.; VAIDYANATHAN, N.; RENGASAMY, M.; OOMMEN, A. O.; SOMAIYA, N.; JAGANNATH, M. R. Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human diseases. **Journal of Lipids**, Cairo, v. 2013, n. 178910, Aug. 2013.

RIZVI, F.; HEIMANN, T.; HERRNREITER, A.; O'BRIEN, W. J. Mitochondrial dysfunction links ceramide activated HRK expression and cell death. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 31, e18137, Mar. 2011.

ROCK, K. L.; KONO H. The inflammatory response to cell death. **Annual Review of Pathology**, Palo Alto, v. 3, p. 99-126, 2008.

SABOL, R. A.; BOWLES, A. C.; CÔTÉ, A.; WISE, R.; PASHOS, N.; BUNNELL, B. A. Therapeutic Potential of Adipose Stem Cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v.1341, p. 15-25, 2021.

SAHU, S. K.; HANNUN, Y. A.; YAO, N. Emergence of membrane sphingolipids as a potential therapeutic target. **Biochimie**, Paris, v. 158, p. 257-264, Mar. 2019.

SARBASSOV, D. D.; GUERTIN, D. A.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-Mtor complex. **Science**, New York, v. 307, n. 5712, p. 1098-1101, Feb. 2005.

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell**, Cambridge, v. 169, n. 2, p. 361-371, Apr. 2017.

SHUKLA, L.; YUAN, Y.; SHAYAN, R.; GREENING, D. W.; KARNEZIS, T. Fat Therapeutics: The Clinical Capacity of Adipose-Derived Stem Cells and Exosomes for Human Disease and Tissue Regeneration. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 3, n. 11, p. 158, Mar. 2020.

SILVA, S. F.; LEVY, D.; RUIZ, J. L. M.; DE MELO, T. C.; ISAAC, C.; FIDELIS, M. L.; RODRIGUES, A.; BYDLOWSKI, S. P. Oxysterols in adipose tissue-derived mesenchymal stem cell proliferation and death. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 169, p. 164-175, May 2017.

SINGH, A.; KUKRETI, R.; SASO, L.; KUKRETI, S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. **Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, Basel, v. 24, n. 8, p. 1583, Apr. 2019.

SINHA, N.; DABLA, P. K. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review. **Current Hypertension Reviews**, Saif Zone, v. 11, n. 2, p. 132-142, 2015.

SISKIND, L. J.; KOLESNICK, R. N.; COLOMBINI, M. Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 30, p. 26796-26803, May 2002.

STAUBER, R. H.; MANN, W.; KNAUER, S. K. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. **Cancer Research**, Baltimore, v. 67, n. 13, p. 5999-6002, Jul. 2007.

STENSON, W. F.; CIORBA, M. A. (2018) Chapter 9 - Cell death. *In* SAID, H.M. (ed) **Physiology of the Gastrointestinal Tract** (6th). Academic Press: Cambridge, Houston, 2018; p. 221–234.

SUKUMARAN, P.; LÖNNFORS, M.; LÅNGVIK, O.; PULLI, I.; TÖRNQUIST, K.; SLOTTE, J. P. Complexation of c6-ceramide with cholesteryl phosphocholine - a potent solvent-free ceramide delivery formulation for cells in culture. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 4, e61290, Apr. 2013.

SUN, Y.; FOX, T.; ADHIKARY, G.; KESTER, M.; PEARLMAN, E. Inhibition of corneal inflammation by liposomal delivery of short-chain, C-6 ceramide. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 83, n. 6, p. 1512-1521, Jun. 2008.

TAVAKOL, S. *et al.* Autophagy Modulators: Mechanistic Aspects and Drug Delivery Systems. **Biomolecules**, Basel, v. 9, n. 10, p. 530-571, Sep. 2019.

TESAR, P. J. Snapshots of pluripotency. **Stem Cell Reports**, Cambridge s, v. 6, n. 2, p. 163-167, Feb. 2016.

TRA, T.; GONG, L.; KAO, L. P.; LI, X. L.; GRANDELA, C.; DEVENISH, R. J.; WOLVETANG, E.; PRESCOTT, M. Autophagy in human embryonic stem cells. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 11, e27485, Nov. 2011.

