

**Universidade de São Paulo FMUSP
Faculdade de Medicina**

Cadiele Oliana Reichert

**Características da ação dos oxisteróis *7-ketocholesterol* e
colestane-3 β ,5 α ,6 β -triol nas proteínas transportadoras ABCs e
LRP das células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea
de pacientes com leucemia mieloide aguda**

**São Paulo
2023**

Cadiele Oliana Reichert

Características da ação dos oxisteróis *7-ketcholesterol* e *colestane-3 β ,5 α ,6 β -triol* nas proteínas transportadoras ABCs e LRP das células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de pacientes com leucemia mieloide aguda

Versão Original

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

Reichert, Cadiele Oliana

Características da ação dos oxisteróis 7-ketocholesterol e colestane-3 β ,5 α ,6 β -
triol nas proteínas transportadoras ABCs e LRP das células-tronco mesenquimais
derivadas de medula óssea de pacientes com leucemia mieloide aguda / Cadiele
Oliana Reichert. -- 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.

Palavras-chave: 1.Células-tronco mesenquimais 2.Leucemia 3.Proteínas
ABCs 4.Fenótipos 5.Oxisteróis 6.7-cetocolesterol 7.Medula óssea.

USP/FM/DBD-043/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: Cadiele Oliana Reichert

Título: Características da ação dos oxisteróis 7-ketocholesterol e colestane-3 β ,5 α ,6 β -triol nas proteínas transportadoras ABCs e LRP das células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de pacientes com leucemia mieloide aguda.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor 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: _____

A finalização desta etapa em minha vida foi um esforço conjunto. Não teria chegado até aqui caso caminhasse sozinha.

Dedico este trabalho à minha mãe Margarida Mangold Reichert (*In Memoriam*) .

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski, agradeço por todo o aprendizado e pela oportunidade de conviver com você nesses últimos anos. Levarei para todo o sempre seus ensinamentos, eles transcenderam o desenvolvimento dessa tese.

À Dra. Débora Levy, amiga e companheira de trabalho, jamais terei palavras para expressar todo o meu afeto por você. Agradeço por todos os ensinamentos, por todas as histórias contadas e ouvidas, por cada momento, por cada dia; com você aprendi, cresci e amadureci.

Ao amigo e meu orientador de mestrado, prof. Dr. Celso Spada, símbolo de ética, dedicação e comprometimento com a educação pública, obrigada pelo incentivo e apoio, sem você não teria chegado até aqui.

Ao prof. Dr. Bruno Caramelli, obrigada pela amizade, ensinamentos, confiança e pela oportunidade de trabalhar tanto no PAE quanto na pós-graduação ao seu lado.

Ao Dr. Pedro Nogueira Giglio, ao Prof. Dr. Marco Kawamura Demange, ao Dr. Luís Alberto de Pádua Covas Lage, à Profa. Dra. profa. Juliana Pereira, à Jessica Liliane Paz e Priscila de Lima Barros, pela obtenção e caracterização das células-tronco mesenquimais

Ao prof. Dr. Edécio Cunha e ao Dr. João Pedro Nunes, pelo auxílio e disponibilidade das sequências de iniciadores dos genes mitocondriais utilizadas neste trabalho.

Aos amigos, Beatriz Araújo Oliveira, Jessica Liliane Paz, Priscila de Lima Barros e Leonardo Rokita de Rosa, pelo tempo que passamos juntas, ensinamentos e ótima convivência.

Aos amigos Dr. Fábio Alessandro de Freitas e Juliana Sampaio Silva, obrigada pela amizade, carinho, auxílio e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Ana Moreti, Simone Regina dos Santos, Sandra Maria e Andréia, agradeço o carinho e a amizade, bem como por todo o auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas Angélica Belém de Sousa e Rose, pela amizade, oportunidade de convívio e todo o aprendizado.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Médicas, pelo acolhimento e auxílios durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pacientes doares de medula óssea, sem vocês não teria realizado este trabalho.

Aos amigos Dr. Hebert Fabrício Culler, profa. Dra Juliana Pereira e Dr. Luis Alberto Covas Lage, por todo o incentivo, oportunidade, paciência e aprendizado.

À amiga Linah Akemi Fukuya por todo o aprendizado e momentos bons que passamos juntas.

Aos integrantes do LIM-19 por todo auxílio durante o desenvolvimento desse trabalho.

À minha família, minha querida tia Loreni Luzia Reichert, meu tio Rogério Henicka, meu primo Rogério Henrique Henicka, exemplo de superação e perseverança, a minha prima Caroline Barbára Henicka, mãe dedicada e atenciosa, ao meu querido afilhado, Samuel Henicka, um anjo em nossas vidas, obrigada pelo apoio, incentivo e por todos os momentos que passamos juntos ao longo dessa vida.

Aos queridos Ivo de Figueiredo e Yvonne Abnade Santos de Figueiredo (*in memoriam*), pela amizade, por todo o amor, apoio e incentivo.

À minha irmã, Patrícia Reichert, por tudo fez e faz por mim. Muito obrigada pela parceria que nós temos.

Ao meu noivo, Alexandre Santos Figueiredo, por toda a parceria, incentivo, amor e dedicação a nossa família.

Aos meus lindos cachorros, Rani e Théo, por todo amor incondicional que recebo todos os dias. Vocês deixam os meus dias mais leves e tranquilos.

Aos meus queridos amigos Débora Borget Wopereis, Edson Gomes, Andressa Borget Wopereis, Jonathan Medeiros e Gabriel Carvalho de Souza, que sempre estiveram ao meu lado. Obrigada por todo o carinho e incentivo.

À querida amiga Dra Glauca Karime Braga, por todos os ensinamentos, apoio e incentivo.

À Universidade de São Paulo, por ter me recebido de braços abertos, sendo centro de excelência e compromisso com a educação pública e desenvolvimento da ciência no Brasil.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao programa de pós-graduação em Farmácia, minha primeira casa na Academia.

Ao CNPq, agência da qual fui bolsista durante o desenvolvimento desta tese.

À Capes, pelo financiamento dos programas de pós-graduação e formação de recursos humanos.

Muito Obrigada!

RESUMO

Reichert CO. Características da ação dos oxisteróis 7-ketocholesterol e colestane-3 β ,5 α ,6 β -triol nas proteínas transportadoras ABCs e LRP das células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de pacientes com leucemia mieloide aguda [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

As proteínas ABCs e LRP (*Lung resistance-related protein*) fazem o transporte de lipídios e de xenobióticos, e estão associadas ao fenótipo de resistência a múltiplas drogas. As células-tronco mesenquimais (CTM) são células multipotentes presentes na medula óssea e fazem parte do nicho hematopoiético. Alterações fenotípicas em CTMs estão relacionadas a progressão da leucemia mieloide aguda (LMA). Os oxisteróis, 7-KC e Triol, são derivados do colesterol; e apresentam funções na sinalização, proliferação e morte celular. Sendo assim, este estudo avaliou a ação do 7-KC (30 μ M, 50 μ M e 70 μ M) e de Triol (20 μ M, 30 μ M e 40 μ M) nas proteínas ABC-A1, ABC-D4, ABC-G1, ABC-G2 e LRP e, em suas respectivas vias de modulação, *LXR- α/β* e *Sonic Hedgehog (SHh)*, das CTM derivadas de medula óssea de pacientes com LMA (CTM-D), sendo utilizado como controle CTM de indivíduos saudáveis (CTM-S). Primeiro, foi observado que a quantidade de LRP, ABC-A1 e do receptor LXR- β diminuíram em CTM-D, enquanto houve aumento de glutathiona oxidada e das proteínas relacionadas a resistência a apoptose, a proliferação e invasão celular: a survivina, o receptor SHh, a proteína SMO, Gli3 e do CD147 – correceptor da proteína ABC-G2 – respectivamente. Em seguida, após o tratamento com 7-KC por 24 horas, foi observado que em CTM-S ocorreu aumento de ABC-A1 na concentração de 30 μ M, e translocação da proteína SMO para o núcleo; com 70 μ M de 7-KC foi observado aumento de survivina, de glutathiona oxidada e diminuição da proteína LRP. Esses efeitos não foram observados em CTM-D tratadas com 7-KC. Em ambas as linhagens, foi observado, que em nível molecular, o tratamento com 7-KC apresentou efeito no processo de fusão e fissão mitocondrial. O tratamento com Triol por 24 horas, diminuiu a quantidade de ABC-A1 e de seu modulador, o receptor LXR- β em CTM-S. Esses resultados foram associados ao aumento da proteína SMO e, de sua translocação para o núcleo na contração de 20 μ M. Esse efeito não foi observado em CTM-D. Em ambas as linhagens tratadas com Triol ocorreu aumento de glutathiona oxidada e diminuição de glutathiona reduzida. Além disso, foi observado, em nível molecular, inversão no processo metabólico de fusão e fissão mitocondrial, enquanto em CTM-S houve aumento na expressão de genes relacionados fusão, em CTM-D houve aumento dos genes relacionados a fissão. Em CTM-D tratadas com Triol, foi observado aumento de ABC-D4 no citoplasma; e aumento de LRP apenas na concentração de 20 μ M de Triol, seguida de diminuição nas concentrações de 30 μ M e 40 μ M de Triol. Esses efeitos não foram observados em CTM-S. O tratamento com 40 μ M de Triol aumentou a quantidade de CD147 em CTM-D e diminuiu em CTM-S. Aqui, foi encontrado a proteína ABC-D4 presente no citoplasma e no núcleo das CTMs. Em suma, as linhagens CTM-S e CTM-D são diferentes fisiologicamente. E, nas mesmas concentrações utilizadas de 7-KC e de Triol em CTMs foi observado efeito diferente, e em partes, oposto sendo que essa diferença é decorrente da origem das células. Além disso, nossos resultados são característicos da ação metabólica citotóxica dos oxisteróis 7-KC e Triol nas CTMs.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais. Leucemia. Proteínas ABCs. Fenótipos. Oxisteróis. 7-cetocolesterol. Medula óssea.

ABSTRACT

Reichert CO. Characteristics of the action of oxysterols 7-ketocholesterol and cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol on ABCs and LRP transport proteins of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with acute myeloid leukemia [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;” 2023.

The ABCs and LRP (Lung resistance-related protein) proteins transport lipids and xenobiotics, and are associated with the multidrug resistance phenotype. Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent cells present in the bone marrow and are part of the hematopoietic niche. Phenotypic changes in MSCs are related to the progression of acute myeloid leukemia (AML). The oxysterols, 7-KC and Triol, are derived from cholesterol; and have functions in cell signaling, proliferation and death. Therefore, this study evaluated the action of 7-KC (30 μ M, 50 μ M and 70 μ M) and Triol (20 μ M, 30 μ M and 40 μ M) on proteins ABC-A1, ABC-D4, ABC-G1, ABC -G2 and LRP and, in their respective modulation pathways, LXR- α/β and Sonic Hedgehog (SHh), from MSCs derived from bone marrow of patients with AML (MSC-D), being used as control MSCs in healthy individuals (MSC-S). First, it was observed that the amount of LRP, ABC-A1 and the LXR- β receptor were decreased in MSC-D, while there was an increase in oxidized glutathione and proteins related to resistance to apoptosis, proliferation and cell invasion: survivin, the SHh receptor, the SMO protein, Gli3 and CD147 –ABC-G2 protein co-receptor– respectively. Then, after treatment with 7-KC for 24 hours, it was observed that in MSC-S there was an increase in ABC-A1 at a concentration of 30 μ M, and translocation of the SMO protein to the nucleus; with 70 μ M of 7-KC, an increase in survivin, oxidized glutathione and a decrease in LRP protein was observed. These effects were not observed in MSC-D treated with 7-KC. In both strains, it was observed that, at the molecular level, treatment with 7-KC influenced the process of mitochondrial fusion and fission. Treatment with Triol for 24 hours decreased the amount of ABC-A1 and its modulator, the LXR- β receptor in MSC-S. These results were associated with an increase in SMO protein and its translocation to the nucleus in a 20 μ M contraction. This effect was not observed in MSC-D. In both strains treated with Triol there was an increase in oxidized glutathione and a decrease in reduced glutathione. Furthermore, at the molecular level, an inversion in the metabolic process of mitochondrial fusion and fission was observed, while in MSC-S there was an increase in the expression of genes related to fusion, in MSC-D there was increase in genes related to fission. In MSC-D treated with Triol, an increase of ABC-D4 in the cytoplasm was observed; and LRP increase only in the 20 μ M Triol concentration, followed by a decrease in the 30 μ M and 40 μ M Triol concentrations. These effects were not observed in MSC-S. Treatment with 40 μ M of Triol increased the amount of CD147 in MSC-D and decreased in MSC-S. Here, the ABC-D4 protein was found to be present in the cytoplasm and nucleus of MSCs. In summary, the MSC-S and MSC-D strains are physiologically different. And, in the same used concentrations of 7-KC and Triol in MSCs, a different effect was observed, and in parts, opposite, being that this difference is due to the origin of the cells. Furthermore, our results are characteristic of the cytotoxic metabolic action of the oxysterols 7-KC and Triol on MSCs.

Keywords: Mesenchymal stem cells. Leukemia. ABC proteins. Phenotypes. Oxysterols. 7-Ketocholesterol. Bone marrow

LISTA DE FIGURAS

	Assunto	Pág.
Figura 1	Mecanismo de efluxo geral de um transportador da família ABC.....	25
Figura 2	Ativação da via de sinalização LXR por oxisteróis.....	35
Figura 3	Via de sinalização <i>Sonic Hedgehog</i> ativada por oxisteróis.....	36
Figura 4	Citotoxicidade dos oxisteróis Triol e 7-KC nas linhagens de CTM-S e CTM-D.....	58
Figura 5	Desorganização da F-actina em linhagem de CTM-S tratada com 7-KC por 24 horas.....	59
Figura 6	Desorganização da F-actina em linhagem de CTM-S tratada com Triol por 24 horas.....	60
Figura 7	Ativação das caspases 3/7 em linhagens de CTM tratadas com 7-KC e Triol.....	61
Figura 8	Efeito dos oxisteróis 7-KC e Triol no potencial de membrana mitocondrial das CTM-S e CTM-D.....	63
Figura 9	Efeito do tratamento com 7-KC nas mitocôndrias de CTMs.....	64
Figura 10	Efeito do tratamento com Triol nas mitocôndrias de CTMs.....	65
Figura 11	Efeito do tratamento com 7-KC e Triol no potencial de membrana das mitocôndrias de CTMs.....	66
Figura 12	Metabolização do MTT por CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	68
Figura 13	Efeito no ciclo celular do tratamento com 7-KC e Triol em CTMs.....	69
Figura 14	Expressão relativa das proteínas ABCs em CTM-D tratadas com Triol e 7-KC.....	70
Figura 15	Efeito do tratamento com 7-KC e Triol na proteína ABC-A1 de linhagens de CTM-S e CTM-D.....	71
Figura 16	Análise do tratamento com 7-KC e Triol na quantidade da proteína ABC-A1 em linhagens de CTM-S e CTM-D.....	73
Figura 17	Efeito do tratamento com 7-KC e Triol na proteína ABC-G1 de linhagens de CTM-S e CTM-D.....	74

	Assunto	Pág.
Figura 18	Análise do tratamento com 7-KC e Triol na proteína ABC-G1 de linhagens de CTM-S e CTM-D.....	75
Figura 19	Efeito do tratamento com 7-KC e Triol na proteína ABC-G2 em linhagens de CTM-S e CTM-D.....	76
Figura 20	Análise do tratamento com 7-KC e Triol na proteína ABC-G2 em linhagens de CTM-S e CTM-D.....	77
Figura 21	Proteína LRP em CTMs tratadas com 7-KC e com Triol.....	78
Figura 22	Análise do tratamento com 7-KC e Triol na proteína LRP de linhagens de CTM-S e CTM-D.....	80
Figura 23	Receptor LXR- α em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	81
Figura 24	Análise dos receptor LXR- α de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	82
Figura 25	Receptor LXR- β em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	83
Figura 26	Análise do receptor LXR- β de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	84
Figura 27	Receptor PPAR- γ em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	85
Figura 28	Análise da quantificação do receptor PPAR- γ em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	86
Figura 29	Proteína caveolina-1 em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	87
Figura 30	Análise da proteína caveolina-1 de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	88
Figura 31	Receptor CD147 de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	89
Figura 32	Análise do receptor CD147 de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	90
Figura 33	Receptor SHh em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	91
Figura 34	Análise do receptor SHh de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	92
Figura 35	Proteína SMO de CTMs tratadas com Triol e 7-KC.....	93
Figura 36	Análise da proteína SMO no citoplasma das CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	94

	Assunto	Pág.
Figura 37	Análise da proteína SMO no núcleo de CTMs tratadas com 7-KC e com Triol.....	96
Figura 38	Análise da proteína Gli3 de CTMs tratadas com 7-KC e com Triol...	97
Figura 39	Proteína ABC-D4 em CTMs tratadas com 7-KC e Triol e nas linhagens MDA-MB-231 e MRC-5.....	98
Figura 40	Análise da proteína ABC-D4 no citoplasma CTMs tratadas com Triol e 7-KC.....	100
Figura 41	Análise da proteína ABC-D4 no núcleo de CTMs tratadas com Triol e 7-KC.....	101
Figura 42	Expressão relativa do gene <i>Mfn1</i> em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	102
Figura 43	Expressão relativa do gene <i>Mfn2</i> em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	103
Figura 44	Expressão relativa do gene <i>OPA1</i> em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	105
Figura 45	Expressão relativa do gene <i>DRP1</i> em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	106
Figura 46	Expressão relativa do gene <i>CYTB</i> em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	107
Figura 47	Expressão relativa do gene <i>ND1</i> em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	108
Figura 48	Expressão relativa dos genes <i>NFKB</i> e <i>IKKB1</i> em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	109
Figura 49	Expressão relativa do gene <i>BCL2</i> em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	110
Figura 50	Proteína survivina de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	111
Figura 51	Análise da proteína survivina no citoplasma de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	112
Figura 52	Análise da proteína survivina no núcleo em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	113
Figura 53	Análise do teor de GSH total de CTMs tratadas com 7-KC e Triol....	115

	Assunto	Pág.
Figura 54	Análise da concentração de glutatona oxidada em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	116
Figura 55	Análise da razão de GSH/GSSH em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.....	117
Figura 56	Interação entre as variáveis estudadas em CTM-S e CTM-D.....	119
Figura 57	Interação entre as variáveis das CTMs que apresentaram diferença após o tratamento com 7-KC e Triol.....	120
Figura 58	<i>Heatmap</i> das variáveis estudadas em CTM-S e CTM-D tratadas com 7-KC e Triol.....	121

LISTA DE TABELAS

	Assunto	Pág.
Tabela 1	Gene, sequência de iniciadores e concentração.....	52
Tabela 2	Anticorpos utilizados na imunofluorescência indireta.....	54
Tabela 3	Concentrações selecionadas de Triol e 7-KC.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS

24-OHC: 24(S)-hidroxicolesterol

27-OHC: 27-hidroxicolesterol

4 β -OHC: 4 β -hidroxicolesterol

7-KC: 7-*ketocholesterol*

7 α -OHC: 7 α -hidroxicolesterol

ABC: *Adenosine Triphosphate-Binding Cassette*

Apo: Apolipoproteína

ATP: *Adenosine TriPhosphate*

BCL2: *B-cell lymphoma two*

BCRP: *Breast cancer resistance protein*

BSA: *Bovine Serum Albumin*

CBP: *Cre-element binding protein*

CD: *Cluster of differentiation*

CFTR: *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

CI₅₀: Concentração Inibitória 50 %

CRD: domínio rico em cisteína

CT: *Cycle of threshold*

CTA: Células-tronco adultas

CTE: Células-tronco embrionárias

CTH: Células-tronco hematopoiéticas

CTM: Células-tronco mesenquimais

CTM-D: Células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de pacientes com LMA

CTM-S: Células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de indivíduos saudáveis

CYP450: *Cytochrome P450*

CYT-B: *Cytochrome b*

DAPI: 4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Dicloridrato

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMEM LOW: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose*

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DPBS: *Dulbecco's phosphate-buffered saline*

DR4: Repetição direta 4

DRP1: *GTPase dynamin-related protein 1*

DTT: *Dithiothreitol*

EMMPRIN: *Extracellular Matrix Metalloproteinase-Indutor*

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (fluorocromo)

Hh: Hedgehog

HLA-DR: *Human Leukocyte Antigen – DR isotype*

IKKB1: *Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B Kinase Beta Subunit 1*

kD: Kilodaltons

LAMP1: *Lysosomal-associated membrane protein 1*

LMBRD1: *LMBR1 domain containing 1*

LRP: *Lung Resistance-related Protein*

LXR: *Liver X Receptor*

LXRE: Elemento responsivo ao LXR

LXR- α : Isoforma alfa do receptor LXR

LXR- β : Isoforma beta do receptor LXR

MAPK / ERK: *mitogen-activated protein kinase /extracellular signal kinase*

MCF-7: Linhagem celular de câncer de mama isolada pela Michigan Cancer Foundation-7

MDA-MB-231: Linhagem celular isolada no MD Anderson de um derrame pleural de uma paciente com carcinoma ductal invasivo.

MDR: *Multidrug Resistance*

Mfn1: Mitofusina 1

Mfn2: Mitofusina 2

MRC-5: Linhagem celular de fibroblasto de pulmão isolada de feto pelo Medical Research Council cell strain 5.

MRP: *Multidrug Resistance-associated protein*

mTOR/S6K1: *Rapamycin complex 1/ p70 ribosomal protein kinase 1*

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

MVP: *Major Vault Protein*

NADH: Forma reduzida da enzima Nicotinamide adenine dinucleotide (ubiquinona oxidoreductase)

NADPH: Forma reduzida Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NBD: *Nucleotide binding domain*

NCoR: *Nuclear receptor corepressor*

ND1: Subunidade da NADH desidrogenase

NEM: N-Etilmaleimida

NF- κ B: Factor nuclear-kappa B

Nrf2: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

OPA1: *Mitochondrial dynamin like GTPase*

P300: Proteína 300

P53: Proteína 53

PARP4: *Poly (ADP-Ribose) Polymerase Family Member 4*

PBS: *Phosphate-buffered saline*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PDGFRa: *platelet-derived growth factor receptor A*

Ph: Cromossomo Philadelphia

PI: *Propidium iodide*

PI3K / AKT: *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*

PPAR- γ : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

Ptch1: *Patched1*

ROR: *Retinoic acid receptor-related orphan receptor*

RT: *Reverse Transcriptase*

RXR: *Retinoid X Receptor*

SCF: *Stem cell factor*

SFB: Soro fetal bovino

SHh: Sonic Hedgehog

SMD: Síndrome Mielodisplásica

SMO: *Smoothened*

SMRT: *Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*

SP1: Fator de transcrição *Specific Protein 1*

SRC-1: *Steroid receptor coactivator 1*

SRE: *Sterol Regulatory Element*

SREBP: *Sterol regulatory element-binding proteins*

SSEA-4: *Stage-specific embryonic antigen-4*

SUR: *Sulfonylurea receptors*

TAP1 (ABCB2): *Transporter associated with antigen processing 1*

TAP2 (ABCB3): *Transporter associated with antigen processing 3*

TEP1: *Telomerase Associated Protein 1*

TMD: *Transmembrane domain*

TMRE: *Tetramethylrhodamine, ethyl ester*

TRICT: Isotiocianato de tetrametil rodamina (fluorocromo)

Triol: Colestane-3 β ,5 α ,6 β -triol

UI: Unidade Internacional

URL: Unidades Relativas de Luz

VTRNA1-1: Vault RNA 1-1

X g: Força gravitacional

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 OBJETIVO	22
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Fenótipo de resistência a múltiplas drogas	23
2.1.1 Família de proteínas ABCs	23
2.1.2 Proteína LRP	30
2.2 Oxisteróis	31
2.2.1 Origem e formação dos oxisteróis.....	31
2.2.2 Oxisteróis e vias de sinalização intracelular	33
2.3 Células-tronco	36
2.3.1 Células-tronco mesenquimais (CTM)	38
2.4 Leucemias	39
2.4.1 Leucemia mieloide aguda (LMA).....	40
2.5. CTM e LMA	41
3. MÉTODOS	43
3.1 Casuística	43
3.2 Cultivo e manutenção das células-tronco mesenquimais	43
3.3 Tratamento das células-tronco mesenquimais	45
3.3.1 Ensaios de Morte celular	45
3.4 Escolha das concentrações inferiores a CI50 de 7-KC e de Triol.....	47
3.4.1 Ensaio de MTT.....	47
3.4.2 Ciclo celular	48
3.5 Tratamento das CTMs com 7-KC e Triol para obtenção do RNA e cDNA	48
3.5.1 Extração do RNA total pelo método de trizol	48
3.5.2 Tratamento com DNase.....	49
3.5.3 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	50
3.6 Análise dos genes <i>BCL2,NF-kB,IKKB1,Mfn1,Mfn2,OPA1,DRP1,CYT-B e ND1</i> .50	
3.7 Avaliação da expressão gênica das proteínas ABCs	52
3.8 Detecção de proteínas por meio de imunofluorescência indireta	53
3.9 Quantificação de glutathiona celular por meio de luminescência	55
3.10 Análise de dados	56
4. RESULTADOS	58

4.1 Citotoxicidade dos oxisteróis em células-tronco mesenquimais	58
4.2 Análise da organização citoplasmática da proteína F-actina	58
4.3 Análise da ativação das caspases 3/7	60
4.4 Análise do potencial de membrana mitocondrial.....	61
4.5 Tratamento com de 7-KC e Triol em CTM	67
4.5.1 Ensaio de MTT	67
4.5.2 Análise do ciclo celular	68
4.6 Expressão gênica das proteínas ABC	69
4.7 Expressão da proteína ABC-A1	71
4.8 Análise das proteínas ABC-C1 e ABC-C2	73
4.9 Análise da proteína ABC-G1	73
4.10 Análise da proteína ABC-G2	75
4.11 Análise da proteína LRP	78
4.12 Análise dos receptores LXR- α e LXR- β	80
4.13 Análise do receptor PPAR- γ	84
4.14 Análise da proteína caveolina-1	86
4.15 Expressão do receptor CD147	88
4.16 Análise das proteínas da via de sinalização <i>Hedgehog</i>	90
4.16.1 Análise do receptor Sonic Hedgehog	90
4.16.2 Análise da proteína SMO	92
4.16.3 Expressão da proteína Gli3	96
4.17 Expressão da proteína ABC-D4.....	97
4.18 Expressão de genes mitocondriais	101
4.18.1 Expressão dos genes relacionados a dinâmica mitocondrial.....	101
4.18.2 Expressão dos genes relacionados a cadeia transportadora de elétrons	106
4.19 Expressão dos genes <i>NF-KB</i> e <i>IKKβ</i>	108
4.20 Expressão do gene <i>BCL2</i>	109
4.21 Expressão da proteína survivina	110
4.22 Quantificação de glutathiona celular	113
4.23 Análise da interação entre as variáveis estudadas.....	118
5.0 DISCUSSÃO	122
6.0 CONCLUSÃO.....	134
7.0 TRABALHOS PUBLICADOS.....	135
8.0 REFERÊNCIAS	137
9.0 ANEXOS	156

1. INTRODUÇÃO

A ausência, ou diminuição do efeito da quimioterapia continua sendo um desafio no tratamento de indivíduos portadores de leucemia mieloide aguda (LMA), que mesmo em acompanhamento clínico-terapêutico sofrem de doença persistente, recidivas e doença residual mínima (1). O fenótipo de resistência a múltiplas drogas, ou MDR (*Multidrug Resistance*), é caracterizado pela falha terapêutica devido à falta de resposta biológica esperada a fármacos com estruturas, mecanismos de ação e classes terapêuticas diferentes durante o período do tratamento quimioterápico realizado pelo paciente. Dentre os mecanismos associados ao fenótipo MDR, o aumento da expressão de proteínas de efluxo ABCs (*Adenosine triphosphate-Binding Cassette*) e LRP (*Lung Resistance-related Protein*) em células leucêmicas, são uns dos mais frequentes associados ao fracasso da quimioterapia e à crise blástica (2–5).

Além disso, alterações no microambiente medular entre as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as células-tronco mesenquimais (CTM) também estão associados a recidivas e falhas na quimioterapia. Sabe-se que alterações fenotípicas em células-tronco mesenquimais mantém um ambiente permissível ao desenvolvimento do clone leucêmico, bem como à progressão, proliferação e invasão de células leucêmicas (6, 7). Até hoje não se sabe se a alteração de determinados fatores nas células-tronco mesenquimais favorecem o desenvolvimento de um clone leucêmico que promove a LMA, ou se o desenvolvimento do clone leucêmico altera as células-tronco mesenquimais. O que se sabe é que ambas se encontram alteradas e proporcionam um nicho hematopoiético próprio para o desenvolvimento da LMA, com alterações na expressão de proteínas e com fenótipo MDR (8, 9).

Os oxisteróis são compostos derivados da oxidação enzimática e não-enzimática da molécula do colesterol (10). Em condições fisiológicas, são encontrados em concentrações baixas a moderadas no corpo humano. Esses compostos apresentam características biológicas, descritas *in vitro* e *in vivo*, e atuam como mediadores para induzir vias de sinalização intracelular envolvidas no crescimento, na renovação, na diferenciação e na morte celular. Os oxisteróis são indutores e/ou inativadores de genes e fatores de transcrição, bem como são moduladores de proteínas ABCs através da ligação a receptores nucleares e de proteínas plasmáticas (11, 12).

Em um estudo conduzido por Silva *et al.*, (13) foi demonstrada a ação apoptótica e a citotoxicidade do 7-cetocolesterol (7-KC:7-*ketocholesterol*) em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, através da hiperpolarização da membrana mitocondrial e

desorganização da actina. Em 2019, nosso grupo de pesquisa descreveu a ação citotóxica do 7-KC na morte celular em células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de indivíduos com LMA, observando a indução simultânea da apoptose e da autofagia associadas ao aumento de espécies reativas do oxigênio (ERO) e ativação da via de sinalização *Sonic Hedgehog* (SHh) (14).

Sendo assim, a adequação e a utilização de determinados oxisteróis como potenciais fármacos e/ou como adjuvantes no tratamento da LMA pode ser um aliado na quimioterapia tradicional, por meio da alteração na expressão de proteínas relacionadas ao fenótipo MDR em células-tronco mesenquimais de indivíduos com leucemia mieloide aguda.

Dessa forma, a hipótese testada no desenvolvimento deste trabalho foi que o tratamento com os oxisteróis 7-KC e Triol por um período de 24 horas apresenta efeito, *in vitro*, na quantidade das proteínas ABCs e LRP, bem como em suas respectivas vias de modulação, em células-tronco mesenquimais derivadas de pacientes com LMA.

1.1 Objetivo

Verificar o efeito do tratamento com os oxisteróis 7-KC e Triol nas proteínas transportadoras ABC e LRP de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de pacientes com leucemia mieloide aguda.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fenótipo de resistência a múltiplas drogas

Atualmente, sabe-se que vários mecanismos se encontram envolvidos no desenvolvimento do fenótipo MDR em células tumorais, tais como o processo de transição epitelial-mesenquimal (15), o ciclo celular alterado, e as vias de sinalização intracelular relacionadas a morte e sobrevivência celular (16, 17). Outro fator importante associado ao fenótipo MDR são as alterações presentes no metabolismo extra e intracelular de fármacos: o sequestro em organelas como os lisossomos, a diminuição da captação, alteração do alvo molecular e aumento do efluxo de fármacos por proteínas transportadoras presentes na membrana celular (18, 19).

Inicialmente, o fenótipo MDR associado as proteínas de bombas de efluxo foi atribuído à glicoproteína P ou ABC-B1, codificada pelo gene *ABCB1* ou *MDR1*. A proteína ABC-B1, faz parte da família de proteínas transportadoras ABC, subfamília ABC-B. A expressão de ABC-B1 foi descrita em culturas de células de carcinoma humano KB (carcinoma epidermoide de boca) no final da década de 1980 (20). É a principal proteína atribuída à resistência a doxorrubicina (21). O aumento da expressão do gene *MDR1* tem sido associado a vários mecanismos envolvendo o fenótipo MDR, incluindo a atividade alterada de fatores de transcrição, rearranjo gênico e/ou mudança de metilação na região promotora do gene (22).

A expressão da proteína ABC-B1 é diversificada tanto em células tumorais, quando em células e tecidos saudáveis com metabolismo elevado. Fisiologicamente, ela mantém a homeostase celular/tecidual através do efluxo de compostos tóxicos presentes no citoplasma, decorrentes do metabolismo (anabolismo e catabolismo) celular (23, 24). A proteína ABC-B1 é amplamente expressa em células embrionárias e na placenta, bem como em células-tronco presentes na medula óssea (23, 24).

Após a descrição e a associação da proteína ABC-B1 à resistência aos quimioterápicos, foi observado que várias linhagens de células tumorais quimiorresistentes não expressavam ABC-B1, sendo atribuído o fenótipo MDR a outras proteínas transportadoras pertencentes a família ABC e as proteínas *vaults* (25). Este trabalho está concentrado nas proteínas: ABC-A1, ABC-D4, ABC-C1, ABC-C2, ABC-G1, ABC-G2 e LRP

2.1.1 Família de proteínas ABCs

As proteínas de efluxo ABCs fazem parte de uma grande família de proteínas presentes em vários órgãos dos sistemas humano. São proteínas transmembranares, que apresentam

interação com o meio extra e intracelular, sendo responsáveis pelo transporte de diversos substratos, bem como, por auxiliar na estruturação e como receptoras na sinalização celular (26). As proteínas ABCs estão amplamente presentes tanto nas membranas celulares e no núcleo, quanto nas membranas de organelas citoplasmáticas: retículo endoplasmático, lisossomos, complexo de Golgi, endossomos, peroxisomos e nas mitocôndrias (27).

Em humanos, as proteínas ABCs estão classificadas em sete subfamílias (A-G). A classificação é baseada nas sequências de aminoácidos do domínio protéico em que ocorre a ligação ao ATP (*Adenosine TriPhosphate*) (28–30). A ligação ao ATP é necessária para que seja gerada energia a partir de sua hidrólise, sendo esta utilizada para translocar substratos específicos por meio das membranas de organelas e das células. Sabe-se que 49 genes codificam as proteínas ABCs em humanos (28–30).

A estrutura global de uma proteína ABC consiste em quatro domínios. As proteínas apresentam dois domínios transmembranares (TMD) e dois domínios de ligação ao nucleotídeo (NBD), denominados de domínio ABC. Ademais, os quatro domínios podem estar presentes em quatro polipeptídeos separados ou em um ou dois polipeptídeos de múltiplos domínios, dependendo da subfamília ABC (31–34).

O domínio NBD pode se ligar e/ou hidrolisar o ATP, enquanto o domínio TMD está associado ao reconhecimento e transporte de substratos. O processo de efluxo de compostos (ou xenobióticos) é caracterizado por alterações conformacionais dinâmicas do transportador ABC, que incluem principalmente a dimerização dos domínios NBDs, que levam o efluxo de droga devido à hidrólise de ATP e, em seguida, o retorno ao estado basal ou inativo (31–34). A figura 1 apresenta o mecanismo de efluxo de um transportador ABC.

Estudos de mecanismos de transporte das proteínas ABCs indicam que alguns substratos fisiológicos das subfamílias ABCs incluem, dentre outros, sais biliares, lipídeos, colesterol, moléculas iônicas, aniônicas, hidrofóbicas e moléculas com tais afinidades e características bioquímicas (34, 35). As proteínas ABCs encontram-se envolvidas na resistência a quimioterápicos em diferentes tipos de cânceres, principalmente as proteínas pertencentes as subfamílias ABC-A, ABC-B, ABC-C e ABC-G (36, 37). Estas proteínas são capazes de retirar as moléculas de quimioterápicos do meio intracelular, transportando-as para o meio extracelular, independentemente da concentração, impactando negativamente na resposta ao tratamento e na sobrevivência do paciente (38, 39).

Figura 1. Mecanismo de efluxo geral de um transportador da família ABC.

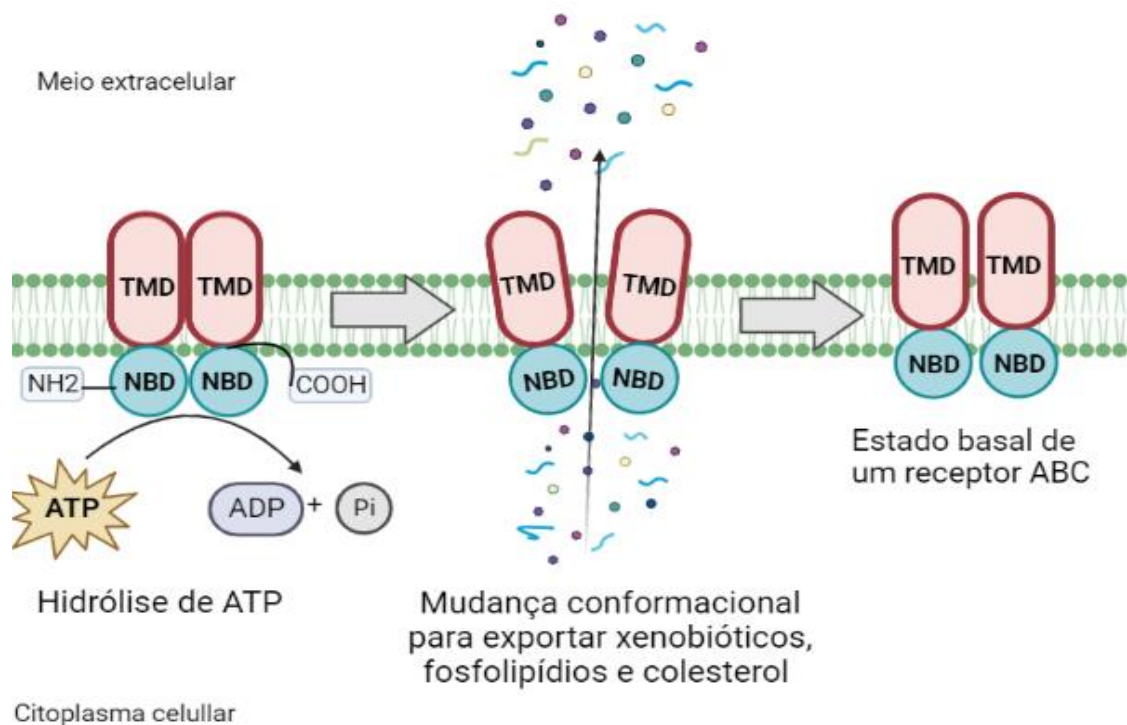


Ilustração apresentando a estrutura básica de um transportador ABC. Fonte: A autora.

2.1.1.1 Proteínas ABC-A1

A proteína ABC-A1 foi o primeiro membro de proteínas de efluxo descrito pertencente a subfamília -A (ABC-A). A subfamília ABC-A consiste em 12 membros, denominados de ABC-A1 a ABC-A13 (o gene *ABCA11* não é funcional em humanos). Todos os membros da subfamília ABC-A estão amplamente distribuídos no corpo humano. Sua função fisiológica é integrar a homeostase lipídica em diferentes compartimentos das células e dos tecidos. A subfamília ABC-A é dividida em dois subgrupos de acordo com sua localização cromossômica e análise filogenética. Um subgrupo dá origem a um *cluster* gênico localizado no cromossomo 17, sendo formado por cinco genes: *ABCA5*, *ABCA6*, *ABCA8*, *ABCA9* e *ABCA10*. O outro subgrupo é composto pelos demais genes: *ABCA1*, *ABCA2*, *ABCA3*, *ABCA4*, *ABCA7*, *ABCA12* e *ABCA13* localizados em seis cromossomos diferentes (40, 41).

O gene *ABCA1* encontra-se localizado no cromossomo 9q31.1, é expresso de forma ubíqua, e codifica uma proteína de 2.261 aminoácidos, com massa molecular de 220 kD, composta por dois domínios de ligação ao ATP altamente conservados, incluindo domínios *Walker A* e *B*. A região promotora do gene *ABCA1* apresenta vários locais de ligação para diferentes fatores de transcrição, contendo sete sítios de ligação para o fator de transcrição SP1

(*Specificity Protein 1*) e quatro sítios para ligação de fatores SREs (*Sterol Regulatory Element*), dentre outros. No organismo humano, a função da proteína ABC-A1 é mediar o efluxo de colesterol e fosfolípidos para as apolipoproteínas (Apo), Apo-A1 e Apo-E com baixo teor de lipídeos, formando as lipoproteínas nascentes de alta densidade (HDL) (42). A proteína ABC-A1 está presente na membrana plasmática, no retículo endoplasmático, no complexo de Golgi e no citoesqueleto. Fisiologicamente, o aumento da expressão da proteína ABC-A1 ocorre na placenta, fígado, pulmão e glândulas adrenais; enquanto sua hipoexpressão ocorre nos rins, pâncreas, hipófise, glândula mamária e na medula óssea (43).

A relação direta entre ABC-A1 e a quimiorresistência ainda é controversa. Entretanto, alguns estudos indicam que o aumento da expressão de ABC-A1 está associado a um mau prognóstico no desenvolvimento do câncer (44, 45). Hedditch *et al.*, (46), demonstraram que o aumento da expressão da proteína ABC-A1 estava associado a baixa sobrevivência em pacientes com câncer de ovário epitelial seroso. Ademais, a supressão da proteína ABC-A1 inibiu o crescimento e a migração de células de câncer de ovário *in vitro* (46). A expressão elevada da proteína ABC-A1 no câncer colorretal levou à transição epitelial para mesenquimal e aumento da invasão celular por meio da estabilização da caveolina-1 (47). Brevemente, a transição epitélio-mesenquimal no câncer é o processo em que células tumorais primárias não invasivas passam por uma mudança fenotípica com alterações de marcadores de superfície e vias de sinalização e, em seguida, apresentam características de migração e invasão, instalando o processo de metástase em diferentes órgãos e tecidos distantes do tumor de origem (48). Em células de câncer de mama triplo-negativo, a inibição da proteína ABC-A1 levou à apoptose mediado por doxorubicina, associada a desregulação da homeostase do colesterol (49).

2.1.1.2 Proteínas ABC-C1 e ABC-C2

As proteínas ABC-C1 e ABC-C2 fazem parte da subfamília ABC-C, também denominadas de família MRP (*Multidrug Resistance-associated protein*). A subfamília ABC-C é composta por treze proteínas, sendo que nove proteínas (ABC-C1 a ABC-C9) estão associadas ao fenótipo MDR em diversos tipos diferentes de tumores (50). As demais proteínas fazem parte dos receptores SURs (*sulfonylurea receptors*) e CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (51).

A primeira proteína descrita que compõe a subfamília -C foi a proteína ABC-C1, encontrada na linhagem celular NCI-H69, uma linhagem celular multirresistente derivada de câncer de pulmão de pequenas células (52). A proteína ABC-C1 é codificada pelo gene *ABCC1*

presente no cromossomo 16p13.11. É uma glicofosfoproteína composta de 1.531 aminoácidos que atua como um transportador ativo de efluxo presente na membrana plasmática (52).

Fisiologicamente, a principal ação de transporte da ABC-C1 é o efluxo da glutatona (GSH) intracelular e de seus derivados metabólitos endógenos e exógenos que contém GSH em sua estrutura. A ABC-C1 atua na resposta inflamatória através do transporte de mediadores inflamatórios, tais como: a) leucotrieno C₄ e prostaglandina E₂; b) efluxo de metabólitos gerados na fase 2 do metabolismo de fármacos (conjugados com glutatona, glicuronídeo ou com sulfatos); e c) no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (51, 53). A proteína ABC-C1 é expressa de forma ubíqua no corpo humano, está presente em maior concentração na barreira hematoencefálica; na placenta e em todas as fases do desenvolvimento do embrião (53, 54).

Em células de fibrossarcoma humano, Lorico *et al.*, (55) demonstraram que a glutatona intracelular pode atuar como um cofator na resistência mediada por ABC-C1 a oxidação de metais pesados. A atividade da proteína ABC-C1 é diretamente proporcional ao conteúdo de GSH presente nas células. Em cultura de células com fenótipo MDR, uma estratégia utilizada para reverter a quimiorresistência, além da inibição da ABC-C1 com verapamil e ciclosporina A, é ativar o efluxo de GSH, induzindo a morte celular devido ao aumento do estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (56).

O aumento na expressão proteica da ABC-C1 induz o efluxo de antraciclinas (doxorubicina e daunorubicina), alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina), e do etoposídeo, aumentando a quimiorresistência (22, 57, 58). As sondas de fluorescência (rodamina 123 e calceína, por exemplo) também são considerados substratos para a proteína ABC-C1 (56).

A proteína ABC-C2 ou MRP2 foi o segundo membro descrito pertencente subfamília ABC-C. O gene *ABCC2* presente no cromossomo 10q24, possui 32 exons, e codifica uma glicoproteína de membrana integral com aproximadamente 190 kD. Estruturalmente, a proteína ABC-C2 apresenta três domínios TMDs e dois domínios NDBs. É expressa majoritariamente na membrana canalicular das células hepáticas, nos rins, intestino, pulmão, placenta e na barreira hematoencefálica (59, 60).

A proteína ABC-C2 é necessária na proteção celular, sendo responsável pelo transporte de conjugados aniônicos endógenos e exógenos na excreção renal. Além disso, é responsável pela secreção de sais biliares conjugados na bile (61). Semelhantemente à ABC-C1, a hiperexpressão de ABC-C2 está envolvida no fenótipo MDR em células tumorais; ambas compartilham os mesmos substratos quimioterápicos (62).

2.1.1.3 Proteína ABC-D4

A proteína ABC-D4, é codificada pelo gene *ABCD4*, presente no cromossomo 14q24.3 e pertence à subfamília ABC-D. Quando descrita, a proteína ABC-D4 foi considerada uma proteína peroxissomal devido à elevada similaridade estrutural com as proteínas ABC-D1, ABC-D2, ABC-D3 localizadas nos peroxissomos (63, 64). Essas proteínas, respectivamente, estão envolvidas no transporte de ácidos graxos de cadeia longa e muito longa, dos derivados da ação da coenzima A (CoA), e no transporte de acil-CoA de cadeia ramificada. Na membrana dos peroxissomos, as proteínas ABC-D1, ABC-D2 e ABC-D3 se dimerizam para formar um transportador ativo, uma vez que são denominadas de “meios-transportadores ABCs” (65).

A proteína ABC-D4 está presente na membrana dos lisossomos, colocalizada entre as proteínas LAMP1 (*Lysosomal-associated membrane protein 1*) e LMBD1, também pode ser encontrada em menor concentração no retículo endoplasmático (66). É considerada um meio-transportador homodimérico expresso de forma ubíqua, contendo 2, 9 e 6 hélices transmembranas com extensões citosólicas. Na ligação da ABC-D4 com a molécula de ATP, o domínio transmembranar fica aberto ao lisossomo e os domínios de ligação ao nucleotídeo formam dímeros de cabeça-a-cauda com duas moléculas de ATP na interface do dímero. O domínio transmembranar forma uma cavidade, delimitada por resíduos hidrofóbicos na entrada, e é fechada no limite do citosol (66).

Até hoje pouco se sabe sobre a função fisiológica da proteína ABC-D4. No entanto, mutações no gene *ABCD4* estão associadas a defeitos hereditários no metabolismo da cobalamina (vitamina B12) intracelular nos lisossomos e ao desenvolvimento de anemia megaloblástica, sugerindo que ela possa estar envolvida no transporte de cobalamina (67–69). Entretanto, não foi demonstrado de forma direta que a cobalamina é um substrato para a ABC-D4. É possível que a proteína ABC-D4 seja uma proteína reguladora necessária para a função da proteína LMBD1, realizando o transporte de cobalamina. Alternativamente, a proteína LMBD1 pode ser uma proteína acessória, necessária para o tráfego lisossomal de cobalamina via ABC-D4 (70).

Por meio de análises de imunoprecipitação e microscopia confocal em células de hepatoma humano, em células renais embrionárias, e células de ovário de hamster chinês, Kawaguchi *et al.*, (71) demonstraram que ABC-D4 estava presente em lisossomos e no retículo endoplasmático, e que interagiu diretamente com a proteína LMBD1; ABC-D4 foi localizada nos lisossomos de maneira dependente da capacidade de direcionamento de LMBD1 lisossomal. Além disso, o *knockout* do gene *LMBRD1* perturbou a localização de ABC-D4 nos

lisossomas, mas não no retículo endoplasmático (ER). A translocação de ABC-D4 do retículo endoplasmático para os lisossomos requer, pelo menos em parte, interação com a LMBD1 (66, 71).

2.1.1.4 Proteínas ABC-G1 e ABC-G2

A proteína ABC-G1 foi a primeira proteína da subfamília ABC-G a ser descrita, seguido pela descrição da proteína ABC-G2. A subfamília ABC-G possui cinco membros: ABC-G1, ABC-G2, ABC-G4, ABC-G5 e ABC-G8. Estruturalmente, os membros ABC-Gs apresentam um único domínio ABC na região N-terminal, seguida por seis domínios transmembranar; para se tornarem funcionalmente ativos, é necessário que ocorra a homo e/ou heterodimerização. As proteínas ABC-G1, ABC-G4, ABC-G5 e ABC-G8 são transportadores ligados ao efluxo de colesterol, de fosfolípidos e de lipídios (36, 72).

A proteína ABC-G1 é um regulador do colesterol e do transporte de fosfolipídios, principalmente em macrófagos. A região promotora do gene *ABCG1*, localizado no cromossomo 21q22.3, contém elementos de silenciamento que podem mediar a repressão transcricional funcional; apresenta locais de ligação ao fator de transcrição SP1, ao NF- κ B (factor nuclear-kappa B), ao elemento de resposta a esterol (ERE) e locais de ligação dos receptores nucleares LXR (*Liver X Receptor*) e RXR (*Retinoid X Receptor*). Essas regiões são consideradas responsivas ao hidroxicolesterol e ao ácido retinóico (73).

A proteína ABC-G2, também denominada de BCRP (*Breast cancer resistance protein*), é codificada pelo gene *ABCG2*, no cromossomo 4q22.1. A região promotora do gene *ABCG2* não possui elemento de resposta ao esterol. Diferente dos demais membros da subfamília ABC-G, a proteína ABC-G2 não é um transportador de lipídios e/ou colesterol (36, 72). Entretanto, há regiões de elementos reguladores positivos e negativos da transcrição gênica associados ao transporte de xenobióticos. A proteína ABC-G2 está ancorada na membrana plasmática. Fisiologicamente, é uma proteína transportadora de alta capacidade para a excreção de ácido úrico no rim, fígado e no intestino (74).

A proteína ABC-G2 foi descrita em 1998 por Doyle *et al.*, na linhagem celular MCF-7 de câncer de mama multirresistente a mitoxantrona, doxorubicina e daunorrubicina (75). Em meados de 2011, Qin *et al.*, (76) relataram que a quimiorresistência à doxorubicina, observada em células de linfoma primário de efusão, era devido ao aumento da expressão de ABC-G2 na membrana celular, induzida positivamente pelo receptor CD147 (também conhecido como EMMPRIN (*Extracellular Matrix Metalloproteinase-Indutor*)) – uma glicoproteína

transmembranar membro da superfamília de receptores de imunoglobulinas – havendo co-interação entre ambos e, como consequência, inibição da apoptose celular (76).

O domínio transmembranar do receptor CD147 interage com a proteína ABC-G2, auxiliando no processo de dimerização e na translocação da ABC-G2 do citoplasma para a membrana celular via PI3K /AKT/mTOR, e confere resistência ao metotrexato (76–79). Além disso, foi demonstrado aumento da expressão de ABC-G2 e CD147 em “*side population*” em uma linhagem celular de carcinoma de células escamosas oral, resistentes ao 5-fluorouracil (80). Ademais, em várias linhagens de células tumorais multirresistentes foi observado que o aumento da expressão da proteína ABC-G2 é regulado positivamente através da ativação da via de sinalização *Sonic Hedgehog* e da via Wnt/ β -catenina (79, 81–85). A via de sinalização *Sonic Hedgehog* será descrita posteriormente, no item oxisteróis.

2.1.2 Proteína LRP

A proteína LRP (*Lung resistance-related protein*) foi descrita em células de câncer de pulmão multirresistente negativas para ABC-B1 (86). A proteína LRP é localizada no citoplasma celular, podendo ser encontrada em menor quantidade nos poros do núcleo e no nucleoplasma. A LRP medeia o efluxo de moléculas quimioterápicas e de xenobióticos por meio de vesículas citoplasmáticas ou de bombas (86). A proteína LRP possui aproximadamente 110 kD e é codificada pelo gene *MVP*, presente no cromossomo 16p11.2. A região promotora do gene *MVP* possui um sítio de ligação para a proteína p53 e para o fator de transcrição SP1 (87).

A proteína LRP é a maior proteína pertencente às *vaults*, que são ribonucleoproteínas com estruturas semelhantes a um “barril oco”, com dimensões de aproximadamente 57 e 32 nM e massa nuclear de 13 KDa. A LRP é também denominada de MVP (*major vault protein*). Fazem parte dessa família: um pequeno RNA (VTRNA1-1) e duas proteínas menores, PARP4 (*Poly (ADP-Ribose) Polymerase Family Member 4*) e TEP1 (*Telomerase Associated Protein 1*) (88).

O agrupamento de 78 cópias da proteína LRP dá origem ao compartimento denominado de *vault*, uma organela citoplasmática com o interior oco. No interior da organela encontram-se as proteínas PARP4 e TEP1 (88).

A expressão da LRP é variável de acordo com o tecido e função celular. Em condições fisiológicas, a LRP é elevada no revestimento epitelial dos bronquíolos e do trato digestivo superior e inferior, túbulos proximais renais, queratinócitos e melanócitos epidérmicos, macrófagos e córtex adrenal. No entanto, em tecidos tumorais quimiossensíveis a expressão de

LRP é cerca de 5 a 8 vezes inferior quando comparado a tecidos tumorais quimiorresistentes (86).

A proteína LRP interage com proteínas oncológicas, com o receptor de estrogênio, bem como vias envolvidas na proliferação, invasão, migração e resistência celular como a via PI3K / AKT / MAPK / ERK, via mTOR/S6K1, vias de sinalização *Notch* e a via *Sonic hedgehog* (32).

2.2 Oxisteróis

2.2.1 Origem e formação dos oxisteróis

Os oxisteróis são esteróis derivados da oxidação da molécula de colesterol. O colesterol ($C_{27}H_{46}O$) é um dos principais constituintes das biomembranas. Está envolvido em processos fisiológicos de sinalização, proliferação, morte celular e no fenótipo MDR (10, 18). O colesterol possui uma estrutura tetracíclica hidrofóbica, um núcleo de esterol contendo um grupo β -hidroxila na posição 3 e uma cadeia lateral iso-octila ramificada. Devido à sua alta distribuição corporal e sua estrutura tridimensional, a molécula de colesterol pode ser oxidada a oxisteróis por espécies reativas de oxigênio e radicais livres (através da reação não enzimática), ou por biotransformação devido à ação de enzimas (formação enzimática), tais como: oxidoreductase, hidrolases e reductases (89, 90).

Os oxisteróis apresentam em sua estrutura um ou mais átomos de oxigênio ligados à estrutura anelar ou à cadeia lateral, podendo ser um álcool, uma cetona, um epóxido, um carboxil, ou um grupamento hidroxiperoxi. Estruturalmente, esses compostos apresentam alguma similaridade; entretanto, suas funções fisio e patológicas são distintas (91–93).

Em humanos, os oxisteróis são intermediários na via de formação de ácidos biliares, através da oxidação do colesterol e da biossíntese de hormônios esteroides, bem como são produtos de auto oxidação do colesterol presente nos tecidos e membranas celulares, especialmente sob condições de estresse oxidativo (91–93).

A manutenção e homeostase dos oxisteróis ocorre por meio da dieta e pela oxidação do colesterol através de ação enzimática ou não-enzimática. Por meio da ação enzimática, o processo de formação de oxisteróis ocorre através da ação da família de proteínas pertencentes ao citocromo P450 (CYP450), as quais oxidam o colesterol endógeno, acrescentando oxigênio a sua estrutura, com subsequente formação de oxisteróis. Os oxisteróis provenientes da dieta são absorvidos no trato gastrointestinal na forma de ésteres e transportados no plasma pelas lipoproteínas, principalmente pela LDL (89).

Os 3 principais tipos de oxisteróis endógenos derivados da ação enzimática são o 4 β -hidroxicolesterol (4 β -OHC), que pode ser usado como um marcador endógeno da atividade das enzimas CYP3A4 e CYP3A5; o 7 α -hidroxicolesterol (7 α -OHC), um intermediário na biossíntese de ácidos biliares, metabolizado pela 7 α -hidroxilase (CYP7A1), uma enzima hepática; e os oxisteróis derivados da modificação na cadeia lateral do colesterol (92).

Dentre os principais oxisteróis de cadeia lateral encontrados no corpo humano temos o 25-hidroxicolesterol, que é um subproduto da enzima esterol 27-hidroxilase (CYP27A1), sendo este sintetizado por uma hidroxilase específica, a enzima colesterol 25-hidroxilase (CH25H). A enzima CH25H utiliza o oxigênio como cofator para a reação de hidroxilação; essa enzima não pertence à família das proteínas CYP450. A esterol-27-hidroxilase mitocondrial (CYP27A1) é expressa em vários tecidos, principalmente no fígado e em macrófagos. Essa enzima catalisa o primeiro passo na via alternativa para a síntese do ácido biliar, produzindo o 27-hidroxicolesterol (27-OHC), o principal oxisterol encontrado na circulação sanguínea em humanos. A hidroxilase do colesterol CYP46 está localizada no retículo endoplasmático, particularmente em células neurais, e produz 24(S)-hidroxicolesterol (24-OHC), também conhecido como cerebrosterol. O 22(R)-hidroxicolesterol é produzido pela ação da CYP11A1 durante o primeiro passo da conversão do colesterol em pregnenolona, um precursor da produção de hormônio esteroide (90, 94).

A oxidação não enzimática ocorre nas insaturações presentes no anel B do colesterol, nas posições alílicas e nos carbonos terciários da cadeia lateral. Essas posições são susceptíveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio, radicais livres, metais de transição, bem como do oxigênio atômico, do ozônio e o cloro molecular, devido ao menor efeito estérico na molécula (95). Os principais oxisteróis originados pela ação não enzimática são: 7-cetocolesterol (7-KC), 7 α -hidroxicolesterol, 7 β -hidroxicolesterol, 5 α ,6 α epoxicolesterol, 5 β ,6 β -epoxicolesterol, colestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (Triol), 3 β ,5 α -dihidroxi-colestane-6-ona, 20 α -hidroxicolesterol, 3 β -hidroxi-5 α -colestane-6-ona (93, 96).

Devido à presença de grupamentos polares na estrutura molecular, os oxisteróis apresentam menor hidrofobia e maiores propriedades anfipáticas, difundindo-se bem através da bicamada lipídica das biomembranas. A taxa de difusão é dependente da concentração. Um determinado percentual de oxisteróis endógenos e exógenos residem na membrana plasmática em microdomínios de membrana (ou *lipids rafts*) ricos em colesterol, esfingomielina, fosfatidilcolina e proteínas (97).

O interesse em estudar a ação dos oxisteróis em diferentes tipos de células vem das descobertas, *in vitro* e *in vivo*, da ação biológica no desenvolvimento de algumas doenças, como

aterosclerose, doenças neurodegenerativas e em alguns tipos de câncer. Atualmente, sabe-se que os oxisteróis desempenham um papel importante na modulação da expressão gênica de fatores de transcrição que atuam na homeostase lipídica; transporte reverso de colesterol; proliferação celular em vias de sinalização relacionadas à morte apoptótica, autofagia e aumento de espécies reativas de oxigênio (11, 98–101).

Oxisteróis, predominantemente o 7-KC, exercem efeitos na indução de morte celular apoptótica. A indução da apoptose por oxisteróis ocorre através de duas vias: a via dependente do receptor de morte, também denominada de via extrínseca; ou a via mitocondrial, denominada de via intrínseca. Os oxisteróis podem induzir a apoptose por ambas as vias, no entanto, a extrínseca é mais limitada (13, 90, 98, 100, 101).

As vias de sinalização celular induzida por oxisteróis envolvem vários fatores de transcrição, dentre os quais, encontram-se o SREBP (*sterol regulatory element-binding proteins*), NF-κB, receptores *Toll like*, Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), LXRs, RXR, PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*), ROR (*retinoic acid receptor-related orphan receptor*), receptores de estrogênio, e a via SHh (97, 102). Aqui serão descritas apenas as vias relacionadas às células-tronco mesenquimais: LXR e SHh

2.2.2 Oxisteróis e vias de sinalização intracelular

2.2.2.1 Receptores nucleares LXR

Os receptores LXR (*Liver X Receptors*) foram descritos em meados da década de 1990 como heterodímeros dos receptores RXR (*Retinoid X Receptors*). A princípio, os receptores LXR foram considerados como receptores órfãos, pois não havia ligantes endógenos e exógenos descritos. Entretanto, foram realocados para a classe de receptores nucleares com a descoberta de que o 22(R)-hidroxicolesterol, o 24(S)-hidroxicolesterol e o 24(S),25-epoxicolesterol são ligantes dos receptores LXR *in vivo*. Brevemente, os receptores nucleares são compostos por 48 receptores, os quais possuem homologia em domínios estruturais e função. Eles são conhecidos como fatores de transcrição induzíveis por ligantes lipofílicos. Os receptores nucleares apresentam 5 domínios: uma região N-terminal variável, uma região de ligação ao DNA, uma região variável, um domínio de ligação ao ligante e uma região C-terminal variável (103). As funções biológicas de ativação, síntese e tráfego de lipídios intra e extracelular de receptores nucleares são reguladas pelo colesterol, oxisteróis, esfingolipídios, fosfolipídios, fosfatidilcolina, glicocorticoides, ácidos graxos, ácido retinóico e vitamina D, entre outros ligantes (97, 103).

Atualmente, sabe-se que existem duas isoformas de LXR: LXR- α e LXR- β (codificadas pelos genes *Nr1h3* e *Nr1h2*, respectivamente), com homologia estrutural de aproximadamente 77% (104). O LXR- α induzível é altamente expresso em tecidos metabolicamente ativos, como: fígado, glândula adrenal, intestino, tecido adiposo, macrófagos, pulmão e rim, enquanto o LXR- β é expresso em todos os tipos de tecido ou células, sendo considerado ubíquo (105).

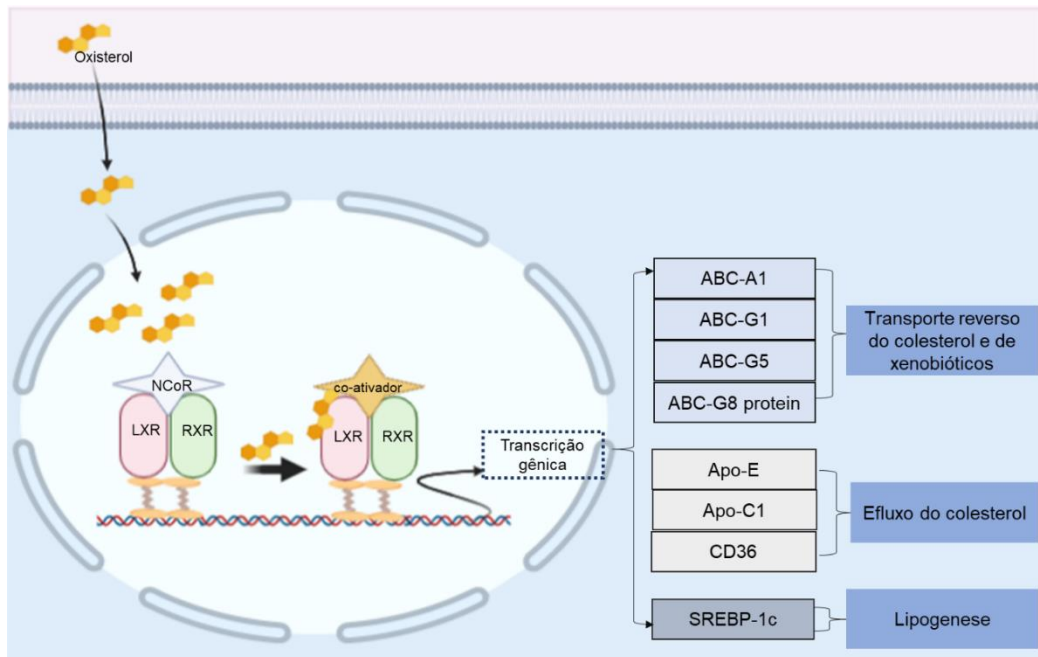
A análise da relação estrutura-atividade entre a ligação de uma molécula de oxisterol e os receptores LXRs, demonstrou que a presença do grupo hidroxila na cadeia lateral do oxisterol é necessária para a ligação e ativação de alta afinidade dos receptores LXR, independente da isoforma. Porém, a introdução de um átomo de oxigênio no anel B da molécula de esterol resulta em um ligante com seletividade a isoforma LXR- α (106).

No núcleo, os receptores LXR permanecem heterodimerizados com os receptores RXR. O complexo LXR-RXR está ligado ao elemento responsivo LXR (LXRE) no DNA, uma região de repetição direta 4 (DR4), reconhecida como a sequência de consenso (5'-AGGTCA-NNNN-AGGTCA-3') (104).

Na forma inativada, o complexo LXR-RXR está associado a corepressores (complexos contendo NCoR ou SMRT) que suprimem a expressão genética. Entretanto, a ligação de oxisteróis ao complexo LXR-RXR gera uma cascata de sinalização, com recrutamento de coativadores como o P300, CBP (*Cre-element binding protein*) e SRC-1 (*steroid receptor coactivator 1*), resultando na transcrição gênica de proteínas e fatores associados à regulação do metabolismo lipídico, incluindo colesterol, e de proteínas ABCs (90, 107).

Além disso, os oxisteróis controlam a absorção do colesterol (via LXR-RXR) por meio do aumento da expressão de proteínas ABC), principalmente da subfamília ABC-A (A1) e ABC-G (G1, G5 e G8). Os receptores LXRs podem modificar a transcrição de genes-alvo que participam da sobrevivência, metabolismo e migração de células tumorais (108–112), figura 2.

Figura 2. Ativação da via de sinalização LXR por oxisteróis.



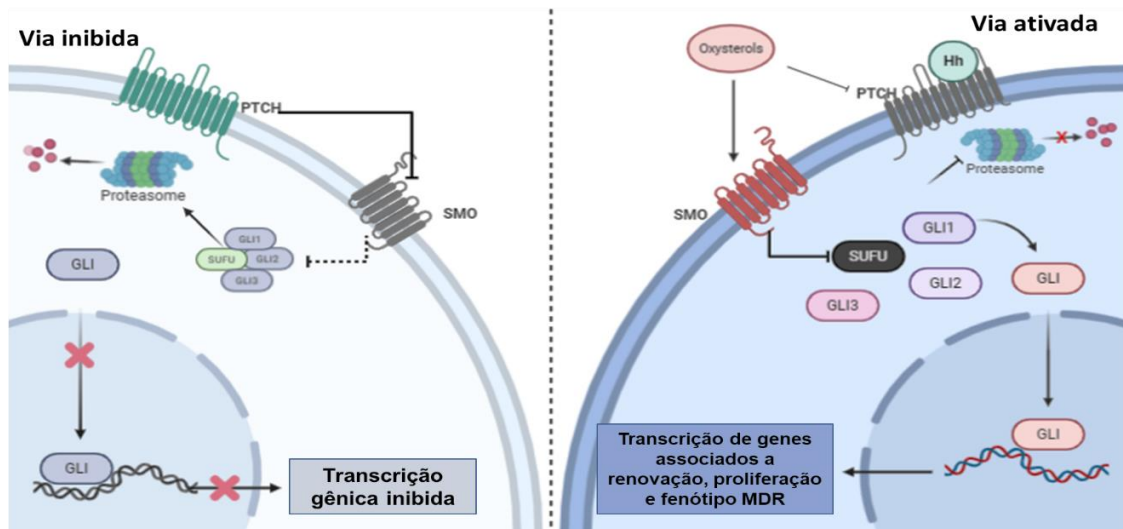
Fonte: A autora.

2.2.2.2 Via de sinalização *Hedgehog*

A via de sinalização *Hedgehog* (Hh) é responsável pela organização, desenvolvimento, proliferação e diferenciação celular no período embrionário. Os homólogos de mamíferos de Hh incluem três proteínas: *Sonic Hedgehog* (SHh), *Indian Hedgehog* (IHh) e *Desert Hedgehog* (DHh). A sinalização de SHh permanece quiescente em tecidos de mamíferos adultos. No entanto, em vários tecidos adultos, a sinalização SHh se torna ativa durante a diferenciação, proliferação e manutenção de células-tronco (113).

Em humanos, a sinalização de SHh depende do cílio primário, uma organela que forma microtúbulos projetando-se para fora da membrana plasmática. Os componentes da via de SHh se movem e se acumulam no cílio em diferentes estágios durante a sinalização (114, 115). A sinalização de SHh inicia quando o ligante SHh une-se ao receptor *Patched1* (Ptch1), inibindo-o. Quando a via está inativa, Ptch1 suprime a expressão de *Smoothed* (SMO). Quando Ptch1 é inibido, ocorre a ativação do receptor SMO. Em seguida, uma cascata de sinalização inicia, com o recrutamento e ativação da família de fatores de transcrição do oncogene associado ao glioma (GLI). O complexo proteico *Sufu* é um dos principais inibidores da via do SHh, que se liga às proteínas Gli1, Gli2, Gli3, inativando-as nos proteossomas. O SMO ativo inibe o processamento das proteínas Glis, que migram para o núcleo e atuam como fatores de transcrição das proteínas ABC-A1, ABC-G1 e ABC-G2 (83, 100, 114,115), figura 3.

Figura 3. Via de sinalização *Sonic Hedgehog* ativada por oxisteróis.



Fonte: A autora.

A proteína SMO, um receptor acoplado à proteína G (GPCR) da classe *Frizzled* (classe F), contém dois locais distintos de ligação ao ligante: domínio transmembranar (TMD) e domínio rico em cisteína (CRD). Ambos são separados por domínio de ligação intermediário, o que estabiliza o estado inativo do SMO e o mantém na membrana plasmática (116).

Além disso, a inativação de Ptch1 por SHh permite que esteróis/oxisteróis atuem diretamente o receptor SMO. Em células humanas, os oxisteróis 24(S), 25-epoxicolesterol são ligantes endógenos de Ptch1, que podem estimular a via de sinalização *Hedgehog* e ativá-la via SMO (117,118). O domínio CRD extracelular do receptor SMO é o local de ação para o colesterol e oxisteróis, incluindo: 20(S)-hidroxicolesterol, 7-ceto-25-hidroxicolesterol e 7-ceto-27-hidroxicolesterol, ativarem a via de sinalização SMO (116). A ativação de SMO por oxisteróis pode ser independente da modulação por ciclopamina e da regulação mediada por Ptch1 na via de SHh (119,120). A via de sinalização SHh e SMO estão associados às vias Wnt/ β -catenina e RUNX relacionados a diferenciação e proliferação celular (121, 122).

2.3 Células-tronco

As células-tronco são células indiferenciadas e apresentam a capacidade de autorrenovação. Elas podem se diferenciar em diversas células que compõem os tecidos, desde os tecidos mais simples aos mais complexos. As células-tronco são classificadas de acordo com o grau de plasticidade celular. Dessa forma, encontra-se descrito na literatura, tipos distintos de células-tronco: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e as unipotentes, sendo que, cada

classe de células-tronco apresenta diferentes graus quanto ao seu potencial de diferenciação celular (123, 124).

As células-tronco totipotentes são oriundas do embrião, após as primeiras 72 horas de fecundação. São células que apresentam maior poder de plasticidade, ou seja, podem originar células do folheto embrionário e extraembrionário, que formam a placenta e os anexos embrionários, responsáveis pelo suporte e manutenção da vida para o desenvolvimento do embrião (125).

As células-tronco pluripotentes são encontradas na fase do desenvolvimento do embrião denominada blastocisto, no período aproximado de sete a doze dias após a fecundação. As células-tronco pluripotentes, através de determinados estímulos, diferenciam-se dando origem às células dos folhetos germinativos; o endoderma, o mesoderma e o ectoderma (126).

As células-tronco multipotentes apresentam capacidade de diferenciação limitada, podendo dar origem a vários tipos de células dentro de uma determinada linhagem. Essas células encontram-se no indivíduo adulto e atuam na homeostase tecidual em que se encontram, através do desenvolvimento de novas células, do reparo e proteção do ambiente tecidual (127, 128).

Quanto à origem das células-tronco, elas podem ser divididas em células-tronco embrionárias (CTE) e células-tronco adultas (CTA). As células-tronco embrionárias são derivadas do blastocisto, como descrito anteriormente. A capacidade de pluripotência dessas células está na expressão dos genes *OCT-3/4*, *Nanog* e *SOX-2*. Esses genes, impedem a diferenciação celular, mantendo as células-tronco em estágio G_0 do ciclo celular, bem como auxiliam na autorrenovação celular e no estado de pluripotência, tanto *in vivo* quanto em *in vitro* (129, 130).

As células-tronco adultas são células multipotentes. São encontradas no organismo após o desenvolvimento embrionário. Encontram-se presentes no cordão umbilical, na medula óssea, no tecido adiposo, dentre outros. As populações de células-tronco adultas estão presentes nos tecidos a fim de manter a regeneração celular e tecidual como, por exemplo, a célula-tronco hematopoiética (CTH), que possui a capacidade de autorrenovação e, além disso, pode se diferenciar em progenitores de linhagem tardia ou permanecer quiescentes. Essas células repõem todas as linhagens celulares sanguíneas por períodos ilimitados. As CTHs existem ao lado de vários tipos de células no microambiente da medula óssea ou “nicho” medular (131, 132).

As CTHs originam as linhagens mieloide e linfoide. A diferenciação inicial da linhagem mieloide ocorre com a formação do monoblasto, proeritroblasto, megarioblasto e o

mieloblasto; a linfoide, com a diferenciação em linfoblasto. Em condições fisiológicas, essas células jovens, denominadas genericamente de blastos, estão presentes apenas na medula óssea (133–135).

Considera-se que várias células do estroma formam o microambiente de suporte da medula óssea em que as CTHs podem crescer, sofrer diferenciação, maturação ou permanecer quiescentes. As células que formam o nicho da célula-tronco na medula óssea incluem células-troncos mesenquimais (CTMs), adipócitos, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos teciduais e osteoclastos. Essas células são derivadas de CTMs ou de CTHs (136, 137).

As CTMs são células multipotentes adultas semelhantes a fibroblastos, envolvidas na manutenção do microambiente e, portanto, na homeostase tecidual. As células-tronco mesenquimais podem ser derivadas da medula óssea, sangue do cordão umbilical, placenta ou tecido adiposo, entre outras fontes. Na medula óssea, as CTMs estão envolvidas na formação e organização da estrutura do microambiente hematopoiético (129, 130).

2.3.1 Células-tronco mesenquimais (CTM)

As células-tronco mesenquimais encontram-se no topo da hierarquia dos elementos estromais da medula óssea. Foram descobertas por Friedenstein *et al.*, (1970) e desde então, vêm ganhando destaque por sua capacidade de autorrenovação, diferenciação e plasticidade celular, bem como por manter e auxiliar as CTHs no progresso de hemopoiese de forma direta e indireta (138).

A definição e a caracterização de uma CTM deve atender aos critérios mínimos definidos pelo *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* e proposto pelo *International Society for Cellular Therapy*, no qual estabelece que em meios de cultivo celular, as CTMs devem ser obrigatoriamente aderentes ao plástico; devem expressar os marcadores CD73, CD90 e CD105; carecer na expressão dos marcadores CD11b, CD14, CD34, CD45, CD79a e antígenos da superfície celular relacionados ao antígeno leucocitário humano (HLA-DR), bem como possuir a capacidade de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* e expressar os genes de indiferenciação celular, *OCT-3/4*, *SOX-2* e *Nanog* (139).

No entanto, algumas populações de CTMs provenientes da medula óssea humana, são capazes de expressar as moléculas de superfície: Stro1, 3G5, CD51, CD146, CD271, o antígeno SSEA-4 (*Stage-specific embryonic antigen-4*), PDGFRa (*platelet-derived growth factor receptor A*), SCF (*stem cell factor*), Nestin e TWIST. Esses marcadores podem definir

populações distintas de CTMs, e, portanto, uma sobreposição fenotípica e funcional também pode ocorrer (140, 141).

Todavia, é importante ressaltar que os procedimentos relacionados ao isolamento celular, as condições de cultura, tanto quanto o meio de cultivo utilizado *in vitro*, influenciam na expressão de marcadores de superfície das CTMs. Além disso, há diferença de expressão dos marcadores de superfície e de plasticidade celular, relacionados à idade, ao sexo do indivíduo, bem como ao órgão de origem da CTM: células derivadas de tecido adulto, cordão umbilical, tecido adiposo e medula óssea, por exemplo (128, 142–144).

Devido a sua propriedade de inibir a proliferação e a ação citotóxica de células do sistema imunológico, as CTMs têm sido empregadas no tratamento de várias doenças, incluindo a doença do enxerto versus hospedeiro na sua forma aguda e na medicina regenerativa (141,145). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado a influência das CTMs no desenvolvimento de síndromes mielodisplásicas, principalmente na leucemia mieloide aguda (LMA), em que as CTMs alteradas fisiologicamente, mantendo um microambiente medular favorável ao desenvolvimento dessas doenças (146).

2.4 Leucemias

As leucemias compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas malignas clonais, caracterizadas por excessiva proliferação, sobrevivência e diferenciação anormal de células hematopoiéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfoides, decorrentes de uma mutação em uma única célula-tronco (147). Dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam que no ano de 2020 no Brasil, 10.810 casos de leucemias foram diagnosticados, dentre os quais, 5.920 casos em homens e 4.890 casos em mulheres. Sendo que no ano de 2018, a taxa de mortalidade para indivíduos portadores de leucemia mieloide ou linfóide foi de 0,41 %, correspondendo a 7.218 das mortes registradas no Sistema de Informação sobre Mortalidade.

De maneira geral, as leucemias são classificadas em agudas e crônicas, de acordo com a contagem de células blásticas presentes no sangue periférico e/ou na medula óssea. De acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016), considera-se leucemia aguda quando a contagem de células blásticas no sangue periférico for superior a 20 % na contagem relativa diferencial de 200 leucócitos, e leucemia crônica quando a contagem de blastos for igual ou inferior a 20 % dos leucócitos. Entretanto, as leucemias apresentam características clínico-laboratoriais distintas, com tratamentos específicos, uma vez que são provenientes de alterações em células progenitoras de linhagens celulares diferentes ou ambas (147).

Mudanças genéticas e/ou epigenéticas na linhagem linfóide dá origem a leucemia linfocítica crônica (LLC), sendo caracterizada pela expansão clonal das células B CD5 (+) CD23 (+) no sangue periférico, medula óssea e no tecido linfóide. A LLC é considerada a leucemia crônica mais frequente em adultos. Contudo, a leucemia linfóide aguda (LLA) ou leucemia linfoblástica é constante em crianças, porém pode ocorrer em adultos. A LLA pode ser resultante de alterações genéticas nas células B e/ou T ou da agudização da leucemia mieloide crônica (LMC) (148, 149).

A LMC é uma expansão clonal de uma célula progenitora hematopoiética pluripotente, traduzindo-se por hiperplasia mieloide com maturação celular. A doença é associada a uma anormalidade citogenética específica, o cromossomo *Philadelphia* (Ph), que resulta de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 $t(9;22)$. Em decorrência dessa translocação, ocorre a formação do oncogene, denominado *BCR-ABL*, que transcreve a proteína tirosina quinase BCR-ABL (150). O cromossomo *Philadelphia* pode estar presente na LLC, LLA e na LMA (151). A LMC é marcada por três fases clínicas: a fase crônica (LMC-FC), a fase acelerada (LMC-FA) e a fase blástica (LMC-FB). Sem intervenção terapêutica, a doença segue uma progressão natural de LMC-FC relativamente benigna, através de LMC-FA, até a fase terminal LMC-FB. Na fase blástica da LMC, os blastos podem ser de linhagem linfóide, iniciando uma LLA, de linhagem mieloide, com progressão para leucemia mieloide aguda, sendo essa a mais frequente; ou ambas, caracterizando uma LMC-FB bi fenotípica (152).

2.4.1 Leucemia mieloide aguda (LMA)

A leucemia mieloide aguda é uma forma de leucemia que compromete a diferenciação, maturação e a função de células da linhagem mieloide, com aumento de mieloblasto na medula óssea e no sangue periférico. A LMA representa cerca de 80 % das leucemias agudas em adultos (153).

A LMA faz parte das síndromes mielodisplásicas — neoplasias hematológicas — que afetam principalmente os idosos. A etiologia da LMA ainda é desconhecida, no entanto cerca de 30 % a 45 % dos pacientes com mielodisplasia acabam progredindo para leucemia mieloide aguda (154). Acredita-se que mutações genéticas transformam uma célula-tronco em uma célula-tronco neoplásica ou leucêmica, com aumento na capacidade de renovação. Dentre as principais mutações descritas, alterações nos genes *FLT3*, *NMP1* e *cEPBA* são as mais frequentes. Esses genes, quando alterados, atuam na proliferação celular exacerbada e impedem a maturação celular, portanto, devem ser avaliados durante o diagnóstico da LMA, juntamente com a expressão do gene *MDR1* (155).

O tratamento quimioterápico na LMA é realizado através da associação de um fármaco citotóxico, da classe das antraciclinas, a daunorrubicina; e um fármaco citostático, a citarabina. Esta combinação é eficaz para se obter a remissão da doença (156-158).

Além disso, dependendo das condições e do avanço da LMA, podem ser utilizados outros fármacos como etoposídeo, tioguanina ou amsacrina, a fim de reduzir o número de células blásticas no sangue periférico e na medula óssea (154). Mesmo com o tratamento quimioterápico, cerca de dois terços dos pacientes com LMA com menos de 60 anos recaem após quimioterapia de indução bem-sucedida, com uma taxa ainda maior em pacientes idosos. Os pacientes apresentam recidivas, devido à falha e/ou a resistência aos fármacos, bem como por alterações na célula-tronco hematopoiética e no microambiente medular (146, 159).

As fases de iniciação, de propagação, progressão e resistência a medicamentos na LMA são definidas por eventos específicos relevantes entre a comunicação da célula leucêmica e as células estromais do microambiente medular, tal como as CTMs. Alterações estruturais, epigenéticas, e alterações quali e quantitativas dos componentes estromais da medula óssea, encontram-se presentes em indivíduos com LMA (160).

2.5. CTM e LMA

As alterações nas células-tronco mesenquimais propiciam um ambiente permissivo ao desenvolvimento e progressão da LMA, em que é observado alteração no sistema imunológico, interações anormais entre células, descontrole do ciclo celular e na produção de fatores de crescimento celular (161, 162).

A plasticidade de células-tronco mesenquimais de pacientes com síndrome mielodisplásica encontram-se alteradas, quanto a capacidade de diferenciação neurogênica, adipogênica e ao suporte da hematopoiese *in vitro*. Estes resultados são consistentes com a hipótese de que quando alterações estão presentes no ambiente do estroma mielodisplásico juntamente com alterações intrínsecas em um clone de células-tronco hematopoiéticas, ambos os fatores podem contribuir igualmente para a hematopoiese anormal (163).

Células-tronco mesenquimais oriundas de pacientes com síndrome mielodisplásica apresentaram diminuição da expressão de moléculas de adesão e nas integrinas CD44 e CD49e. Essas moléculas são necessárias para que ocorra interação entre a CTH e CTM na medula óssea saudável (164). A molécula CD44 liga as proteínas de matriz extracelular hialuronana, osteopontina e E-selectina, sendo fundamental para direcionar as células de LMA para o nicho leucêmico. Além disso, a molécula CD44 foi associada à capacidade de repovoamento de

células leucêmicas humanas em modelos de xenoenxerto murino, na quimiorresistência e recidiva da doença na LMA (161).

Em um estudo coorte realizado por Diaz *et al.*, (165) as CTMs derivadas de 46 pacientes portadores de LMA foram caracterizadas, porém não foram encontradas alterações citogenéticas nessas células. No entanto, as CTMs derivadas de LMA apresentaram maior potencial clonogênico, maior imunossupressão de proliferação de linfócitos e diminuíram a secreção de citocinas pró-inflamatórias quando comparadas a CTMs de indivíduos saudáveis. Os dados obtidos pelos autores sugerem que as CTMs derivadas da medula óssea de indivíduos com LMA apresentam diferenças funcionais que contribuem para a resistência à terapia e evolução da doença.

Até a presente data, não há descrição na literatura do perfil de expressão de proteínas ABCs e LRP associadas ao fenótipo MDR em células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de pacientes com leucemia e de indivíduos saudáveis. Dessa forma, esse trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito dos oxisteróis na expressão de proteínas ABCs e LRP em CTMs derivadas de pacientes com LMA e indivíduos saudáveis.

3. MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no grupo “Lípidos, Oxidação e Biologia Celular”, no Laboratório de Histocompatibilidade e Imunidade Celular (LIM-19) do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). A execução desta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HC-FMUSP sob Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número 30797820.4.0000.0068, parecer número: 4.011.280, anexo 1.

3.1 Casuística

Para a elaboração deste trabalho foram selecionadas 10 linhagens de células-tronco mesenquimais previamente caracterizadas e identificadas de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* e proposto pelo *International Society for Cellular Therapy* (139). Essas linhagens celulares são pertencentes ao biorrepositório do Grupo de Lípidos, Oxidação e Biologia Celular do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunidade Celular (LIM-19) do InCor, HC-FMUSP.

As linhagens de CTM foram divididas em dois grupos. Cada grupo foi composto por 5 linhagens de CTM derivada de indivíduos portadores de LMA, aqui denominadas de CTM-D; e 5 linhagens derivada de indivíduos considerados clinicamente saudáveis para doenças hematológicas, aqui denominadas de CTM-S. As células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de pacientes com LMA (CTM-D) foram obtidas por procedimento cirúrgico por médico cirurgião especialista para a realização de mielograma e imunofenotipagem para diagnóstico confirmatório de LMA.

As células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de indivíduos considerados saudáveis (CTM-S), foram obtidas de doadores voluntários que realizaram cirurgia ortopédica para fins paliativos ou corretivos. Ambas as linhagens, CTM-D e CTM-S, foram obtidas de indivíduos adultos, de ambos os gêneros através de punção da crista ilíaca, do fêmur ou da tíbia. Essas células se encontram criopreservadas em passagens 1, 2 e 3 (P1, P2 e P3) em solução contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 80% de meio de cultura DMEM *LOW* em ultra freezer a -80 °C.

3.2 Cultivo e manutenção das células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais de medula óssea criopreservadas foram descongeladas por aproximadamente 60 segundos em banho-maria a 37 °C, até a formação de um “botão de

gelo” (parte da solução encontra-se congelada e parte em estado líquido). Em seguida, a solução foi transferida por gotejamento pelas laterais para um tubo plástico de fundo cônico de 15 mL, contendo 10 mL de meio *DMEM LOW Glucose* em temperatura ambiente suplementado com 20 % de soro fetal bovino (SFB) (Invitrocell, Brasil), 26,4 mM de bicarbonato de sódio (Merck); e antibióticos (100 UI/mL de penicilina (Sigma-Aldrich, USA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich)). O tubo foi centrifugado a 250 X g por 6 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a massa celular foi ressuspensa em 15 mL de meio *DMEM LOW*, suplementado com 20 % de SFB e antibióticos, e cultivadas em garrafas de cultura celular de 75 cm² em incubadora a 37 °C, com atmosfera úmida e 5 % de CO₂ (Thermo Scientific, Forma II, USA).

Após 24 horas em cultura, ocorreu a adesão das CTM viáveis ao plástico, e foi substituído o meio de cultivo, a fim de retirar as células mortas decorrentes do processo de criopreservação e descongelamento, bem como retirar resíduos de DMSO. A partir deste período, as culturas de CTM foram acompanhadas de uma a duas vezes por semana, sem troca de meio até a formação da primeira colônia de células. Transcorrido esse período, as culturas de CTMs foram acompanhadas a cada três dias, para observação do crescimento, da confluência e da morfologia celular; e a substituição completa do meio de cultivo foi realizada a cada três dias até as células obterem 80-90% de confluência.

Quando as células atingiram confluência mínima de 80-90 % foi realizada a dissociação proteolítica enzimática. Inicialmente, o meio de cultura foi removido e a garrafa foi lavada duas vezes com 5 mL de PBS (*Phosphate-buffered saline*) para a retirada do soro fetal bovino. Em seguida, foi adicionado 1,5 mL de solução contendo uma associação de tripsina e versene (ATV) (Instituto Adolfo Lutz, Brasil). A garrafa foi mantida em incubadora úmida em temperatura de 37 °C por um período de 3-5 minutos até a completa dissociação das células aderidas ao plástico. Após este procedimento, foi adicionado 1,5 mL de meio *DMEM LOW* 20 % à garrafa para inativar a tripsina com soro fetal bovino. Este procedimento, descrito anteriormente, foi realizado com duas finalidades: expandir a quantidade de células necessárias para realizar os experimentos, colocando-as em garrafas de cultura de 182 cm² e/ou em placas transparentes de 6 e de 96 poços para cultivo celular (Corning, USA), e para a realização dos experimentos. O período de cultura das CTMs desde o descongelamento, crescimento, expansão e experimento final foi em torno de 30 a 90 dias para cada linhagem celular.

Para a realização dos experimentos, a suspensão celular, contendo ATV e meio *DMEM LOW* 20%, foi centrifugada a 250 X g por 6 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a massa celular ressuspensa em 1 mL de meio *DMEM LOW* 20 %, e

contadas em câmara de *Neubauer*. A viabilidade celular foi observada através do corante *Trypan blue* (1:1). Foi estabelecido para a realização dos experimentos viabilidade celular $\geq 95\%$ e que as CTM estivessem em passagem celular entre P4–P6, sem produção intensa de grânulos.

3.3 Tratamento das células-tronco mesenquimais

Para a realização deste trabalho, foram escolhidos dois oxisteróis, o 7-cetocolesterol (7-KC: *7-ketocholesterol*) e o colestane-3 α -5 β -6 α -triol (Triol), ambos sintetizados a partir da molécula do colesterol (Sigma-Aldrich). A biossíntese dos oxisteróis foi realizada pela equipe do Prof. Dr. Alessandro Rodrigues da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema (166,167). A pureza dos oxisteróis, 7-KC e Triol foi avaliada por cromatografia em fase gasosa acoplada com espectrometria de massas, apresentando índice de 98%. Para a realização dos experimentos, foi preparado uma solução de 10.000 μM de 7-KC e de Triol, diluídos em etanol absoluto. A solução foi armazenada em freezer -20 °C por período máximo de 30 dias.

Para a realização de todos os experimentos descritos a seguir, foram utilizadas as CTMs cultivadas em meio basal como controle, e para o tratamento com os oxisteróis 7-KC e Triol, ambos foram diluídos no meio de cultivo das CTMs, *DMEN LOW 20%*.

A realização da primeira etapa dos experimentos envolve o cálculo do CI_{50} (Concentração Inibitória 50 %) de 7-KC e de Triol. Para tanto, foram utilizadas quatro concentrações: 100 μM , 50 μM , 25 μM e 10 μM de ambos os oxisteróis. As células-tronco mesenquimais de ambos os grupos (CTM-S e CTM-D) foram tripsinizadas e contadas, sendo adicionado 5×10^3 células por poço, em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (Corning) e mantidas em incubadora úmida a 37 °C por 24 horas para que ocorresse a adesão da célula ao plástico.

Após este período, foi realizado o tratamento, em duplicata, com os oxisteróis nas concentrações descritas acima por um período de 24 horas. Foi utilizado DMSO 20 % como controle positivo de morte e como controle negativo foi adicionado apenas meio de cultivo basal. Os ensaios apresentados a seguir foram realizados para avaliar a citotoxicidade nas CTMs tratadas com Triol e 7-KC.

3.3.1 Ensaios de Morte celular

3.3.1.1 Viabilidade celular – Iodeto de propídio

Após o tratamento de 24 horas com Triol e 7-KC, foi avaliado a viabilidade celular das CTMs com iodeto de propídio (PI: *Propidium iodide*) (Molecular Probes, USA). A marcação

dos núcleos das células foi realizada através da adição de 0,1 µg/mL do intercalante de DNA Hoechst 33342 (Molecular Probes,), duas horas antes da finalização do experimento. Ao término das 24 horas do tratamento com 7-KC e Triol foi acrescentado 2 µL de iodeto de propídio de uma solução de 50 µg/mL antes da leitura. O iodeto de propídio não é permeável a membrana celular íntegra, corando apenas as células não viáveis, que apresentaram ruptura da membrana plasmática. Para realizar a aquisição das imagens das células viáveis e não viáveis foi utilizado o sistema *ImageXpress Micro High Content Screening System* (Molecular Devices, USA). Para tanto, foram selecionados cinco sítios por poço e dois poços por tratamento. Foi usado o programa *Cell Scoring MetaXpress* (versão 5, Molecular Devices) para analisar o número de células e a viabilidade celular. Os cálculos de CI_{50} dos oxisteróis 7-KC e Triol foram realizados utilizando a porcentagem de células positivas para PI através de uma curva de ajuste de inclinação variável no programa estatístico GraphPad Prism (GradPad Software versão 8.0, USA).

3.3.1.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($P\Psi m$) por TMRE

As CTM foram plaqueadas 5×10^3 células/poço em duplicata e tratadas com os oxisteróis 7-KC e Triol por 24 horas, nas concentrações 100 µM, 50 µM, 25 µM e 10 µM. Ao final do período de tratamento, as células foram incubadas com 0,1 µg/mL de Hoechst 33342 e 50 nM TMRE (Sigma-Aldrich) por 40 minutos a 37 °C. O TMRE (*tetramethylrhodamine, ethyl ester*) é utilizado para marcar mitocôndrias ativas. O TMRE é um corante vermelho-alaranjado, carregado positivamente, que se acumula rapidamente nas mitocôndrias ativas devido à sua carga negativa. Mitocôndrias despolarizadas ou inativas têm potencial de membrana diminuído e falham ao sequestrar o corante TMRE, sendo que o resultado gerado é apresentado em intensidade de fluorescência.

A fluorescência do TMRE foi determinada usando sistema *Image X Press Micro High Content*. Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos. A intensidade de fluorescência relativa ao potencial transmembranar mitocondrial foi determinado usando o software *Cell Scoring MetaXpress*.

3.3.1.3 Análise da ativação da caspase 3/7

As CTMs foram plaqueadas 5×10^3 células/poço em duplicata e tratadas com os oxisteróis 7-KC e Triol por 24 horas, nas concentrações de 100 µM, 50 µM, e 25 µM. Foram adicionados 3 µL do reagente *CellEvent Caspase 3/7 Green* (Invitrogen Life Technologies, USA) juntamente com 0,1 µg/mL de Hoechst 33342 em cada poço da placa e essa foi incubada

por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a leitura da fluorescência foi realizada na plataforma *ImageXpress Micro High Content Screening System*. Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos e a verificação da ativação das caspases 3/7 foi realizada com a utilização do *software Cell Scoring MetaXpress*. O resultado é apresentado em porcentagem de células positivas para ativação das caspases 3/7.

3.3.1.4 Análise de alterações na organização da F-actina

As alterações na organização da F-actina foram investigadas com utilização do kit Faloidina Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, USA). As células tratadas com 25-100 μ M de Triol e de 7-KC foram fixadas em uma solução de paraformaldeído 4 % (Sigma-Aldrich) por 2 horas a 4 °C. Após duas lavagens com DPBS, as células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,1 % (Sigma-Aldrich) a 4 °C por 15 minutos e, após nova lavagem com DPBS, foi feita incubação com 3 U/mL de faloidina Alexa Fluor 568 em DPBS por 60 minutos. Após a lavagem com DPBS, o núcleo da célula foi marcado com 0,1 μ g/mL de Hoechst 33342. As placas foram lavadas duas vezes com DPBS e analisadas usando *ImageXpress Micro High Content Screening System*. Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos.

3.4 Escolha das concentrações inferiores a CI₅₀ de 7-KC e de Triol

A escolha das concentrações de 7-KC e de Triol foi baseado no valor de CI₅₀ para o desenvolvimento dos experimentos. Para tanto, foram escolhidas concentrações abaixo do CI₅₀ afim de determinar qual a menor e a maior concentração de 7-KC e de Triol que apresentam efeitos nas CTMs. Para verificar se essas concentrações de oxisteróis apresentavam efeito metabólico nas CTMs foram realizados dois experimentos em ambas as linhagens de células, CTM-D e CTM-S; o ensaio de MTT e o ciclo celular.

3.4.1 Ensaio de MTT

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi utilizado para determinar a metabolização celular em diferentes concentrações de 7-KC e de Triol. A avaliação é realizada através da quantificação do MTT reduzido pela atividade metabólica celular ligada as enzimas NADH e NADHP formando cristais de formazan, de cor roxo. Sendo assim, a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis e a atividade metabólica associada ao processo de redução enzimática.

As células CTM-S e CTM-D foram plaqueadas na concentração de 5×10^3 células/poço em sextuplicatas, em microplacas transparentes de fundo chato com 96 poços e incubadas por 24 horas em incubadora com atmosfera úmida a 37 °C e 5 % de CO₂. Transcorrido este período, foi realizado o tratamento com sete concentrações de 7-KC (10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 60 µM e 70 µM) e de Triol (20 µM, 25 µM, 30 µM, 35 µM, 40 µM, 45 µM e 50 µM) por um período de 24 horas.

Ao término do período de tratamento, foram adicionados 0,5 mg/mL da solução de MTT em cada poço de cultivo e encubado por 4 horas em incubadora com atmosfera úmida a 37 °C e 5 % de CO₂. Em seguida, foi removido o sobrenadante; diluído os cristais precipitados com 100 µL de DMSO absoluto e realizado a leitura em leitor de placas SpectraMax Paradigm Multi-mode Detection Platform (Molecular Devices) com o comprimento de onda de 570 nm e referência em 650 nm.

Após o tratamento das CTMs com 7-KC e Triol nas concentrações descritas anteriormente, foram escolhidas três concentrações abaixo do CI₅₀ para o 7-KC (70 µM, 50 µM e 30 µM) e para o Triol (40 µM, 30 µM e 20 µM).

3.4.2 Ciclo celular

As CTM-S e CTM-D foram plaqueadas na concentração de 5×10^3 células/poço em duplicata, em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços (Corning). Após 24 horas, as células foram incubadas com os oxisteróis 7-KC (30 µM, 50 µM e 70 µM) e Triol (20 µM, 30 µM e 40 µM); e meio de cultivo basal (controle) por 24 horas em incubadora com atmosfera úmida a 37 °C e 5 % de CO₂. Em seguida, foi verificado o efeito do tratamento no ciclo celular. O corante Hoechst 33342 (0,1 µg/mL) foi adicionado às células 2 horas antes da realização da leitura. As células foram analisadas na plataforma *ImageXPRESS Micro High Content Screening*. Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento dos oxisteróis, 7-KC e Triol, foram adquiridos. O *software Cell Cycle MetaXpress* foi utilizado para analisar as diferentes fases do ciclo celular. O resultado é apresentado em porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular, fase G₀/G₁, fase S e fase G₂/M.

3.5 Tratamento das CTMs com 7-KC e Triol para obtenção do RNA e cDNA

3.5.1 Extração do RNA total pelo método de trizol

As CTM-S e CTM-D foram plaqueadas na concentração de 8×10^3 células por poço em triplicatas, em placas transparentes de fundo chato com 6 poços, e cultivadas em incubadora com atmosfera úmida e 5% de CO₂ a 37 °C até atingir 80-90% de confluência, período

aproximado de 8-15 dias. Após, as CTMs foram tratadas com os oxisteróis 7-KC (30 μ M, 50 μ M e 70 μ M) e Triol (20 μ M, 30 μ M e 40 μ M); e meio de cultivo basal (controle) por 24 horas. Em seguida, foi removido o meio de cultivo e lavado 2 vezes com 2 mL de PBS. Após este procedimento, foi adicionado 1000 μ L de trizol em cada poço da triplicata e as amostras foram armazenadas em freezer -20 °C por no mínimo 48 horas ou até o momento da extração de RNA.

Para a extração do RNA, os microtubos foram retirados do freezer e descongelados em temperatura ambiente por aproximadamente 30-50 minutos. Subsequentemente, foram adicionados às amostras, 200 μ L de clorofórmio e os microtubos agitados vigorosamente com uma pausa de 3 minutos. Transcorrido este período, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 x g, a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa da mistura foi transferida para um novo tubo estéril previamente tratado com DEPC (dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich) para inativação de nucleases.

Para precipitação do RNA, 500 μ L de álcool isopropílico gelado foram adicionados à solução aquosa. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e, após esse período, centrifugadas por 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se ao RNA precipitado, 1 ml de etanol 75 %, diluído em água livre de RNase. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C. Novamente o sobrenadante foi descartado; foi aguardado a secagem em temperatura ambiente e em seguida, o RNA foi ressuspenso em 50 μ L de água DEPC e armazenado em freezer -20 °C até síntese do cDNA.

3.5.2 Tratamento com DNase

As amostras de RNA diluídas em água DEPC, foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop. O grau de pureza foi determinado pela razão entre as absorvâncias medidas a 260 e 280 nanômetros. Foi aceito um grau de pureza igual ou superior a 1,5. Após a quantificação, foram diluídos 1.000 ng de RNA em 8 μ L de água DEPC. Em seguida foi adicionado à solução de RNA, 1 μ L da enzima RQ1 RNase-Free DNase 1UI/ μ L e 1 μ L de Reaction Buffer 1X. A solução foi homogeneizada e incubada em termociclador PTC-200® (Peltier Engine, EUA) a 37 °C durante 30 minutos, para que ocorra a digestão do DNA genômico. Em seguida, foi adicionado 1 μ L do tampão de parada da reação, RQ1 DNase Stop solution (Promega, USA), para inativar a enzima DNase. A solução foi homogeneizada e incubada em termociclador PTC-200® (Peltier Engine, EUA) a 65 °C por 10 minutos.