VILLENA, J.; HENRIQUEZ, M.; TORRES, V.; MORAGA, F.; DÍAZ-ELIZONDO, J.; ARREDONDO, C.; CHIONG, M.; OLEA-AZAR, C.; STUTZIN, A.; LAVANDERO, S.; QUEST, A. F. Ceramide-induced formation of ROS and ATP depletion trigger necrosis in lymphoid cells. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 44, n. 6, p. 1146-1160, Mar. 2008.

WANG, X.; PROUD, C. G. mTORC2 is a tyrosine kinase. **Cell Research**, Beijing, v. 26, n. 1, p. 1-2, Feb. 2016.

WILHELM, R.; ECKES, T.; IMRE, G.; KIPPENBERGER, S.; MEISSNER, M.; THOMAS, D.; TRAUTMANN, S.; MERLIO, J. P.; CHEVRET, E.; KAUFMANN, R.; PFEILSCHIFTER, J.; KOCH, A.; JÄGER, M. C6 Ceramide (d18:1/6:0) as a Novel Treatment of Cutaneous T Cell Lymphoma. **Cancers**, Basel, v. 13, n. 2, p. 270, Jan. 2021.

WU, C. C.; HOU, S.; ORR, B. A.; KUO, B. R.; YOUN, Y. H.; ONG, T.; ROTH, F.; EBERHART, C. G.; ROBINSON, G. W.; SOLECKI, D. J.; TAKETO, M. M.; GILBERTSON, R. J.; ROUSSEL, M. F.; HAN, Y. G. mTORC1-Mediated Inhibition of 4EBP1 Is Essential for Hedgehog Signaling-Driven Translation and Medulloblastoma. **Developmental cell**, Cambridge, v. 43, n. 6, p. 673-688, Dec. 2017.

XU, F.; YANG, C. C.; GOMILLION, C.; BURG, K. J. Effect of ceramide on mesenchymal stem cell differentiation toward adipocytes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n. 1, p. 197-212, Jan. 2010.

XU, H. D.; QIN, Z. H. Beclin 1, Bcl-2 and Autophagy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 1206, p. 109-126, 2019.

YANG, L.; ZHENG, L. Y.; TIAN, Y.; ZHANG, Z. Q.; DONG, W. L.; WANG, X. F.; ZHANG, X. Y.; CAO, C. C6 ceramide dramatically enhances docetaxel-induced growth inhibition and apoptosis in cultured breast cancer cells: a mechanism study. **Experimental Cell Research**, New York, v. 332, b. 1, p. 47-59, Mar. 2015.

YOSHIMURA, K.; SHIGEURA, T.; MATSUMOTO, D.; SATO, T.; TAKAKI, Y.; AIBAKOJIMA, E.; SATO, K.; INOUE, K.; NAGASE, T.; KOSHIMA, I.; GONDA, K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions

of liposuction aspirates. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 208, n. 1, p. 64-76, Jul. 2006.

YU, T.; LI, J.; SUN, H. C6 ceramide potentiates curcumin-induced cell death and apoptosis in melanoma cell lines in vitro. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Berlin, v. 66, n. 5, p. 999-1003, Oct. 2010.

ZAKRZEWSKI, W.; DOBRZYŃSKI, M.; SZYMONOWICZ, M.; RYBAK, Z. Stem cells: past, present, and future. **Stem Cell Research and Therapy**, London, v. 10, n. 68, p. 1-22, Feb. 2019.

ZANIERI, F. *et al.* Exogenous Liposomal Ceramide-C6 Ameliorates Lipidomic Profile, Energy Homeostasis, and Anti-Oxidant Systems in NASH. **Cells**, Basel, v. 9, n. 5, p. 1237, May 2020.

ZHAO, X.; SUN, B.; ZHANG, J.; ZHANG, R.; ZHANG, Q. Short-chain C6 ceramide sensitizes AT406-induced anti-pancreatic cancer cell activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 479, n. 2, p. 166-172, Oct. 2016.

ZHENG, K.; HE, Z.; KITAZATO, K.; WANG, Y. Selective Autophagy Regulates Cell Cycle in Cancer Therapy. **Theranostics**, Wyoming, v. 9, n. 1, p. 104-125, Jan. 2019.