3.5.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para realizar a síntese do DNA complementar a partir do RNA tratado, foi utilizado o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems™, EUA). A reação de transcrição reversa foi realizada através de uma solução contendo os seguintes componentes: as bases nitrogenadas (dNTPs: 4 mM de cada dNTP); iniciadores aleatórios (20 pM); MultiScribe™ Reverse Transcriptase (enzima transcriptase reversa) (1,0 µL) e RT *buffer* (2,0 µL); e 3,2 µL de água DEPC para obter volume final de 9 µL de solução. O mix da reação foi homogeneizado e adicionado ao RNA tratado (11 µL no total). O volume final contendo o mix da reação foi de 20 µL. A reação de transcrição reversa foi realizada em termociclador PTC-200® (Peltier Engine, EUA). As condições da reação foram: um ciclo de 25 °C por 10 minutos, em seguida, 37 °C por 120 minutos e 85 °C por 5 minutos. Após o término dos ciclos, foi adicionado 180 µL de água DEPC, com volume final de 200 µL (5 ng de cDNA em 1 µL) e o cDNA foi armazenado a 4 °C até a realização da PCR em tempo real.

3.6 Análise dos genes *BCL2*, *NF-kB*, *IKKB1*, *Mfn1*, *Mfn2*, *OPAI*, *DRP1*, *CYT-B* e *NDI*

Utilizando a técnica de PCR em tempo real, foi avaliada a expressão relativa dos genes *BCL2*, *NF-kB*, *IKKB1*, *Mfn1*, *Mfn2*, *OPAI*, *DRP1*, *CYT-B* e *NDI* em ambos os grupos de CTMs, CTM-S e CTM-D, tratadas com 7-KC (70 µM, 50 µM e 30 µM) e com Triol (40 µM, 30 µM e 20 µM) por 24 horas. As CTMs cultivadas em meio basal foram utilizadas como controle. O RNA mensageiro e o cDNA foram preparados como descrito anteriormente.

Os sistemas de detecção de sequências utilizados para avaliar a expressão dos genes estudados neste trabalho foram diferentes, sendo que para avaliar a expressão dos genes *BCL2*, *NF-kB* e *IKKB1* foi utilizado o sistema de detecção de sequências com sondas de hidrólise, TaqMan® (ou “ensaio para nuclease 5’ fluorescente”); e para avaliar a expressão dos genes *Mfn1*, *Mfn2*, *OPAI*, *DRP1*, *CYT-B* e *NDI* foi utilizado o sistema de detecção de sequências por meio do corante SYBR® Green I.

Para ambos os sistemas de detecção, os ensaios foram realizados em duplicatas e a variação do valor de CT (*Cycle of threshold*) entre as duplicatas foi igual ou inferior a 0,5 CT ($\leq 0,5$). Todos os ensaios utilizaram um controle de amplificação ao qual não foi adicionado amostra, apenas água DEPC. A expressão do RNA mensageiro foi normatizada em relação ao gene endógeno. As sequências de iniciadores utilizadas nesses experimentos foram adquiridas da Applied Biosystems™. As reações de PCR foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System.

Para o sistema de detecção TaqMan®, foram utilizadas as sondas hidrolisáveis para *BCL2* (Hs00153350_m1); *NF-KB* (Hs00968440_m1); *IKKBI* (Hs00233284_m1). A expressão do RNA mensageiro foi normatizada em relação ao gene endógeno β -glucuronidase (Thermo Fisher USA). A solução completa da reação de PCR foi composta por volume total de 10 μ L, sendo: 3 μ L de cDNA; 5 μ L de Mastermix (TaqMan Universal PCR Master Mix- Applied Biosystem); 0,5 μ L de sonda e 1,5 μ L de água DEPC. A solução da reação foi homogeneizada e adicionado 7 μ L em cada poço da placa de 96 poços para PCR (Scientific Specialities Inc, USA), em seguida, foi adicionado 3 μ L de cDNA referente a cada condição de tratamento. Após esse procedimento, a placa foi selada com o adesivo óptico MicroAmp™ (Applied Biosystem), e centrifugada a 250 X g por 2 minutos a temperatura ambiente.

As condições iniciais das reações foram: a temperatura das amostras foi elevada para 95 °C por 5 minutos para que ocorresse a desnaturação inicial das duplas fitas de cDNA, em seguida a temperatura diminuiu para 60 °C por 30 segundos para a ligação (anelamento) das sondas de hidrólise e extensão, em seguida, ocorreu a desnaturação da dupla fita em 95 °C por 15 segundos. A reação foi realizada em 40 ciclos completos.

As reações de expressão dos genes mitocôndrias *Mfn1*, *Mfn2*, *OPA1*, *DRP1*, *CYT-B* e *ND1* foram realizadas utilizando o sistema de detecção de sequências *SYBR Green I*. A expressão do RNA mensageiro foi normatizada em relação ao gene endógeno GAPDH (Thermo Fisher). A solução completa da reação de PCR foi composta por um volume total de 10 μ L. Para todas as reações foi utilizado 3 μ L de cDNA e 5 μ L de Mastermix (SYBR Green Master Mix - Applied Biosystem), sendo variável o volume de cada iniciador, devido as diferentes concentrações (tabela 1), e a quantidade final de água DEPC. A solução da reação foi homogeneizada e adicionado 7 μ L em cada poço da placa de 96 poços para PCR, em seguida, foi adicionado 3 μ L de cDNA referente a cada condição de tratamento. Após esse procedimento, a placa foi selada com o adesivo óptico MicroAmp™ e centrifugada a 250 X g por 2 minutos a temperatura ambiente.

As condições iniciais das reações, no equipamento, foram de 2 minutos na temperatura de 50 °C, seguida de aumento para temperatura para 95 °C por 10 minutos, para que ocorresse a primeira desnaturação da dupla fita de cDNA. A propagação da reação ocorreu em uma quantidade total foi de 35 ciclos. Sendo que a temperatura de anelamento foi de 60 °C por 2 segundos, seguida de aumento da temperatura para extensão da fita até 65 °C por 60 segundos e desnaturação da dupla fita em temperatura de 95 °C por 15 segundos. As condições das reações foram iguais para todos os genes avaliados. No final do ciclo foi verificado a

temperatura de *melting* para a sequência de iniciadores. A tabela 1 apresenta as sequências senso (*Forward*) e antisenso (*Reverse*) dos iniciadores.

Tabela 1. Gene, sequência de iniciadores e concentração

<i>Gene</i>	<i>Código</i>	<i>Sequência de Iniciadores (5'-3')</i>	<i>Concentração (nM)[#]</i>
<i>Mitofusina 1 (Mfn1)</i>	NM_033540.2	<i>F:</i> TCCGCCTTTAACTTCTCGGG <i>R:</i> GCCATTATGCTAAGTCTCCGC	400
<i>Mitofusina 2 (Mfn2)</i>	NM_014874.3	<i>F:</i> AATCTGAGGCGACTGGTGAC <i>R:</i> CTCCACCAGTCTGACTCAC	200
<i>OPA1</i>	NM_015560.2	<i>F:</i> AGCCCTTCCTAGTTCAGAAGA <i>R:</i> TCTTCCGGGAGAACCTGAGGTAA	600
<i>DRP1</i>	NM_012062.4	<i>F:</i> GGGAGTAAGCCCTGAACCAAT <i>R:</i> CCTACAGGCACCTTGGTCAT	600
<i>MT-CYTB</i>	NC_012920.1	<i>F:</i> ACCCCCTAGGAATCACCTCC <i>R:</i> GCCTAGGAGGTCTGGTGAG	200
<i>MT-ND1</i>	NC_012920.1	<i>F:</i> ATACCCATGGCCAACCTCCT <i>R:</i> GGGCCTTTGCGTAGTTGTAT	200

Concentração para cada uma das sequências de iniciadores (senso e antisenso) para 10 µL de reação final.

A aquisição e análise dos resultados foi realizada através do *software 7500 softwares v2.0.5* (Applied Biosystem). Usualmente, é considerado biologicamente relevante quando a expressão relativa for igual e/ou superior e/ou inferior a 2 vezes a quantificação relativa (RQ: *relative quantification*). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando a fórmula aritmética de $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrita por Livak *et al.* (168).

3.7 Avaliação da expressão gênica das proteínas ABCs

Para avaliar o efeito dos oxisteróis Triol e 7-KC na expressão gênica das proteínas ABCs, foi escolhido duas concentrações: Triol (20 µM) e 7-KC (25µM). Dessa forma, ambos os cDNAs foram utilizados para um amplo estudo de expressão gênica de proteínas ABCs, utilizando placas de PCR em arranjo (qPCR array) (TaqMan® Array 96 Well FAST Plate Human ABC Transporters, Applied Biosystems).

Foram verificadas a expressão de 44 proteínas transportadoras ABC, sendo elas: ABCA1, ABCA12, ABCA2, ABCA3, ABCA4, ABCA5, ABCA6, ABCA7, ABCA8, ABCB1, ABCB10, ABCB11, ABCB4, ABCB5, ABCB6, ABCB7, ABCB8, ABCB9, ABCC1, ABCC10, ABCC11, ABCC12, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC6, ABCC8, ABCC9, ABCD1, ABCD2, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCF2, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, ABCG8, CFTR (ABCC7), TAP1 (ABCB2) e TAP2 (ABCB3).

Para tanto, a solução para a reação conteve: 144 µL das amostras de cDNA, 96 µL de água DEPC e 240 µL de TaqMan universal PCR master mix 2X (Applied Biosystems). A solução foi homogeneizada, em seguida, foi aplicado 10 µL da solução em cada poço da placa, sendo essa selada com o adesivo óptico MicroAmp™ e centrifugada a 250 xg por 2 minutos a temperatura ambiente.

Foram avaliadas duas amostras por placa, sendo aplicadas uma amostra em todos os poços das colunas 1 a 6 (controle, não tratado) e a outra amostra em todos os poços das colunas 7 a 12 (amostra tratada, Triol ou 7-KC). A reação de PCR foi realizada no equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System*, nas seguintes condições: a temperatura das amostras foi elevada para 95 °C por 20 segundos, seguida pela realização de 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos. A expressão das proteínas ABCs foi analisada em relação ao controle não tratado. A aquisição e análise dos resultados foi realizada através do *software 7500 softwares v2.0.5*.

3.8 Detecção de proteínas por meio de imunofluorescência indireta

As células-tronco mesenquimais, CTM-S e CTM-D, foram plaqueadas em duplicatas, na densidade de 5×10^3 células/poço em microplacas pretas de fundo chato com 96 poços por 24 horas e mantidas em incubadora com atmosfera úmida a 37 °C e 5 % de CO₂. Em seguida, foram tratadas com 30 µM, 50 µM e 70 µM de 7-KC e 20 µM, 30 µM e 40 µM de Triol por 24 horas, e CTMs, cultivadas em meio basal, serviram como controle. Após o término do tratamento, as células foram lavadas duas vezes com 100 µL DPBS e fixadas com 50 µL de paraformaldeído 4 % por duas horas a 4 °C. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes com 100 µL de DPBS e armazenadas com 200 µL de DPBS a 4 °C até a realização do experimento de imunofluorescência indireta.

Para realizar a imunofluorescência, primeiro, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% (Sigma-Aldrich), por 15 minutos a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com 100 µL de DPBS para remover todo o detergente. Logo após, foi realizado o bloqueio com BSA 5 % (*Bovine Serum Albumin* - SigmaAldrich), por 40 minutos, sob agitação moderada em temperatura ambiente. O bloqueio com BSA 5% é necessário para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos. Transcorrido este período, foi adicionado o anticorpo específico (ou primário) diluído em BSA 5 %, nas concentrações indicadas na tabela 2.

As placas permaneceram em incubação por um período de 12-14 horas, em agitação moderada e temperatura de 4 °C. Após incubação, foi removido o anticorpo primário, lavado

2 vezes com 100 μ L de DPBS e adicionado o anticorpo secundário diluído em DPBS nas concentrações descritas na tabela 2. As células ficaram incubadas por 90 minutos sob agitação moderada em temperatura ambiente. Em seguida, foi removido o anticorpo secundário e lavado duas vezes com 100 μ L de DPBS. Após a lavagem com DPBS, o núcleo das células foi marcado com 1 μ L (0,1 μ g/mL) de Hoechst 33342 por poço e analisadas usando a plataforma *ImageXpress High Content Screening*. Cinco sítios por poço e dois poços por tratamento foram adquiridos. O resultado para cada uma das marcações das proteínas avaliadas é apresentado em intensidade de fluorescência.

Para as marcações das proteínas ABC-A1, LXR- α e ABC-G2 foi utilizado *Cell Mask* (1:1000) (*HCS CellMask™ Blue Stain-*, Thermo Fisher Scientific), um corante de delineamento celular para a plataforma HCS. Para a análise das proteínas ABC-A1, LXR- α e ABC-G2 foi utilizado o *software Multi-Wavelength Cell Scoring MetaXpress*. Para análise de todas as outras proteínas foi utilizado o *software Cell Scoring MetaXpress*. As análises e aquisições na plataforma *ImageXpress High Content Screening* foram realizadas pela pesquisadora Dra. Débora Levy.

Tabela 2. Anticorpos utilizados na imunofluorescência indireta

Anticorpo Primário	Marca	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
Anti ABC-A1	Novus Biologicals	1:200	R-phycoerythrin	1:500
Anti ABC-C1	ABCam	1:50	R-phycoerythrin	1:500
Anti ABC-C2	ABCam	1:50	R-phycoerythrin	1:500
Anti ABC-D4	Novus Biologicals	1:500	AlexaFluor 488	1:500
Anti ABC-G1	Novus Biologicals	1:100	R-phycoerythrin	1:500
Anti ABC-G2	Novus Biologicals	1:250	R-phycoerythrin	1:500
Anti LRP	ABCam	1:100	R-phycoerythrin	1:500
Anti CD147	ABCam	1:100		
Anti SHh	ABCam	1:400	AlexaFluor 488	1:500
Anti SMO	Novus Biologicals	1:100	AlexaFluor 488	1:500
Anti Gli3	Novus Biologicals	1:100	R-phycoerythrin	1:500
Anti LXR- α	ABCam	1:50	R-phycoerythrin	1:500
Anti LXR- β	Sigma-Aldrich	1:200	AlexaFluor 488	1:500
Anti PPAR- γ	Novus Biologicals	1:200	AlexaFluor 488	1:500
Anti Caveolina-1	ABCam	1:500	AlexaFluor 488	1:500
Anti Survivina	ABCam	1:500	AlexaFluor 488	1:500

3.9 Quantificação de glutathiona celular por meio de luminescência

A quantificação de glutathiona celular foi realizada por meio do kit comercial GSH/GSSG-Glo™ Assay (Promega Corporation, RU) conforme as instruções no fabricante com algumas alterações. Ao término do experimento, realizado por luminescência, obtêm-se o teor de glutathiona total (GSH) e de glutathiona oxidada (GSSH). Com esses dois parâmetros é calculado a razão entre glutathiona total e glutathiona oxidada (GSH/GSSH), que reflete de maneira indireta o teor de glutathiona reduzida na célula. A seguir é descrito como foi realizado o experimento, bem como o cálculo de GSH/GSSH.

Para a realização deste experimento, ambas as linhagens de CTMs foram descongeladas, em garrafa de 75 cm³, em incubadora úmida a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂.

Sendo assim, as CTM-S e CTM-D foram plaqueadas em duplicatas, na densidade de 7 x 10³ células/poço em microplaca branca (Corning Costar) de fundo plano e transparente com 96 poços por um período de 24 horas. Após esse período, o meio de cultivo foi removido e ambas as CTMs foram tratadas com 30 µM, 50 µM e 70 µM de 7-KC e 20 µM, 30 µM e 40 µM de Triol por 24 horas, as CTMs cultivadas em meio basal serviram como controle. Passado o período de tratamento com os oxisteróis, o meio de cultivo foi removido e as CTMs foram lavadas duas vezes com PBS em temperatura ambiente.

Para quantificar o teor de glutathiona total foi adicionado às CTMs e ao branco (controle da reação sem células) 50 µL do reagente de lise celular sendo composto por: 1,0 µL de luciferina-NT, 10 µL de *Passive Lise Buffer* (5X) e 39 µL de água DPEC.

Para quantificar o teor de glutathiona oxidada foi adicionado às CTMs e ao branco 50 µL do reagente de lise celular, sendo 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 DPEC. Todos os reagentes foram utilizados em até 30 minutos após o preparo.

Após a adição do reagente de lise celular tanto para glutathiona total quanto para glutathiona oxidada, as CTMs permaneceram em agitação moderada em temperatura ambiente por um período de 15 minutos. Em seguida foi adicionada 50 µL do reagente de geração de luciferina, sendo composto por: 1,25 µL de DTT (100 mM), 3,0 µL de Glutathiona-S-transferase e 45,75 µL do *Buffer* de reação para glutathiona. Ao término dessa etapa, o volume foi de 100 µL. A solução permaneceu sob agitação moderada por 15 minutos para facilitar a reação, e em seguida, em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente.

Após esse período foi adicionado 100 µL do reagente de detecção de luciferina, composto por uma solução tampão de reconstituição de esterase e luciferina liofilizada. A reação completa, composta por 200 µL no total, ficou em agitação moderada por 5 minutos e

em seguida em repouso absoluto por 20 minutos. Transcorrido esse período, foi realizado a leitura de luminescência com tempo de integração de 0,3 segundos por poço na plataforma GloMax® Discover (Promega Corporation, USA).

Após a leitura no equipamento, o resultado da luminescência é dado em unidades relativas de luz (URL), sendo necessário diminuir o valor de URL do branco, tanto de glutathione total quanto da glutathione oxidada, e em seguida pode-se calcular a razão entre GSH/GSSG, por meio da fórmula:

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

3.10 Análise de dados

A análise de dados foi realizada através dos valores obtidos, em duplicata de experimentos independentes, realizados nas linhagens de CTM-S e CTM-D. Foi verificada a diferença dos parâmetros avaliados entre CTM-D e CTM-S, a fim de observar a heterogeneidade entre as duas linhagens. Para tanto, foi utilizado o teste T de *Student* não-pareado.

Em seguida, foi observado se os tratamentos com 7-KC e com Triol nas CTMs impactariam nos parâmetros avaliados. Quando a análise foi referente a apenas um grupo de CTM (intragrupo) foi utilizado a análise de variância de uma via ou fator (ANOVA) com pós Teste de *Tukey* (para múltiplas comparações) ou pós Teste de *Dunnet* (comparação com o controle).

Para verificar o efeito dos tratamentos com 7-KC e Triol nas linhagens de CTM (intragrupos), bem como entre as linhagens (intergrupos: CTM-D e CTM-S), foi utilizado a análise de variância (ANOVA) de duas vias ou dois fatores com pós teste de *Tukey* ou pós Teste de *Dunnet*. O teste de ANOVA de duas vias, fornece quatro (4) valores de P (probabilidade), sendo: 3 valores de P relacionados ao teste global (1 valor de P para cada fator e 1 valor de P para a interação entre os fatores); e 1 valor de P relacionado ao pós-teste. Foi considerado significativo quando pelo menos 1 valor de P do teste global foi igual ou inferior a 0,0500 ($P \leq 0,0500$), associado ao valor de P do pós-teste de $P \leq 0,0500$.

Após a finalização das análises foi realizado uma análise global de interação com as variáveis estudadas. Este dado é apresentado em forma de gráfico de rede. Em seguida, foi construído um mapa de calor ou *heatmap* em que foi observado o efeito de 7-KC e de Triol nas CTM-S e CTM-D. Para realizar essa avaliação todas as variáveis foram transformadas em *Z-score*, a fim de garantir que todas as variáveis ficassem na mesma escala de medida.

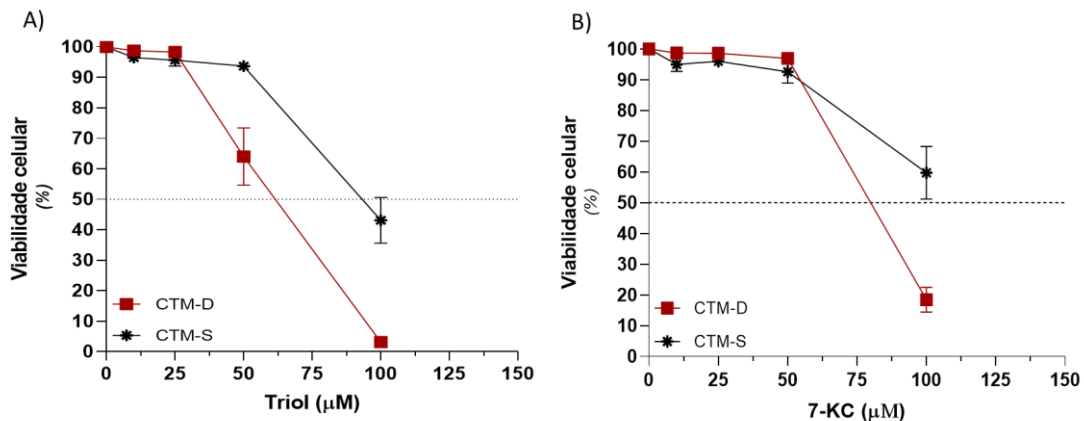
Os resultados são expressos em média e erro padrão (média \pm EP). Para realizar a análise de dados e a apresentação gráfica dos resultados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 8.0.1 [®] para *Windows*. Foi considerado significativo quando $P \leq 0,0500$.

4. RESULTADOS

4.1 Citotoxicidade dos oxisteróis em células-tronco mesenquimais

Neste trabalho, foi avaliada a citotoxicidade dos oxisteróis Triol e do 7-KC nas CTM-S e CTM-D durante o período de 24 horas de tratamento nas concentrações de 10 μM , 25 μM , 50 μM e 100 μM . Nota-se que há diferença entre as concentrações inibitórias médias (CI_{50}) para o oxisterol Triol quando comparada entre as linhagens CTM-S e CTM-D. A CI_{50} do Triol nas linhagens CTM-S foi de 102,0 μM , enquanto nas linhagens CTM-D foi de 55,0 μM , figura 4A. Referente ao tratamento com o oxisterol 7-KC, foi observado nas linhagens CTM-S CI_{50} de 98,0 μM , e nas linhagens CTM-D a CI_{50} foi de 82,0 μM , figura 4B.

Figura 4. Citotoxicidade dos oxisteróis Triol e 7-KC nas linhagens de CTM-S e CTM-D.



Análise da citotoxicidade do oxisterol Triol (A) e 7-KC (B) em CTM-S e CTM-D após 24 horas de tratamento. Ensaio realizado com Hoechst 33342 e iodeto de propídio. Análise realizada por meio do ajuste de curva com regressão não-linear. Fonte: Autoria própria.

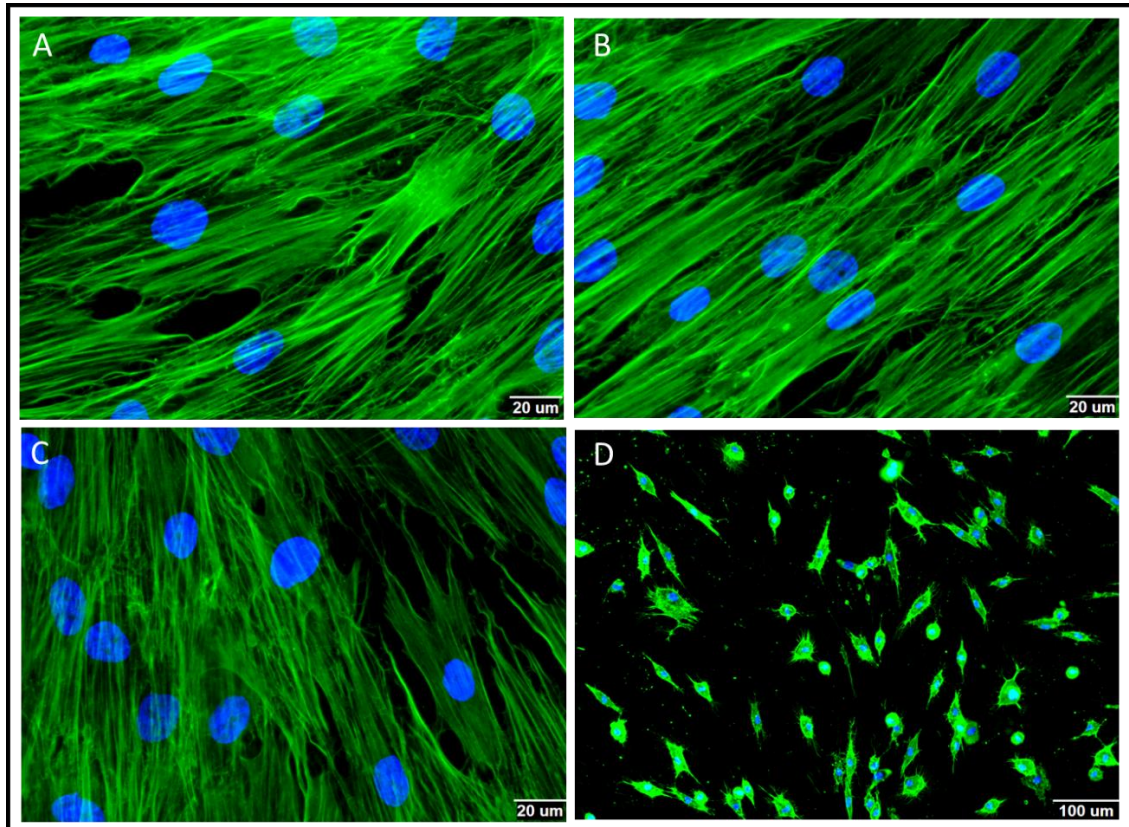
4.2 Análise da organização citoplasmática da proteína F-actina

Neste trabalho, foi avaliado nas CTMs o efeito do tratamento com concentrações de 25–100 μM dos oxisteróis 7-KC e Triol, por um período de 24 horas na organização da proteína F-actina por meio da técnica de imunofluorescência indireta.

A F-actina é uma proteína dispersa no citoplasma, nas fotomicrografias é possível observá-la na coloração verde. A avaliação do efeito dos oxisteróis na organização da F-actina é visual.

Nota-se que, em relação ao controle cultivado em meio basal, no tratamento com 50 μM de 7-KC ocorre, perda da formação das fibras de F-actina com diminuição de volume e com bordas celulares soltas. Na concentração de 100 μM de 7-KC, a F-actina perde sua integridade conformacional, com diminuição na área total do citoplasma nas CTMs, figura 5.

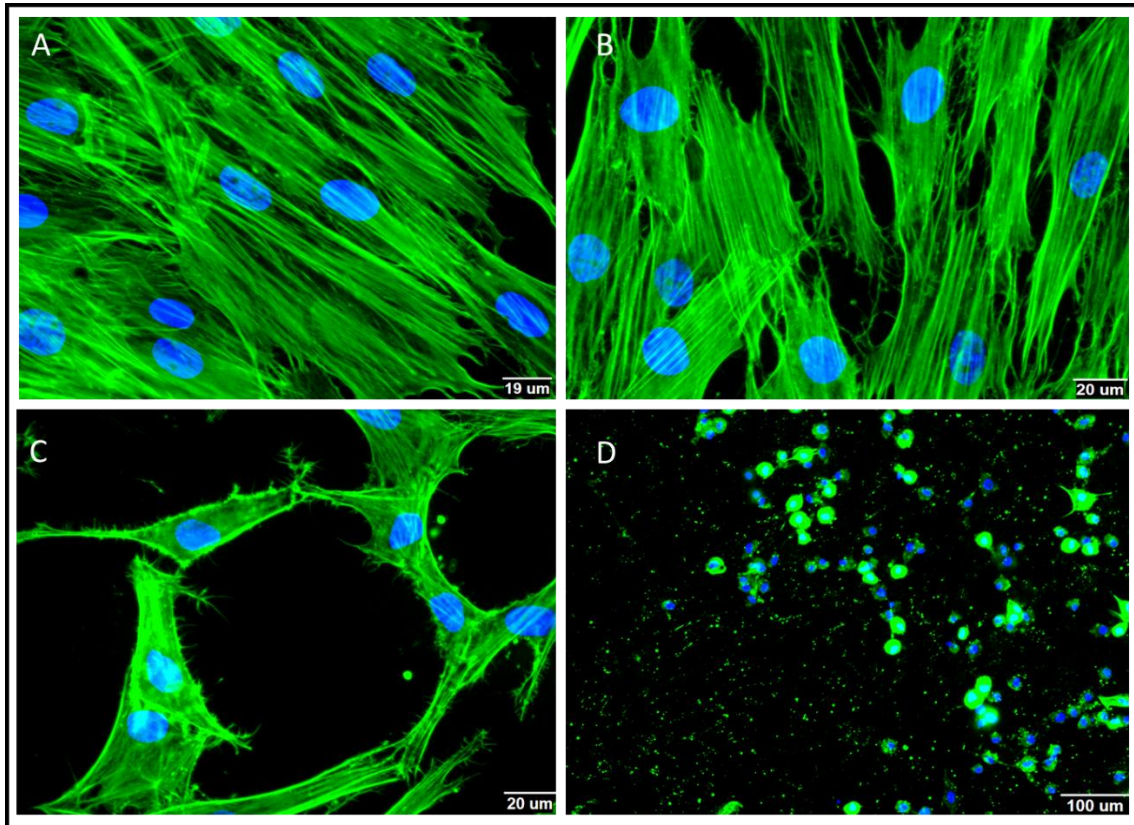
Figura 5. Desorganização da F-actina em linhagem de CTM-S tratada com 7-KC por 24 horas.



Fotomicrografia representativa da marcação da proteína F-actina (FITC-verde) em linhagem de CTM-S tratada com 7-KC por 24 horas. **A:** Controle cultivado em meio basal. **B:** Tratamento com 25 μM de 7-KC. **C:** Tratamento com 50 μM de 7-KC. **D:** Tratamento com 100 μM de 7-KC. Marcação do núcleo celular com Hoechst 33342 (DAPI-azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 40 X (A, B e C) – escala igual a 20 μm ; objetiva de 10 X (D) – escala igual a 100 μm . Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

Referente ao tratamento com o oxisterol Triol, foi observado que a desorganização da F-actina e diminuição da área do citoplasma iniciam-se na concentração de 25 μM , com aumento na concentração de 50 μM , seguida de total desorganização da F-actina e ruptura da membrana celular na concentração de 100 μM de Triol, figura 6.

Figura 6. Desorganização da F-actina de linhagem de CTM-S tratada com Triol por 24 horas.



Fotomicrografia representativa da marcação da proteína F-actina (FITC-verde) em linhagem de CTM-S tratada com Triol por 24 horas. **A:** Controle cultivado em meio basal. **B:** Tratamento com 25 μM de Triol. **C:** Tratamento com 50 μM de Triol. **D:** Tratamento com 100 μM de Triol. Marcação do núcleo celular com Hoechst 33342 (DAPI-azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 40 X (A, B e C) – escala igual a 20 μm ; objetiva de 10 X (D) – escala igual a 100 μm . Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

4.3 Análise da ativação das caspases 3/7

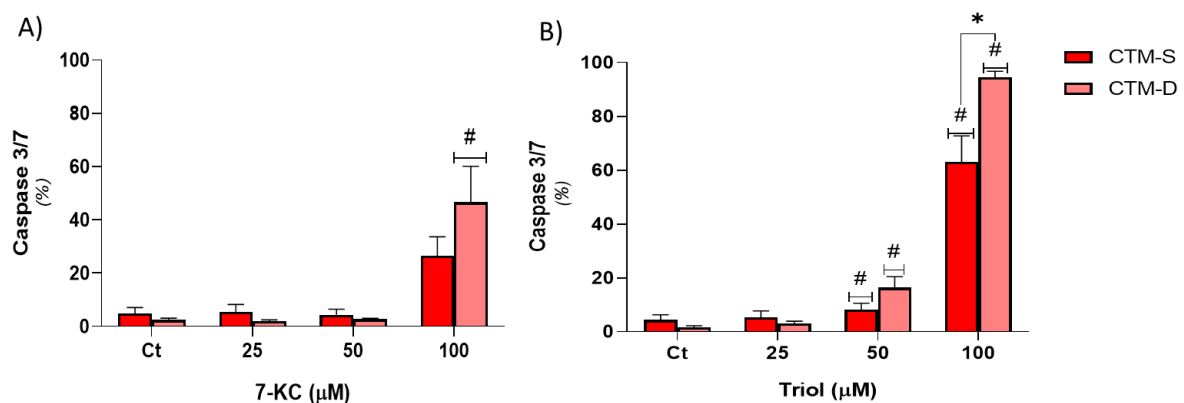
As enzimas caspases estão associadas a via de morte celular apoptótica. Foi analisado se o tratamento com 7-KC e com Triol nas linhagens de CTMs podem ativar as caspases 3/7. Referente ao tratamento com concentrações tóxicas de 7-KC foi observado aumento da ativação de caspase 3/7 ($p = 0,002$). No entanto não houve diferenças entre as linhagens quanto a ativação de caspases ($p = 0,1694$) ou interação entre o tratamento e as linhagens CTM-D e CTM-S ($0,0972$). A diferença observada na ativação da caspase foi na linhagem CTM-D na concentração de 100 μM em relação ao controle ($p = 0,0003$) e as concentrações de 25 μM ($0,0003$) e 50 μM ($p = 0,0004$), figura 7A.

O tratamento em concentrações tóxicas de Triol por 24 horas ativa as caspases 3/7 ($p = 0,0001$). Além disso, o aumento da atividade das caspases 3/7 é diferente em entre as

linhagens CTM-D e CTM-S ($p = 0,0339$), bem como, em relação a interação das linhagens CTMs e o tratamento com Triol ($p = 0,0023$), figura 7B.

Nas linhagens de CTM-D há diferença entre o controle e o tratamento na concentração de $100 \mu\text{M}$ ($p < 0,0001$); e entre as concentrações de $25 \mu\text{M}$ e $50 \mu\text{M}$ em relação a concentração de $100 \mu\text{M}$ ($p < 0,0001$) de Triol. Em relação as linhagens CTM-S foi observado diferença entre a concentração de $100 \mu\text{M}$ em relação ao controle ($p < 0,0001$). e ao tratamento com $50 \mu\text{M}$ ($p < 0,0001$). A diferença entre a ativação da caspase entre as linhagens de CTMs foi observada apenas na concentração de $100 \mu\text{M}$ de Triol em que houve um aumento de células positivas para caspase 3/7 nas linhagens de CTM-D (94 %) quando comparado a linhagem CTM-S (63 %) ($p = 0,0012$), Figura 7B.

Figura 7. Ativação das caspases 3/7 em linhagens de CTM tratadas com 7-KC e Triol.



Gráficos representando a porcentagem de células positivas para a ativação das caspases 3/7. **A.** Comparação entre as linhagens CTM-D e CTM-S tratadas com 7-KC por 24 horas. Comparação entre a variância das médias por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0002$; fator células: $p = 0,1694$; interação $p = 0,0972$. **B.** Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D tratadas com Triol por 24 horas. Comparação entre a variância das médias por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0001$; fator células: $p = 0,0339$; interação: $p = 0,0023$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos entre as da linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.4 Análise do potencial de membrana mitocondrial

O efeito dos oxisteróis 7-KC e Triol no potencial de membrana mitocondrial nas CTMs foi avaliado através da intensidade de fluorescência do corante TMRE. Como mencionado anteriormente, o TMRE é um corante fluorescente catiônico, permeável às células, sendo sequestrado por mitocôndrias ativas. A coloração vermelha indica o sequestro do corante TMRE em ambas as linhagens de CTMs. As linhagens de CTM-S e CTM-D foram tratadas com 7-KC e Triol por 24 horas. Foi observado diferenças no padrão de marcação (na arquitetura

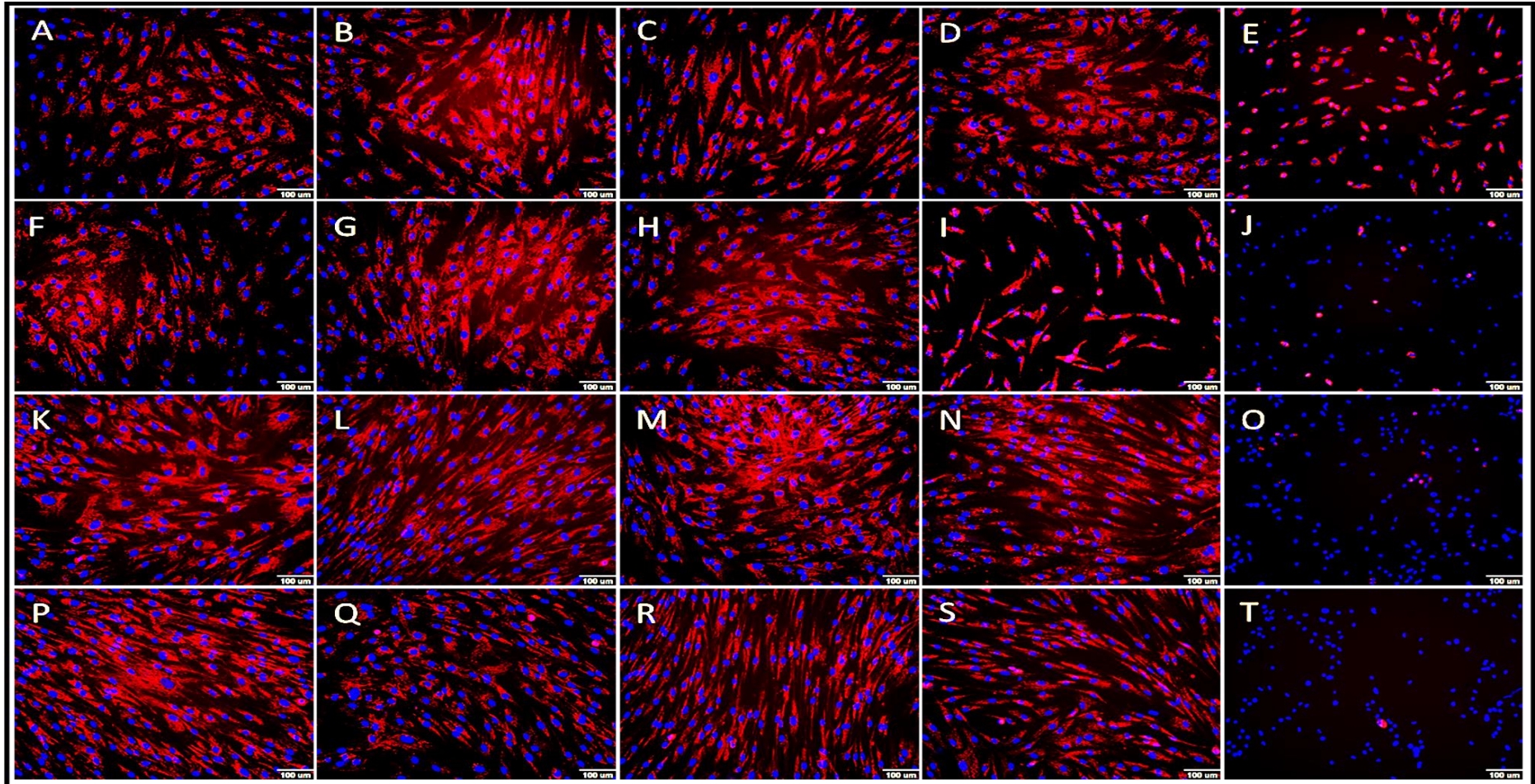
das mitocôndrias) tratadas com concentrações de 10 – 100 μM de 7-KC e Triol entre as linhagens CTM-S e CTM-D. figura 8.

Por meio da avaliação visual das fotomicrografias obtidas das mitocôndrias marcadas com TMRE, é observado que as CTMs cultivadas em meio basal apresentam um padrão homogêneo de mitocôndrias espalhadas pelo citoplasma e em formato alongado/tubular, figuras 9A e 10A. O tratamento com 25 μM de 7-KC altera o formato das mitocôndrias, deixando-as em uma estrutura de rede reticular espalhadas pelo citoplasma das células, figura 9B.

Na concentração de 50 μM de 7-KC é observado diminuição do padrão homogêneo de distribuição das mitocôndrias no citoplasma, com translocação perinuclear, e é observado uma mudança discreta na forma das mitocôndrias, com diminuição da rede reticular, figura 9C.

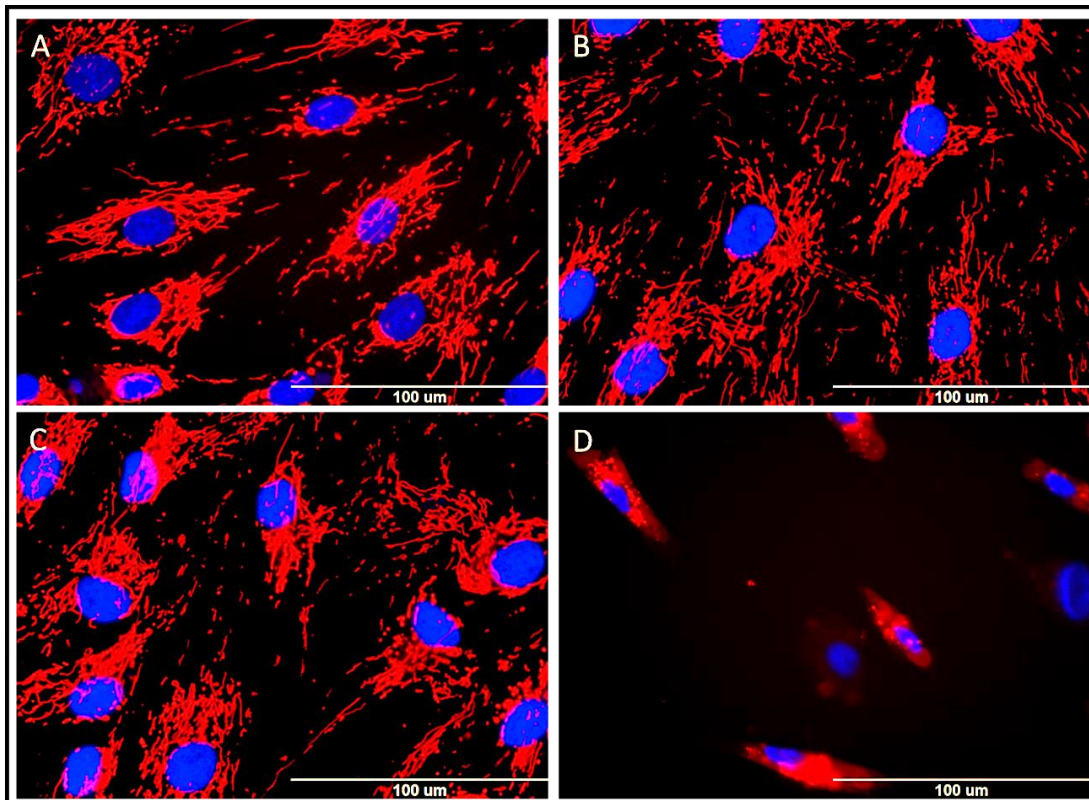
Na concentração de 100 μM de 7-KC, a forma reticular das mitocôndrias nas CTMs foi completamente perdida. Além disso, é observado que algumas mitocôndrias apresentam perda da capacidade de sequestrar o corante TMRE, uma vez que é observado marcação do núcleo da célula (em azul) sem marcação do corante. As mitocôndrias apresentaram-se em formato esférico e/ou pontos; e localizaram-se, em maior parte, na região perinuclear, figura 9D.

Figura 8. Efeito dos oxisteróis 7-KC e Triol no potencial de membrana mitocondrial das CTM-S e CTM-D.



Fotomicrografia representativa das mitocôndrias coradas com TMRE (TRICT – vermelho) em linhagem de CTM-S (A–J) e de CTM-D (K–T) tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. **A)** meio basal; **B)** 10 μM de 7-KC; **C)** 25 μM de 7-KC; **D)** 50 μM de 7-KC; **E)** 100 μM de 7-KC; **F)** meio basal; **G)** 10 μM de Triol; **H)** 25 μM de Triol; **I)** 50 μM de Triol; **J)** 100 μM de Triol; **K)** meio basal; **L)** 10 μM de 7-KC; **M)** 25 μM de 7-KC; **N)** 50 μM de 7-KC; **O)** 100 μM de 7-KC; **P)** meio basal; **Q)** 10 μM de Triol; **R)** 25 μM de Triol; **S)** 50 μM de Triol; **T)** 100 μM de Triol. Núcleos marcados com *Hoechst* 33342 (DAPI – azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 10 X – escala igual a 100 μm . Fonte: Dra Débora Levy e a autora

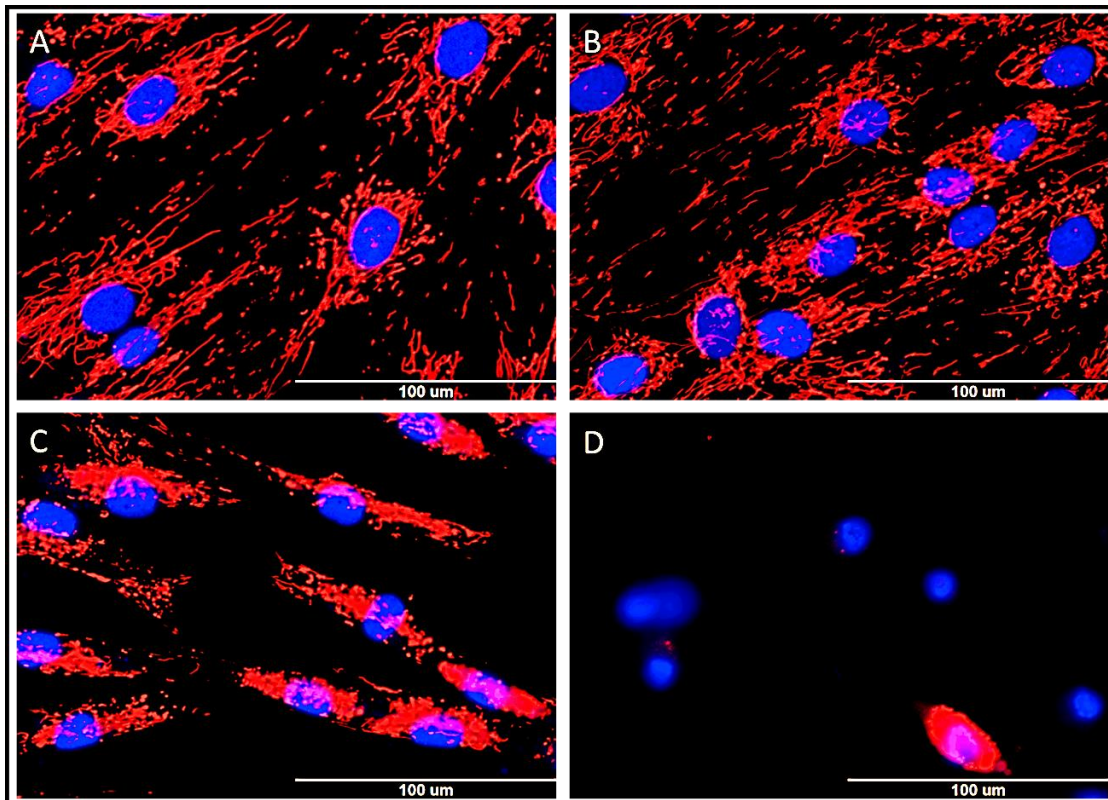
Figura 9. Efeito do tratamento com 7-KC nas mitocôndrias de CTMs.



Fotomicrografia representativa das mitocôndrias coradas com TMRE (TRICT – vermelho) em linhagem de CTM-S tratada com 7-KC por 24 horas. **A:** Controle cultivado em meio basal. **B:** Tratamento com 25 μM de 7-KC. **C:** Tratamento com 50 μM de 7-KC. **D:** Tratamento com 100 μM de 7-KC. Marcação do núcleo celular com Hoechst 33342 (DAPI-azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 40 X – escala igual a 100 μm . Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

Quanto ao efeito do tratamento com Triol nas mitocôndrias das CTMs, foi observado que na concentração 25 μM diminui o padrão reticular das mitocôndrias no citoplasma e que aumenta a quantidade de mitocôndrias perinucleares e em formato de esfera ou ponto, figura 10B. Na concentração de 50 μM de Triol é observado alteração completa do padrão homogêneo de distribuição das mitocôndrias no citoplasma, com ampla translocação perinuclear e mitocôndrias em formato esférico e/ou pontos, figura 10C. Na concentração de 100 μM de Triol, é observado as mitocôndrias 100% perinucleares e em formato esférico e/ou pontos. Também é observado perda da capacidade das mitocôndrias em sequestrar o corante TMRE. É observado a marcação do núcleo da célula (em azul), sem a presença do corante, figura 10D.

Figura 10. Efeito do tratamento com Triol nas mitocôndrias de CTMs.



Fotomicrografia representativa das mitocôndrias coradas com TMRE (TRICT – vermelho) em linhagem de CTM-S tratada com Triol por 24 horas. **A:** Controle cultivado em meio basal. **B:** Tratamento com 25 μM de Triol. **C:** Tratamento com 50 μM de Triol. **D:** Tratamento com 100 μM de Triol. Marcação do núcleo celular com Hoechst 33342 (DAPI-azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 40 X – escala igual a 100 μm . Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

Baseados na intensidade de fluorescência do TMRE, foi realizado a análise estatística entre os grupos e dos tratamentos, a fim de verificar o efeito dos oxisteróis 7-KC e Triol no potencial de membrana das mitocôndrias nas CTMs.

A comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal foi semelhante quanto a intensidade de fluorescência do TMRE ($p = 0,0830$), figura 11A.

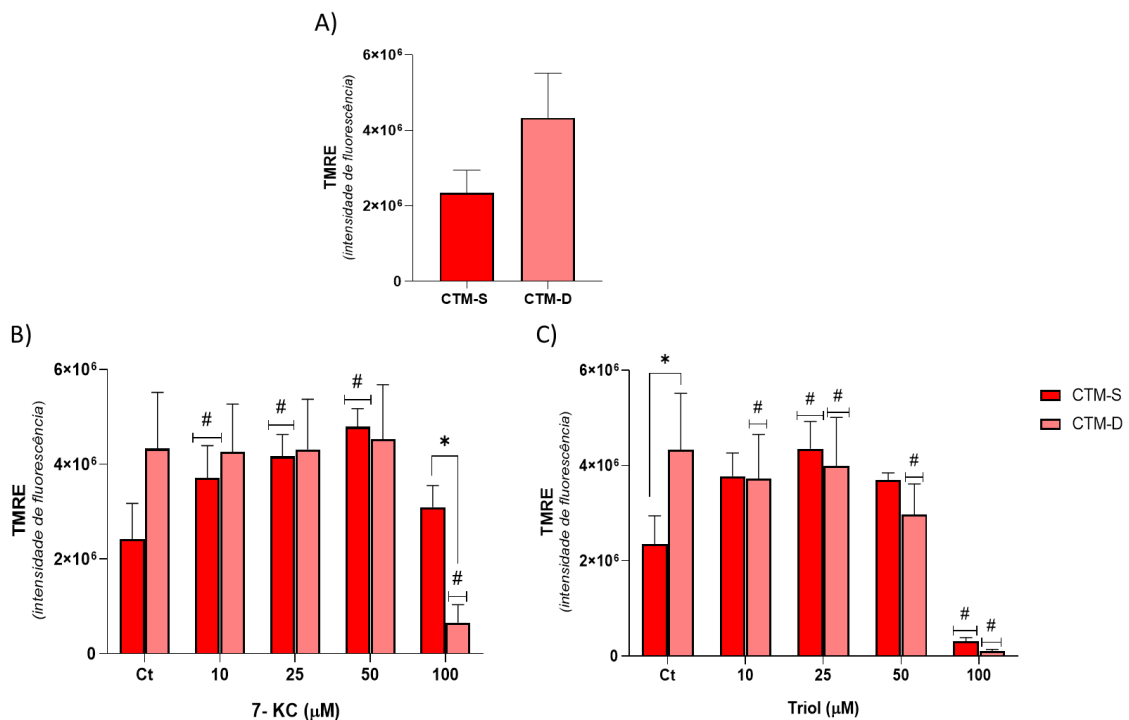
Por meio da análise de variância de dois fatores, foi observado diferença na intensidade de fluorescência do corante TMRE entre as concentrações de tratamento de 7-KC ($p = 0,0103$); com interação do tratamento com 7-KC nas linhagens de CTM-S e CTM-D ($p < 0,0001$). A diferença observada foi nas linhagens CTM-D quando comparado o controle cultivado em meio basal com a concentração de 100 μM de 7-KC ($p < 0,0001$).

Nas linhagens de CTM-S foi observado diferença na intensidade de fluorescência do TMRE do controle em relação aos tratamentos de 10 – 50 μM ($p < 0,0001$) de 7-KC. Sendo característico de hiperpolarização do potencial de membrana mitocondrial. Entre as linhagens

CTM-S e CTM-D, a intensidade de fluorescência do TMRE foi diferente na concentração de 100 μM ($p < 0,0001$), enquanto o potencial de membrana mitocondrial manteve estável nas linhagens de CTM-S, foi observado despolarização do potencial de membrana nas linhagens CTM-D figura 11B.

O tratamento com Triol também apresentou efeito no potencial de membrana mitocondrial em ambas as linhagens de CTMs, sendo que a resposta foi diferente entre as concentrações utilizadas ($p < 0,0001$). Nas linhagens de CTM-S a diferença na intensidade de fluorescência do corante TMRE foi entre a concentração de 100 μM e 25 μM ($p = 0,0315$) e 50 μM ($p = 0,0484$) de Triol. Nas linhagens de CTM-D a diferença observada foi entre o tratamento com 100 μM de Triol em relação ao controle cultivado em meio basal ($p = 0,0019$) e em relação as concentrações de 10 μM ($p = 0,0061$), 25 μM ($p = 0,0036$) e 50 μM ($p = 0,0294$), figura 11C.

Figura 11. Efeito do tratamento com 7-KC e Triol no potencial de membrana das mitocôndrias de CTMs.



Gráficos representando a intensidade de fluorescência do corante TMRE em CTMs. **A.** Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal por 24 horas. Comparação entre médias através do Teste T de Student ($p = 0,0830$). **B.** Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D tratadas com 7-KC por 24 horas. Comparação entre a variância das médias por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0103$; fator células: $p = 0,9724$; interação $p < 0,0001$. **C.** Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D tratadas com Triol por 24 horas. Comparação entre a variância das médias por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p < 0,0001$; fator células: $p = 0,5948$; interação: $p = 0,0738$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.5 Tratamento com 7-KC e Triol em CTM

Baseado nos resultados anteriores, foram escolhidas concentrações abaixo do CI_{50} para dar continuidade aos experimentos, tabela 3. Os CI_{50} foram diferentes entre as linhagens CTM-S e CTM-D, portanto foi optado por usar como referência para a realização dos experimentos, as concentrações abaixo do CI_{50} nas CTM-D, pois são inferiores quando comparado as CTM-S, mantendo a viabilidade celular para a realização dos demais experimentos. Dessa forma, para avaliar se as concentrações dos oxisteróis 7-KC e Triol promovem alguma alteração nas CTMs foi optado por realizar dois experimentos: o ensaio de MTT e o ciclo celular, em ambas as linhagens (CTM-S e CTM-D).

Tabela 3. Concentrações selecionadas de Triol e 7-KC

Colestane- 3 β ,5 α ,6 β -triol (Triol)	7-Cetocolesterol (7-KC)
CI_{50}: 55,0 μM	CI_{50}: 82,0 μM
40 μ M	70 μ M
30 μ M	50 μ M
20 μ M	30 μ M

4.5.1 Ensaio de MTT

O ensaio de MTT foi realizado com sete concentrações abaixo da concentração inibitória de 7-KC e de Triol, em ambas as linhagens de CTMs, tratadas por 24 horas. Este ensaio visa observar a metabolização do MTT em formazan por enzimas oxirredutases presentes na célula.

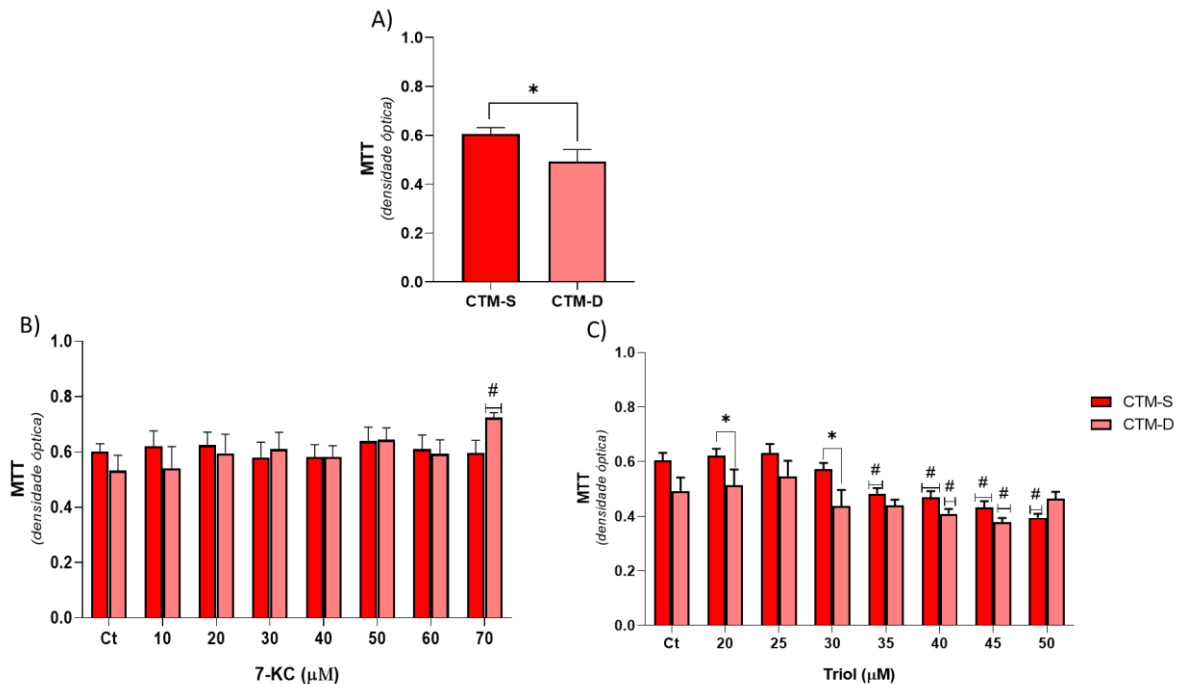
Inicialmente, foi realizado a comparação média da metabolização do MTT entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Por meio desta análise foi verificado que a metabolização do MTT foi maior nas CTM-S quando comparado as linhagens CTM-D ($p = 0,0292$), figura 12A.

O tratamento com 7-KC por 24 horas apresentou diferença na metabolização do MTT ($p = 0,0363$). Não houve diferenças entre as linhagens CTM-D e CTM-S ($p = 0,9701$), porém, houve interação entre tratamento com 7-KC e as CTMs ($p = 0,0136$). A diferença observada foi na linhagem CTM-D, foi no controle em relação a concentração de 70 μ M ($p = 0,0013$), figura 12B.

O tratamento com Triol apresentou diferença na metabolização do MTT ($p < 0,0001$), com diferenças entre as linhagens CTM-D e CTM-S ($p = 0,0208$), bem como, houve interação entre tratamento e as linhagens de CTMs ($p < 0,0001$). Nas linhagens de CTM-D a diferença

observada foi no controle cultivado em meio basal em relação a concentração de 40 μM ($p = 0,0057$) e 45 μM ($p < 0,0001$), em que ocorreu diminuição na metabolização do MTT. Nas linhagens de CTM-S a diferença foi entre o controle e as concentrações de 35 μM ($p < 0,0001$), 40 μM ($p < 0,0001$), 45 μM ($p < 0,0001$) e 50 μM ($p < 0,0001$), figura 12C.

Figura 12. Metabolização do MTT por CTMs tratadas com 7-KC e Triol.

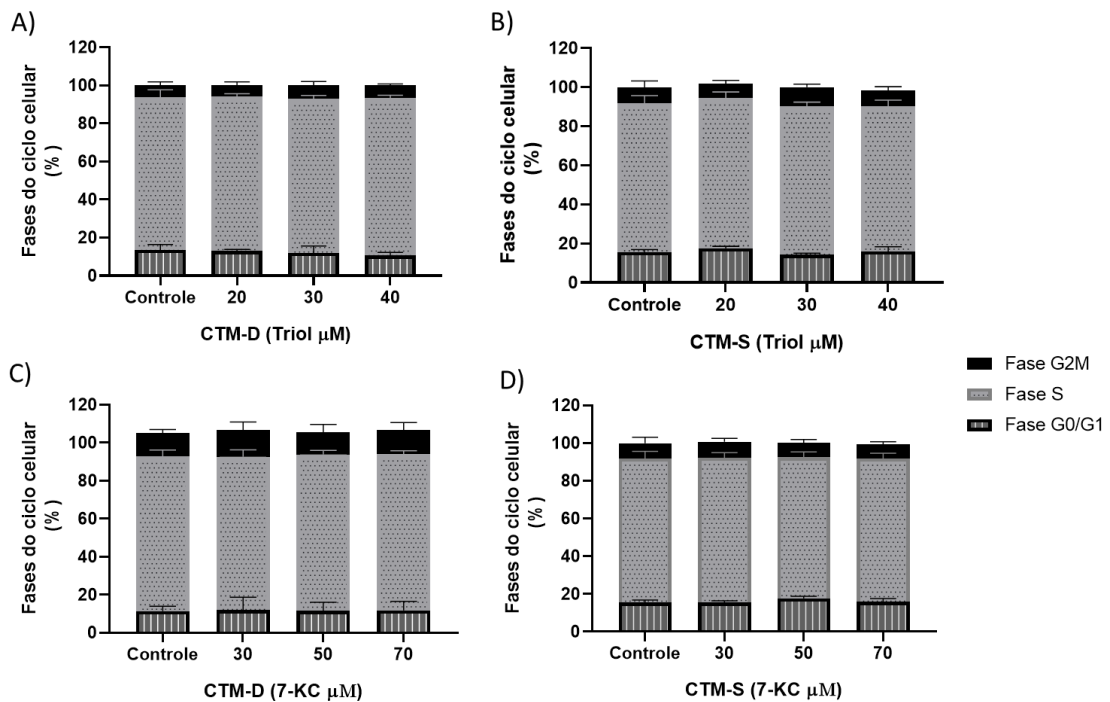


Gráficos representando, em densidade óptica, o metabolismo do MTT. **A.** Comparação do metabolismo do MTT entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,0292$). **B.** Gráfico representando, em densidade óptica, o metabolismo do MTT em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da variância média entre os grupos por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0363$; fator células: $p = 0,9701$; interação: $p = 0,0136$. **C.** Gráfico representando, em densidade óptica, o metabolismo do MTT em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-D e CTM-S através da variância média entre os grupos por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p < 0,0001$; fator células: $p = 0,0208$; interação: $p < 0,0001$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.5.2 Análise do ciclo celular

A análise do ciclo celular foi realizada com a finalidade de verificar se o tratamento no período de 24 horas com Triol e 7-KC, apresentavam efeito citostático nas CTM-S e CTM-D. Não foi observado nenhuma alteração no ciclo celular das CTMs tratadas com Triol e 7-KC, nas concentrações testadas, figura 13.

Figura 13. Efeito no ciclo celular do tratamento com 7-KC e Triol em CTMs.



4.6 Expressão gênica das proteínas ABC

Para escolher as proteínas ABCs utilizadas no estudo foi avaliada a expressão gênica de 44 proteínas pertencentes à família ABC. A linhagem CTM-D foi tratada com 20 μM de Triol e 25 μM de 7-KC por 24 horas, e foi verificado se essas concentrações apresentavam efeito na expressão gênica das proteínas ABCs quando comparado ao controle (células cultivadas em meio basal), figura 14A e figura 14B, respectivamente.

Dos genes pertencentes a família ABC-A, os genes *ABCA1*, *ABCA2*, *ABCA3*, *ABCA5* e *ABCA8* apresentaram alteração na expressão relativa tanto com o tratamento com Triol quanto com 7-KC; o gene *ABCA6* apresentou efeito apenas com o tratamento com 7-KC e o gene *ABCA7* apenas com Triol.

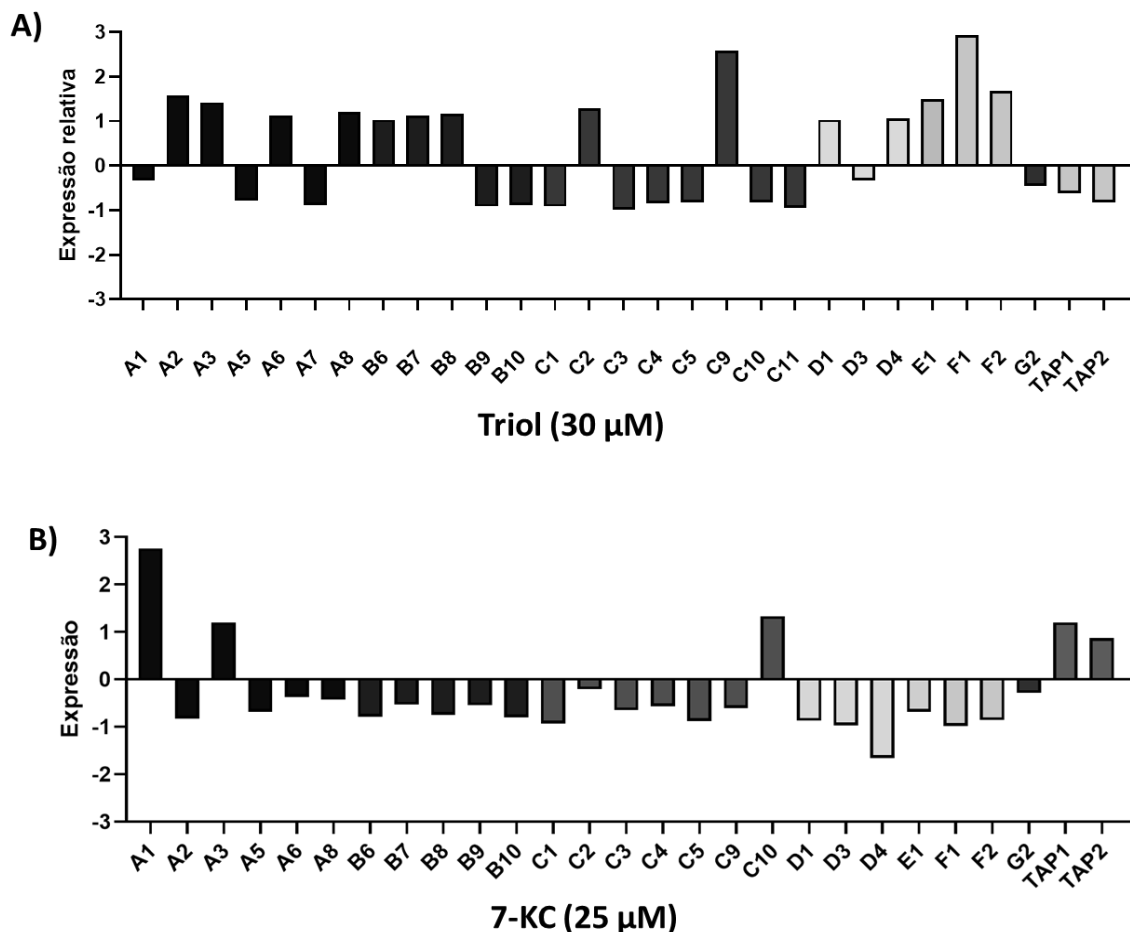
Dos genes pertencentes a família ABC-B, os genes *ABCB2*, *ABCB3*, *ABCB6*, *ABCB7*, *ABCB8*, *ABCB9* e *ABCB10* apresentaram diferença na expressão com o tratamento com 7-KC e com Triol. Em relação ao genes pertencentes a família ABC-C, os genes *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5*, *ABCC9*, *ABCC10* apresentaram diferença na expressão tanto no

tratamento com Triol quanto com 7-KC; o gene *ABCC11* apresentou diferença apenas com Triol.

Dos genes pertencentes a família ABC-D, o genes *ABCD1*, *ABCD3* e *ABCD4* apresentaram diferença na expressão após o tratamento com ambos os oxisteróis. Dos genes pertencentes a família E e F, os genes *ABCE1*, *ABCF1*, *ABCF2* apresentaram diferença na expressão após o tratamento com ambos os oxisteróis. Dos genes pertencentes a Família G, o gene *ABCG2* apresentou diferença na expressão após o tratamento com ambos os oxisteróis.

Em seguida, foram escolhidas 5 proteínas ABCs para serem avaliadas neste trabalho: ABC-A1, ABC-C1, ABC-C2, ABC-D4, ABC-G1 e ABC-G2, que apresentaram alteração na expressão gênica relativa com as concentrações tratadas de Triol e 7-KC.

Figura 14. Expressão relativa das proteínas ABCs em CTM-D tratadas com Triol e 7-KC.

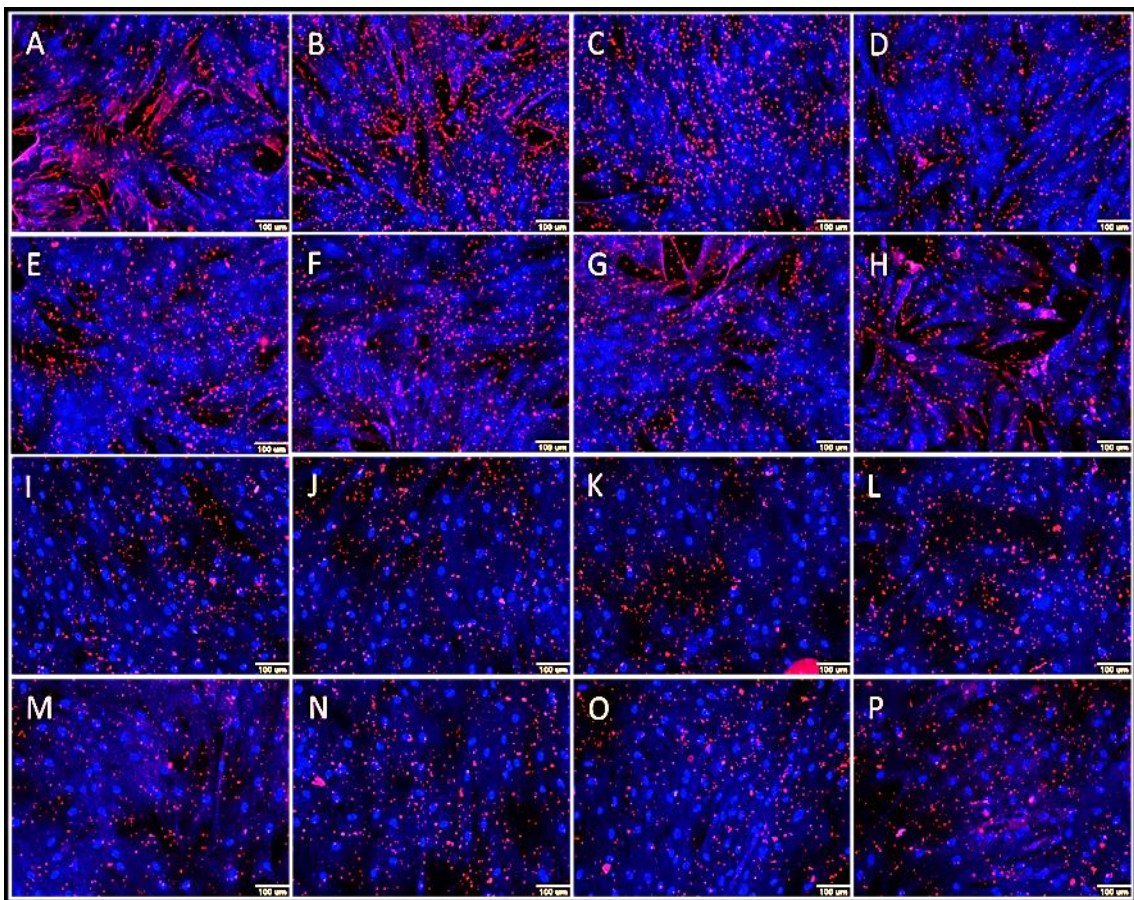


Gráficos representando a expressão gênica relativa das proteínas ABCs em CTM-D. **A:** Expressão gênica das proteínas ABCs em CTM-D tratadas com 20 µM de Triol por 24 horas. **B:** Expressão gênica das proteínas ABCs em CTM-D tratadas com 25 µM de 7-KC por 24 horas. Fonte: A autora.

4.7 Análise da proteína ABC-A1

A proteína ABC-A1 foi quantificada por imunofluorescência indireta nas linhagens de CTM-S e CTM-D tratadas com os oxisteróis 7-KC e Triol por um período de 24 horas. A ABC-A1 é uma proteína transmembranar, sendo possível observá-la na forma de pontos, na coloração em vermelho, presente nas bordas da membrana plasmática celular, delimitado pela cor azul claro, figura 15.

Figura 15. Efeito do tratamento com 7-KC e Triol na proteína ABC-A1 de linhagens de CTM-S e CTM-D.



Fotomicrografia representativa da marcação da proteína ABC-A1 (TRICT – vermelho) em uma linhagem de CTM-S (A–H) e de CTM-D (I–P) tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. **A)** CTM-S cultivada em meio basal; **B)** CTM-S cultivada com 30 μM de 7-KC; **C)** CTM-S cultivada com 50 μM de 7-KC; **D)** CTM-S cultivada com 70 μM de 7-KC; **E)** CTM-S cultivada em meio basal; **F)** CTM-S cultivada com 20 μM de Triol; **G)** CTM-S cultivada com 30 μM de Triol; **H)** CTM-S cultivada com 40 μM de Triol; **I)** CTM-D cultivada em meio basal; **J)** CTM-D cultivada com 30 μM de 7-KC; **K)** CTM-D cultivada com 50 μM de 7-KC; **L)** CTM-D cultivada com 70 μM de 7-KC; **M)** CTM-D cultivada em meio basal; **N)** CTM-S cultivada com 20 μM de Triol; **O)** CTM-D cultivada com 30 μM de Triol; **P)** CTM-D cultivada com 40 μM de Triol. Núcleos marcados com *Hoechst 33342* (DAPI – azul). Delineamento celular com *CellMask Blue* (DAPI-azul claro). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 10 X – escala igual a 100 μm . Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

Por meio da avaliação visual é possível perceber diferenças na intensidade de fluorescência entre a linhagem CTM-S (figuras 15A e 15E) e a linhagem CTM-D (figuras 15I e 15M). Além disso, nas linhagens CTM-S tratadas com 30 μ M de 7-KC (figura 15B) e com 50 μ M de 7-KC (figura 15C) a intensidade de fluorescência foi maior, sendo possível visualizar aumento da marcação da proteína ABC-A1 nas bordas da membrana plasmática.

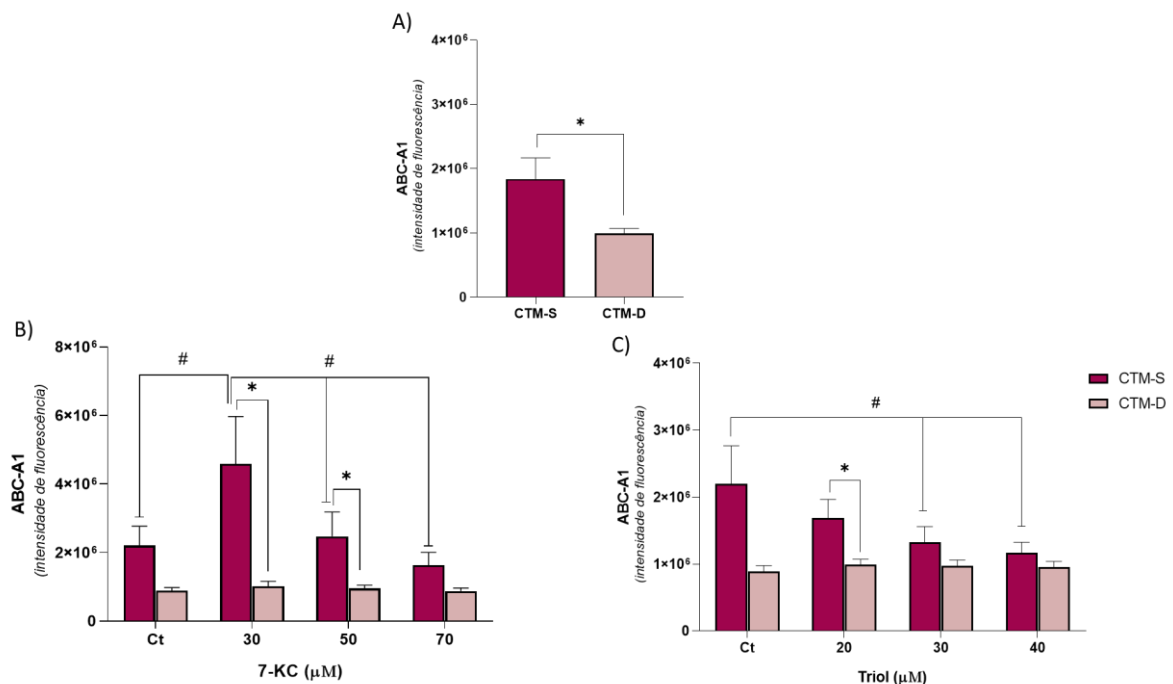
Baseados na intensidade de fluorescência da proteína ABC-A1, foi analisado a comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Dessa avaliação foi observado que em linhagens CTM-S a quantidade da proteína ABC-A1 é maior quando comparado as linhagens de CTM-D ($p = 0,0084$), figura 16A.

A análise do efeito do tratamento com 7-KC demonstrou que há diferença na quantidade da proteína ABC-A1 nas CTMs ($p = 0,0008$), entre as linhagens ($p = 0,0018$); e que há interação entre o tratamento com 7-KC e o tipo de resposta nas linhagens de CTMs ($p = 0,0148$), figura 16B.

Essa diferença na resposta quanto a quantidade da proteína ABC-A1 foi observada nas linhagens de CTM-S, em que o tratamento com a concentração de 30 μ M de 7-KC aumentou a proteína ABC-A1 em relação ao controle cultivado em meio basal ($p = 0,0098$). A intensidade de fluorescência da proteína ABC-A1 nas concentrações de 50 μ M e 70 μ M de 7-KC foram similares ao controle cultivado em meio basal ($p > 0,0500$), no entanto, diferentes quando comparado a concentração de 30 μ M de 7-KC ($p = 0,0399$ e $p = 0,0004$). Quanto a resposta ao tratamento entre as linhagens de CTM-S e CTM-D, foi observado que na concentração de 30 μ M e 50 μ M de 7-KC houve aumento da proteína ABC-A1 nas linhagens de CTM-S, enquanto nas linhagens de CTM-D não houve diferença ($p < 0,0500$). Além disso, com as concentrações testadas de 7-KC, nas linhagens de CTM-D não foi observado efeito na proteína ABC-A1, figura 16B.

O tratamento com o oxisterol Triol diminuiu a quantidade da proteína ABC-A1 ($p = 0,0107$), sendo que foi observado diferença entre as linhagens de CTMs ($p = 0,0319$), bem como interação entre linhagem de CTM e o tratamento ($p = 0,0029$). As diferenças observadas foram nas linhagens de CTM-S, em que ocorreu diminuição na proteína ABC-A1 nas concentrações tratadas com 30 μ M ($p = 0,0039$) e 40 μ M ($p = 0,0006$) de Triol quando comparadas ao controle cultivado em meio basal. Na concentração de 20 μ M de Triol foi observado diferença entre as linhagens CTM-S e CTM-D, em que houve aumento da proteína ABC-A1 nas linhagens de CTM-S em relação as linhagens de CTM-D ($p = 0,0279$). O tratamento com Triol não apresentou efeito na proteína ABC-A1 em linhagens de CTM-D ($p > 0,0500$), figura 16C.

Figura 16. Análise do tratamento com 7-KC e Triol na quantidade da proteína ABC-A1 em linhagens de CTM-S e CTM-D.



Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína ABC-A1. **A.** Comparação da proteína ABC-A1 entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de Student ($p = 0,0084$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína ABC-A1 em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0088$; fator células: $p = 0,0183$; interação: $p = 0,0148$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína ABC-A1 em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0107$; fator células: $p = 0,0319$; interação: $p = 0,0029$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.8 Análise das proteínas ABC-C1 e ABC-C2

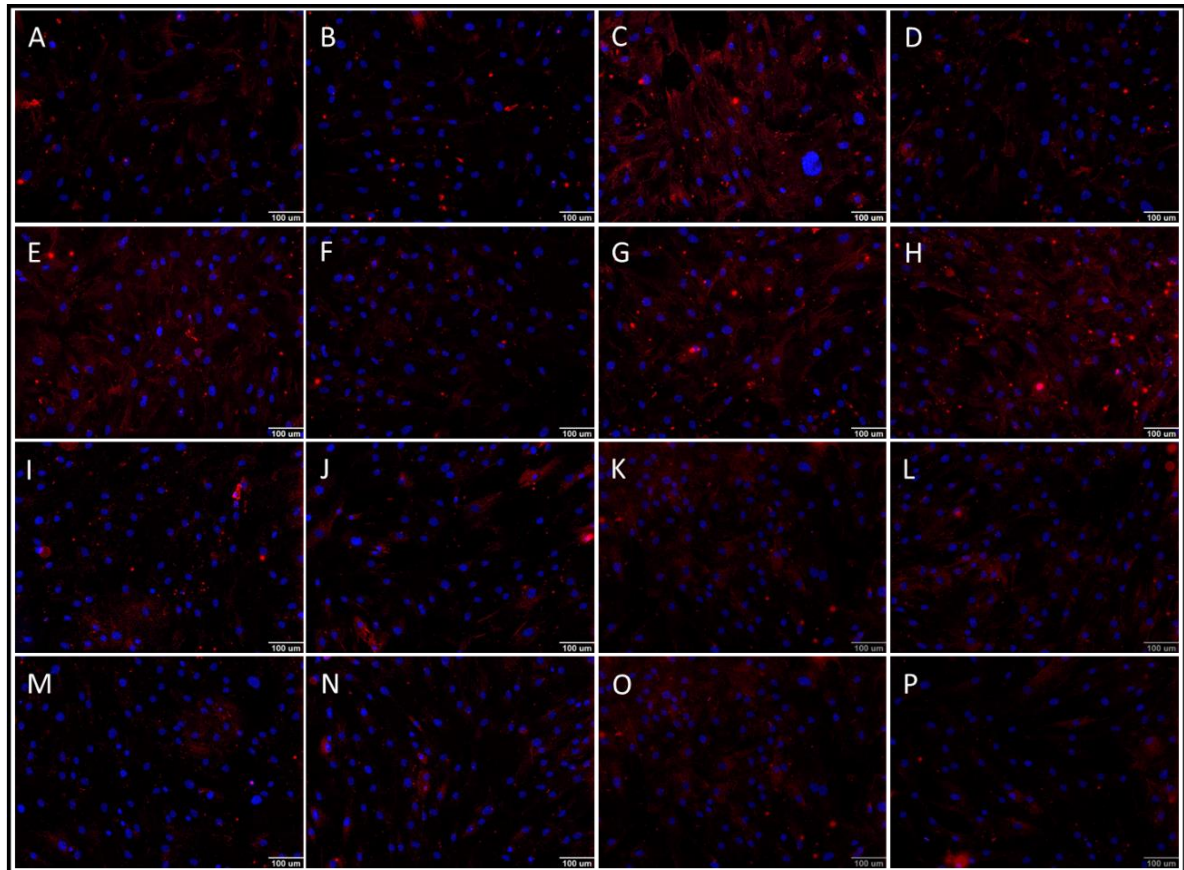
As proteínas ABC-C1 e ABC-C2 foram avaliadas por meio da técnica de imunofluorescência indireta em ambas as linhagens de CTMs tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. No entanto, não foram encontradas essas proteínas nas linhagens de CTM-S e de CTM-D.

4.9 Análise da proteína ABC-G1

A proteína ABC-G1 foi avaliada por meio da técnica de imunofluorescência indireta em ambas as linhagens de CTMs tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. A ABC-G1

é uma proteína transmembranar, sendo possível observá-la na cor vermelha, em padrão de marcação difuso na célula, figura 17.

Figura 17. Efeito do tratamento com 7-KC e Triol na proteína ABC-G1 de linhagens de CTM-S e CTM-D.

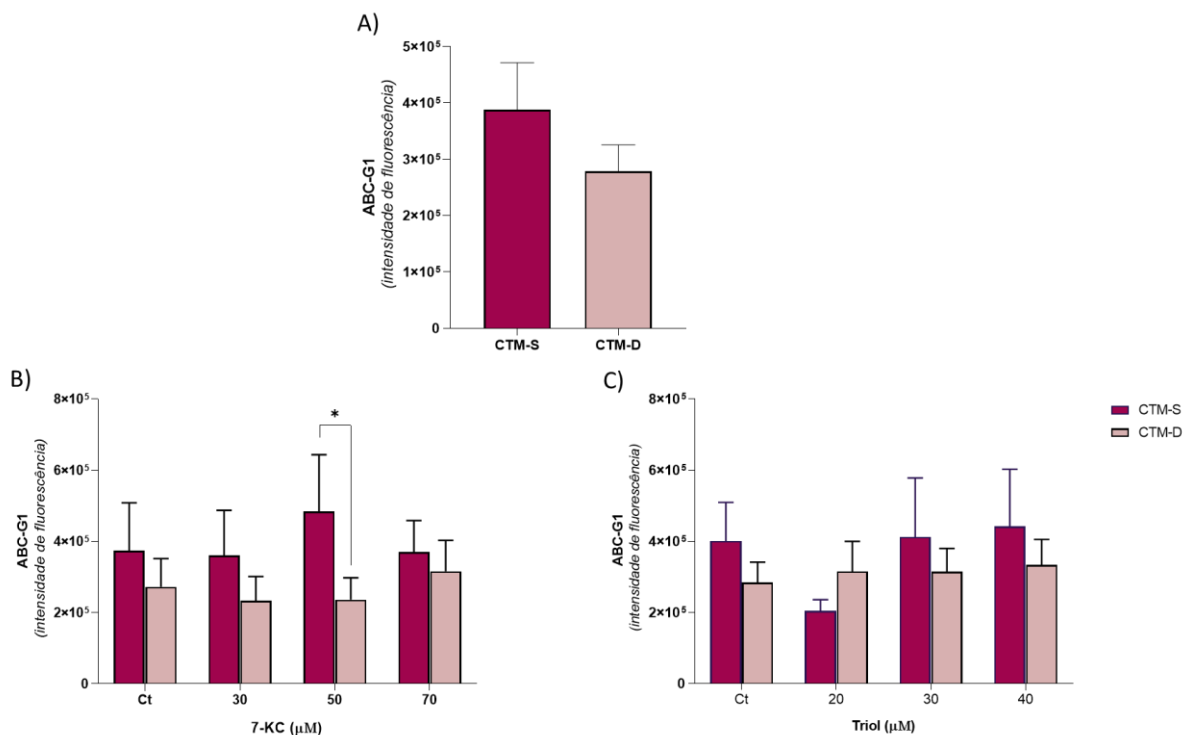


Fotomicrografia representativa da marcação da proteína ABC-G1 (TRICT – vermelho) em uma linhagem de CTM-S (A–H) e de CTM-D (I–P) tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. **A)** CTM-S cultivada em meio basal; **B)** CTM-S cultivada com 30 µM de 7-KC; **C)** CTM-S cultivada com 50 µM de 7-KC; **D)** CTM-S cultivada com 70 µM de 7-KC; **E)** CTM-S cultivada em meio basal; **F)** CTM-S cultivada com 20 µM de Triol; **G)** CTM-S cultivada com 30 µM de Triol; **H)** CTM-S cultivada com 40 µM de Triol; **I)** CTM-D cultivada em meio basal; **J)** CTM-D cultivada com 30 µM de 7-KC; **K)** CTM-D cultivada com 50 µM de 7-KC; **L)** CTM-D cultivada com 70 µM de 7-KC; **M)** CTM-D cultivada em meio basal; **N)** CTM-S cultivada com 20 µM de Triol; **O)** CTM-D cultivada com 30 µM de Triol; **P)** CTM-D cultivada com 40 µM de Triol. Núcleos marcados com *Hoechst 33342* (DAPI – azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 10 X - escala igual a 100 µm. Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

Foi analisado a quantidade da proteína ABC-G1 entre as linhagens CTM-S e CTM-D, bem como, em ambas as linhagens tratadas com 7-KC e Triol por 24 horas. Neste trabalho, a quantidade média da proteína ABC-G1 não foi diferente entre as linhagens CTM-S e CTM-D ($p = 0,1324$), figura 18A. No entanto, o tratamento com o oxisterol 7-KC demonstrou que há interação entre o tipo de linhagem de CTM e a concentração de 7-KC ($p = 0,0251$), sendo que

a diferença observada foi na concentração de 50 μM de 7-KC, em que houve aumento da proteína ABC-G1 nas linhagens de CTM-S em relação as linhagens de CTM-D ($p = 0,0002$), figura 18B. Ademais, não foi observado diferença significativa nas linhagens de CTMs tratadas com o oxisterol Triol após período de 24 horas ($p = 0,3853$), em nenhuma das concentrações testadas, figura 18C.

Figura 18. Análise do tratamento com 7-KC e Triol na proteína ABC-G1 de linhagens de CTM-S e CTM-D.



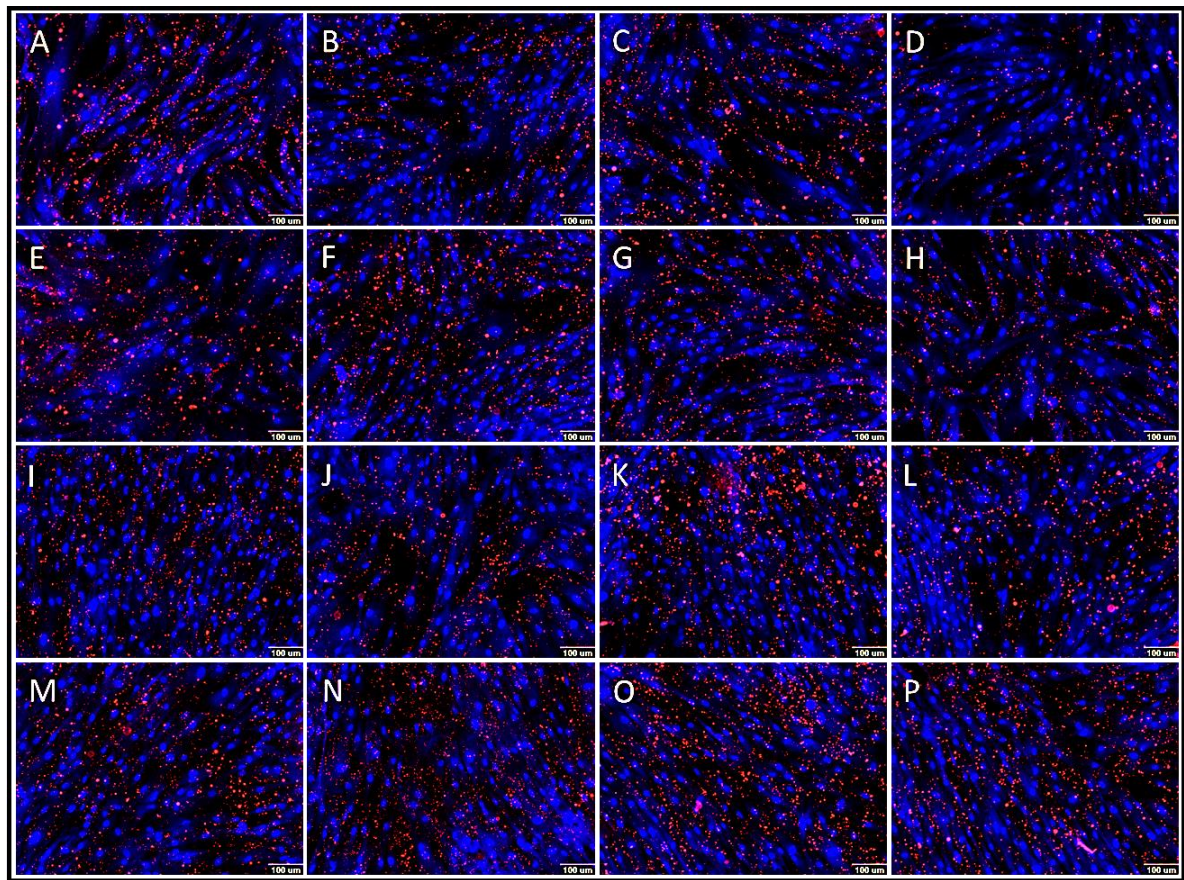
Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína ABC-G1. **A.** Comparação da proteína ABC-G1 entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de Student ($p = 0,1324$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína ABC-G1 em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,4240$; fator células: $p = 0,3542$; interação: $p = 0,0251$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína ABC-G1 em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,3853$; fator células: $p = 0,6680$; interação: $p = 0,1260$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: Autora.

4.10 Análise da proteína ABC-G2

A proteína ABC-G2 foi avaliada por meio da técnica de imunofluorescência indireta em ambas as linhagens de CTMs tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. A proteína

ABC-G2 está localizada na membrana plasmática, sendo possível observá-la por meio da marcação em cor vermelha e em formato de pontos, nas bordas das células, delimitadas pela cor azul claro, figura 19. A intensidade de fluorescência da cor vermelha é proporcional a quantidade de proteína ABC-G2 nas linhagens de CTM-S e de CTM-D.

Figura 19. Efeito do tratamento com 7-KC e Triol na proteína ABC-G2 em linhagens de CTM-S e CTM-D.

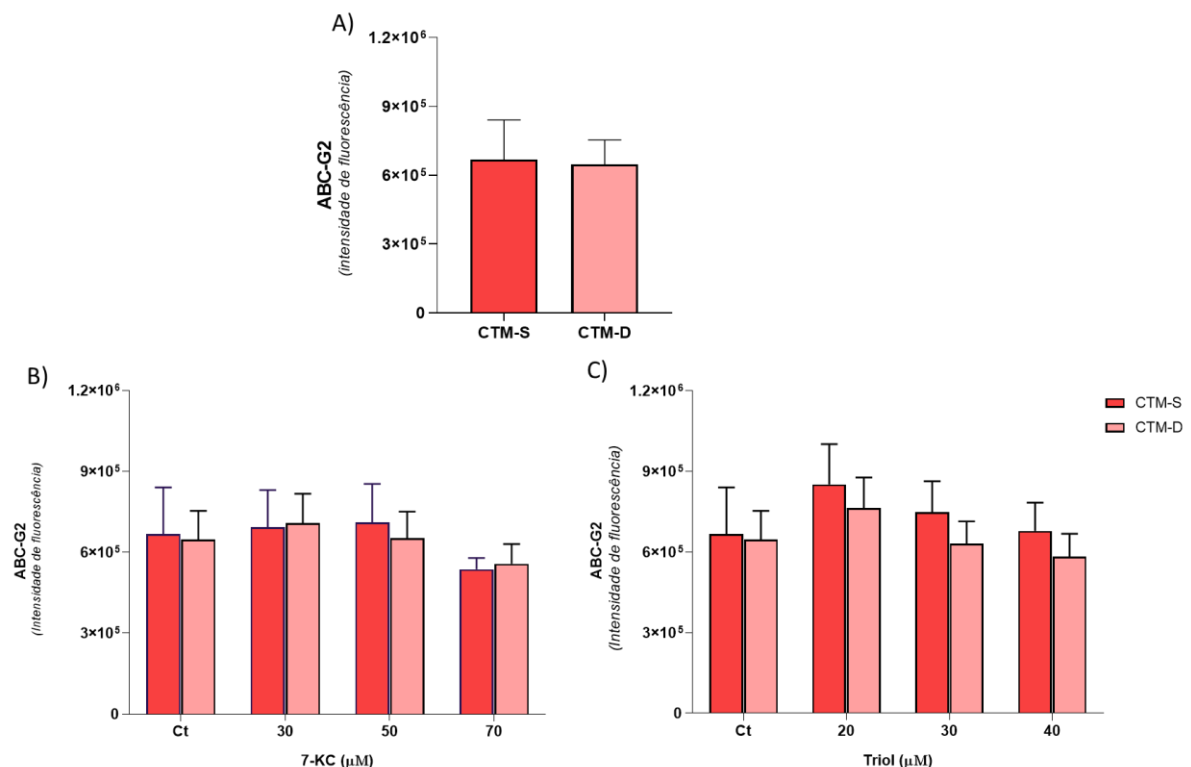


Fotomicrografia representativa da marcação da proteína transmembranar ABC-G2 (TRICT – vermelho) em linhagem de CTM-S (A–H) e de CTM-D (I–P) tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. **A)** CTM-S cultivada em meio basal; **B)** CTM-S cultivada com 30 μM de 7-KC; **C)** CTM-S cultivada com 50 μM de 7-KC; **D)** CTM-S cultivada com 70 μM de 7-KC; **E)** CTM-S cultivada em meio basal; **F)** CTM-S cultivada com 20 μM de Triol; **G)** CTM-S cultivada com 30 μM de Triol; **H)** CTM-S cultivada com 40 μM de Triol; **I)** CTM-D cultivada em meio basal; **J)** CTM-D cultivada com 30 μM de 7-KC; **K)** CTM-D cultivada com 50 μM de 7-KC; **L)** CTM-D cultivada com 70 μM de 7-KC; **M)** CTM-D cultivada em meio basal; **N)** CTM-D cultivada com 20 μM de Triol; **O)** CTM-D cultivada com 30 μM de Triol; **P)** CTM-D cultivada com 40 μM de Triol. Núcleos marcados com *Hoechst* 33342 (DAPI – azul). Delineamento celular em azul por meio da utilização do corante CellMask™ Blue. Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 10 X – escala igual a 100 μm . Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

Por meio da análise de dados, foi comparado a quantidade da proteína ABC-G2 entre as linhagens CTM-S e CTM-D, bem como após o tratamento com os oxisteróis 7-KC e Triol por

24 horas. A concentração de proteína ABC-G2 entre as linhagens CTM-S e CTM-D foi similar ($p = 0,4609$), figura 20A. Na análise de variância global, o tratamento com 7-KC apresentou diferença significativa diminuindo a concentração de ABC-G2 em ambas as linhagens, CTM-S e CTM-D, na concentração de 70 μM de 7-KC ($p = 0,0116$). No entanto, na comparação entre pares ou *pós-hoc* por meio do teste de Tukey não foi observado diferença significativa ($p > 0,0500$), figura 20B. O tratamento com Triol não apresentou diferença significativa na quantidade da proteína ABC-G2 nas linhagens de CTMs avaliadas, em nenhuma das concentrações testadas ($p = 0,1575$), figuras 20C.

Figura 20. Análise do tratamento com 7-KC e Triol na proteína ABC-G2 em linhagens de CTM-S e CTM-D.

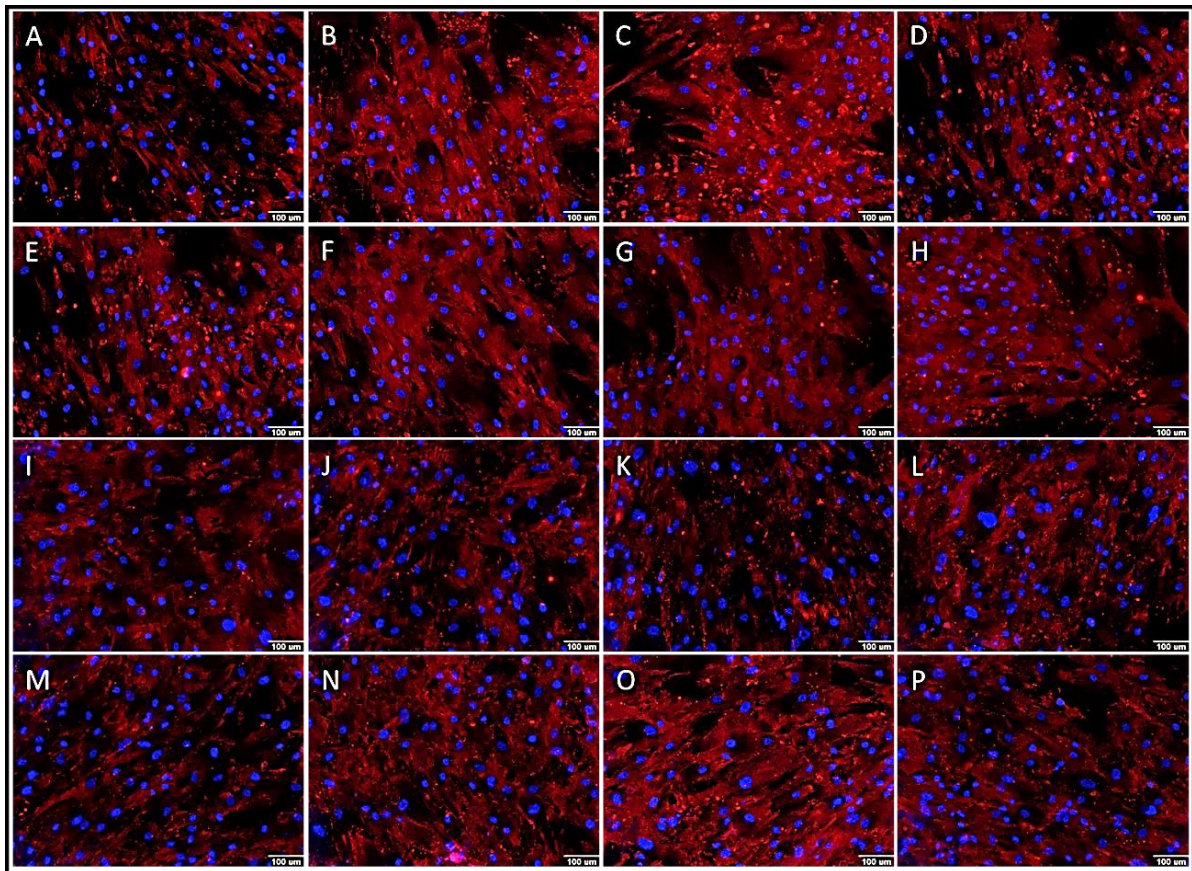


Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a proteína ABC-G2. **A.** Comparação da quantidade da proteína ABC-G2 entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de Student ($p = 0,4609$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína ABC-G2 em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0116$; fator células: $p = 0,9616$; interação: $p = 0,9151$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína ABC-G2 em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,1575$; fator células: $p = 0,6541$; interação: $p = 0,9448$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.11 Análise da proteína LRP

Por meio da técnica de imunofluorescência indireta, foi avaliado a quantidade da proteína LRP entre linhagens de CTM-S e de CTM-D, e, após o tratamento com os oxisteróis 7-KC e Triol por um período de 24 horas. A seguir são apresentadas as fotomicrografias obtidas uma linhagem representativa de CTM-S e de CTM-D para marcação da proteína LRP tratadas com 7-KC e com Triol, figura 21.