ZHOU, Y.; YAN, H.; GUO, M.; ZHU, J.; XIAO, Q.; ZHANG, L. Reactive oxygen species in vascular formation and development. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 2013, ID 374963, Jan. 2013.

ZHU, X.; DU, X.; DENG, X.; YI, H.; CUI, S.; LIU, W.; SHEN, A.; CUI, Z. C6 ceramide sensitizes pemetrexed-induced apoptosis and cytotoxicity in osteosarcoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 452, n. 1, p. 72-78, Sep. 2014.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of The Cell**, Maryland, v. 13, n. 12, p. 4279-4295, Dec. 2002.

## 10.ANEXOS

### Anexo 01. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise da diferenciação e morte celular por ação de esfingolipídios, ceramidas e espécies reativas de oxigênio (ROS)

**Pesquisador:** Sergio Paulo Bydlowski

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 47363121.3.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.834.568

##### Apresentação do Projeto:

O projeto apresentado para apreciação trata-se da "Análise da diferenciação e morte celular por ação de esfingolipídios, ceramidas e espécies reativas de oxigênio (ROS)". O estudo será realizado como tese de Doutorado da aluna Juliana Sampaio Silva, onde os pesquisadores vão utilizar células tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo que pertencem ao Biorepositório do LIM-19. Serão realizados ensaios em cultura celular para o desenvolvimento do estudo. O desenho do projeto está claro e é de grande interesse científico para que se possa desenvolver novas estratégias terapêuticas ligadas a engenharia de tecidos.

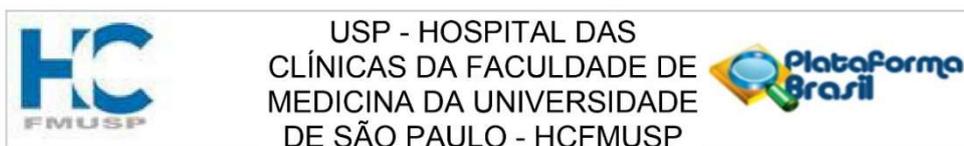
##### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste projeto é identificar e caracterizar as vias de sinalização com as quais estão associadas os seguintes componentes: ceramidas, esfingolipídios, espécies reativas de oxigênio (ROS) e oxisteróis, que levam à diferenciação e morte celular (apoptose e autofagia) em células-tronco mesenquimais. Os objetivos estão claros e bem definidos, ainda a metodologia que será utilizada é pertinente para o desenvolvimento do estudo.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Neste estudo serão utilizadas células provenientes do Biorepositório do Grupo de Lípidos, Oxidação e Biologia Celular do Laboratório de Imunologia (LIM 19). Para minimizar o risco de eventual quebra de anonimato somente o pesquisador responsável possui a identidade e os dados

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.834.568

de cada indivíduo.

**Benefícios:**

A pesquisa irá trazer como benefício o aumento de conhecimento específico da interação e diferenciação das células tronco mesenquimais com o tratamento com as moléculas de oxisteróis, esfingolípídeos e ceramidas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo em cultura celular que é de grande valia para os processos de reparação tecidual.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os pesquisadores solicitam a dispensa do TCLE e justificam que trata-se de um estudo retrospectivo com células do Biorepositório do Grupo de Lípidos, Oxidação e Biologia Celular do Laboratório de Imunologia (LIM 19) de responsabilidade do pesquisador e que será garantido pelo pesquisador o anonimato da procedência destas células.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sugerimos sua aprovação.

**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 ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1745796.pdf	27/05/2021 15:05:58		Aceito
Folha de Rosto	FR19733.pdf	27/05/2021 15:02:10	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.834.568

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_Juliana_Cappesq.pdf	18/05/2021 14:09:58	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_resumido.pdf	18/05/2021 14:09:45	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Declaração do Patrocinador	Financiamento_propio.pdf	18/05/2021 14:07:46	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Parecer_Uso_de_dados_digitais_final.pdf	18/05/2021 14:06:11	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_encaminhamento.pdf	18/05/2021 14:05:00	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Doutorado.pdf	18/05/2021 14:03:47	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	18/05/2021 14:01:48	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	18/05/2021 13:55:05	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 08 de Julho de 2021

Assinado por:  
ALFREDO JOSE MANSUR  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br