Figura 21. Proteína LRP em CTMs tratadas com 7-KC e com Triol.



Fotomicrografia representativa da marcação da proteína transmembranar LRP (TRICT – vermelho) em linhagem de CTM-S (A–H) e de CTM-D (I–P) tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. **A)** CTM-S cultivada em meio basal; **B)** CTM-S cultivada com 30 μ M de 7-KC; **C)** CTM-S cultivada com 50 μ M de 7-KC; **D)** CTM-S cultivada com 70 μ M de 7-KC; **E)** CTM-S cultivada em meio basal; **F)** CTM-S cultivada com 20 μ M de Triol; **G)** CTM-S cultivada com 30 μ M de Triol; **H)** CTM-S cultivada com 40 μ M de Triol; **I)** CTM-D cultivada em meio basal; **J)** CTM-D cultivada com 30 μ M de 7-KC; **K)** CTM-D cultivada com 50 μ M de 7-KC; **L)** CTM-D cultivada com 70 μ M de 7-KC; **M)** CTM-D cultivada em meio basal; **N)** CTM-S cultivada com 20 μ M de Triol; **O)** CTM-D cultivada com 30 μ M de Triol; **P)** CTM-D cultivada com 40 μ M de Triol. Núcleos marcados com *Hoechst 33342* (DAPI – azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 10 X – escala igual a 100 μ m. Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

A marcação da proteína LRP apresenta um padrão reticular denso, na cor vermelha, espalhada pelo citoplasma e no núcleo das células. Também é possível observá-la em forma de

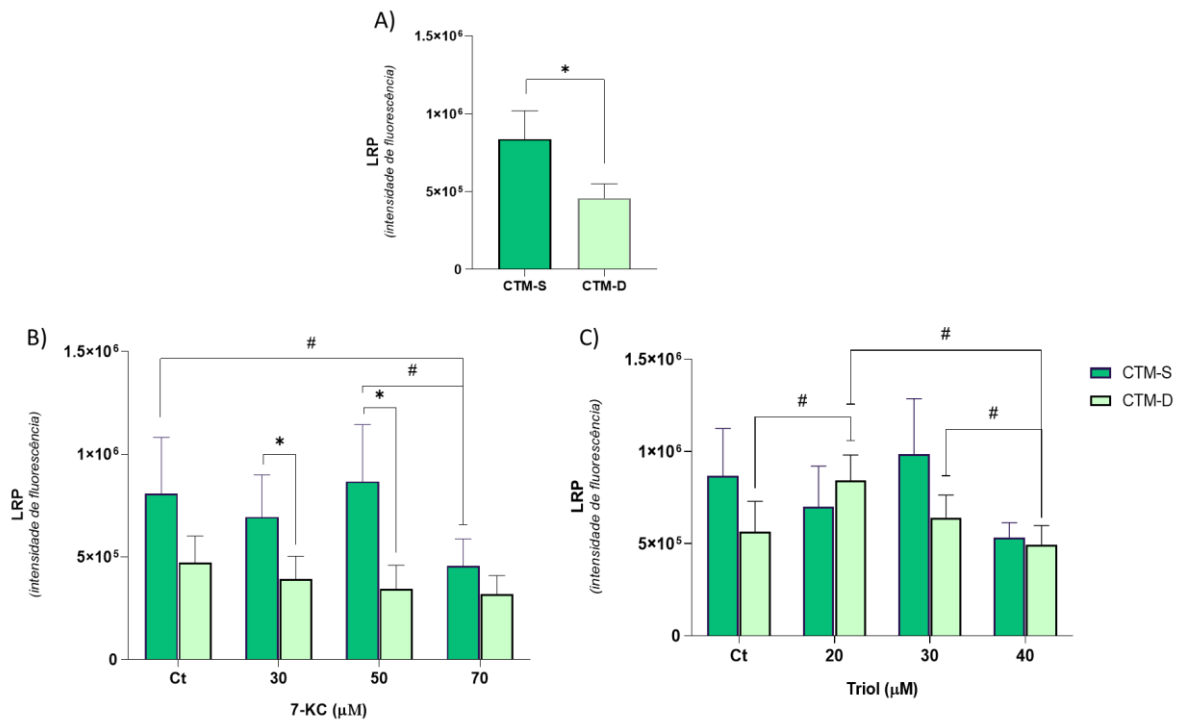
pontos. Por meio da avaliação visual é observado que a intensidade de fluorescência da proteína LRP é diferente entre os controles cultivados em meio basal, figuras 21A, 21E, 21I e 21M. Além disso, tanto o tratamento com 7-KC quanto com Triol alteram o padrão de marcação da proteína LRP, figura 21.

Após a análise estatística, foi observado que a concentração de LRP é maior em linhagens CTM-S quando comparado as linhagens CTM-D ($p = 0,0356$), figura 22A.

O tratamento com 7-KC apresentou efeito na quantidade da proteína LRP ($p = 0,0023$), bem como, houve interação entre o tratamento e o tipo de linhagem de CTM ($p = 0,0284$). Dessa forma, foi observado que o tratamento com 7-KC manteve a concentração da proteína LRP constante entre os grupos das linhagens de CTM-D ($p > 0,0500$). Por outro lado, nas linhagens de CTM-S o tratamento com 70 μM de 7-KC diminuiu a concentração de LRP quando comparado ao tratamento de 50 μM de 7-KC ($p = 0,0013$) e ao controle cultivado em meio basal ($p = 0,0068$). Na comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D, foi observado diferença nas concentrações de 30 μM ($p = 0,0248$) e 50 μM ($p < 0,0001$) de 7-KC, figura 22B.

O tratamento com o oxisterol Triol apresentou efeito na quantidade da proteína LRP nas linhagens de CTMs avaliadas ($p = 0,0241$), sendo que o efeito foi diferente entre as linhagens CTM-S e CTM-D ($p = 0,0138$). Sendo assim, por meio da análise de variância de um fator nas linhagens CTM-S o efeito do oxisterol Triol na quantidade da proteína LRP foi limítrofe, devido a elevada amplitude dos resultados ($p = 0,0950$). Por outro lado, nas linhagens de CTM-D, o tratamento com 20 μM de Triol aumentou a quantidade da proteína LRP quando comparado ao controle cultivado em meio basal ($p = 0,0493$), sendo este, o maior aumento da proteína LRP observado nas linhagens CTM-D. As demais concentrações de Triol, 30 μM ($p = 0,0779$) e 40 μM ($p = 0,0005$), apresentaram diminuição da proteína LRP quando comparada a concentração de 20 μM ; e mantendo-se similar ao controle ($p > 0,0500$), figura 22C.

Figura 22. Análise do tratamento com 7-KC e Triol na proteína LRP de linhagens de CTM-S e CTM-D.



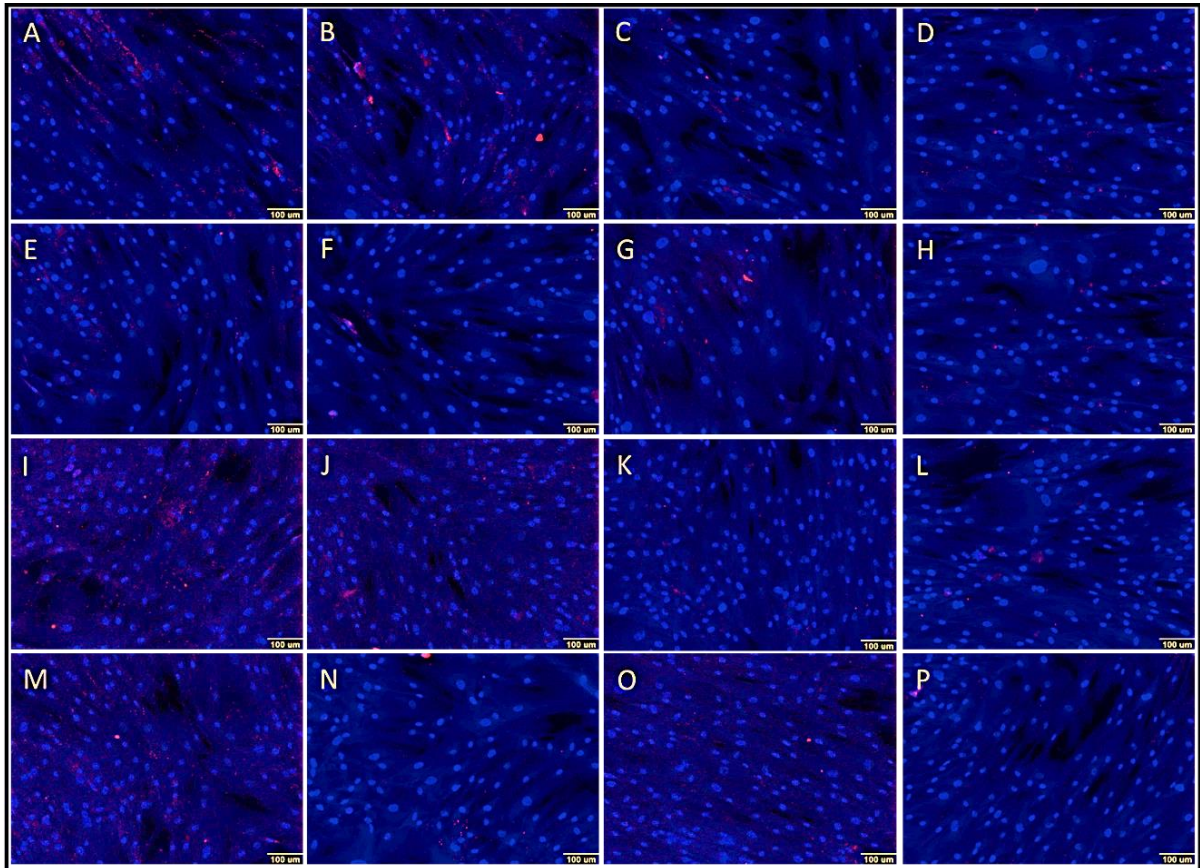
Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína LRP. **A.** Comparação da quantidade da proteína LRP entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,0356$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína LRP em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0116$; fator células: $p = 0,9616$; interação: $p = 0,9151$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína LRP em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0241$; fator células: $p = 0,3478$; interação: $p = 0,0138$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as da linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.12 Análise dos receptores LXR- α e LXR- β

Neste trabalho, foi avaliado os receptores nucleares LXR- α e LXR- β , por imunofluorescência indireta, nas linhagens de CTMs tratadas com 7-KC e Triol por 24 horas.

O receptor LXR- α encontra-se localizado no citoplasma e no núcleo das CTMs, sendo possível observá-lo em forma de pontos, na cor vermelha, figura 23. Por meio da avaliação visual é possível observar aumento da intensidade de fluorescência nos controles cultivados em meio basal das linhagens de CTM-D (figuras 23I e 23M).

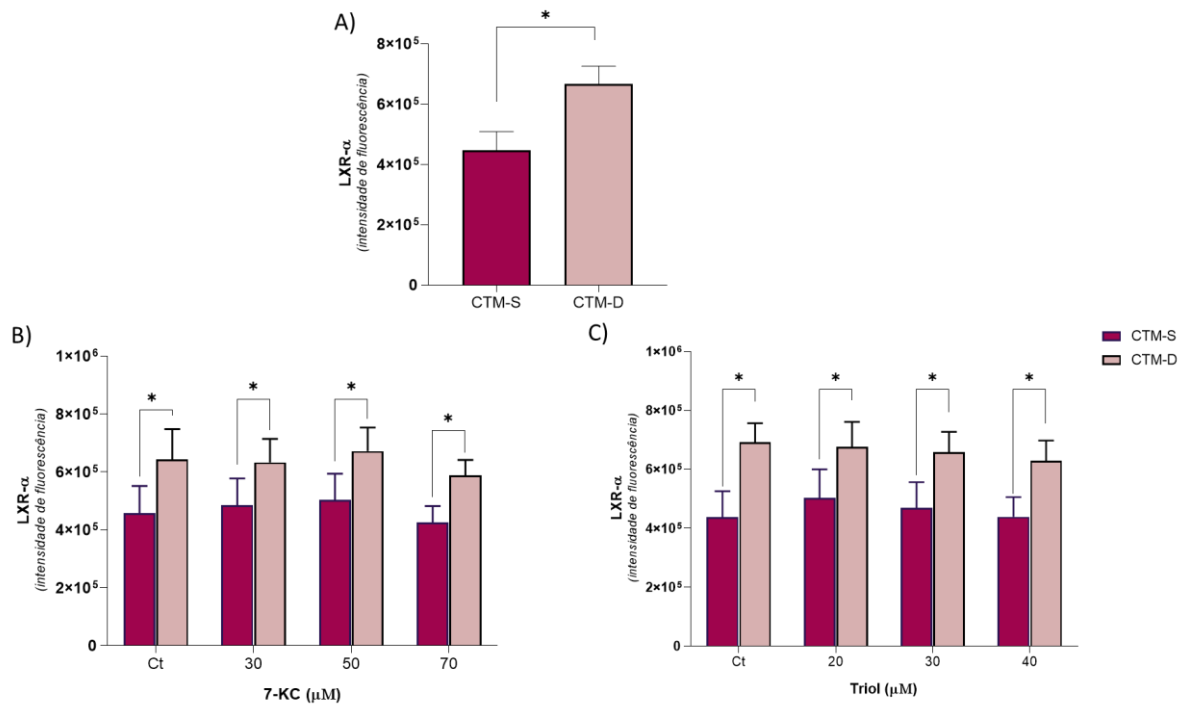
Figura 23. Receptor LXR- α em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



Fotomicrografia representativa da marcação do receptor LXR- α (TRICT – vermelho) em linhagem de CTM-S (A–H) e de CTM-D (I–P) tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. A) CTM-S cultivada em meio basal; B) CTM-S cultivada com 30 μ M de 7-KC; C) CTM-S cultivada com 50 μ M de 7-KC; D) CTM-S cultivada com 70 μ M de 7-KC; E) CTM-S cultivada em meio basal; F) CTM-S cultivada com 20 μ M de Triol; G) CTM-S cultivada com 30 μ M de Triol; H) CTM-S cultivada com 40 μ M de Triol; I) CTM-D cultivada em meio basal; J) CTM-D cultivada com 30 μ M de 7-KC; K) CTM-D cultivada com 50 μ M de 7-KC; L) CTM-D cultivada com 70 μ M de 7-KC; M) CTM-D cultivada em meio basal; N) CTM-D cultivada com 20 μ M de Triol; O) CTM-D cultivada com 30 μ M de Triol; P) CTM-D cultivada com 40 μ M de Triol. Núcleos marcados com *Hoechst* 33342 (DAPI – azul). Delineamento celular marcado com *CellMask*TM Blue. Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 10 X – escala igual a 100 μ m. Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

Após a análise estatística, foi observado que há diferença na quantidade proteica do receptor LXR- α , sendo que, em linhagens CTM-S a intensidade de fluorescência para a marcação do LXR- α foi menor quando comparado as linhagens CTM-D ($p = 0,0086$), figura 24A. Tanto o tratamento com 7-KC ($p = 0,2207$) quanto com Triol ($p = 0,0804$) não apresentou efeito significativo na quantidade do receptor LXR- α e/ou interação do tratamento com as linhagens de CTMs ($p > 0,0500$). As diferenças observadas foram apenas entre as linhagens de CTM-S e CTM-D independente do grupo de tratamento com 7-KC ($p = 0,0192$) ou Triol ($p = 0,0128$), figuras 24B e 24C.

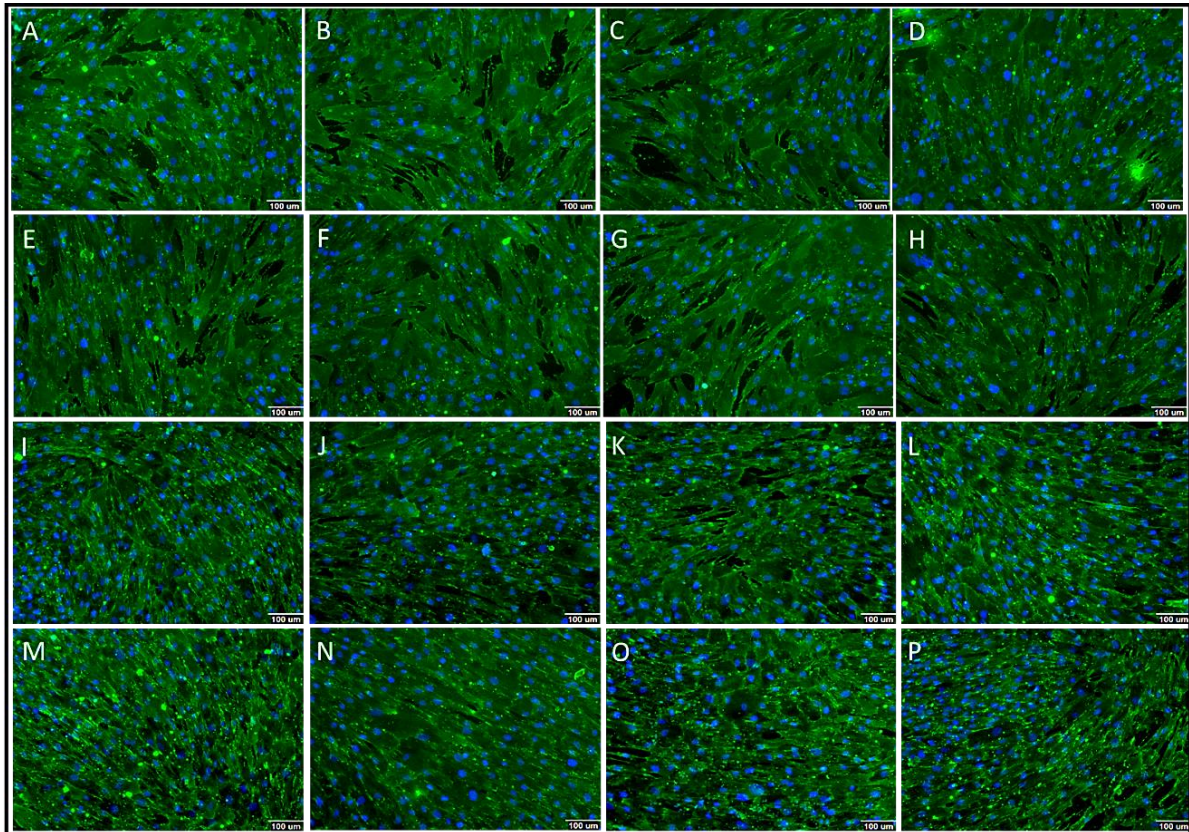
Figura 24. Análise do receptor LXR- α de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade do receptor LXR- α . **A.** Comparação da quantidade do receptor LXR- α entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,0086$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade do receptor LXR- α em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,2207$; fator células: $p = 0,0192$; interação: $p = 0,7605$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade do receptor LXR- α em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0804$; fator células: $p = 0,0128$; interação: $p = 0,1930$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: Autora.

O receptor LXR- β está presente no citoplasma e no núcleo das CTMs, por meio das fotomicrografias é observado a marcação do receptor LXR- β , na cor verde, figura 25.

Figura 25. Receptor LXR- β em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



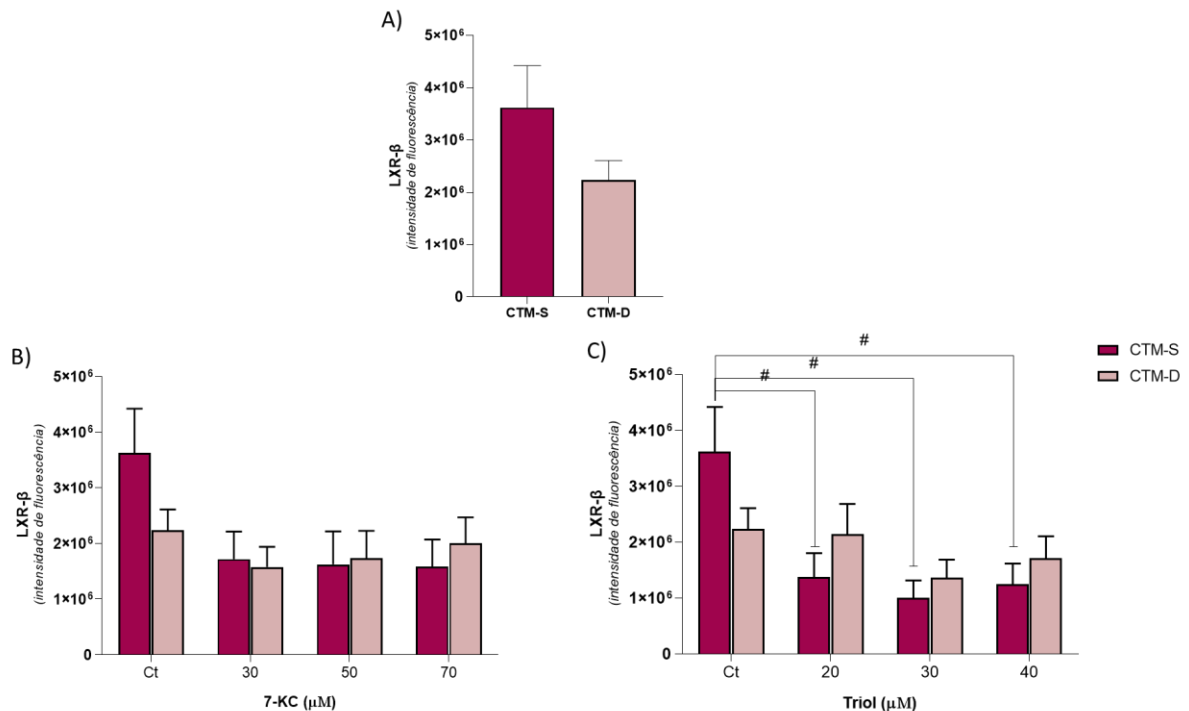
Fotomicrografia representativa da marcação do receptor LXR- β (FITC – verde) em linhagem de CTM-S (A–H) e de CTM-D (I–P) tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. **A)** CTM-S cultivada em meio basal; **B)** CTM-S cultivada com 30 μ M de 7-KC; **C)** CTM-S cultivada com 50 μ M de 7-KC; **D)** CTM-S cultivada com 70 μ M de 7-KC; **E)** CTM-S cultivada em meio basal; **F)** CTM-S cultivada com 20 μ M de Triol; **G)** CTM-S cultivada com 30 μ M de Triol; **H)** CTM-S cultivada com 40 μ M de Triol; **I)** CTM-D cultivada em meio basal; **J)** CTM-D cultivada com 30 μ M de 7-KC; **K)** CTM-D cultivada com 50 μ M de 7-KC; **L)** CTM-D cultivada com 70 μ M de 7-KC; **M)** CTM-D cultivada em meio basal; **N)** CTM-D cultivada com 20 μ M de Triol; **O)** CTM-D cultivada com 30 μ M de Triol; **P)** CTM-D cultivada com 40 μ M de Triol. Núcleos marcados com *Hoechst* 33342 (DAPI – azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 10 X – escala igual a 100 μ m. Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

Referente a análise estatística da quantidade do receptor LXR- β , não foi observado diferença significativa entre as linhagens de CTM-S e CTM-D ($p = 0,0737$), figura 26A. Embora o tratamento com 7-KC por 24 horas tenha diminuído a quantidade do receptor LXR- β em ambos os grupos de CTMs, essa alteração não foi significativa, sendo limítrofe ($p = 0,0750$), figura 26B.

Por outro lado, o tratamento com o oxisterol Triol diminuiu a concentração do receptor LXR- β ($p = 0,0125$) e apresentou interação entre o tipo de linhagem de CTM e a resposta ao tratamento ($p = 0,0450$). Essas diferenças observadas foram nas linhagens de CTM-S, em que nas concentrações de 20 μ M ($p = 0,0120$), 30 μ M ($p = 0,0032$) e 40 μ M ($p = 0,0075$) de Triol

a quantidade proteica do receptor LXR- β diminuiu em relação ao controle cultivado em meio basal. Não foi observado diferença entre as linhagens de CTMs ($p = 0,8680$), figura 26C.

Figura 26. Análise do receptor LXR- β de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



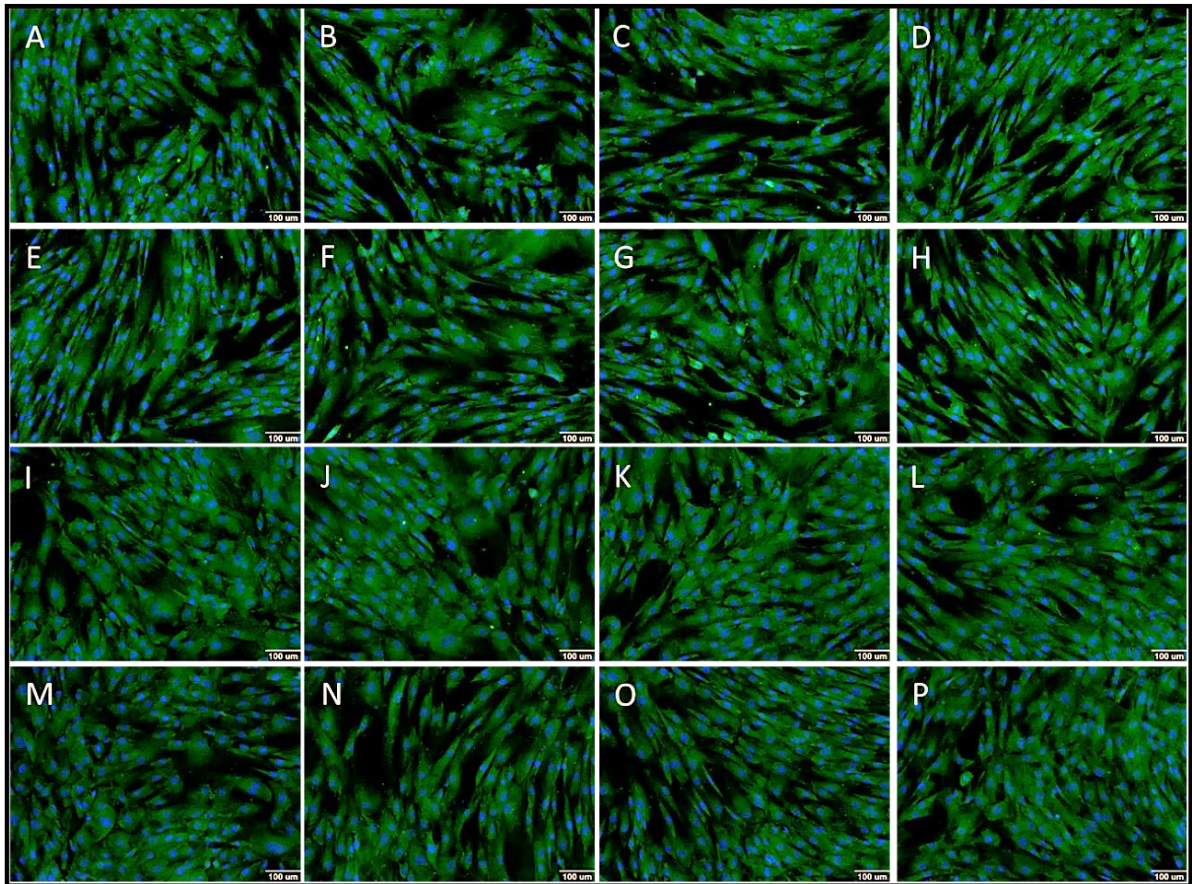
Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade do receptor LXR- β . **A.** Comparação da quantidade do receptor LXR- β entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,0737$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade do receptor LXR- β em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0750$; fator células: $p = 0,3375$; interação: $p = 0,1935$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade do receptor LXR- β em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0125$; fator células: $p = 0,8680$; interação: $p = 0,0450$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: Autora.

4.13 Análise do receptor PPAR- γ

Neste trabalho, foi avaliado o receptor nuclear PPAR- γ , por imunofluorescência indireta, nas linhagens de CTM-S e CTM-D tratadas com 7-KC e Triol por 24 horas.

Por meio da avaliação visual das fotomicrografias é possível observar a marcação do receptor PPAR- γ , em padrão pontilhado na cor verde, espalhado pelo citoplasma e no núcleo das CTMs, figura 27.

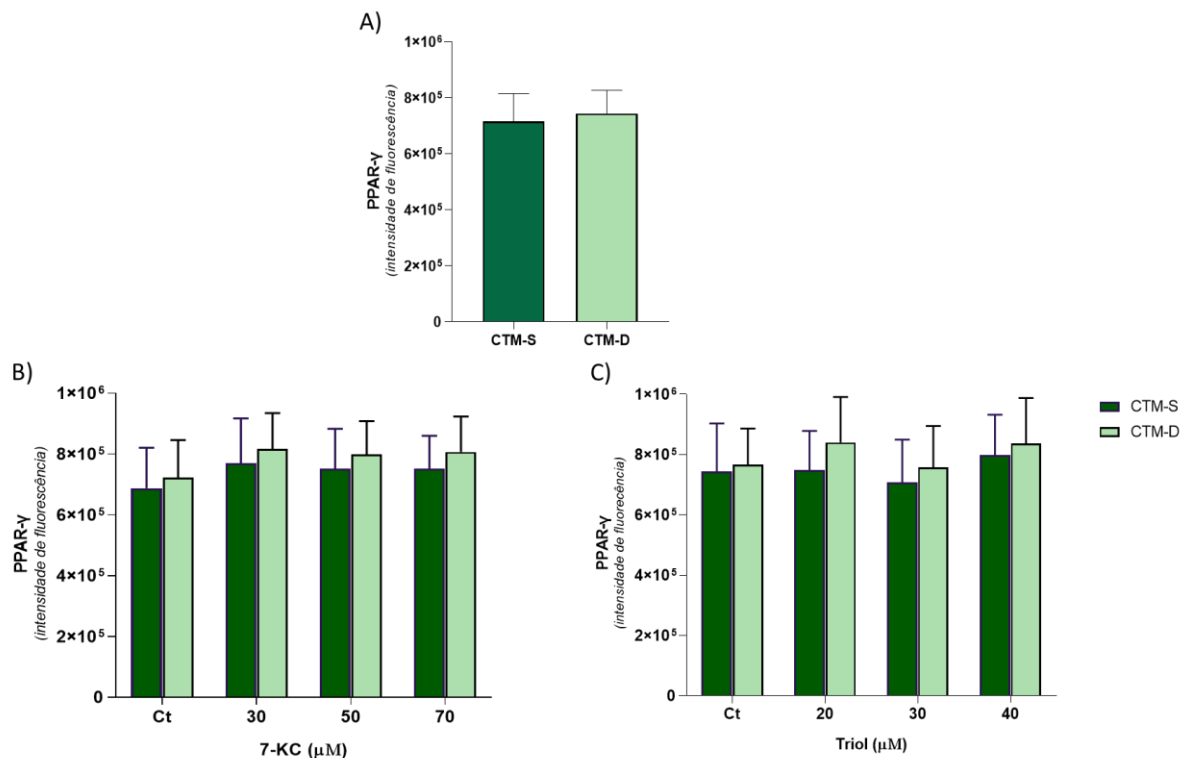
Figura 27. Receptor PPAR- γ em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



Fotomicrografia representativa da marcação do receptor PPAR- γ (FITC – verde) em uma linhagem de CTM-S (A–H) e de CTM-D (I–P) tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. A) CTM-S cultivada em meio basal; B) CTM-S cultivada com 30 μ M de 7-KC; C) CTM-S cultivada com 50 μ M de 7-KC; D) CTM-S cultivada com 70 μ M de 7-KC; E) CTM-S cultivada em meio basal; F) CTM-S cultivada com 20 μ M de Triol; G) CTM-S cultivada com 30 μ M de Triol; H) CTM-S cultivada com 40 μ M de Triol; I) CTM-D cultivada em meio basal; J) CTM-D cultivada com 30 μ M de 7-KC; K) CTM-D cultivada com 50 μ M de 7-KC; L) CTM-D cultivada com 70 μ M de 7-KC; M) CTM-D cultivada em meio basal; N) CTM-S cultivada com 20 μ M de Triol; O) CTM-D cultivada com 30 μ M de Triol; P) CTM-D cultivada com 40 μ M de Triol. Núcleos marcados com *Hoechst 33342* (DAPI – azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 10 X – escala igual a 100 μ m. Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

Foi analisado a quantidade do receptor PPAR- γ em ambas as linhagens de CTMs tratadas com 7-KC e Triol por 24 horas. A quantidade do receptor PPAR- γ foi semelhante entre as linhagens de CTM-S e CTM-D ($p = 0,4154$), figura 28A. Além disso, não foi observado diferença significativa do receptor PPAR- γ nas CTMs tratadas com 7-KC ($p = 0,0509$) ou com Triol ($p = 0,0540$), embora na análise de dados o valor da probabilidade tenha sido limítrofe, figuras 28B e 28C, respectivamente.

Figura 28. Análise da quantificação do receptor PPAR- γ em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



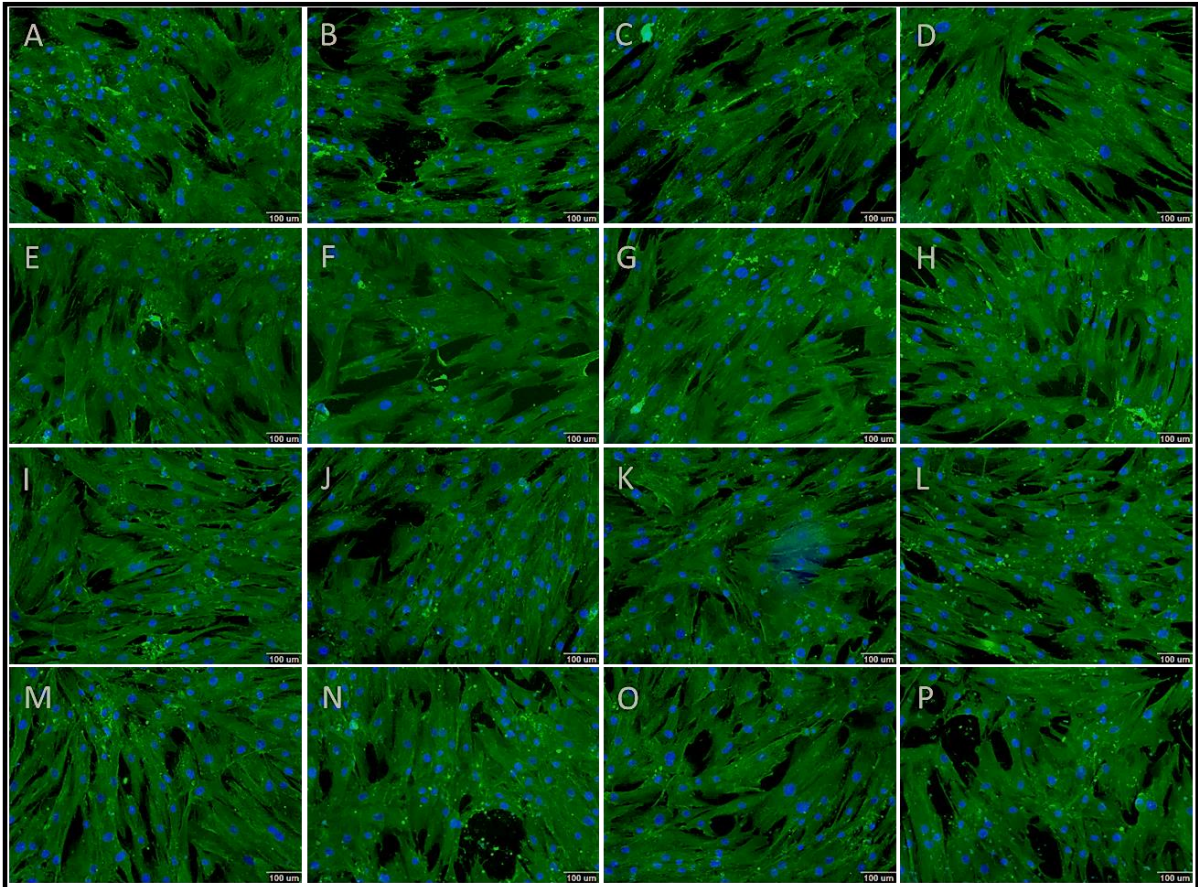
Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade do receptor PPAR- γ . **A.** Comparação da quantidade do receptor PPAR- γ entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,4154$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade do receptor PPAR- γ em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0509$; fator células: $p = 0,7718$; interação: $p = 0,9910$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade do receptor PPAR- γ em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0540$; fator células: $p = 0,7782$; interação: $p = 0,7779$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.14 Análise da proteína caveolina-1

Neste trabalho, foi avaliado a quantidade da proteína caveolina-1, por imunofluorescência indireta, nas linhagens de CTM-S e CTM-D tratadas com 7-KC e Triol por 24 horas. A caveolina-1 está localizada na membrana plasmática, pode estar presente no complexo de Golgi, bem como, nas vesículas denominadas cavéolas.

Por meio da avaliação visual nas fotomicrografias é possível observar a marcação da proteína caveolina-1, na coloração verde, em padrão difuso no citoplasma e na membrana plasmáticas das células, figura 29.

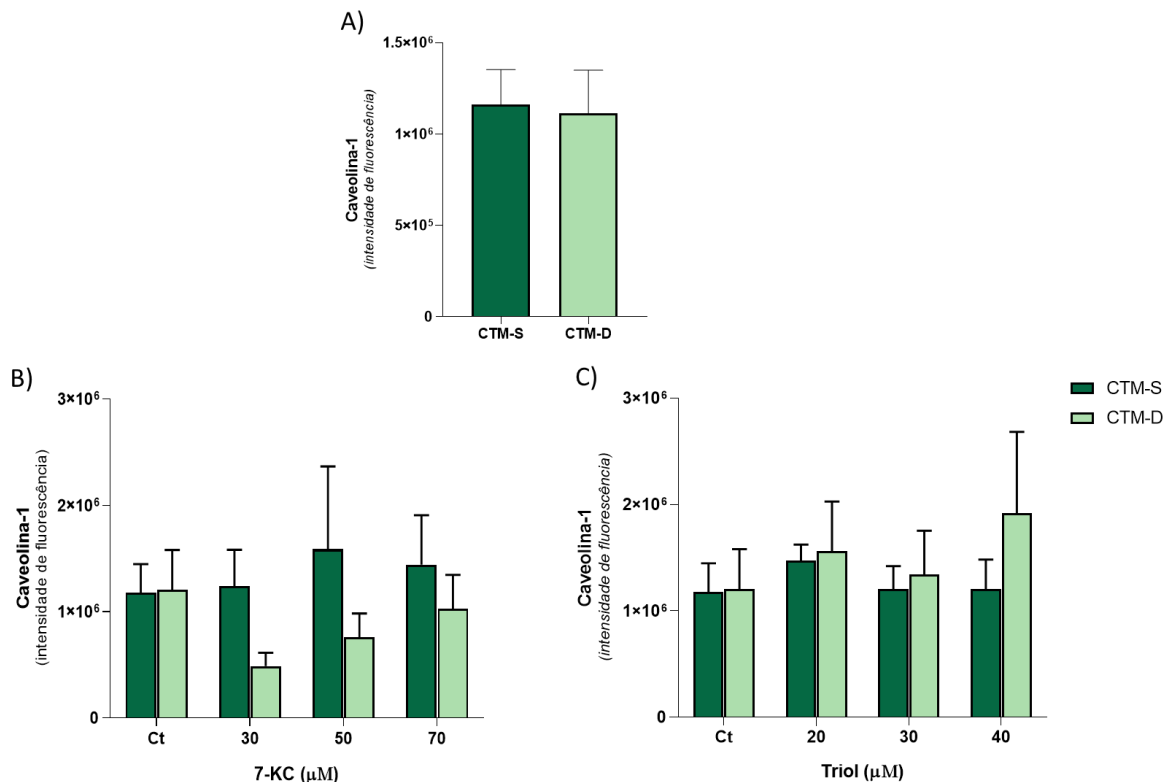
Figura 29. Proteína caveolina-1 em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



Fotomicrografia representativa da marcação da proteína caveolina-1 (FITC – verde) em linhagem de CTM-S (A–H) e de CTM-D (I–P) tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. **A)** CTM-S cultivada em meio basal; **B)** CTM-S cultivada com 30 µM de 7-KC; **C)** CTM-S cultivada com 50 µM de 7-KC; **D)** CTM-S cultivada com 70 µM de 7-KC; **E)** CTM-S cultivada em meio basal; **F)** CTM-S cultivada com 20 µM de Triol; **G)** CTM-S cultivada com 30 µM de Triol; **H)** CTM-S cultivada com 40 µM de Triol; **I)** CTM-D cultivada em meio basal; **J)** CTM-D cultivada com 30 µM de 7-KC; **K)** CTM-D cultivada com 50 µM de 7-KC; **L)** CTM-D cultivada com 70 µM de 7-KC; **M)** CTM-D cultivada em meio basal; **N)** CTM-D cultivada com 20 µM de Triol; **O)** CTM-D cultivada com 30 µM de Triol; **P)** CTM-D cultivada com 40 µM de Triol. Núcleos marcados com *Hoechst 33342* (DAPI – azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 10 X – escala igual a 100 µm. Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

Por meio da análise estatística foi observado que a quantidade da proteína caveolina-1 foi semelhante entre as linhagens de CTM-S e CTM-D ($p = 0,4391$), figura 30A. Embora seja possível observar diferença na quantidade média da proteína caveolina-1 nas linhagens de CTMs tratadas com 7-KC e com Triol, na análise de variância nenhum dos tratamentos apresentou efeito significativo ($p > 0,0500$), devido a ampla dispersão dos resultados obtidos, figuras 30B e 30C, respectivamente.

Figura 30. Análise da proteína caveolina-1 de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



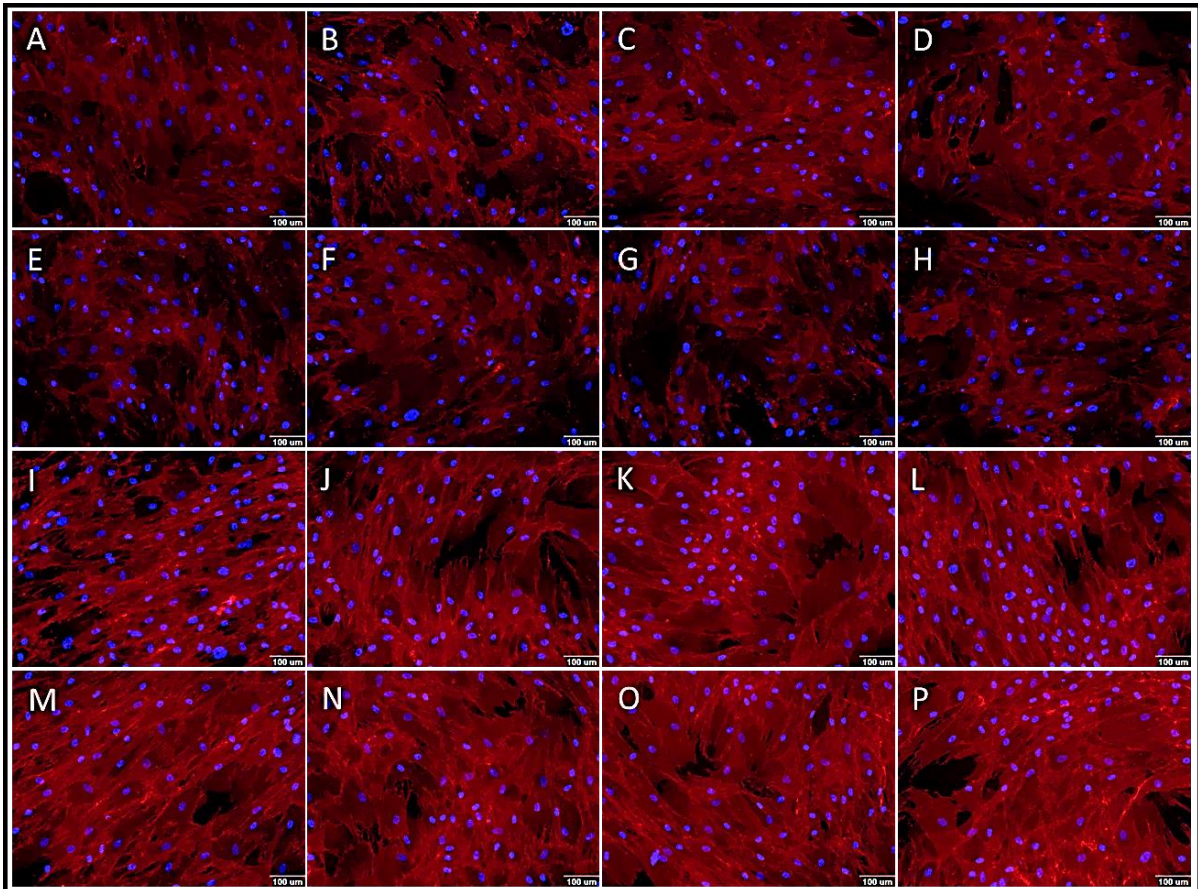
Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína caveolina-1. **A.** Comparação da quantidade da proteína caveolina-1 entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,4391$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína caveolina-1 em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,7886$; fator células: $p = 0,0958$; interação: $p = 0,7112$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína caveolina-1 em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,2449$; fator células: $p = 0,6665$; interação: $p = 0,5480$. Fonte: A autora.

4.15 Análise do receptor CD147

O receptor CD147 é um correceptor da proteína ABC-G2. Sendo assim, foi comparado, por meio da técnica de imunofluorescência indireta, a quantidade do receptor CD147 entre as linhagens de CTM-S e de CTM-D; e após o tratamento com 7-KC e Triol por 24 horas.

O receptor CD147 é uma proteína transmembranar presente na membrana plasmática. Por meio da avaliação visual das fotomicrografias é possível observar a marcação, em vermelho, do receptor transmembranar CD147, em um padrão contínuo espalhado por toda a membrana das CTMs, figura 31. Além disso, nas fotomicrografias, a intensidade de fluorescência do receptor CD147 é maior na linhagem de CTM-D quando comparado a linhagem de CTM-S, figura 31.

Figura 31. Receptor CD147 de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



Fotomicrografia representativa da marcação do receptor transmembranar CD147 (TRICT – vermelho) em linhagem de CTM-S (A–H) e de CTM-D (I–P) tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. **A)** CTM-S cultivada em meio basal; **B)** CTM-S cultivada com 30 μM de 7-KC; **C)** CTM-S cultivada com 50 μM de 7-KC; **D)** CTM-S cultivada com 70 μM de 7-KC; **E)** CTM-S cultivada em meio basal; **F)** CTM-S cultivada com 20 μM de Triol; **G)** CTM-S cultivada com 30 μM de Triol; **H)** CTM-S cultivada com 40 μM de Triol; **I)** CTM-D cultivada em meio basal; **J)** CTM-D cultivada com 30 μM de 7-KC; **K)** CTM-D cultivada com 50 μM de 7-KC; **L)** CTM-D cultivada com 70 μM de 7-KC; **M)** CTM-D cultivada em meio basal; **N)** CTM-D cultivada com 20 μM de Triol; **O)** CTM-D cultivada com 30 μM de Triol; **P)** CTM-D cultivada com 40 μM de Triol. Núcleos marcados com *Hoechst* 33342 (DAPI – azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 10 X – escala igual a 100 μm . Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

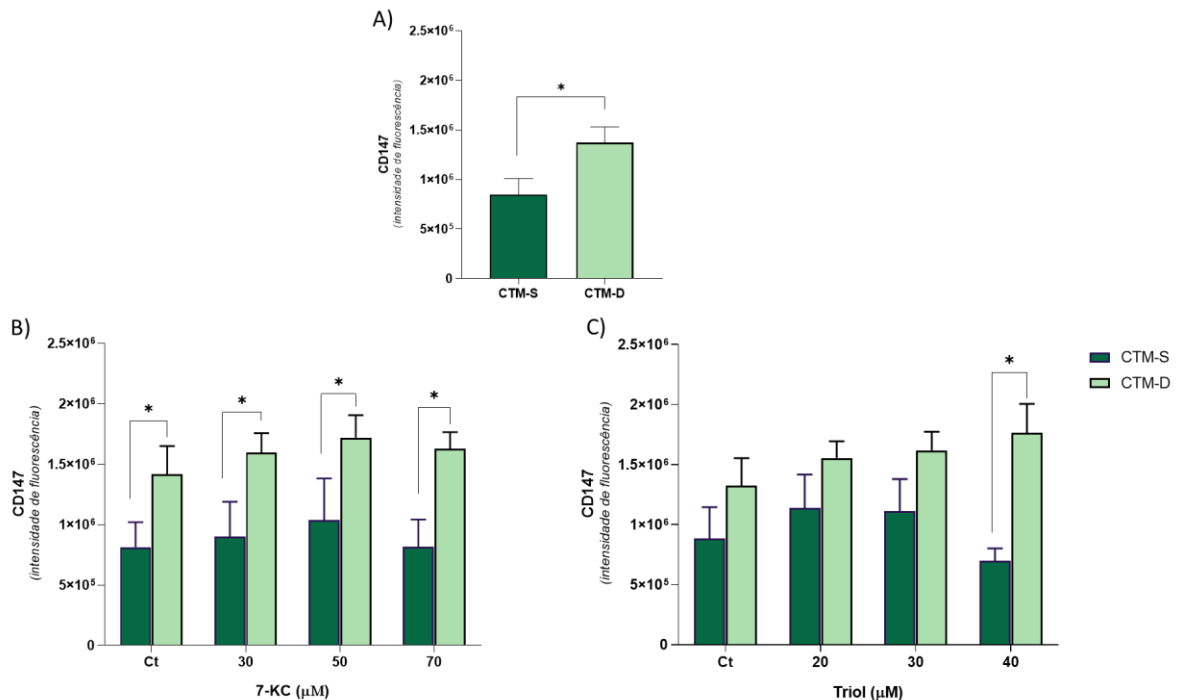
Por meio da análise estatística foi observado que a quantidade do receptor CD147 foi menor em linhagens CTM-S quando comparado as linhagens CTM-D ($p = 0,0137$), figura 32A.

A quantidade do receptor CD147 foi similar após o tratamento com 7-KC ($p = 0,1695$), sendo que a diferença observada foi apenas entre as linhagens de CTMs ($p < 0,0500$), figura 32B.

O tratamento com Triol nas linhagens de CTMs foi diferente ($p = 0,0031$). Enquanto ocorreu aumento na quantidade de CD147 nas linhagens de CTM-S, sendo gradativo de acordo

com a concentração de Triol, nas linhagens de CTM-D, na concentração de 40 μM de Triol ocorreu diminuição da concentração do receptor CD147 ($p = 0,0002$), figura 32C.

Figura 32. Análise do receptor CD147 de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, o receptor CD147. **A.** Comparação da quantidade do receptor CD147 entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,0137$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade do receptor CD147 em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,1695$; fator células: $p = 0,0905$; interação: $p = 0,8391$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade do receptor CD147 em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,1245$; fator células: $p = 0,0031$; interação: $p = 0,0860$. *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as da linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.16 Análise das proteínas da via de sinalização *Hedgehog*

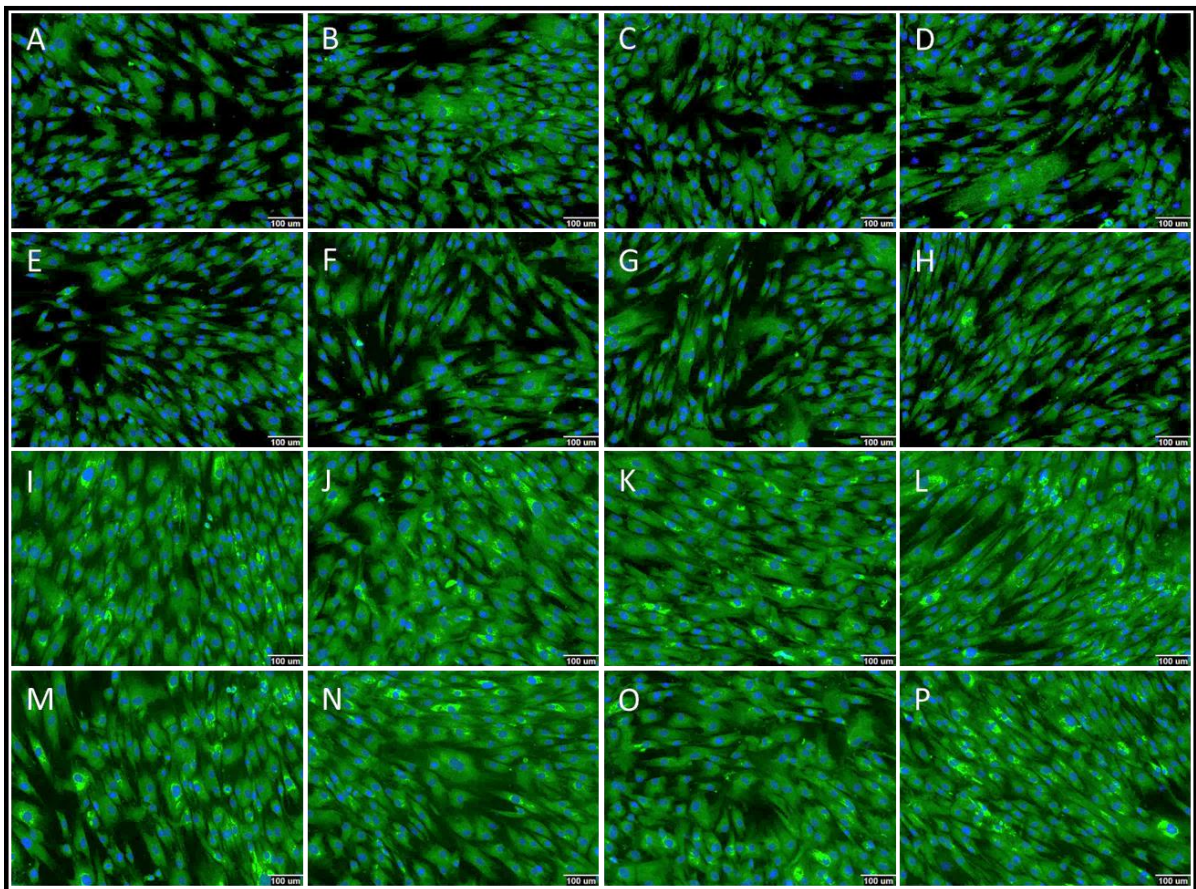
Alguns oxisteróis podem ativar a via de sinalização *Sonic Hedgehog*. Neste trabalho foi avaliado se os oxisteróis 7-KC e Triol podem alterar a concentração do receptor SHh, da proteína SMO e da proteína Gli3 nas linhagens de CTM-S e de CTM-D. Essas proteínas são componentes chaves na sinalização *Hedgehog*.

4.16.1 Análise do receptor *Sonic Hedgehog*

A quantidade do receptor SHh foi avaliada por imunofluorescência indireta nas linhagens de CTM-S e de CTM-D tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas.

O receptor SHh é uma proteína transmembranar presente na membrana plasmática e no citoplasma, como fator de transcrição. Por meio da avaliação visual das fotomicrografias o receptor SHh pode ser observado na cor verde nas linhagens de CTM-S e CTM-D. A marcação apresenta um padrão difuso pontilhado nas células e aglomeração perinuclear, figura 33. Além disso, é observado diferença na intensidade de fluorescência entre a linhagem de CTM-S e CTM-D, sendo que a maior intensidade de fluorescência do receptor SHh é observada na linhagem CTM-D, figura 33.

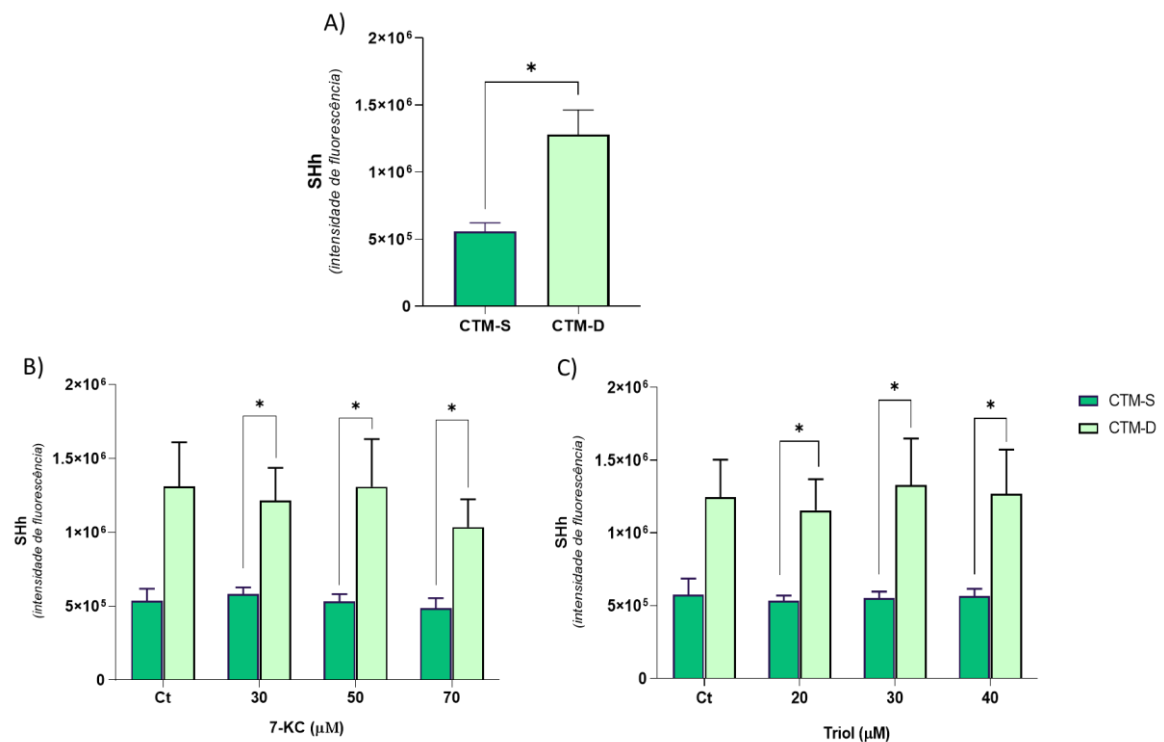
Figura 33. Receptor SHh em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



Fotomicrografia representativa da marcação do receptor SHh (FITC – verde) em linhagem de CTM-S (A–H) e de CTM-D (I–P) tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. **A)** CTM-S cultivada em meio basal; **B)** CTM-S cultivada com 30 μ M de 7-KC; **C)** CTM-S cultivada com 50 μ M de 7-KC; **D)** CTM-S cultivada com 70 μ M de 7-KC; **E)** CTM-S cultivada em meio basal; **F)** CTM-S cultivada com 20 μ M de Triol; **G)** CTM-S cultivada com 30 μ M de Triol; **H)** CTM-S cultivada com 40 μ M de Triol; **I)** CTM-D cultivada em meio basal; **J)** CTM-D cultivada com 30 μ M de 7-KC; **K)** CTM-D cultivada com 50 μ M de 7-KC; **L)** CTM-D cultivada com 70 μ M de 7-KC; **M)** CTM-D cultivada em meio basal; **N)** CTM-D cultivada com 20 μ M de Triol; **O)** CTM-D cultivada com 30 μ M de Triol; **P)** CTM-D cultivada com 40 μ M de Triol. Núcleos marcados com *Hoechst 33342* (DAPI – azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 10 X – escala igual a 100 μ m. Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

Na comparação da quantidade do receptor SHh entre as linhagens CTM-S e CTM-D, foi verificado que em linhagens CTM-S a quantidade do receptor SHh é menor quando comparado as linhagens de CTM-D ($p = 0,0011$), figura 34A. Ademias, tanto o tratamento com 7-KC quanto com Triol por 24 horas não apresentou efeito significativo na quantidade do receptor SHh nas linhagens de CTM-S e CTM-D ($p > 0,0500$), figuras 34B e 34C, respectivamente.

Figura 34. Análise do receptor SHh de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



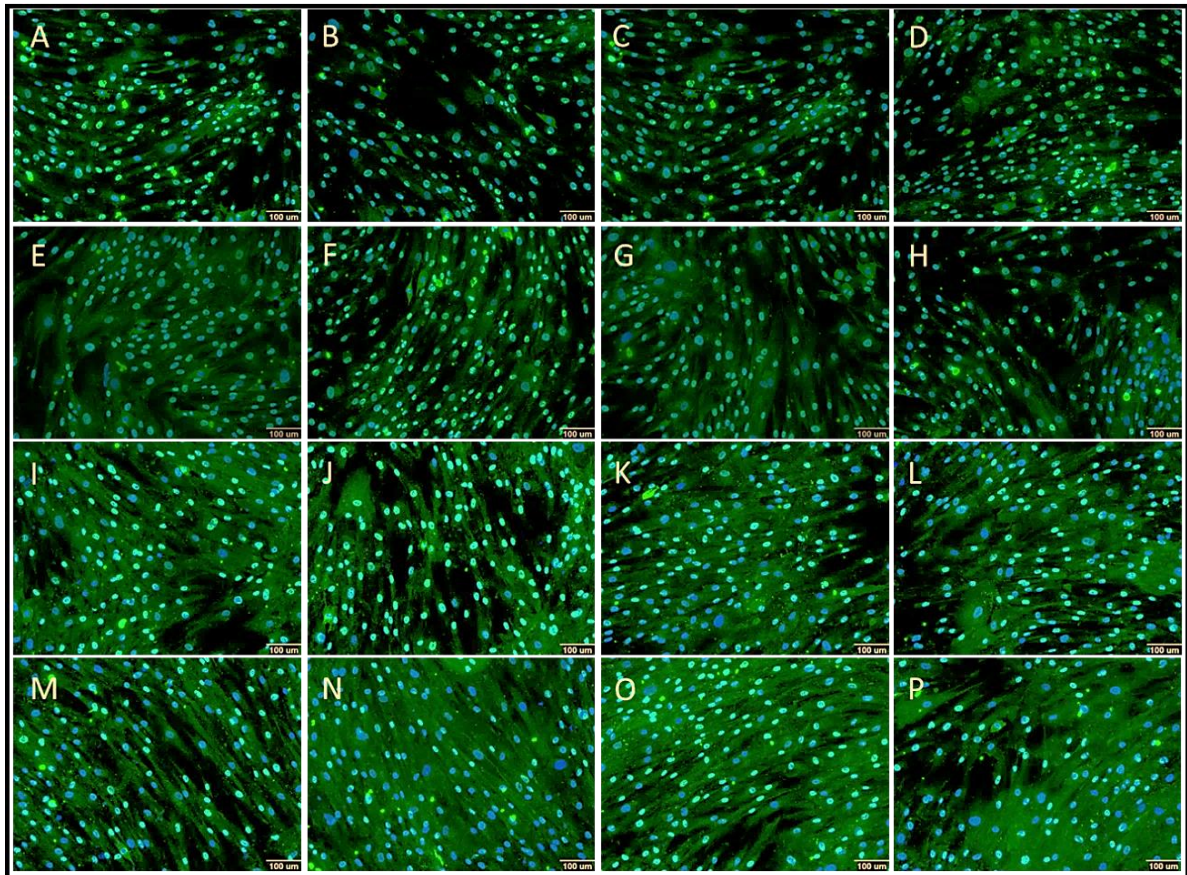
Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade do receptor SHh. **A.** Comparação da quantidade do receptor SHh entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,0011$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade do receptor SHh em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0699$; fator células: $p = 0,1152$; interação: $p = 0,2040$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade do receptor SHh em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,4425$; fator células: $p = 0,1228$; interação: $p = 0,6617$. *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as da linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.16.2 Análise da proteína SMO

A proteína SMO foi avaliada por imunofluorescência indireta nas linhagens de CTM-S e de CTM-D tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. A proteína SMO é um receptor transmembranar encontrado na membrana plasmática, após sua translocação pode estar

presente tanto no citoplasma quanto no núcleo da célula. Por meio da avaliação visual das fotomicrografias é possível observar a marcação da proteína SMO, em cor verde, em padrão pontilhado contínuo na membrana, no citoplasma e no núcleo das CTMs tratadas com 7-KC e Triol, figura 35.

Figura 35. Proteína SMO de CTMs tratadas com Triol e 7-KC.



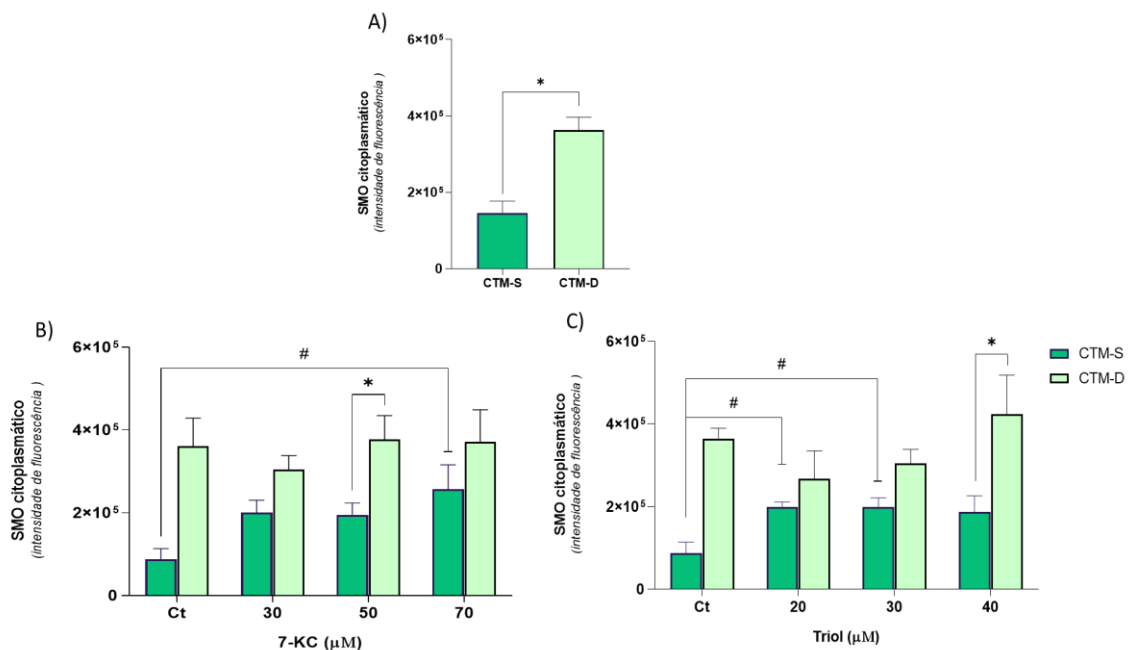
Fotomicrografia representativa da marcação do receptor SMO (FITC – verde) em linhagem de CTM-S (A–H) e de CTM-D (I–P) tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. **A)** CTM-S cultivada em meio basal; **B)** CTM-S cultivada com 30 μM de 7-KC; **C)** CTM-S cultivada com 50 μM de 7-KC; **D)** CTM-S cultivada com 70 μM de 7-KC; **E)** CTM-S cultivada em meio basal; **F)** CTM-S cultivada com 20 μM de Triol; **G)** CTM-S cultivada com 30 μM de Triol; **H)** CTM-S cultivada com 40 μM de Triol; **I)** CTM-D cultivada em meio basal; **J)** CTM-D cultivada com 30 μM de 7-KC; **K)** CTM-D cultivada com 50 μM de 7-KC; **L)** CTM-D cultivada com 70 μM de 7-KC; **M)** CTM-D cultivada em meio basal; **N)** CTM-D cultivada com 20 μM de Triol; **O)** CTM-D cultivada com 30 μM de Triol; **P)** CTM-D cultivada com 40 μM de Triol. Núcleos marcados com *Hoechst* 33342 (DAPI – azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 10 X – escala igual a 100 μm . Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

Referente a quantidade da proteína SMO no citoplasma e na membrana plasmática das CTMs, foi verificado que a concentração da proteína SMO é menor em linhagens CTM-S quando comparado as linhagens CTM-D ($p < 0,0001$), figura 36A. Além disso, foi observado, por meio da análise de variância de um fator, que o tratamento com 7-KC por 24 horas

aumentou a concentração da proteína SMO no citoplasma das CTM-S, sendo concentração dependente ($p = 0,0364$). A principal diferença observada no aumento da concentração da proteína SMO no citoplasma foi na concentração de $70 \mu\text{M}$ de 7-KC quando comparado ao controle cultivado em meio basal ($p = 0,0244$), figura 36B.

Quanto ao tratamento com o oxisterol Triol, foi observado diferença entre as linhagens CTM-S e CTM-D ($p = 0,0016$) e interação entre o tipo de CTMs e o tratamento ($p = 0,0477$). Na comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D, a diferença observada foi na concentração de $40 \mu\text{M}$ de Triol, em que ocorreu aumento da concentração de SMO no citoplasma em ambas as linhagens de CTMs ($p = 0,0106$). Na comparação dentro da mesma linhagem por meio da análise de variância de um fator, o aumento na concentração da proteína SMO no citoplasma ocorreu apenas nas linhagens de CTM-S tratadas nas concentrações de $20 \mu\text{M}$ ($p = 0,0334$) e $30 \mu\text{M}$ ($p = 0,0343$) de Triol quando comparadas ao controle cultivado em meio basal ($p = 0,0186$), figura 36C.

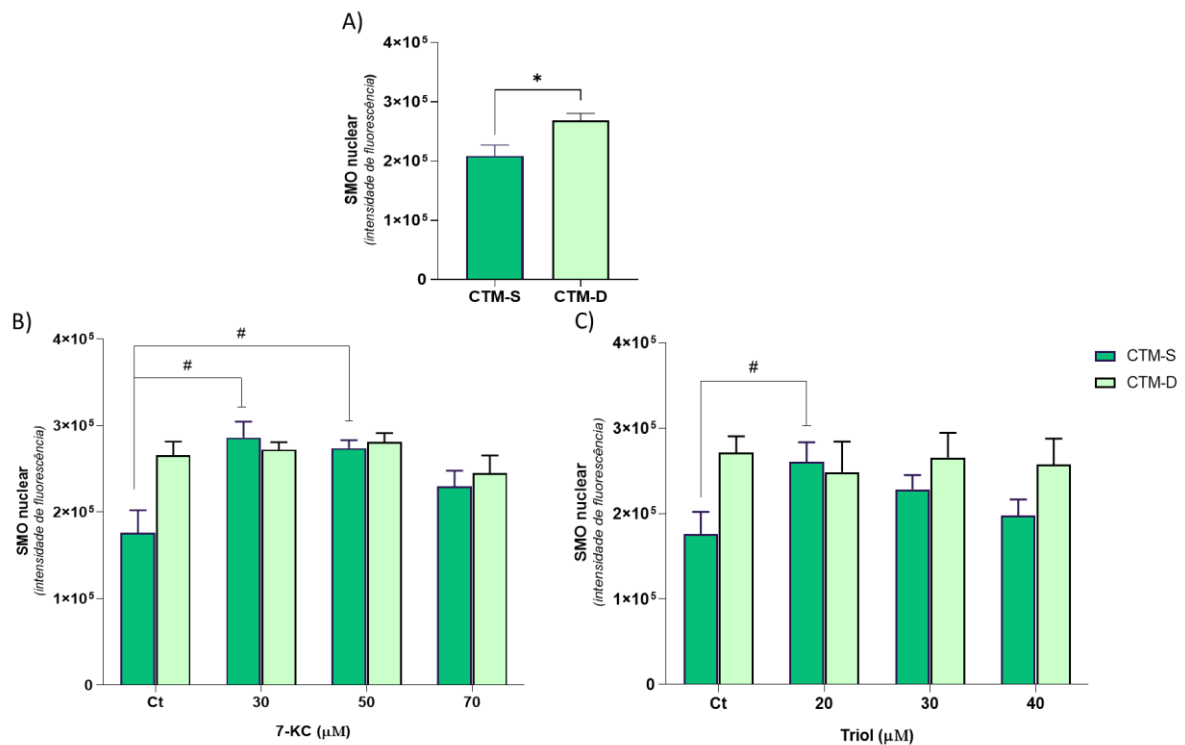
Figura 36. Análise da proteína SMO no citoplasma das CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína SMO citoplasmática. **A.** Comparação da proteína SMO citoplasmática entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p < 0,0001$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína SMO citoplasmática em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,2521$; fator células: $p = 0,0458$; interação: $p = 0,1224$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína SMO citoplasmática em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,3024$; fator células: $p = 0,0016$; interação: $p = 0,0477$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

A quantidade de SMO nuclear foi menor nas linhagens CTM-S quando comparado as linhagens CTM-D ($p = 0,0058$), figura 37A. O tratamento com 7-KC por 24 horas aumentou a concentração de SMO nuclear ($p = 0,0079$), sendo que a resposta ao tratamento com 7-KC foi diferente entre as linhagens CTM-S e CTM-D ($p = 0,0311$), a interação entre linhagens de CTM e o tratamento com 7-KC foi limítrofe ($p = 0,0642$). Essa alteração observada foi na linhagem CTM-S, em que ocorreu aumento da concentração de SMO nuclear nas concentrações de $30 \mu\text{M}$ ($p = 0,0128$) e $50 \mu\text{M}$ ($p = 0,0314$) de 7-KC quando comparadas ao controle cultivado em meio basal. Ademais, as linhagens CTM-D não apresentam variância significativa com o tratamento com 7-KC ($p > 0,0500$), figura 37B. O tratamento com o oxisterol Triol por 24 horas apresentou interação com o tipo de linhagem de CTM ($p = 0,0108$), sendo que as principais diferenças observadas foram nas linhagens CTM-S. O tratamento com Triol aumentou a concentração de SMO nuclear na concentração de $20 \mu\text{M}$ quando comparado ao controle cultivado em meio basal ($p = 0,0106$). Nas concentrações de $30 \mu\text{M}$ e $40 \mu\text{M}$ o aumento de SMO nuclear não foi significativo ($p > 0,0500$). Nas linhagens de CTM-D não foi observado diferença na presença do SMO no núcleo após o tratamento com Triol ($p > 0,0500$), figura 37C.

Figura 37. Análise da proteína SMO no núcleo de CTMs tratadas com 7-KC e com Triol.

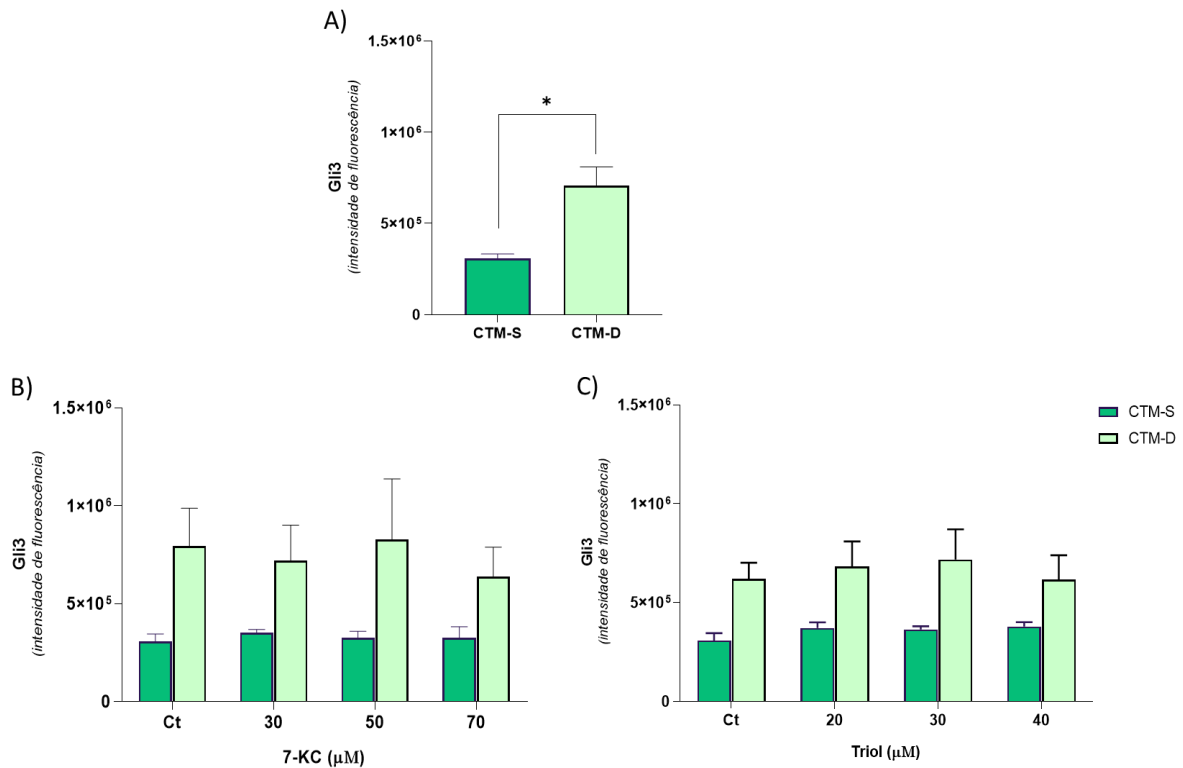


Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína SMO nuclear. **A.** Comparação da quantidade da proteína SMO nuclear entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,0058$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína SMO nuclear em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0079$; fator células: $p = 0,0311$; interação: $p = 0,0642$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína SMO nuclear em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,2839$; fator células: $p = 0,1616$; interação: $p = 0,0108$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.16.3 Análise da proteína Gli3

A proteína Gli3 é repressora da via SHh. A quantidade da proteína Gli3 foi menor nas linhagens CTM-S quando comparado as linhagens CTM-D ($p = 0,0010$), figura 38A. O tratamento com os oxisteróis 7-KC ($p = 0,6988$) e Triol ($p = 0,0992$) por 24 horas não apresentou alteração significativa na quantidade da proteína Gli3 em ambas as linhagens de CTM, figuras 38B e 38C, respectivamente.

Figura 38. Análise da proteína Gli3 de CTMs tratadas com 7-KC e com Triol.



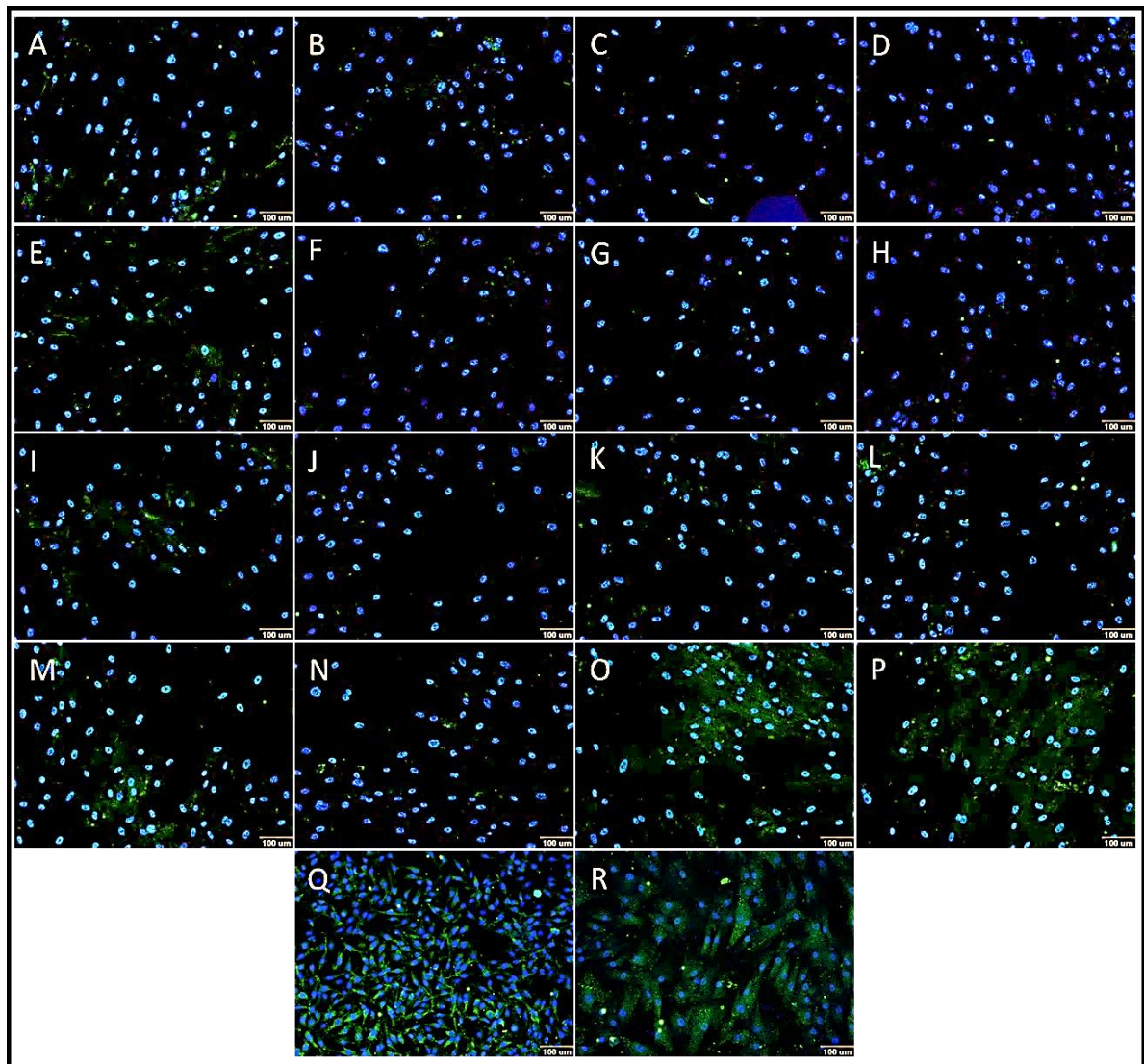
Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína Gli3. **A.** Comparação da quantidade da proteína Gli3 entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de Student ($p = 0,0010$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína Gli3 em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0116$; fator células: $p = 0,9616$; interação: $p = 0,9151$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína Gli3 em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,1575$; fator células: $p = 0,6541$; interação: $p = 0,9448$. *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.17 Análise da proteína ABC-D4

Foi avaliado nas linhagens de CTM-S e de CTM-D a presença da proteína ABC-D4 tratadas com os oxisteróis 7-KC e Triol por um período de 24 horas. A concentração de ABC-D4 foi determinada por meio de imunofluorescência indireta. Na avaliação visual das fotomicrografias foi observado a presença da proteína ABC-D4 no núcleo das células-tronco mesenquimais, em padrão pontilhado, tipo “bola de golfe”, na cor verde, em ambas as linhagens de CTMs. No citoplasma das células, a marcação da proteína ABC-D4 é observada em forma de ponto, na cor verde, figura 39. Para confirmar a ligação específica do anticorpo anti-ABC-D4 e a localização da proteína ABC-D4, foi realizado a marcação da proteína por meio de

imunofluorescência indireta nas linhagens MDA-MB-231 (linhagem de adenocarcinoma mamário) e MRC-5 (linhagem de fibroblasto de pulmão de feto humano), em que foi observado a presença da proteína ABC-D4 apenas no citoplasma. Não foi observado marcação da proteína ABC-D4 no núcleo dessas células, figuras 39Q e 39R.

Figura 39. Proteína ABC-D4 em CTMs tratadas com 7-KC e Triol e nas linhagens MDA-MB-231 e MRC-5

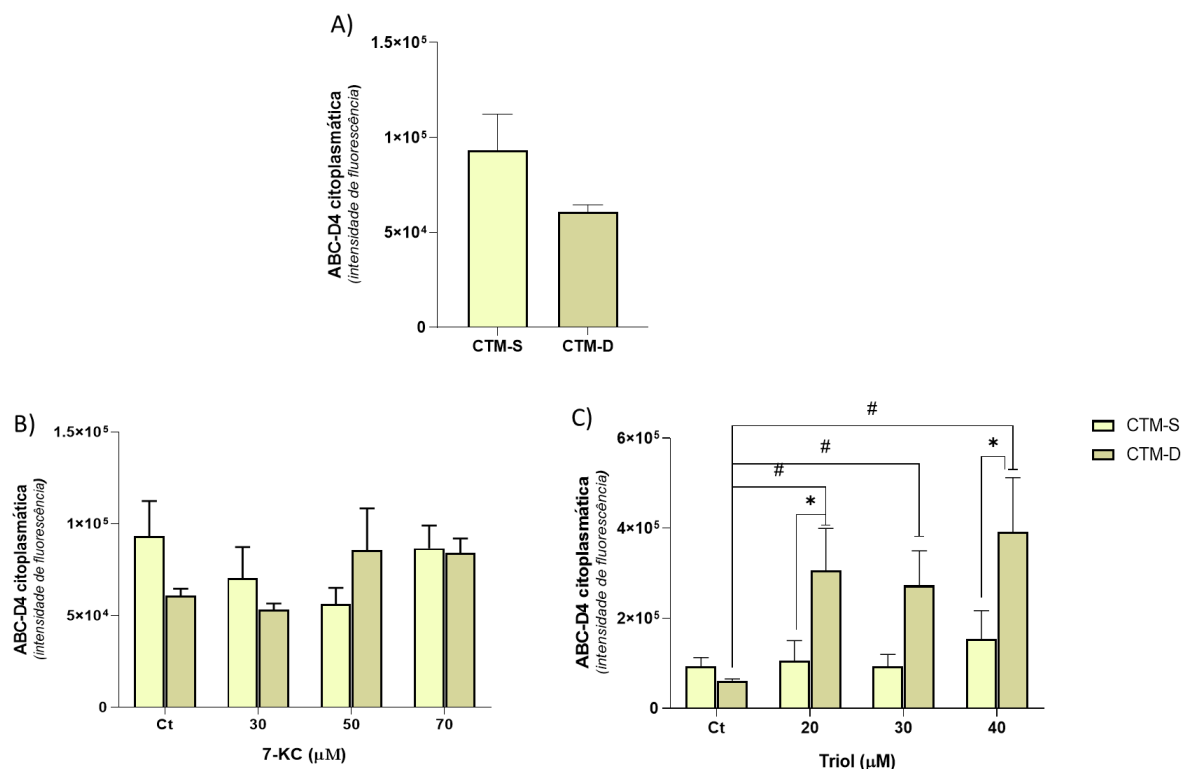


Fotomicrografia representativa da marcação da proteína ABC-D4 (FITC – verde) em uma linhagem de CTM-S (A–H) e de CTM-D (I–P) tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. A) CTM-S cultivada em meio basal; B) CTM-S cultivada com 30 µM de 7-KC; C) CTM-S cultivada com 50 µM de 7-KC; D) CTM-S cultivada com 70 µM de 7-KC; E) CTM-S cultivada em meio basal; F) CTM-S cultivada com 20 µM de Triol; G) CTM-S cultivada com 30 µM de Triol; H) CTM-S cultivada com 40 µM de Triol; I) CTM-D cultivada em meio basal; J) CTM-D cultivada com 30 µM de 7-KC; K) CTM-D cultivada com 50 µM de 7-KC; L) CTM-D cultivada com 70 µM de 7-KC; M) CTM-D cultivada em meio basal; N) CTM-D cultivada com 20 µM de Triol; O) CTM-D cultivada com 30 µM de Triol; P) CTM-D cultivada com 40 µM de Triol. Q) Marcação da proteína ABC-D4 no citoplasma da linhagem celular MDA; R) Marcação da proteína ABC-D4 no citoplasma da linhagem celular MRC-5. Núcleos marcados com *Hoechst 33342* (DAPI – azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 10 X – escala igual a 100 µm. Fonte: Dra Débora Levy e autora.

Baseados nos resultados anteriores obtidos pelas fotomicrografias, foi realizado a análise da concentração citoplasmática (figura 40) e da concentração nuclear da proteína ABC-D4 nas CTM-S e CTM-D tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas, (figura 41).

A quantidade de ABC-D4 citoplasmática foi maior nas linhagens de CTM-S quando comparada as linhagens de CTM-D, embora o valor de probabilidade tenha sido limítrofe ($p = 0,0566$), figura 40A. O tratamento com o oxisterol 7-KC por 24 horas não alterou significativamente a concentração citoplasmática de ABC-D4 em ambas as linhagens de CTMs ($p = 0,3662$), figura 40B. Por outro lado, o tratamento com o oxisterol Triol aumentou a concentração de ABC-D4 citoplasmática ($p = 0,0141$); e foi observado interação entre o tipo de linhagem de CTM e a resposta ao tratamento com Triol ($p = 0,0099$), sendo que a diferença observada foi na linhagem de CTM-D tratadas com 20 μM ($p = 0,0044$), 30 μM ($p = 0,0172$) e 40 μM ($p = 0,0001$) de Triol quando comparadas ao controle cultivado em meio basal. A comparação entre as linhagens de CTM-S e CTM-D tratadas com Triol foram diferentes nas concentrações de 20 μM ($p = 0,0263$) e de 40 μM ($p = 0,0062$), figura 40C.

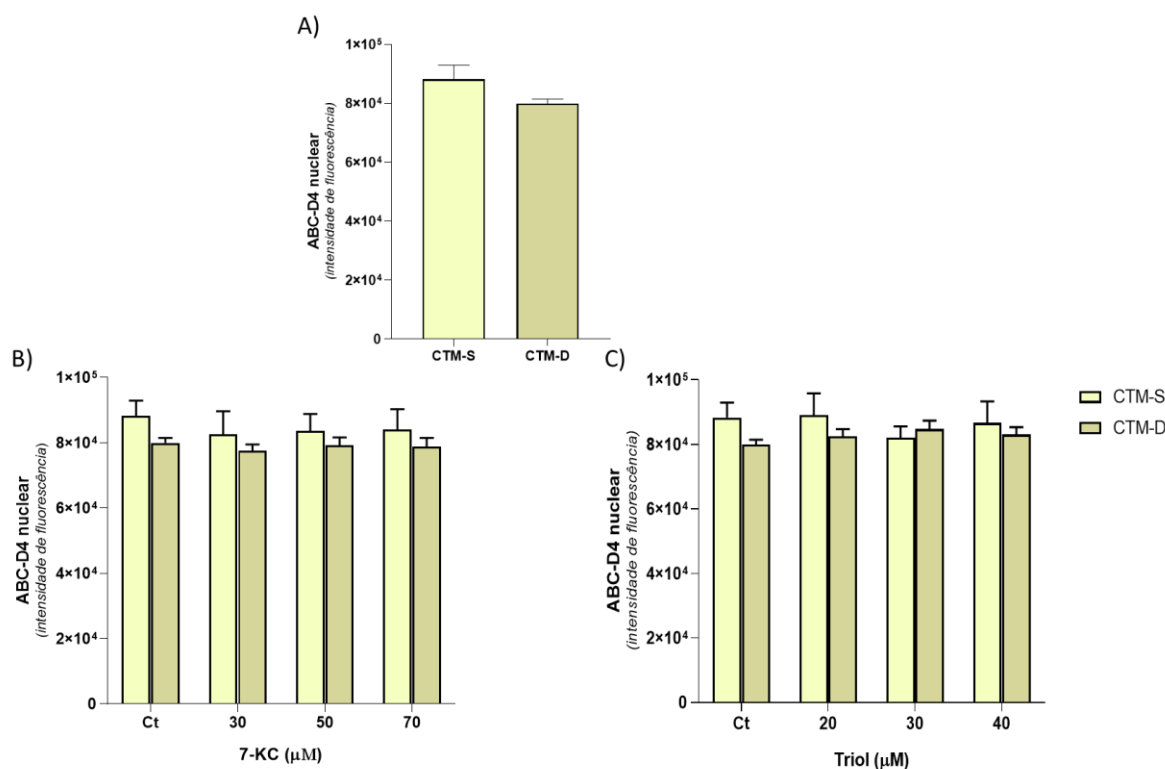
Figura 40. Análise da proteína ABC-D4 no citoplasma CTMs tratadas com Triol e 7-KC.



Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína ABC-D4 citoplasmática. **A.** Comparação da quantidade da proteína ABC-D4 citoplasmática entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,0566$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína ABC-D4 citoplasmática em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,3662$; fator células: $p = 0,6954$; interação: $p = 0,1160$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína ABC-D4 citoplasmática em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0141$; fator células: $p = 0,0900$; interação: $p = 0,0099$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

A concentração de ABC-D4 nuclear foi similar entre as linhagens de CTM-S e CTM-D ($p = 0,0561$), figura 41A. Além disso, tanto o tratamento com 7-KC ($p = 0,1442$) quanto com Triol ($p = 0,8547$) não apresentou efeito significativo no aumento e/ou diminuição na concentração nuclear da proteína ABC-D4, figuras 41B e 41C, respectivamente.

Figura 41. Análise da proteína ABC-D4 no núcleo de CTMs tratadas com Triol e 7-KC.



Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína ABC-D4 nuclear. **A.** Comparação da quantidade da proteína ABC-D4 nuclear entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,0561$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína ABC-D4 nuclear em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,1442$; fator células: $p = 0,4529$; interação: $p = 0,6208$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade da proteína ABC-D4 nuclear em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,8547$; fator células: $p = 0,4851$; interação: $p = 0,2121$. Fonte: A autora.

4.18 Expressão de genes mitocondriais

Neste trabalho, foi avaliado a influência dos oxisteróis 7-KC e Triol na expressão relativa de genes mitocondriais associadas aos processos de fusão e fissão, bem como, genes relacionados a cadeia transportadora de elétrons.

4.18.1 Expressão dos genes relacionados a dinâmica mitocondrial

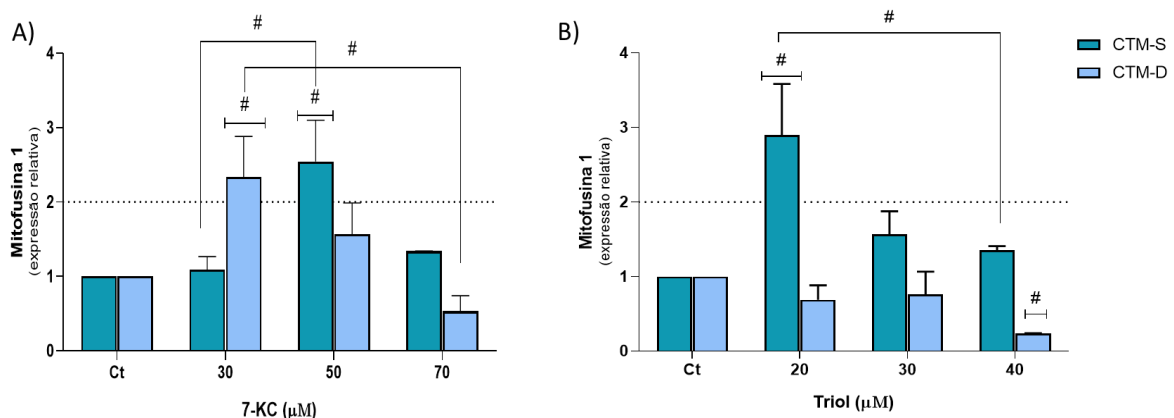
O processo de fusão mitocondrial é regulado pelos genes *Mfn1*, *Mfn2* e *OPA1*, enquanto o processo de fissão é coordenado pelo gene *DRP1*. Neste trabalho, foi avaliado a expressão dos genes *Mfn1*, *Mfn2*, *OPA1* e *DRP1* nas CTMs tratadas com Triol e 7-KC por 24 horas. A

análise da expressão gênica relativa foi realizada em relação ao controle cultivado em meio basal, portanto o valor do controle é considerado sempre um (1).

Referente a expressão relativa do gene *Mfn1* nas CTMs, tanto o tratamento com 7-KC ($p = 0,0045$) quanto com Triol ($p = 0,0153$) alterou a expressão gênica, figuras 42A e 42B, respectivamente. O tratamento com 30 μM de 7-KC aumento a expressão relativa do gene *Mfn1* nas linhagens CTM-D ($p = 0,0877$), enquanto o tratamento com a concentração de 70 μM de 7-KC diminuiu a expressão relativa ($p = 0,0127$). Nas linhagens de CTM-S, o tratamento com 50 μM de 7-KC aumentou a expressão do gene *Mfn1* em relação ao controle ($p = 0,0125$) e a concentração de 30 μM de 7-KC ($p = 0,0183$).

O tratamento com 20 μM de Triol aumentou a expressão relativa do gene *Mfn1* em 2,89 vezes nas linhagens CTM-S, quando comparado ao controle ($p = 0,0029$) e ao tratamento com 40 μM de Triol ($p = 0,0216$).

Figura 42. Expressão relativa do gene *Mfn1* em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



Gráficos representando a expressão relativa do gene *Mfn1* após o tratamento com 7-KC e Triol por um período de 24 horas em CTM-S e CTM-D. **A.** A comparação da expressão relativa do gene *Mfn1* entre as linhagens CTM-D e CTM-S tratadas com 7-KC foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0045$; fator células: $p = 0,5646$; interação: $p = 0,0089$. **B.** A comparação da expressão relativa do gene *Mfn1* entre as linhagens CTM-S e CTM-D tratadas com Triol foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0153$; fator células: $p < 0,0001$; interação: $p = 0,0094$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

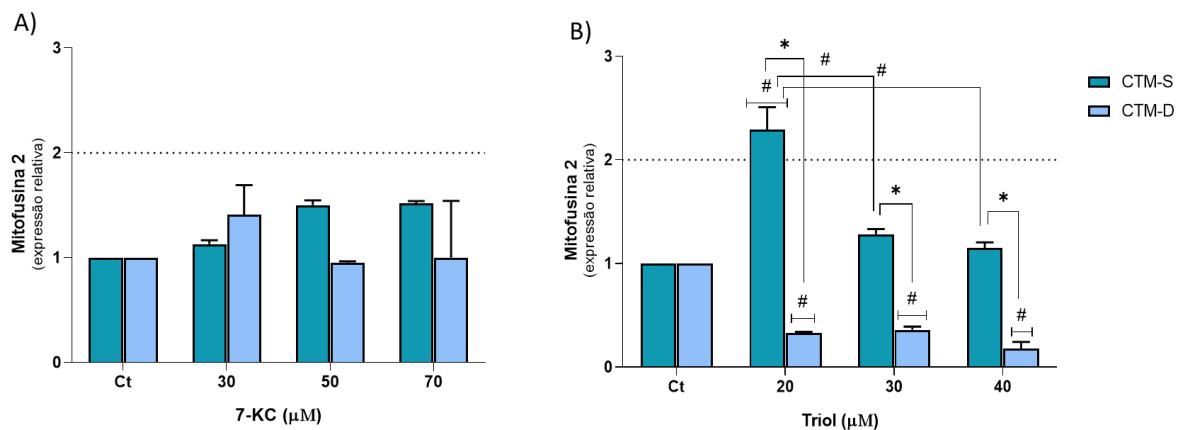
Referente ao gene *Mfn2*, o tratamento com 7-KC não alterou a expressão relativa ($p = 0,5572$), figura 43A. No entanto, o tratamento com Triol foi significativo ($p < 0,0001$) em relação ao tipo de linhagem ($p < 0,0001$) e a interação entre as concentrações do tratamento com Triol

e o tipo de linhagem de CTM ($p < 0,0001$), figura 43B. Isso significa que dependendo da linhagem de CTM a resposta ao tratamento com Triol é diferente.

Dessa forma, foi observado que a expressão relativa do gene *Mfn2* entre as linhagens CTM-S e CTM-D foi oposta. Enquanto foi observado aumento da expressão relativa do gene *Mfn2* nas linhagens CTM-S tratadas com 20 μM de Triol em relação ao controle ($p < 0,0001$) e as concentrações de 30 μM ($p < 0,0001$) e 40 μM ($p < 0,0001$); nas linhagens de CTM-D foi observado diminuição da expressão nas concentrações de 20 μM ($p = 0,0002$), de 30 μM ($p = 0,0004$) e de 40 μM ($p < 0,0001$) de Triol em relação ao controle cultivado em meio basal.

Além disso, da interação observada entre as linhagens de CTMs e o tratamento com Triol foi observado que na concentração de 20 μM ocorreu aumento da expressão relativa em aproximadamente 2,30 vezes nas linhagens de CTM-S enquanto nas linhagens de CTM-D foi de 0,32 ($p < 0,0001$). Ademais, foi observado diferença na expressão relativa do gene *Mfn2* entre as linhagens de CTM-S e CTM-D tratadas nas concentrações de 30 μM ($p < 0,0001$) e 40 μM ($p < 0,0001$); enquanto não houve alteração da expressão relativa nas linhagens de CTM-S, foi observado diminuição da expressão nas linhagens de CTM-D.

Figura 43. Expressão relativa do gene *Mfn2* em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.

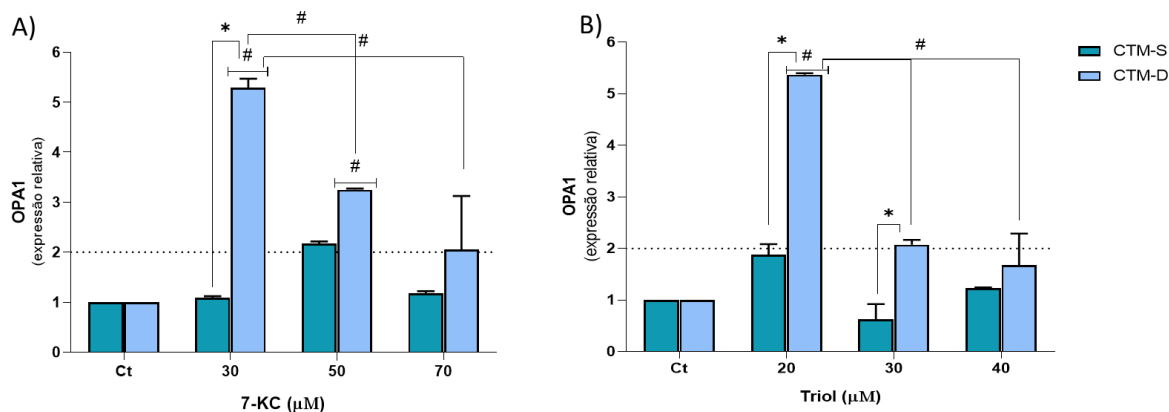


Gráficos representando a expressão relativa do gene *Mfn2* após o tratamento com 7-KC e Triol por um período de 24 horas em CTM-S e CTM-D. **A.** A comparação da expressão relativa do gene *Mfn2* entre as linhagens CTM-D e CTM-S tratadas com 7-KC foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,5578$; fator células: $p = 0,2118$; interação: $p = 0,1812$. **B.** A comparação da expressão relativa do gene *Mfn2* entre as linhagens CTM-S e CTM-D tratadas com Triol foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p < 0,0001$; fator células: $p < 0,0001$; interação: $p < 0,0001$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

Respectivo a expressão relativa do gene *OPAI*, o tratamento com 7-KC foi diferente ($p < 0,0001$), tanto entre as linhagens de CTMs ($p < 0,0001$), quanto na interação entre tratamento e linhagens CTM-S e CTM-D ($p < 0,0001$), figura 44A. A principal alteração observada foi na linhagem CTM-D, em que o tratamento com 30 μM de 7-KC aumentou a expressão relativa do gene *OPAI* em aproximadamente 5 vezes quando comparado ao controle basal ($p < 0,0001$); ao tratamento com 50 μM em que o aumento foi de 3,25 vezes ($p = 0,0184$), e a concentração de 70 μM , que apresentou o menor aumento na expressão relativa, apenas 2 vezes ($p < 0,0001$). Em relação a interação entre as linhagens de CTMs e o tratamento com 7-KC foi observado que enquanto a concentração de 30 μM aumenta a expressão relativa do gene *OPAI* em CTMs-D, o mesmo efeito não ocorreu nas linhagens de CTM-S ($p < 0,0001$). Para as demais concentrações, 50 μM e 70 μM de 7-KC, é possível observar que a expressão relativa foi maior nas linhagens de CTM-D em relação as linhagens de CTM-S, no entanto não foi significativa ($p = 0,5082$; $p = 0,7373$, respectivamente).

Em relação ao tratamento com Triol, foi observado que ocorreu modificação na expressão relativa do gene *OPAI* ($p < 0,0001$), tanto entre as linhagens de CTMs ($p < 0,0001$), quanto na resposta para cada concentração de tratamento de acordo com a linhagem, CTM-S e CTM-D ($p < 0,0001$), Figura 44B. O aumento da expressão relativa do gene *OPAI* foi maior nas linhagens de CTM-D tratadas com 20 μM de Triol, em que foi observado aumento de 5,37 vezes, em relação ao controle basal ($p < 0,0001$), e as concentrações de 30 μM ($p < 0,0001$) e 40 μM ($p < 0,0001$), com aumento de 2,01 e 1,67 vezes, respectivamente. Além disso, nas concentrações de 20 μM e 30 μM a expressão gênica aumentou nas linhagens de CTM-D em comparação as linhagens de CTM-S ($p < 0,0001$ e $p < 0,0163$).

Figura 44. Expressão relativa do gene *OPA1* em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.

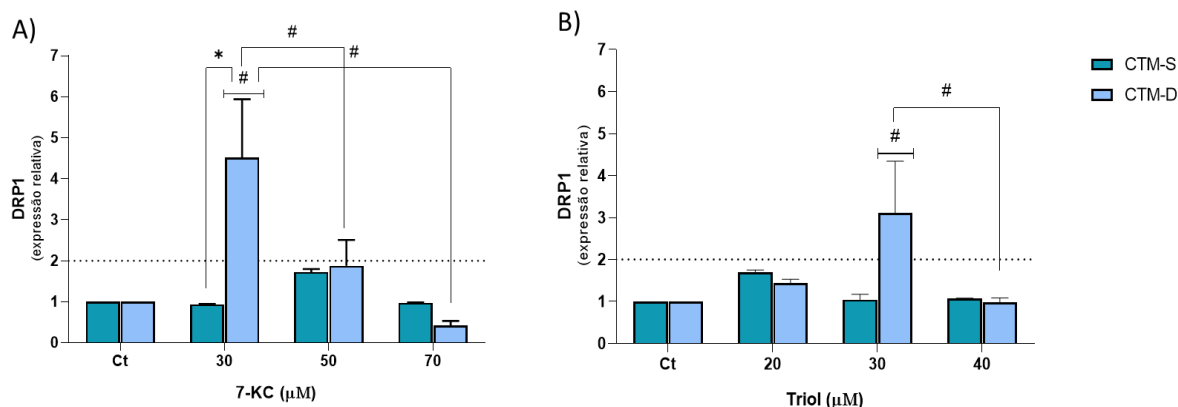


Gráficos representando a expressão relativa do gene *OPA1* após o tratamento com 7-KC e Triol por um período de 24 horas em CTM-S e CTM-D. **A.** A comparação da expressão relativa do gene *OPA1* entre as linhagens CTM-D e CTM-S tratadas com 7-KC foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p < 0,0001$; fator células: $p < 0,0001$; interação: $p < 0,0001$. **B.** A comparação da expressão relativa do gene *OPA1* entre as linhagens CTM-S e CTM-D tratadas com Triol foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p < 0,0001$; fator células: $p < 0,0001$; interação: $p < 0,0001$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: autora.

O gene *DRP1* está associado ao processo de fissão mitocondrial. O tratamento com 7-KC alterou a expressão relativa do gene *DRP1* ($p = 0,0054$). Além disso, a resposta ao tratamento foi diferente entre as linhagens CTM-S e CTM-D ($p = 0,0040$). No entanto, a expressão média global entre as linhagens foi limítrofe ($p = 0,0528$). As principais alterações observadas foram nas linhagens CTM-D, em que foi observado aumento da expressão relativa do gene *DRP1* na concentração de 30 μM de 7-KC quando comparado ao controle basal ($p = 0,0031$), a concentração de 50 μM ($p = 0,0428$) e de 70 μM ($p = 0,0005$). Comparando a resposta ao tratamento entre as linhagens, foi observado diferença na expressão relativa na concentração de 30 μM, em que nas linhagens de CTM-S não ocorreu alteração e nas linhagens CTM-S houve aumento da expressão relativa do gene *DRP1*, de aproximadamente 4,50 vezes ($p = 0,0026$), figura 45A.

Nas CTMs tratadas com Triol por 24 horas foi observado diferença na interação entre o tratamento e a resposta ($p = 0,0477$). Essa diferença foi no tratamento com 30 μM de Triol em que a expressão relativa do gene *DRP1* aumentou nas linhagens CTM-D, quando comparado ao controle basal ($p = 0,0443$) e a concentração de 40 μM ($p = 0,0418$), figura 45B. Ademais, não foi observado diferença na expressão global entre as linhagens CTM-S e CTM-D ($p = 0,1816$) ou em relação as concentrações de Triol ($p = 0,0702$).

Figura 45. Expressão relativa do gene *DRP1* em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.

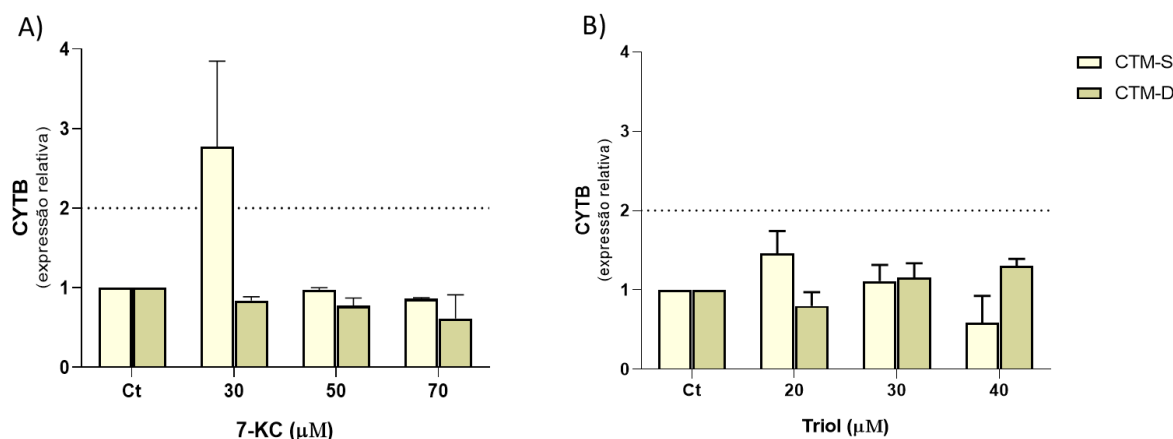


Gráficos representando a expressão relativa do gene *DRP1* após o tratamento com 7-KC e Triol por um período de 24 horas em CTM-S e CTM-D. **A.** A comparação da expressão relativa do gene *DRP1* entre as linhagens CTM-D e CTM-S tratadas com 7-KC foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0054$; fator células: $p = 0,0528$; interação: $p = 0,0040$. **B.** A comparação da expressão relativa do gene *DRP1* entre as linhagens CTM-S e CTM-D tratadas com Triol foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0702$; fator células: $p < 0,1816$; interação: $p = 0,0477$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.18.2 Expressão dos genes relacionados a cadeia transportadora de elétrons

Para verificar a influência do 7-KC e Triol na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial foi avaliado a expressão relativa dos genes *CYTB* e *ND1* em linhagens de CTM-S e CTM-D após o tratamento com os oxisteróis por 24 horas, figura 46. Na análise de variância por dois fatores, tanto o tratamento com 7-KC quanto com Triol não apresentou diferença significativa entre as concentrações de tratamento, entre as linhagens e/ou interação entre tratamento e linhagem de CTM ($p > 0,0500$). Embora seja possível observar diferença na expressão relativa do gene *CYTB* na concentração de 30 µM de 7-KC entre as linhagens CTM-S e CTM-D, a mesma não foi significativa ($p = 0,0523$), figura 46A.

Figura 46. Expressão relativa do gene *CYTB* em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



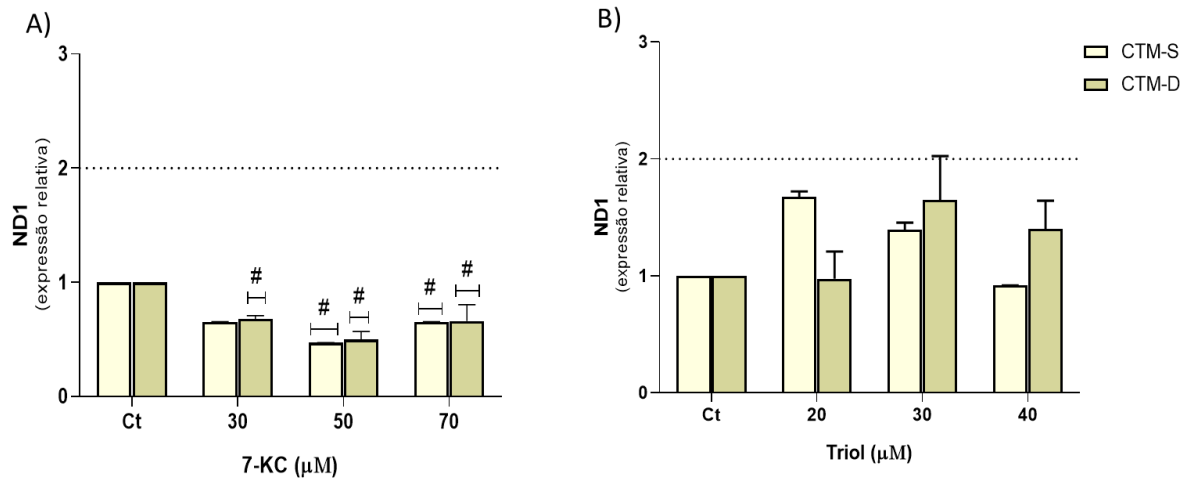
Gráficos representando a expressão relativa do gene *CYTB* após o tratamento com 7-KC e Triol por um período de 24 horas em CTM-S e CTM-D. **A.** A comparação da expressão relativa do gene *CYTB* entre as linhagens CTM-D e CTM-S tratadas com 7-KC foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p < 0,0751$; fator células: $p < 0,0670$; interação: $p < 0,1032$. **B.** A comparação da expressão relativa do gene *CYTB* entre as linhagens CTM-S e CTM-D tratadas com Triol foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p < 0,7013$; fator células: $p < 0,8686$; interação: $p < 0,8686$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

O segundo gene relacionado a cadeia transportadora de elétrons foi o gene *NDI*. O tratamento com 7-KC diminui a expressão relativa ($p < 0,0001$), não foi observado diferenças entre as linhagens CTM-S e CTM-D ($p = 0,7495$) ou diferença na interação entre tratamento e linhagens de CTMs ($p = 0,9957$). Isso significa que o tratamento com 7-KC diminui a expressão relativa do gene *NDI* da mesma forma tanto em CTM-S quanto em CTM-D, figura 47A.

Sendo assim, foi observado diminuição na expressão relativa do gene *NDI* nas linhagens de CTM-S tratadas com 50 μM ($p = 0,0021$) e 70 μM ($p = 0,0163$) de 7-KC quando comparada ao controle cultivado em meio basal. Nas linhagens de CTM-D foi observado diminuição na expressão relativa do gene *NDI* nas concentrações de 30 μM ($p = 0,0317$), 50 μM ($p = 0,0004$) e 70 μM ($p = 0,0197$) de 7-KC quando comparado ao controle.

Nas linhagens de CTM-S e CTM-D tratadas com Triol por 24 horas, a análise de variância de dois fatores apresentou diferença na expressão relativa do gene *NDI* em relação as concentrações de Triol ($p = 0,0459$), bem como entre a interação do tratamento com as linhagens de CTMs ($p = 0,0182$). No entanto não foi observado diferença entre as linhagens de CTM-S e CTM-D ($p = 0,9466$). Na análise pós-hoc não foi verificado diferença significativa entre as três concentrações de Triol nos seus respectivos grupos ou em comparação aos demais grupos ($p > 0,0500$). Figura 47B.

Figura 47. Expressão relativa do gene *ND1* em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



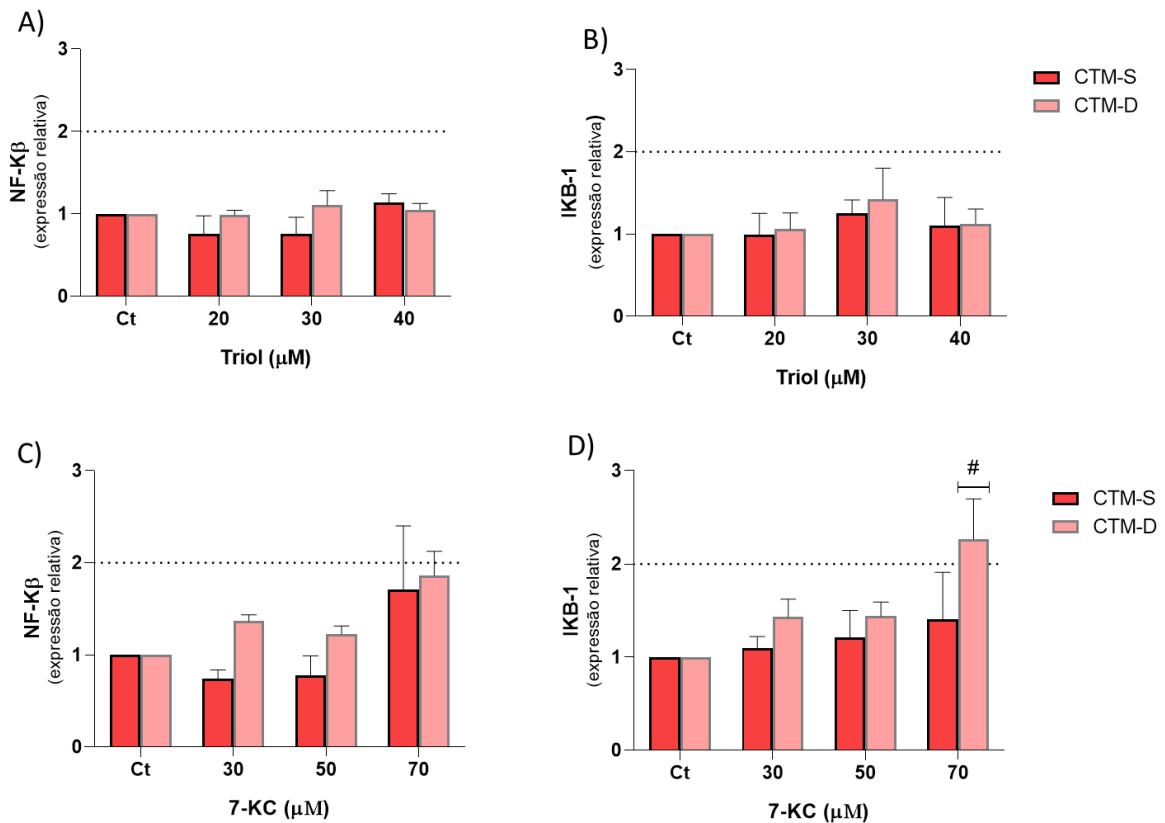
Gráficos representando a expressão relativa do gene *ND1* após o tratamento com 7-KC e Triol por um período de 24 horas em CTM-S e CTM-D. **A.** A comparação da expressão relativa do gene *ND1* entre as linhagens CTM-D e CTM-S tratadas com 7-KC foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p < 0,0001$; fator células: $p < 0,7495$; interação: $p < 0,9957$. **B.** A comparação da expressão relativa do gene *ND1* entre as linhagens CTM-S e CTM-D tratadas com Triol foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p < 0,0459$; fator células: $p < 0,9466$; interação: $p < 0,0182$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.19 Expressão dos genes *NF-KB* e *IKKB1*

Foi avaliado a expressão relativa dos genes *NF-KB* e de seu repressor *IKKB1* em CTMs tratadas com Triol e 7-KC por 24 horas. A expressão relativa foi em relação ao controle cultivado em meio basal, portanto o valor do controle é considerado sempre um. O tratamento com Triol não alterou a expressão dos genes *NF-KB* ($p = 0,3353$) e *IKKB1* ($p = 0,2553$), figura 48A e 48B, respectivamente.

O tratamento com 7-KC aumentou a expressão relativa do gene *NF-KB* ($p = 0,0289$), figura 48C. Referente ao gene *IKKB1* foi observado aumento na expressão relativa nas CTM-D tratadas com 70 μM de 7-KC em relação ao controle ($p = 0,0491$), figura 48D.

Figura 48. Expressão relativa dos genes *NFKB* e *IKKB1* em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



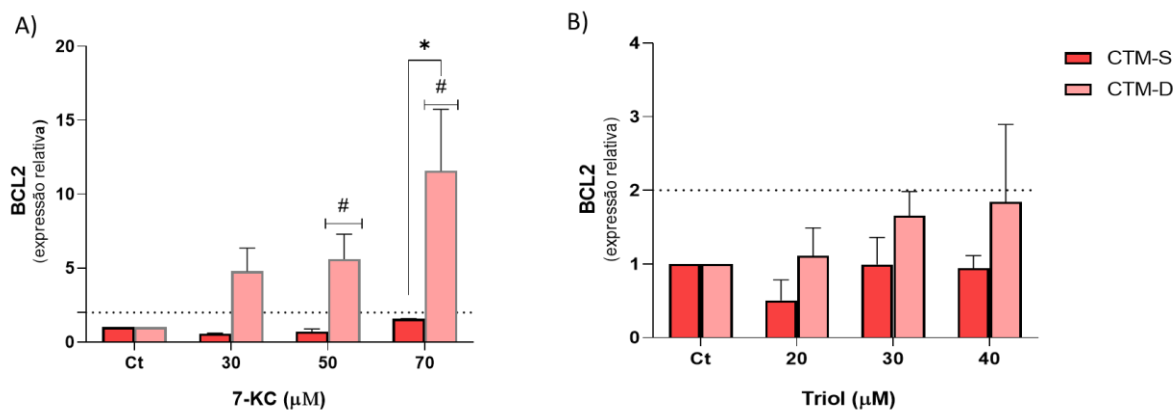
Gráficos representando a expressão relativa do gene *NF-κB* e do gene *IKK1* após o tratamento com Triol e 7-KC por um período de 24 horas em CTM-D e CTM-S. **A:** A comparação da expressão relativa do gene *NF-κB* entre as linhagens CTM-S e CTM-D tratadas com Triol foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,3353$; fator células: $p = 0,1790$; interação: $p = 0,2790$. **B:** A comparação da expressão relativa do gene *IKK1* entre as linhagens CTM-S e CTM-D tratadas com Triol foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,2553$; fator células: $p = 0,6203$; interação: $p = 0,9630$. **C:** A comparação da expressão relativa do gene *NF-κB* entre as linhagens CTM-S e CTM-D tratadas com 7-KC foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0405$; fator células: $p = 0,0007$; interação: $p = 0,1070$. **D:** A comparação da expressão relativa do gene *IKK1* entre as linhagens CTM-S e CTM-D tratadas com 7-KC foi realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0491$; fator células: $p = 0,0834$; interação: $p = 0,4672$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.20 Expressão do gene *BCL2*

Foi avaliado a expressão do gene *BCL2* nas CTMs tratadas com Triol e 7-KC, por 24 horas. A análise da expressão relativa do gene *BCL2* foi realizada em relação ao controle cultivado em meio basal, portanto o valor do controle é considerado sempre um. O tratamento com 7-KC aumentou a expressão do gene *BCL2* nas linhagens de CTM-D ($p = 0,0297$). Esse aumento significativo foi observado na concentração de 70 μM em relação ao controle cultivado em meio basal ($p = 0,0011$). Houve diferença entre as linhagens CTM-D e CTM-S ($p = 0,0010$)

em relação as concentrações utilizadas de 7-KC. No entanto, não foram observadas interações entre tratamento e as linhagens CTMs ($p = 0,0628$). Figura 49A. O tratamento com Triol por 24 horas não influenciou de maneira significativa na expressão relativa do gene *BCL2* ($p = 0,5843$). Figura 49B.

Figura 49. Expressão relativa do gene *BCL2* em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.

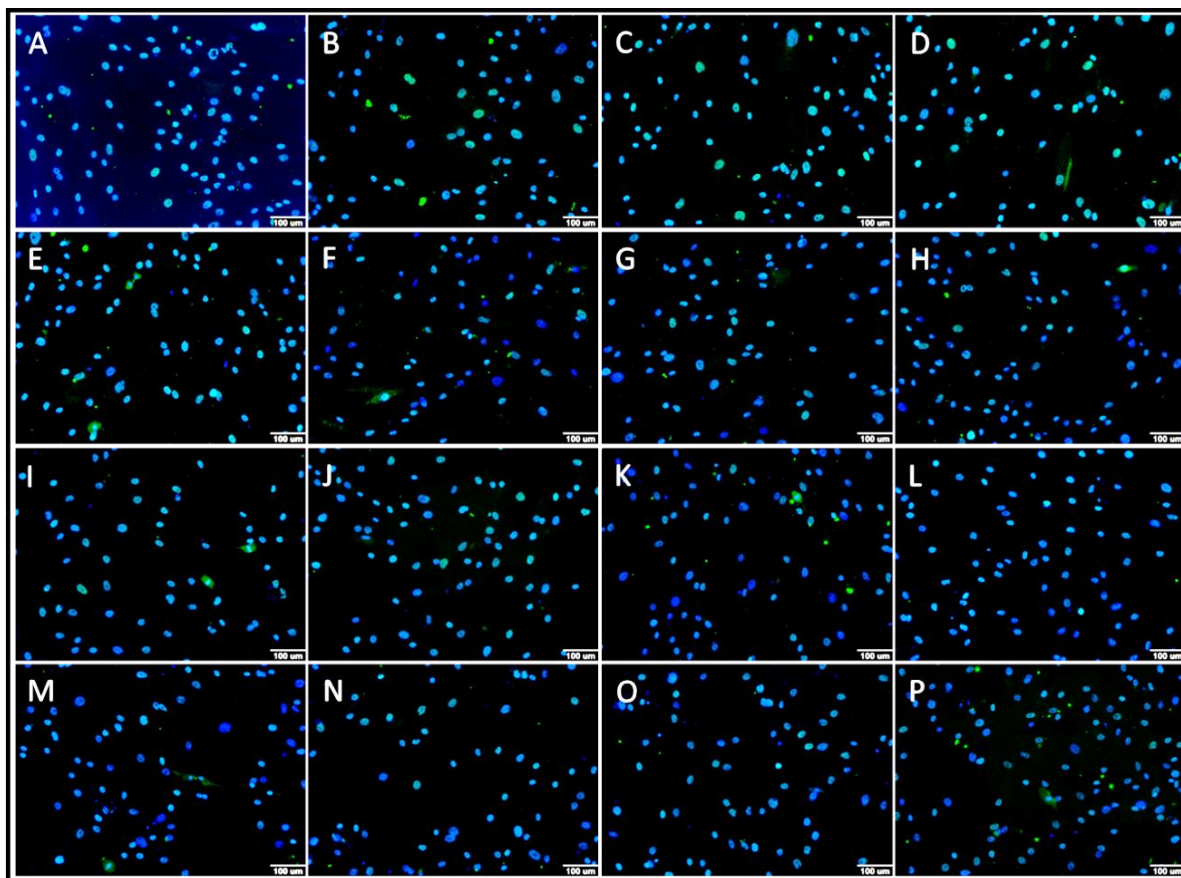


Gráficos representando a expressão relativa do gene *BCL2* após o tratamento com 7-KC (A) e com Triol (B) por um período de 24 horas em CTM-S e CTM-D. **A.** A comparação da expressão relativa entre as linhagens CTM-S e CTM-D foram realizadas através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0297$; fator células: $p = 0,0010$; interação: $p = 0,0628$. **B.** Comparação da expressão relativa entre as linhagens CTM-S e CTM-D realizada através do teste de ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,5843$; fator células: $p = 0,1204$; interação: $p = 0,7835$; #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

4.21 Análise da proteína survivina

Neste trabalho, foi avaliado a quantidade de survivina citoplasmática e de survivina nuclear entre as linhagens de CTM-S e de CTM-D, e após o tratamento com 7-KC e com Triol por um período de 24 horas, por imunofluorescência indireta. Por meio da avaliação das fotomicrografias é observado a marcação da proteína survivina na coloração verde, presente no citoplasma, em padrão difuso pontilhado; e no núcleo, em padrão pontilhado, em ambas as linhagens de CTM, figura 50.

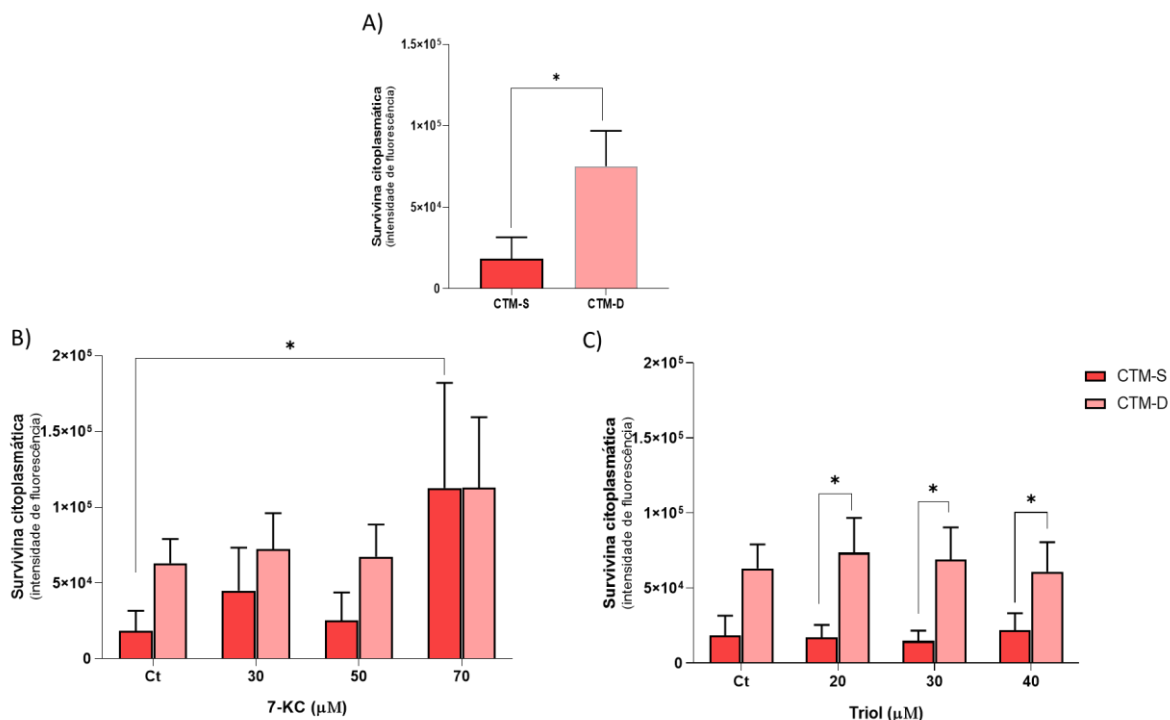
Figura 50. Proteína survivina de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



Fotomicrografia representativa da marcação da proteína survivina (FITC – verde) em linhagem de CTM-S (A–H) e de CTM-D (I–P) tratadas com 7-KC e Triol por um período de 24 horas. **A)** CTM-S cultivada em meio basal; **B)** CTM-S cultivada com 30 μM de 7-KC; **C)** CTM-S cultivada com 50 μM de 7-KC; **D)** CTM-S cultivada com 70 μM de 7-KC; **E)** CTM-S cultivada em meio basal; **F)** CTM-S cultivada com 20 μM de Triol; **G)** CTM-S cultivada com 30 μM de Triol; **H)** CTM-S cultivada com 40 μM de Triol; **I)** CTM-D cultivada em meio basal; **J)** CTM-D cultivada com 30 μM de 7-KC; **K)** CTM-D cultivada com 50 μM de 7-KC; **L)** CTM-D cultivada com 70 μM de 7-KC; **M)** CTM-D cultivada em meio basal; **N)** CTM-D cultivada com 20 μM de Triol; **O)** CTM-D cultivada com 30 μM de Triol; **P)** CTM-D cultivada com 40 μM de Triol. Núcleos marcados com *Hoechst* 33342 (DAPI – azul). Aquisição das imagens por meio da plataforma *High Content Screening*, objetiva de 10 X – escala igual a 100 μm . Fonte: Dra Débora Levy e a autora.

Baseados na análise da intensidade de fluorescência, foi verificado que a quantidade de survivina citoplasmática foi menor nas linhagens CTM-S quando comparado as linhagens CTM-D ($p = 0,0220$), figura 51A. O tratamento por 24 horas com 7-KC aumentou a quantidade de survivina citoplasmática nas linhagens de CTM-S, na concentração de 70 μM comparada ao controle cultivado em meio basal ($p = 0,0099$), figura 51B. Por outro lado, o tratamento com Triol não apresentou efeito significativo na quantidade de survivina citoplasmática tanto em CTM-S quanto em CTM-D ($p = 0,8993$). As diferenças observadas forma em relação as linhagens CTM-S e CTM-D ($p = 0,0502$), figura 51C.

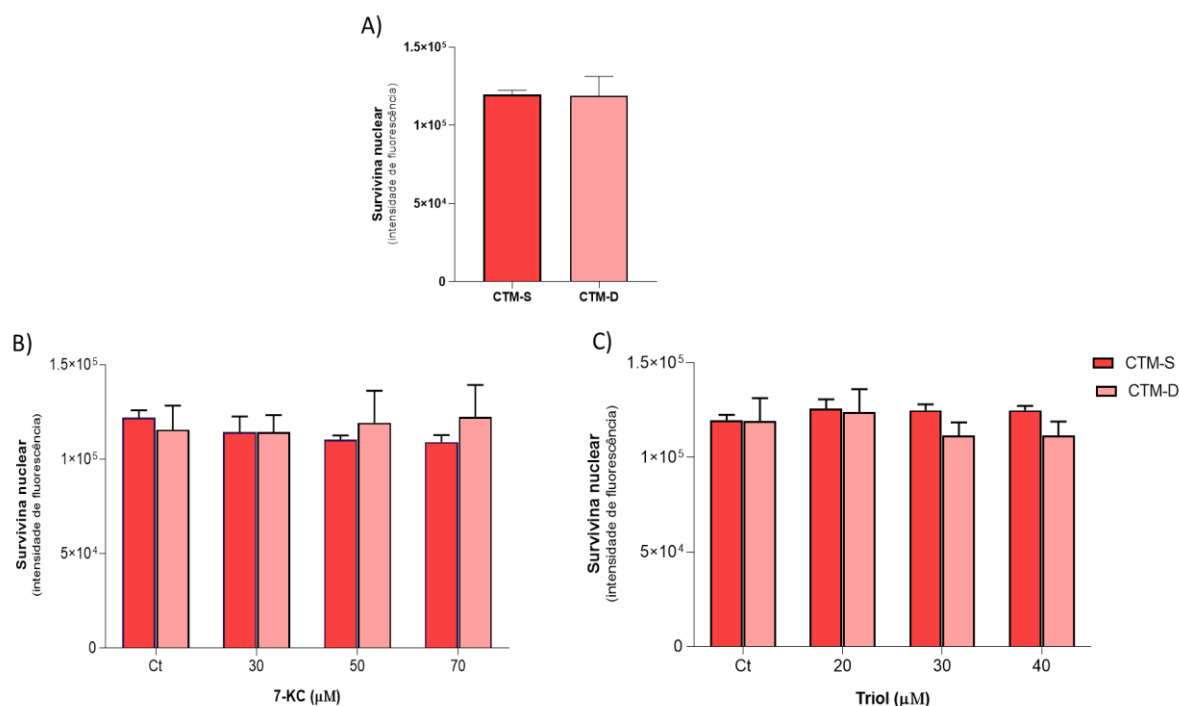
Figura 51. Análise da proteína survivina no citoplasma de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade de survivina citoplasmática. **A.** Comparação de survivina citoplasmática entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,0220$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade de survivina citoplasmática em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,1753$; fator células: $p = 0,2921$; interação: $p = 0,4704$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade de survivina citoplasmática em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p < 0,8993$; fator células: $p = 0,0502$; interação: $p = 0,6807$. *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as da linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

A quantidade de survivina nuclear foi semelhante entre as linhagens de CTM-S e CTM-D ($p = 0,4836$), figura 52A. Além disso, tanto o tratamento com diferentes concentrações de 7-KC ($p = 0,8430$) quanto com Triol ($p = 0,3257$) não apresentou efeito significativo na quantidade de survivina nuclear nas linhagens de CTMs avaliadas, figuras 52B e 52C respectivamente.

Figura 52. Análise da proteína survivina no núcleo em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



Gráficos representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade de survivina nuclear. **A.** Comparação de survivina nuclear entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,4836$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade de survivina nuclear em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,8430$; fator células: $p = 0,8012$; interação: $p = 0,2372$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de fluorescência, a quantidade de survivina nuclear em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p < 0,3257$; fator células: $p = 0,4735$; interação: $p = 0,3243$. Fonte: A autora.

4.22 Quantificação de glutatona celular

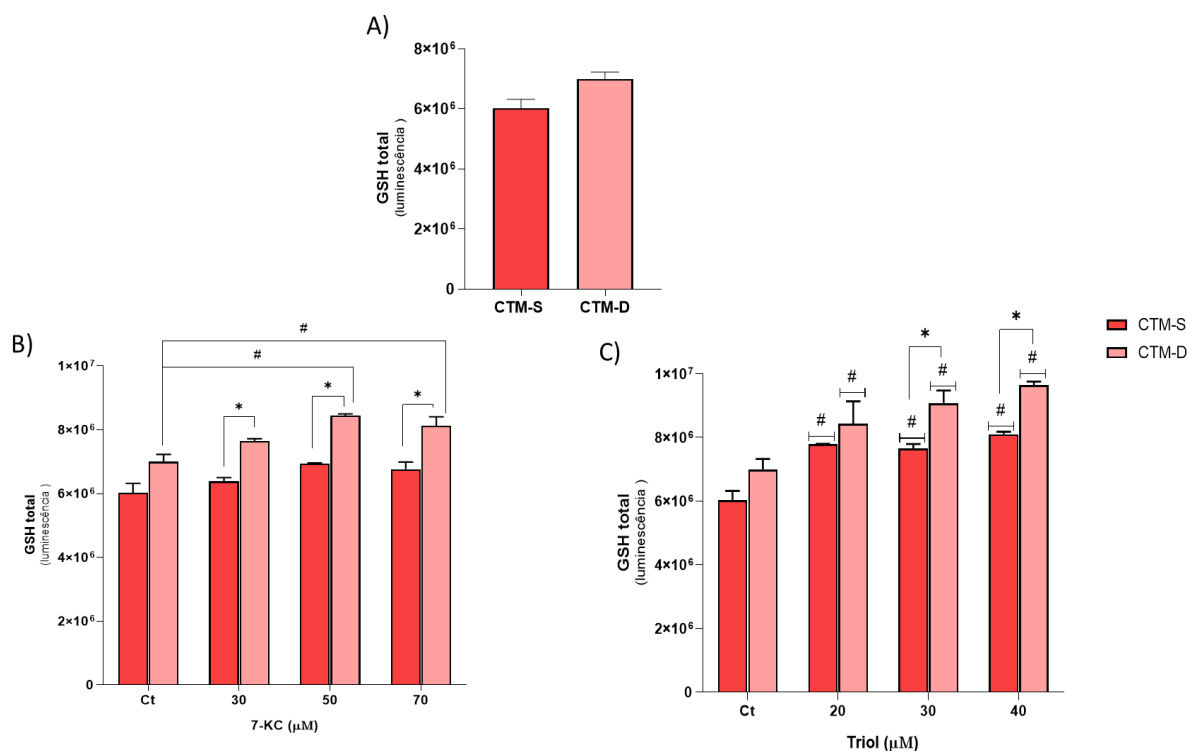
Neste trabalho foi avaliado o teor de glutatona celular por luminescência em ambas as linhagens de CTMs tratadas com os oxisteróis 7-KC e Triol por 24 horas. Sendo assim, foi verificado a concentração de glutatona total (figura 53), de glutatona oxidada (figura 54) e a razão entre o teor de glutatona total e de glutatona oxidada (figura 55), o que infere o teor de glutatona celular reduzida.

A comparação média do teor de glutatona total entre as linhagens CTM-S e CTM-D foram similares. Embora as linhagens CTM-D tenham apresentado maior concentração de glutatona total quando comparado as linhagens CTM-S a análise estatística por meio do teste T de *Student* para amostras independentes demonstrou uma significância limítrofe ($p = 0,0600$), figura 53A. No entanto, o tratamento com 7-KC ($p = 0,0013$) e com Triol por 24 horas aumentou a concentração de glutatona total. Referente ao tratamento com concentrações de 7-KC foi

observado que as diferenças encontradas foram nas linhagens de CTM-D ($p < 0,0001$); entre o controle cultivado em meio basal quando comparado as concentrações de 50 μM ($p = 0,0096$) e 70 μM ($p = 0,0388$) de 7-KC. Além disso, não foi observado interação entre o tratamento com 7-KC e as linhagens CTM-S e CTM-D ($p = 0,5899$), sendo que as diferenças observadas no aumento do teor celular de glutathiona total foram nas linhagens de CTM-D tratadas com as concentrações de 30 μM ($p = 0,0205$), 50 μM ($p = 0,0076$) e 70 μM ($p = 0,0135$) quando comparada as linhagens de CTM-S, figura 53B.

Quanto ao tratamento com o oxisterol Triol foi observado que em ambas as linhagens, CTM-S e CTM-D, houve aumento do teor celular de glutathiona total ($p = 0,0002$), porém não ocorreu interação entre tratamento e o tipo de linhagem celular ($p = 0,3079$). As diferenças observadas foram em ambas as linhagens de CTM-S e CTM-D tratadas nas concentrações de 20 μM , 30 μM e 40 μM de Triol quando comparado ao controle cultivado em meio basal ($p < 0,0500$). Entre as linhagens, foi observado diferença entre as concentrações de 30 μM ($p = 0,0420$) e 40 μM ($p = 0,0284$), figura 53C.

Figura 53. Análise do teor de GSH total de CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



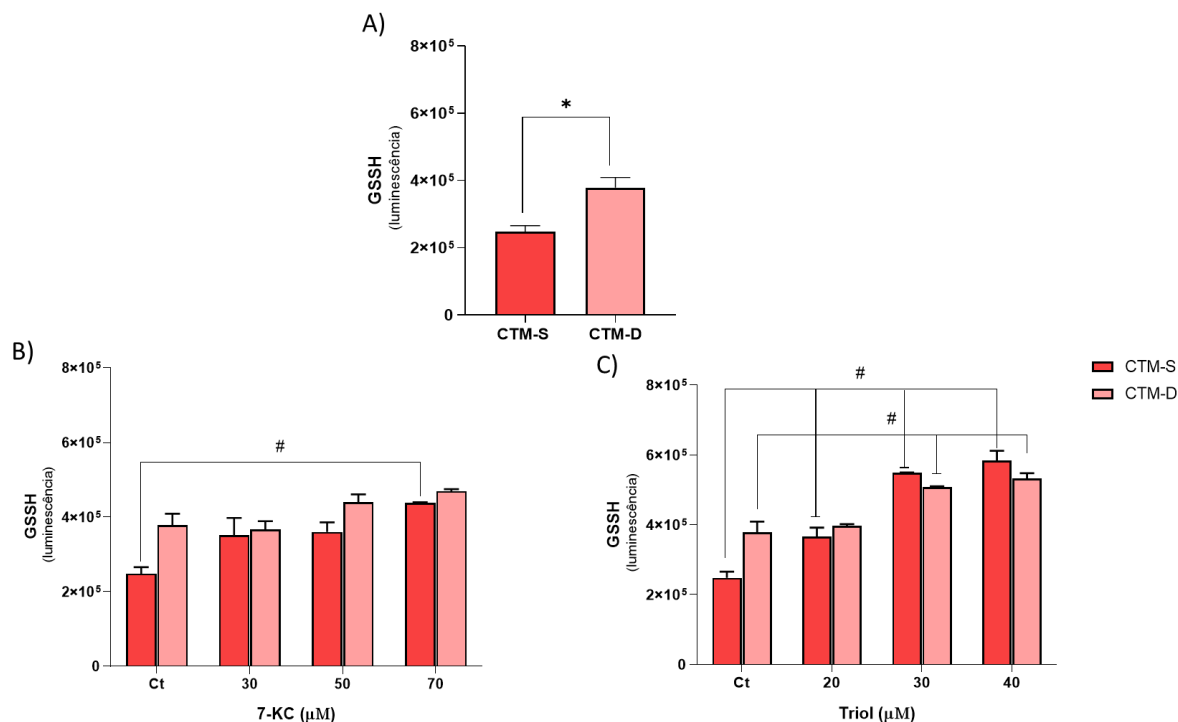
Gráficos representando, em intensidade de luminescência, a quantidade glutatona (GSH) total. **A.** Comparação de GSH total entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,0600$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de luminescência, a quantidade de GSH total em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0013$; fator células: $p < 0,0001$; interação: $p = 0,5899$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de luminescência, a quantidade de GSH total em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p < 0,0001$; fator células: $p = 0,0002$; interação: $p = 0,3079$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

A quantidade de glutatona oxidada (GSSH) foi elevada nas linhagens de CTM-D quando comparada as linhagens de CTM-S ($p = 0,0320$), figura 54A. Além disso, o tratamento com por 24 horas com o oxisterol 7-KC aumento a concentração celular de glutatona oxidada nas linhagens de CTMs ($p = 0,0028$), sendo que a principal alteração observada foi na linhagem CTM-S ($p = 0,0062$), em que ocorreu aumento no teor de glutatona oxidada nas linhagens de CTM-S tratadas com 70 μM de 7-KC quando comparada ao controle cultivado em meio basal ($p = 0,0087$), figura 54B.

O tratamento com o oxisterol Triol também promoveu aumento da concentração de glutatona oxidada nas linhagens de CTMs ($p < 0,0001$), não foi observado diferença entre as linhagens ($p = 0,2305$), porém, foi observada interação entre o tratamento e as linhagens de

CTMs ($p = 0,0050$). Dessa forma, em ambas as linhagens, CTM-S e CTM-D, o aumento de glutatona oxidada foi concentração-dependente em relação ao controle cultivado em meio basal ($p = 0,0050$), figura 54C.

Figura 54. Análise da concentração de glutatona oxidada em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



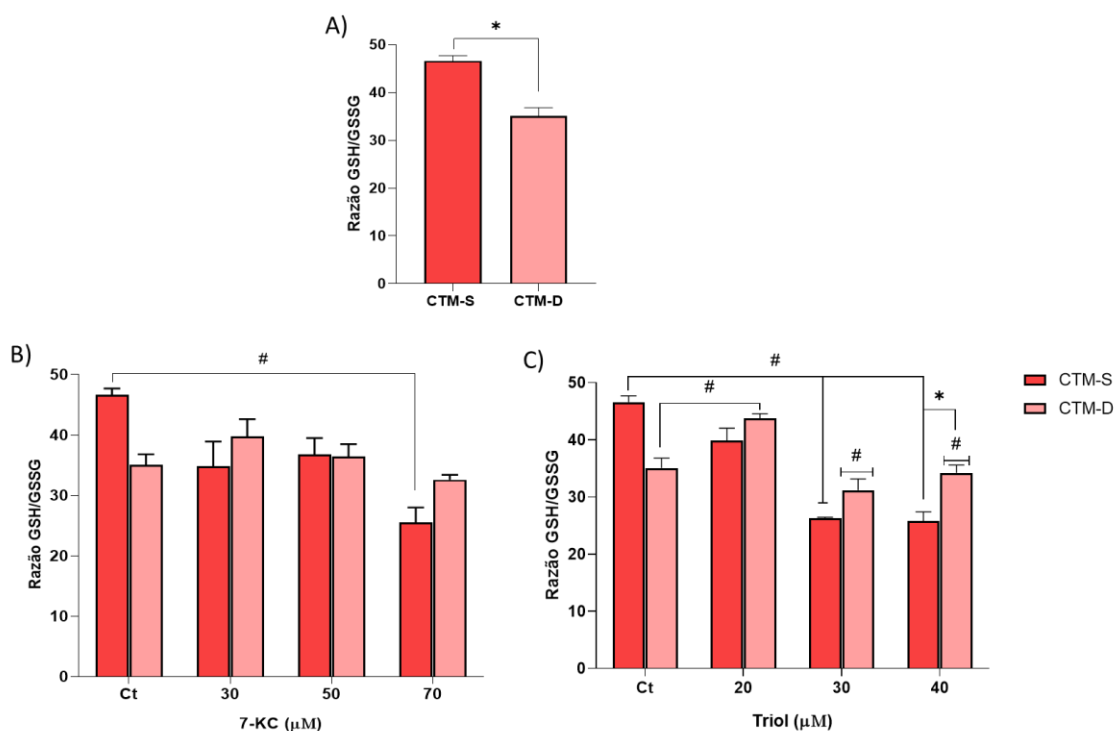
Gráficos representando, em intensidade de luminescência, a quantidade de glutatona oxidada (GSSH). **A.** Comparação de GSSH entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,0320$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de luminescência, a quantidade de GSSH em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0028$; fator células: $p = 0,0062$; interação: $p = 0,1660$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de luminescência, a quantidade de GSSH em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p < 0,0001$; fator células: $p = 0,2305$; interação: $p = 0,0050$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

Após a quantificação do teor de glutatona total e de glutatona oxidada foi calculado a razão entre glutatona total e oxidada (GSH/GSSH). A comparação entre as linhagens de CTMs demonstrou que em linhagens de CTM-S a razão GSH/GSSH foi maior quando comparada as linhagens de CTM-D ($p = 0,0149$), figura 55A. Além disso, o tratamento com 7-KC diminui a razão GSH/GSSH ($p = 0,0080$) e foi observado interação entre linhagens de CTMs e resposta ao tratamento ($p = 0,0209$). A diferença significativa na diminuição da razão GSH/GSSH foi nas linhagens de CTM-S tratadas com 70 μM de 7-KC quando comparada ao controle cultivado

em meio basal ($p = 0,0041$). Nesta análise não foi verificado diferença entre as linhagens de CTMs ($p = 0,9821$), figura 55B.

O tratamento com Triol apresentou efeito na razão GSH/GSSH nas linhagens de CTMs ($p < 0,0001$), sendo que a resposta entre as linhagens foi diferente ($p = 0,0007$). Referente as linhagens de CTM-S, foi observado diminuição da razão GSH/GSSH nas concentrações utilizadas de Triol, sendo significativa a concentração de $30 \mu\text{M}$ ($p = 0,0002$) e $40 \mu\text{M}$ ($p = 0,0001$) quando comparada ao controle cultivado em meio basal. Por outro lado, o tratamento com Triol em CTM-D apresentou variações na resposta, enquanto houve aumento da razão GSH/GSSH em CTM-D tratadas com $20 \mu\text{M}$ ($p = 0,0409$) em relação as concentrações de $30 \mu\text{M}$ ($p = 0,0368$) e $40 \mu\text{M}$ ($p = 0,0286$) de Triol, foi observado diminuição da razão de GSH/GSSH quando comparado as concentrações de $30 \mu\text{M}$ ($p = 0,0368$) e $40 \mu\text{M}$ ($p = 0,0286$) de Triol em relação ao controle cultivado em meio basal, figura 55C.

Figura 55. Análise da razão de GSH/GSSH em CTMs tratadas com 7-KC e Triol.



Gráficos representando, em intensidade de luminescência, a razão entre glutathiona total e glutathiona oxidada (GSH/GSSH). **A.** Comparação da razão GSH/GSSH entre as linhagens CTM-S e CTM-D cultivadas em meio basal através do teste T de *Student* ($p = 0,0149$). **B.** Gráfico representando, em intensidade de luminescência, a razão GSH/GSSH em células tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p = 0,0028$; fator células: $p = 0,0062$; interação: $p = 0,1660$. **C.** Gráfico representando, em intensidade de luminescência, a razão GSH/GSSH em células tratadas com diferentes concentrações de Triol. Comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D através da análise de variância por ANOVA de duas vias com pós teste de Tukey; fator tratamento: $p < 0,0001$; fator células: $p = 0,2305$; interação: $p = 0,0050$. #: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento dentro da mesma linhagem de CTM; *: Diferença significativa quando comparado os grupos de tratamento entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Fonte: A autora.

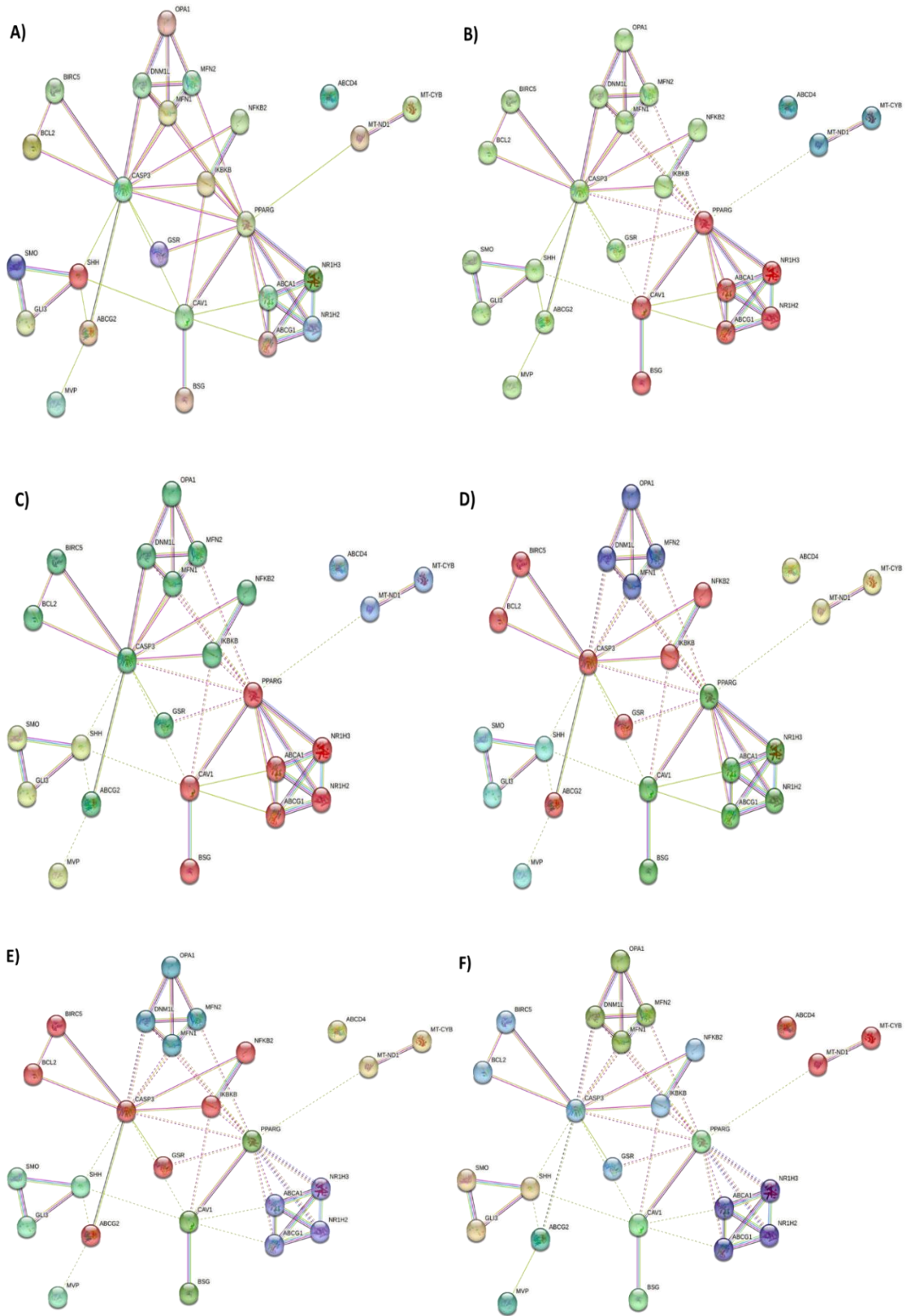
4.23 Análise da interação entre as variáveis estudadas

Após a avaliação final de todos os resultados, foi realizada análise de bioinformática de interação entre as variáveis estudadas. Sendo assim, foi observado a interação qualitativa entre gene-gene, proteína-gene ou proteína-proteína, figura 56A. Em seguida, foi avaliada a interação por agrupamentos, por meio da técnica não-hierárquica de *K-means*. Da interação entre as proteínas e os genes estudados, foi possível identificar sete agrupamentos diferentes com relações entre si, (figuras 56B-56F), ou seja, foram formados agrupamentos menores de relação entre as variáveis estudadas, no entanto, independentemente do número de agrupamentos, as relações entre as variáveis se mantiveram.

Dentre os agrupamentos formados, a figura 56E, foi formada por 6 agrupamentos, sendo eles: em azul um grupo formado pelos genes mitocondriais: *Mfn1*, *Mfn2*, *OPA1* e *DRP1*. Em roxo, um grupo formado pelos receptores LXR- α e LXR- β , e pelas proteínas ABC-A1 e ABC-G1. Em verde esmeralda, um grupo formado pelos receptores PPAR- γ e CD147, e pela proteína caveolina-1. Em verde água, um agrupamento composto pelos receptores SHh e SMO, e pelas proteínas GLI-3 e LRP. Em amarelo, um agrupamento formado pelos genes *NDI* e *CYTB*. Em vermelho, um grande agrupamento formado pelas proteínas survivina, ABC-G2, pela glutathiona, pelas enzimas caspases 3/7 e pelos genes *BCL2*, *NF-KB* e *IKKB1*. A proteína ABC-D4 não fez parte de nenhum agrupamento, ficando isolada (cor amarelo claro).

Nota-se que o maior agrupamento é composto por proteínas e genes relacionados ao metabolismo e sobrevivência celular. Além disso, a principal conexão entre todas as variáveis e a presença das enzimas caspases 3/7. Elas formam as principais conexões entre as proteínas relacionadas ao transporte de colesterol e fosfolípidos, bem como com a proteína ABCG2 e via de sinalização SHh; e com os genes relacionados a fusão e fissão mitocondrial.

Figura 56. Interação entre as variáveis estudadas em CTM-S e CTM-D



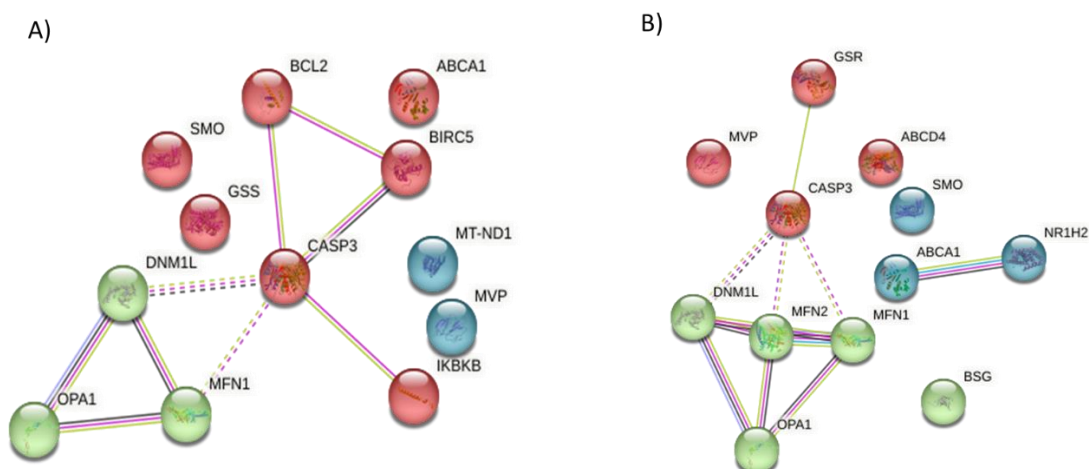
Interação entre proteínas e genes avaliados. O agrupamento foi realizado por meio de inteligência artificial que utilizou a base de dados PubMed como fonte de associação entre as variáveis. A análise é apenas qualitativa, demonstrando as possíveis conexões entre as variáveis. Os gráficos foram gerados pela Autora no site string-db.org. Fonte: A autora.

Após verificar que todas as variáveis apresentavam o mesmo perfil de associação, independentemente da quantidade de agrupamentos, foi realizada uma análise de *cluster* por meio da técnica não-hierárquica de *K-means*, apenas com as variáveis que demonstraram diferença após o tratamento com 7-KC (figura 57A) e com Triol (figura 57 B). Para ambos os tratamentos foi formado 3 agrupamentos.

Referente as 12 variáveis que apresentaram diferença após o tratamento com 7-KC, é observado que os principais efeitos da ação do 7-KC nas CTMs foram relacionados a proteínas e genes associados sobrevivência celular e no metabolismo energético mitocondrial. As proteínas SMO e LRP, bem como o gene *ND1* e a glutathiona não apresentaram conexões com nenhum dos agrupamentos após o tratamento com 7-KC. Isso ocorreu, pois, essas proteínas se conectavam a rede por meio de outras proteínas que não apresentaram diferença após o tratamento com 7-KC, figura 57A.

O tratamento com Triol nas CTMs apresentou um perfil diferenciado. Das 12 variáveis que apresentaram diferença após o tratamento com Triol, vale destacar que manteve o *cluster* formado pelos genes mitocondriais de fusão e fissão associado as caspases 3/7. Além disso, a proteína ABC-A1 e receptor *LXR-β* formaram um agrupamento independente. As proteínas LRP, ABC-D4, SMO e o receptor CD147 não formaram conexões fortes com as proteínas presentes nos agrupamentos, permanecendo isoladas. Com base nessa avaliação, o efeito da ação do Triol nas CTMs está relacionado ao metabolismo energético e lipídico, figura 57B.

Figura 57. Interação entre as variáveis das CTMs que apresentaram diferença após o tratamento com 7-KC e Triol



Interação entre proteínas e genes avaliados após o tratamento com 7-KC (A) e Triol (B). O agrupamento foi realizado por meio de inteligência artificial que utilizava a base de dados PubMed como fonte de associação entre as variáveis. A análise é apenas qualitativa, demonstrando as possíveis conexões entre as variáveis. Os gráficos foram gerados pela Autora no site string-db.org. Fonte: A autora.

Embora em apenas 12 variáveis o efeito do 7-KC e do Triol tenha sido significativo, é possível observar, em conjunto na figura 58, que as linhagens CTM-S e CTM-D apresentam perfis diferentes após o tratamento com 7-KC e Triol por 24 horas.

A normalização das variáveis foi realizada por meio do *Z-score* para cada grupo de proteínas ou genes. Por exemplo, para normalizar a proteína ABC-A1 foi utilizado os valores de imunofluorescência da ABC-A1 cultivada em meio basal e tratada com 7-KC, e calculado o *Z-score*, depois foi realizado o mesmo procedimento para a ABC-A1 tratada com Triol, e assim para todas as variáveis.

Figura 58. Heatmap das variáveis estudadas em CTM-S e CTM-D tratadas com 7-KC e Triol.

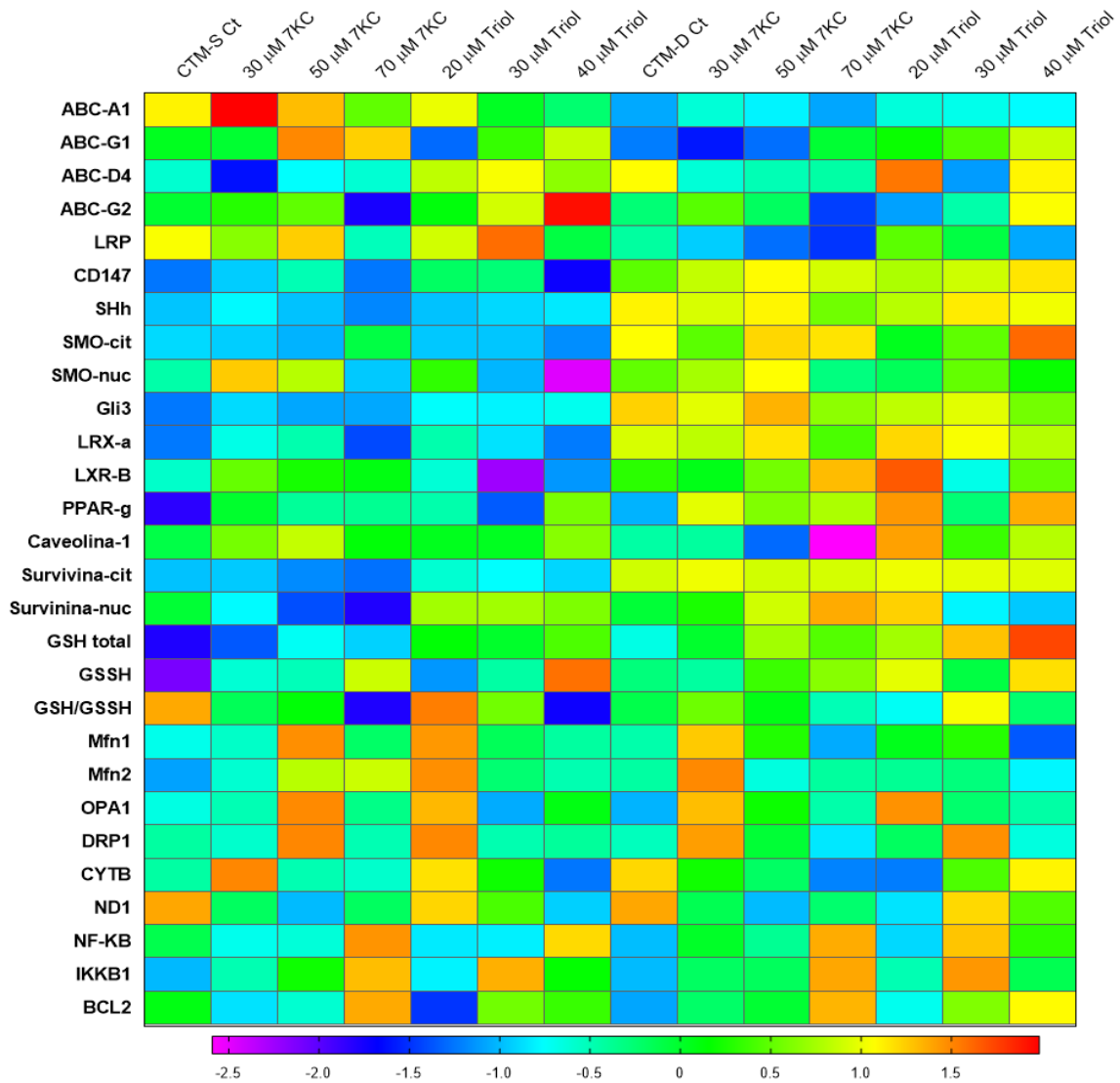


Gráfico representando em intensidade de cor as variáveis estudadas após o tratamento com 7-KC e Triol. A normalização dos dados foi realizada pelo meio do *Z-score*. Escala apresentando a variação em intensidade de cor o menor valor de -2,5 em roxo até o maior valor de 1,5 em vermelho. Fonte: A autora.

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do tratamento com Triol e 7-KC nas proteínas ABCs e LRP das células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de pacientes com LMA (CTM-D). Para tanto, foi utilizado como controle células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de indivíduos saudáveis (CTM-S).

Inicialmente, para responder ao objetivo geral foi necessário determinar a concentração citotóxica de Triol e 7-KC. Para tanto, os experimentos de citotoxicidade foram realizados em linhagens diferentes de CTMs, CTMs derivadas de medula óssea de indivíduos considerados clinicamente saudáveis (CTM-S) e CTMs de pacientes com LMA (CTM-D). Foi observado que os CI_{50} encontrados foram diferentes entre as linhagens CTM-S e CTM-D, tanto para o oxisterol Triol, quanto para o 7-KC.

O oxisterol Triol apresentou um CI_{50} de 55,0 μ M para as linhagens de CTM-D enquanto nas linhagens de CTM-S, o CI_{50} foi de 102,0 μ M. Referente ao tratamento com o oxisterol 7-KC, foi observado nas linhagens CTM-S, CI_{50} de 98,0 μ M, e nas linhagens CTM-D, CI_{50} foi de 82,0 μ M. Esses resultados demonstraram que as linhagens CTM-D são mais sensíveis aos efeitos citotóxicos de Triol e de 7-KC quando comparada as linhagens CTM-S.

Em ambos os tratamentos, tanto com 7-KC quanto com Triol foi observado a ativação das caspases 3/7, associada a desorganização das fibras de actina. A desorganização do citoesqueleto e a ativação das caspases 3/7 estão associadas ao início dos processos de morte celular causada por oxisteróis (169).

Entre as linhagens CTM-S e CTM-D, não foi observado diferença na ativação das caspases 3/7 tratadas com diferentes concentrações de 7-KC. Por outro lado, o tratamento com o oxisterol Triol apresentou diferença na ativação das caspases 3/7 entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Tais resultados para ambos os tratamentos podem ser justificados por meio dos valores das CI_{50} encontrados para cada linhagem de CTM. Sendo que, a CI_{50} do 7-KC foi próximo entre as linhagens de CTM-S e de CTM-D, enquanto para o oxisterol Triol os valores de CI_{50} entre as linhagens foram discrepantes. Isso indica que a mesma concentração de Triol apresenta um efeito diferente entre as linhagens CTM-S e CTM-D na indução de vias mortas em que as caspases 3/7 participam.

Sendo assim, foram escolhidas concentrações de 7-KC e de Triol inferiores a CI_{50} com o objetivo de avaliar o efeito da ação desses oxisteróis nas proteínas transportadoras ABCs e LRP e em suas vias de modulação, sem a presença de morte celular.

Das 44 proteínas ABCs expressas em humanos, 29 proteínas apresentaram alguma diferença na expressão gênica na linhagem de CTM-D tratadas com 20 μ M de Triol; e 27 proteínas transportadoras ABCs apresentaram diferença na expressão gênica após o tratamento com 25 μ M de 7-KC. Por meio desse experimento foi possível observar que o oxisterol 7-KC apresentou um efeito de inibidor da expressão gênica das proteínas ABCs, enquanto que o oxisterol Triol apresentou um efeito variado.

A partir desses resultados foram selecionadas seis proteínas ABCs para serem avaliadas após o tratamento com 7-KC e com Triol. Dentre as proteínas selecionadas, a proteína ABC-A1 e ABC-G1 são proteínas transmembranares responsáveis pelo efluxo colesterol e de fosfolípidios (170); a proteína ABC-D4, presente na membrana dos lisossomos, é responsável pelo efluxo de cobalamina dos lisossomos para o citoplasma (171); e as proteínas ABC-C1, ABC-C2 e ABC-G2 estão associadas ao fenótipo de resistência a múltiplas drogas (172).

Em células-tronco as proteínas pertencentes à família ABC apresentam entre outras, funções relacionadas a plasticidade. Também é observado diferenças entre células-tronco pluripotentes e/ou multipotentes saudáveis e de células-tronco tumorais no perfil de expressão das proteínas ABCs (173–176). Embora em nossas linhagens de CTMs, o gene *ABCB1* não tenha sido expresso, tanto o aumento da expressão gênica quanto da proteína ABC-B1 estão associadas ao fenótipo MDR e são marcadores de “*side population*” de células-tronco tumorais (177).

A relação entre a expressão gênica das proteínas ABCs e a diferenciação das células-tronco ainda não está bem estabelecida. No entanto, durante o processo de maturação e de diferenciação celular, ocorre um balanço em que há perda e ganhos na expressão gênica e na quantidade de proteínas ABCs (178). Essas diferenças encontradas podem ser explicadas, em partes, pelo tipo celular, o grau de diferenciação, a localização tecidual e as alterações no microambiente celular (179, 180).

De maneira surpreendente, das proteínas ABCs avaliadas em nosso trabalho, as proteínas ABC-C1 e ABC-C2 não foram encontradas pela técnica de imunofluorescência indireta em ambas as linhagens de CTMs. Romain Barbet *et al.*, (181) descreveram as diferenças na expressão gênica das proteínas ABCs em células-tronco embrionárias, células-tronco mesenquimais de medula óssea e células-tronco mesenquimais derivadas de células-tronco embrionárias. O perfil de expressão foi diferente entre as linhagens estudadas. As células-tronco embrionárias apresentaram a expressão de 44 genes da família ABC, as células-tronco mesenquimais derivada de células-tronco embrionárias apresentaram a expressão de 37 genes e as células-tronco de medula óssea apresentaram expressão de 35 genes da família ABC. Na

análise conduzida pelos pesquisadores as proteínas da família ABC-C, incluindo ABC-C1 e ABC-C2, apresentaram expressão estável entre as 3 linhagens estudadas. Cabe ressaltar que as células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea são heterogêneas, sendo possível observar subpopulações de CTMs diferentes derivadas de um mesmo tecido e/ou condições fisiopatológicas (182, 183). Além disso, em nosso trabalho foi verificada a presença das proteínas ABC-C1 e ABC-C2 e não apenas a expressão gênica. É possível que haja mecanismos pós-transcricionais nas CTMs avaliadas em nosso estudo, que impossibilitam a tradução da proteína.

As proteínas ABC-A1 e ABC-G1 são reguladas positivamente pelos receptores nucleares LXR- α , LXR- β e PPAR- γ , quando há alteração na quantidade de colesterol e moléculas lipofílicas no meio intracelular. Neste trabalho, foi avaliada as proteínas ABC-A1 e ABC-G1 e seus respectivos moduladores entre as linhagens de CTM-S e CTM-D e após o tratamento com 7-KC e Triol. Foi observado que as linhagens CTM-S apresentaram maior quantidade da proteína ABC-A1 quando comparada as linhagens CTM-D. Além disso, a diferença na quantidade de ABC-G1 também foi maior nas linhagens CTM-S, embora não tenha sido significativa. Outro dado interessante, foi que ocorreu uma inversão na presença dos receptores LXR- α e LXR- β entre as linhagens de CTMs. Nas linhagens de CTM-S, a quantidade do receptor LXR- α foi menor quando comparado as linhagens de CTM-D; enquanto a quantidade do receptor LXR- β foi maior nas linhagens CTM-S do que em CTM-D.

Pesquisas recentes tem demonstrado que o papel das proteínas ABC-A1 e ABC-G1 vão além do transporte de colesterol. Elas podem exercer a função de moléculas sinalizadoras na membrana plasmática para ativar a apoptose e a fagocitose de células apoptóticas (184, 185). Estratégias de restrição intracelular de colesterol vem sendo testadas a fim de diminuir a proliferação celular por meio da modulação da expressão da proteína ABC-A1 via ativação dos receptores LXR (186, 187). No câncer de ovário, por exemplo, a hipermetilação do gene *ABCA1* associado a diminuição na proteína ABC-A1 foram associados a sobrevivência livre de progressão menor (188). Ainda, em animais deficientes para as proteínas ABC-A1 e ABC-G1 foi observado aumento da mieloproliferação e após o transplante de medula óssea com a presença dos genes *ABCA1* e *ABCG1*, ocorreu diminuição da leucopoesse (189). Embora esse trabalho não tenha avaliado as CTMs de maneira isolado, e sim as CTHs do nicho medular, é importante ressaltar que nossos resultados são um indicativo de que os mecanismos de transporte de colesterol em CTMs derivadas de LMA estão alteradas e que isso pode ocorrer devido a necessidade de aumentar a proliferação de células-tronco mesenquimais e/ou outras células na medula óssea, uma vez que o colesterol intracelular é utilizado como fonte de energia.

Os oxisteróis são conhecidos como ligantes naturais dos receptores nucleares LXRs (91). Neste trabalho, o efeito do tratamento com 7-KC aumentou a quantidade da proteína ABC-A1 apenas nas linhagens CTM-S tratadas com 30 μ M de 7-KC. De maneira surpreendente, nas CTMs avaliadas, o tratamento por um período de 24 horas com o oxisterol 7-KC não apresentou efeito significativo na expressão da proteína ABC-G1, ou nos receptores LXR- α , LXR- β e PPAR- γ . Embora nas linhagens CTM-S e CTM-D a quantidade do receptor LXR- β tenha diminuído. Resultado semelhante foi reportado anteriormente em que o tratamento com 25 μ M de 7-KC em células humanas de epitélio pigmentar da retina (ARPE-19) que diminuiu a expressão dos receptores LXR- α/β , no entanto não foi significativo (190). É provável que o tempo de 24 horas de incubação das células com 7-KC não seja suficiente para que possa ocorrer diminuição no receptor LXR- β .

Por outro lado, o tratamento com Triol diminuiu a expressão da proteína ABC-A1 nas linhagens de CTM-S associada a diminuição do receptor LXR- β . Um dado interessante foi que o tratamento com Triol não apresentou efeito significativo na expressão de ABC-A1 e do receptor LXR- β nas linhagens de CTM-D. Esses resultados em conjunto demonstram que relacionado a presença da proteína ABC-A1 e ao receptor LXR- β as linhagens CTM-D são mais resistentes ao efeito do tratamento com Triol nas concentrações testadas, enquanto as CTM-S são mais sensíveis. Além disso, o efeito observado foi específico para as linhagens de CTM-S.

A terceira proteína associada ao fenótipo MDR avaliada neste trabalho, foi a proteína ABC-G2. A quantidade da proteína ABC-G2 entre as linhagens CTM-S e CTM-D, bem como após o tratamento com 7-KC e Triol, foi similar. Como descrito na seção de revisão da literatura, a atividade e a translocação da proteína ABC-G2 requer, em partes, interação com o receptor CD147. Posto que o tratamento com 7-KC e Triol não tenha apresentado efeito na quantidade de ABC-G2 das linhagens de CTMs, hipotetizamos que ambos os oxisteróis poderiam influenciar na concentração do receptor CD147.

O receptor CD147 é uma glicoproteína transmembranar e que apresenta em sua estrutura diferentes locais de interações proteína-proteína, na mesma célula ou em contato com células diferentes. Dentre as funções descritas, o receptor CD147 pode atuar como chaperona para expressar os transportadores de monocarboxilato MCT1 e MCT4 na membrana plasmática; e na membrana plasmática pode interagir com proteína integrina, com a enzima ciclofilina A e com a proteína caveolina-1 (191).

Na comparação entre as linhagens de CTM, foi observado que na linhagem CTM-D a quantidade do receptor CD147 foi maior em comparação as linhagens CTM-S. Este é o primeiro

trabalho que reporta a diferença na quantidade do receptor CD147 em CTMs derivadas de medula óssea de pacientes com LMA e em CTMs de indivíduos considerados saudáveis. Para mais, o tratamento com 40 μM de Triol diminuiu a concentração do receptor CD147 nas linhagens CTM-S enquanto nas CTM-D ocorreu aumento. Em células tumorais o receptor CD147 está associado ao processo de invasão tecidual, por meio da indução da atividade metaloproteinases de matriz, o que leva a degradação da matriz extracelular (192). O aumento da expressão e da metilação do gene *CD147* foi associado com baixa sobrevivência em pacientes com carcinoma espinocelular oral (193). Além disso, a expressão do gene *CD147* foi elevada em células T tumorais de pacientes com LLA-T e linfoma de células T (194), tornando-o um alvo na terapia contra o câncer (195).

A caveolina-1 é o principal constituintes das cavéolas, porções ricas em colesterol e glicosíngolipídeos presentes na membrana plasmática e que medeiam o transporte de macromoléculas independente da clatrina (196). A caveolina-1 está associada a homeostase do colesterol, a organização e retenção de receptores celulares e pode atuar como reguladora na tumorigênese (196). Neste trabalho, não foi observado diferença na expressão da proteína caveolina-1 entre as linhagens CTM-S e CTM-D. Leanne S. Sleer *et al.*, (197) demonstraram que a caveolina-1 interage com o 7-KC, provavelmente devido a similaridade entre as estruturas químicas do 7-KC e do colesterol. No entanto, tanto o tratamento com Triol quanto com 7-KC não apresentou efeito significativo na quantidade de caveolina-1 das linhagens de CTM.

A proteína LRP é o principal componente do complexo *vault*. O complexo *vault* realiza o transporte de moléculas do núcleo da célula para o citoplasma. A proteína LRP pode estar presente na célula na forma de monômeros e ativar vias de sinalização celular associadas a tumorigênese (198, 199). Aqui, é a primeira vez que é reportado as diferenças na quantidade de LRP entre linhagens de CTM-S e CTM-D. De maneira contra intuitiva, em nosso trabalho, foi observado diminuição da proteína LRP nas linhagens CTM-D em comparação as linhagens CTM-S. Embora esse resultado seja intrigante, a associação entre a resistência da multiplas drogas e a hiperexpressão da proteína LRP na LMA é de longa data, uma vez que em células-tronco tumorais multirresistentes e em células derivadas de pacientes com LMA é reportado aumento na expressão de LRP (200–203).

A resposta ao tratamento com 7-KC e com Triol foi diferente entre as linhagens de CTM-S e CTM-D. O tratamento com 70 μM de 7-KC diminuiu a quantidade da proteína LRP das linhagens de CTM-S, enquanto não foi observado efeito nas linhagens de CTM-D. Por outro lado, a expressão da proteína LRP foi similar nas linhagens de CTM-S tratadas com Triol enquanto nas linhagens de CTM-D, o tratamento com 20 μM de Triol aumentou a expressão da

proteína LRP, e nas demais concentrações houve diminuição da proteína LRP. Por meio da avaliação visual, foi observado que nas concentrações utilizadas de 7-KC e de Triol, a marcação da proteína se apresentou mais reticular quando comparada ao controle. Esse dado é sugestivo de que o tratamento com os oxisteróis 7-KC e Triol pode desintegrar o complexo *vault*. No entanto, para testar essa hipótese é necessário avaliar a estrutura da proteína por técnicas específicas, como microscopia eletrônica de transmissão e confocal.

Neste trabalho, avaliamos por imunofluorescência indireta a presença das proteínas SHh, SMO e Gli-3, em CTM-S e CTM-D e após o tratamento com 7-KC e Triol. Na comparação entre as linhagens CTM-S e CTM-D foi observado que todos os integrantes da via de sinalização SHh foram elevados nas linhagens de CTM-D em comparação as linhagens de CTM-S. Esse resultado, pode ser devido as CTM-D serem de um nicho hematopoiético alterado presente na leucemia mieloide aguda. As CTMs derivadas de medula óssea de doenças hematológicas apresentam fatores genéticos e fenotípicos alterados, são células tipicamente senescentes, secretoras de proteases, de citocinas inflamatórias, e de fatores de crescimento que podem tornar o microambiente medular favorável ao crescimento e desenvolvimento de uma célula-tronco tumoral e resistência a terapia (204–208).

A inibição de vias de sinalização, como a via SHh é uma alternativa para diminuir a proliferação celular e a resistência a múltiplas drogas (209–211). Alguns estudos têm demonstrado que análogos de oxisteróis e oxisteróis endógenos podem inibir a expressão dos fatores de transcrição da família Gli em diferentes tipos de células (212–215).

Nas proteínas da via SHh avaliadas nesse trabalho, foi observado diferença na concentração citoplasmática e nuclear da proteína SMO tratadas com 7-KC e Triol. As demais proteínas, SHh e Gli-3, não apresentaram diferença. Nas linhagens CTM-S, o tratamento com 70 μM de 7-KC aumentou a concentração da proteína SMO no citoplasma, enquanto nas concentrações de 30 μM e 50 μM de 7-KC foi observado aumento da translocação da proteína SMO para o núcleo. De forma semelhante, o tratamento com 20 μM e 30 μM de Triol aumentou a concentração da proteína SMO no citoplasma das linhagens de CTM-S, associado ao aumento da translocação da proteína SMO para o núcleo na concentração de 20 μM de Triol. Nas linhagens de CTM-D não foi observado efeito do tratamento com 7-KC e Triol na concentração e/ou translocação da proteína SMO.

Baseados nesses resultados, é possível afirmar que as linhagens CTM-S são mais responsivas ao tratamento com 7-KC e Triol do que as CTM-D na ativação e translocação da proteína SMO e que isso ocorre independente da via de sinalização SHh, ou seja, os oxisteróis 7-KC e Triol ativam a proteína SMO a jusante da via SHh apenas em linhagens CTM-S.

Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa encontraram resultados semelhantes relacionado a ativação da proteína SMO por oxisteróis, porém em diferentes linhagens celulares (216). Cabe ressaltar que diferentes oxisteróis podem ser ligantes alostéricos da proteína SMO na membrana plasmática e em seguida induzir ativação da via, o que pode resultar na endocitose e translocação da proteína SMO para o núcleo (217–220).

A proteína ABC-D4 está associada ao transporte de cobalamina, até então, é considerada uma proteína presente apenas na membrana dos lisossomos(171). Por meio da avaliação visual das fotomicrografias em que foi marcado a proteína ABC-D4 com anticorpo anti-ABC-D4 foi verificado a presença da proteína ABC-D4 no núcleo das células-tronco mesenquimais. Para confirmar a marcação da proteína ABC-D4 no núcleo das CTMs e não a ligação inespecífica do anticorpo, foi realizado a marcação desta proteína nas linhagens de câncer de mama (MDA) e de fibroblasto (MRC-5). Em ambas as linhagens não foi observado a presença da proteína no núcleo. É possível que a presença da proteína ABC-D4 no núcleo das CTMs esteja associada ao transporte de cobalamina, ou que haja algum envolvimento da proteína no ciclo celular, na fase de síntese de DNA devido a função da cobalamina. No entanto, é necessário realizar experimentos de imunoprecipitação e de colocalização para saber em que região e em quais proteínas a ABC-D4 está associada no núcleo celular.

O tratamento com 7-KC não alterou a presença da proteína ABC-D4 no núcleo ou no citoplasma nas linhagens de CTM-S e de CTM-D. No entanto, o tratamento com Triol aumentou a quantidade da proteína ABC-D4 no citoplasma das células de CTM-D. Essa alteração não foi observada nas linhagens CTM-S. Este resultado pode ser devido a toxicidade do oxisterol Triol nas CTM-D, em que há necessidade do aumento do transporte de cobalamina para síntese de DNA em condições de estresse metabólico celular e início da ativação de vias morte e/ou para diminuir o estresse oxidativo causado pelo Triol, uma vez que a cobalamina é um agente redutor de espécies reativas derivadas do oxigênio (221–223).

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental na reprogramação metabólica e adaptação de uma célula saudável ou tumoral. Tais características são derivadas das inúmeras vias catabólicas e anabólicas do metabolismo bioenergético que as mitocôndrias participam e da interação com outras organelas citoplasmáticas (224, 225).

Aqui, foi avaliado o efeito do tratamento com os oxisteróis 7-KC e Triol nas mitocôndrias das CTMs em dois momentos diferentes: primeiro, foi verificado se o tratamento com concentrações tóxicas de 7-KC e de Triol apresenta impacto no potencial de membrana mitocondrial por meio da alteração na intensidade de fluorescência do corante TMRE e em segundo, se o tratamento com concentrações abaixo da IC₅₀ de 7-KC e de Triol pode interferir

na expressão relativa de genes associados a dinâmica mitocondrial e a cadeia transportadora de elétrons.

Referente ao efeito do oxisterol 7-KC no potencial de membrana mitocondrial, foi observado que nas linhagens de CTM-S ocorreu aumento gradativo do potencial de membrana até a concentração de 50 μM de 7-KC, seguido de uma diminuição parcial do potencial de membrana na concentração de 100 μM de 7-KC. Nas linhagens de CTM-D o potencial de membrana mitocondrial manteve-se estável, similar ao controle, nos tratamentos de 10-50 μM de 7-KC, sendo que o potencial de membrana mitocondrial diminuiu apenas na concentração de 100 μM de 7-KC.

Quanto ao tratamento com o oxisterol Triol, o aumento do potencial de membrana foi gradual até a concentração de 25 μM nas linhagens CTM-S, seguida de diminuição nas concentrações de 50 μM e 100 μM de Triol. Nas linhagens de CTM-D, o tratamento com as concentrações entre 10 e 50 μM de Triol manteve o potencial de membrana mitocondrial semelhante ao do controle. A principal diferença observada nas linhagens CTM-D foi na concentração de 100 μM de Triol em que o potencial de membrana diminuiu. Aqui, é importante ressaltar a baixa viabilidade celular no tratamento com 100 μM de 7-KC e Triol, o que é inversamente proporcional a quantidade de mitocôndrias ativas.

O potencial de membrana mitocondrial é um gradiente eletroquímico gerado a partir da energia livre do transporte de elétrons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, sendo este, mantido por meio do bombeamento de prótons. A partir dessa força próton-motriz ocorre a síntese de ATP pela ATP sintase (complexo V) (226, 227).

Nossos resultados são sugestivos de que o tratamento com 7-KC e com Triol nas linhagens CTM-S com concentrações até 50 μM aumentam a capacidade da mitocôndria em bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, ou seja, são acopladoras do potencial de membrana mitocondrial. Isso não significa que essas mitocôndrias mais ativas são mais saudáveis, mas sim, que há uma resposta de adaptação das CTM-S a um meio oxidativo promovido pelo efeito dos oxisteróis, 7-KC e Triol. De maneira surpreendente, as linhagens CTM-D não apresentaram esse efeito de aumento no potencial de membrana mitocondrial tratadas com 7-KC e Triol. É possível que as mitocôndrias de CTM-D sejam adaptadas ao estresse celular devido a sua origem – um microambiente medular tumoral – e dessa forma, as concentrações de 7-KC e Triol não apresentam o mesmo efeito no potencial de membrana como foi observado nas linhagens de CTM-S.

Na avaliação visual das fotomicrografias, foi observado que em CTMs cultivadas em meio basal as mitocôndrias apresentavam-se em forma de rede reticular espalhadas pelo

citoplasma celular, e que o tratamento com concentrações de 10 a 100 μM de 7-KC e de Triol apresentavam efeito na morfologia, com possível fragmentação da rede mitocondrial e agrupamento perinuclear. O agrupamento perinuclear de mitocôndrias é uma estratégia para aumentar a troca de substâncias entre mitocôndrias e núcleo em situações de estresse celular metabólico e ativação inicial das vias de morte celular. Em CTH a fragmentação de mitocôndrias foi associada ao aumento do potencial de membrana e a quiescência celular (228).

Sendo assim, levantamos a hipótese de que os oxisteróis 7-KC e Triol podem alterar a expressão de genes que fazem parte do processo de dinâmica mitocondrial e de genes associados a cadeia transportadora de elétrons nas CTMs. Neste sentido, foi avaliado por PCR em tempo real, a expressão relativa dos genes mitocondriais *Mfn1* e *Mfn2*, *OPA1*, relacionados ao processo de fusão mitocondrial, o gene *DRP1* relacionado ao processo de fissão mitocondrial, e os genes *CYTB* e *ND1* relacionados a cadeia transportadora de elétrons.

Referente ao efeito do tratamento com 7-KC nas CTMs, foi observado que na menor concentração de 7-KC (30 μM), ocorre aumento da expressão relativa dos genes *Mfn1* e *OPA1* relacionado a fusão e do gene *DRP1* relacionado a fissão. Sendo que na concentração de 50 μM de 7-KC, foi observado aumento na expressão do gene *Mfn1* e *DRP1* em CTM-S, enquanto em CTM-D foi observado aumento de expressão relativa dos genes *OPA1* e *DRP1*. Por fim, o tratamento com 70 μM de 7-KC não alterou a expressão desses genes nas linhagens CTM-S, enquanto nas linhagens CTM-D o tratamento com 70 μM de 7-KC diminuiu a expressão do gene *Mfn1* e *DRP1* e aumento na expressão do gene *OPA1*. O hipoexpressão do gene *ND1* foi observado em ambas as linhagens de CTM tratadas com 7-KC.

Esses resultados em associação, referente ao tratamento com 7-KC, nas CTM-S e CTM-D, demonstram que na menor concentração utilizada ocorre uma alteração no processo metabólico celular envolvendo a dinâmica mitocondrial. O processo da fusão mitocondrial é regulado pelas enzimas GTPases *Mfn1* e *Mfn2*, que estão ancoradas na membrana mitocondrial externa, e pela *OPA1*, presente na membrana interna mitocondrial. Por outro lado, o processo de fissão mitocondrial ocorre com o recrutamento da enzima GTPase *Drp1* do citosol para as mitocôndrias (229, 230). O processo de fusão mitocondrial dá-se quando há necessidade celular de ganho energético. Em contrapartida, o processo de fissão mitocondrial ocorre quando há necessidade celular de manter o controle de mitocôndrias disfuncionais devido a ação de agentes tóxicos e/ou alteração metabólica prejudicial a sobrevivência celular (231).

Nossos dados demonstram que mesmo em concentrações em que não há morte celular, há um dano metabólico na geração de energia em nível molecular. Tal resultado se sustenta devido a regulação negativa da expressão do gene *ND1* nas CTM-S e CTM-D. O gene *ND1*

codifica a subunidade central da NADH desidrogenase da cadeia respiratória da membrana mitocondrial (Complexo I). O Complexo I é responsável pela transferência de elétrons do NADH para a cadeia respiratória (232). Nossos resultados, sugerem em partes e em nível molecular, que o 7-KC pode atuar diminuindo a transferência de elétrons via complexo I. No entanto é importante ressaltar que esses resultados são relacionados a expressão gênica, e não a funcionalidade completa do complexo I mitocondrial.

Quanto ao efeito do tratamento com Triol nos genes mitocôndrias das linhagens de CTMs, foi observado que na menor concentração, 20 μM de Triol, a resposta ao tratamento entre as linhagens foi inversa. Enquanto ocorreu aumento da expressão dos genes *Mfn1*, *Mfn2* e *OPA1* nas linhagens de CTM-S, nas linhagens de CTM-D esses genes foram hiporexpressos ou sem alteração. Na concentração de 30 μM de Triol foi observado diminuição da expressão do gene *Mfn2* e aumento da expressão do gene *OPA1* e *DRP1* nas linhagens CTM-D. Não foi observado diferença na expressão desses genes nas linhagens de CTM-S. Na concentração de 40 μM de Triol os genes *Mfn1*, *Mfn2* foram hiporexpressos enquanto que o gene *OPA1* apresentou aumento na expressão nas linhagens de CTM-S.

Sendo assim, o processo de fusão mitocondrial inicia-se, em nível molecular, nas CTM-S com o tratamento de 20 μM de Triol, enquanto que nas CTM-D é regulado negativamente. Tal resultado é sustentado pelas alterações de morfologia observadas nas fotomicrografias das CTMs tratadas com Triol, em que há alteração na rede reticular de mitocôndrias. Outro dado relevante é que as linhagens de CTM-D são mais sensíveis ao efeito citotóxico do Triol quando comparado as CTM-S, ou seja nas mesmas concentrações de Triol em que ocorre início do processo de fusão nas CTM-S, nas CTM-D pode estar ocorrendo um processo metabólico tóxico associado a ativação de vias morte celular, portanto, a regulação da fusão mitocondrial será negativa ou inalterada.

Embora o tratamento com Triol não tenha influenciado a expressão dos genes relacionados a cadeia transportadora de elétrons, resultados de estudos anteriores demonstraram, que oxisteróis como o 25-hidroxicolesterol são essenciais para manter a capacidade da cadeia respiratória mitocondrial (233); e que oxisteróis com efeito mais tóxico como o Triol prejudicam a biogênese mitocondrial por indução da apoptose e reduzem a capacidade da cadeia respiratória mitocondrial (234).

Das variáveis relacionadas a sobrevivência celular, os genes *NF-KB*, *IKKB1* e *BCL2*, e a proteína survivina, foi observado diferença na expressão relativa do gene *BCL2* em CTM-D tratadas com 7-KC. Além disso, nas CTM-D foi observado aumento da expressão gênica do *IKKB1*, repressor da via de sinalização NF-kappa B. Por outro lado, na concentração de 70 μM

de 7-KC ocorreu aumento na expressão da proteína survivina no citoplasma das linhagens de CTM-S. Tais resultados são característicos do início da ativação da via de morte apoptótica e que o aumento na expressão desses genes e da proteína survivina é uma forma de reverter o processo de morte celular iniciada pelo 7-KC.

O gene *BCL2*, codifica a proteína BCL2, presente na membrana interna mitocondrial e exerce a função de inibição da apoptose e sobrevivência celular. De forma semelhante, a proteína survivina no citoplasma atua como repressora da apoptose, no núcleo ela está associada a tubulina e participa da divisão celular. Ambas as proteínas estão associadas a resistência a quimioterapia e mecanismos de escape de morte celular em células tumorais (235–237). Aqui, cabe destacar que em CTM-D a quantidade de survivina citoplasmática foi elevada, e que esse pode ser um mecanismo de sobrevivência das CTMs derivadas de pacientes diagnosticados com LMA, uma vez que a survivina interage com mais várias vias de proliferação e moléculas de superfície (238, 239).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa caracterizou o tipo de morte celular induzida por 7-KC em CTM-D, com predominância da apoptose (14). Além disso, em outros trabalhos conduzidos por nosso grupo foi evidenciado que os oxisteróis induzem a morte celular, preferencialmente por apoptose e aumento do estresse oxidativo celular através da geração de espécies reativas de oxigênio (169, 216, 240–244).

Aqui, foi verificado a presença do estresse oxidativo nas CTMs tratadas com 7-KC e Triol por meio da quantificação do teor de glutatona através da técnica de luminescência, em que foram avaliados três parâmetros: o teor de glutatona total, glutatona oxidada e a razão entre GSH/GSSH. Na avaliação entre as CTMs, foi observado que as linhagens CTM-S apresentaram teor reduzido de glutatona oxidada e aumento na razão de GSH/GSSH, o que reflete a quantidade de glutatona reduzida celular. No entanto, nas linhagens de CTM-D esses valores foram inversos, foi verificado aumento no teor de glutatona oxidada e diminuição na razão GSH/GSSH.

A glutatona é o principal meio de proteção celular contra o dano causado por peróxido de hidrogênio as membranas e organelas celulares (245). Em CTMs tumorais o aumento do estresse oxidativo no microambiente induz a senescência celular, perda de função e incapacidade de diferenciação celular (204). Em contrapartida, exossomos derivadas de CTMs saudáveis de medula óssea protegem diferentes tipos de células dos danos causados por peróxido de hidrogênio (246, 247).

O tratamento com 7-KC aumentou de glutatona oxidada e diminuição de glutatona reduzida apenas nas linhagens de CTM-S. Embora, nas linhagens de CTM-D tratadas com

7-KC tenha sido observado aumento no teor de glutatona total. Este dado reafirma as diferenças observadas anteriormente entre as linhagens de CTM-S e CTM-D tratadas com 7-KC. Em que há mecanismos de resistência diferentes entre ambas as linhagens.

O tratamento com Triol aumentou o teor de glutatona total, devido ao aumento de glutatona oxidada e diminuição de glutatona reduzida, em ambas as linhagens de CTMs. Esses dados associados aos dados de expressão gênica mitocondrial demonstram que o Triol pode induzir a lipotoxicidade em CTMs, em que há aumento de peróxido de hidrogênio e disfunção mitocondrial (248).

Em suma nossos resultados sugerem que o tratamento com concentrações inferiores da CI_{50} do 7-KC e Triol promovem uma ruptura do equilíbrio redox metabólico em CTMs. E que as diferenças entre as linhagens de CTMs determinam o efeito da ação do 7-KC e do Triol.

6. CONCLUSÃO

Baseados nos resultados encontrados durante o desenvolvimento desse trabalho, em que foi verificado a ação dos oxisteróis 7-KC e Triol nas proteínas transportadoras ABCs (*ATP-binding cassette*) e LRP (*Lung resistance-related protein*) de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de pacientes com leucemia mieloide aguda (CTM-D), sendo utilizado como controle células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de indivíduos saudáveis (CTM-S) foi concluído que:

- 1) Fisiologicamente as CTM-S e CTM-D são diferentes. As linhagens CTM-D apresentam alteração nas vias de transporte de colesterol e do estresse metabólico, em que foi observado diminuição da proteína ABC-A1, do receptor LXR- β , da proteína LRP e de glutathione reduzida, associados ao aumento da resistência a apoptose via survivina citoplasmática, e das vias de proliferação e invasão celular, *Sonic Hedgehog* e CD147.
- 2) As linhagens CTM-D são mais sensíveis ao efeito citotóxico dos oxisteróis Triol e 7-KC do que as linhagens CTM-S; e respondem diferente ao tratamento com as mesmas concentrações de 7-KC e de Triol e isso é decorrente das diferenças fisiológicas entre as linhagens.
- 3) Os tratamentos com 7-KC e Triol não apresentaram efeito na quantidade das proteínas ABC-G1 e ABC-G2 das CTMs.
- 4) Os efeitos decorrentes da ação do 7-KC nas CTMs foram no metabolismo e na sobrevivência celular, com diferenças entre as linhagens. Em CTM-S foi observado diminuição da proteína LRP e do teor de glutathione reduzida associado ao aumento de survivina citoplasmática e translocação da proteína SMO para o núcleo. Em linhagens CTM-D foi observado aumento da expressão do gene *BCL2* e de genes *Mfn1*, *OPA1* e *DRP1* relacionados ao processo de fusão e fissão mitocondrial.
- 5) Os efeitos decorrentes da ação do Triol nas CTMs foram em fatores relacionados ao metabolismo energético celular e ao transporte de colesterol, com diferença na resposta ao tratamento entre as linhagens. Em linhagens CTM-S o efeito metabólico do Triol foi no aumento da expressão de genes relacionados a fusão, *Mfn1*, *Mfn2* e *OPA1* e translocação da proteína SMO para o núcleo, associados a diminuição da proteína ABC-A1 e do receptor LXR- β . Em linhagens CTM-D houve aumento do processo de fissão mitocondrial e regulação negativa dos genes relacionados ao processo de fusão mitocondrial, associado ao aumento de glutathione oxidada e das proteínas ABC-D4 e LRP.

7. TRABALHOS PUBLICADOS

Artigos completos publicados em periódicos durante o período de doutorado

1. De Pádua Covas Lage, Luís Alberto; Culler, Hebert Fabrício; Barreto, Guilherme Carneiro; **Reichert, Cadiele Oliana**; Levy, Débora; De Oliveira Costa, Renata; Rocha, Vanderson; Pereira, Juliana. Tumor Mutation Burden Involving Epigenetic Regulatory Genes And The Rho Gtpase Predicts Overall Survival In Nodal Mature T-Cell Lymphomas. *Clinical Epigenetics.*, V.14, P.180 - 188, 2022.
2. De Pádua Covas Lage, Luís Alberto; Machado, Pedro Paulo Faust; **Reichert, Cadiele Oliana**; Miranda, Eliana; Culler, Hebert Fabrício; Da Siqueira, Sheila Aparecida Coelho; De Oliveira Costa, Renata; Miyashiro, Dênis Ricardo; Sanches, José Antônio; Rocha, Vanderson; Chiattonne, Carlos Sérgio; Pereira, Juliana. High-Dose Extended-Field Radiotherapy Plus Chemotherapy Improved Survival In Extranodal Nk/T-Cell Lymphoma In A Real-Life Setting: Results From The Multicenter T-Cell Brazil Project. *Scientific Reports.*, V.12, P.1 - 13, 2022.
3. De Freitas, Fábio Alessandro; Levy, Débora; **Reichert, Cadiele Oliana**; Cunha-Neto, Edecio; Kalil, Jorge; Bydlowski, Sérgio Paulo. Effects Of Oxysterols On Immune Cells And Related Diseases. *Cells.*, V.11, P.1251, 2022.
4. Renata De Oliveira Costa; Joyce Santos Nascimento; **Reichert, Cadiele Oliana.**; Adriana Pedroso Augusto Da Costa; Maria Aparecida Pedrosa Dos Santos; Alberto Macedo Soares; Carlos Eduardo Mendonça Tomé; Ricardo Leite Hayden; Cassiano Waldanski Dos Santos; Bruno Barreiro; Amer Abdul;Khatib; Luís Alberto De Pádua Covas Lage; Juliana Pereira; Mônica Mazzurana Benett. “H” Is Not For Hydroxychloroquine— “H” Is For Heparin: Lack Of Efcacy Of Hydroxychloroquine And The Role Of Heparin In Covid-19—Preliminary Data Of A Prospective And Interventional Study From Brazil. *Bmc Infectious Diseases.*, V.22, P.120, 2022.
5. De Pádua Covas Lage, Luís Alberto; Araújo Soares, Vinícius; Meneguim, Thales Dalessandro; Culler, Hebert Fabrício; **Reichert, Cadiele Oliana**; Jacomassi, Mayara D’auria; Reis, Diego Gomes Cândido; Zerbini, Maria Cláudia Nogueira; De Oliveira Costa, Renata; Rocha, Vanderson; Pereira, Juliana. The Role Of Whole-Brain Radiotherapy (Wbrt) In Primary Central Nervous System Lymphoma: Is It An Alternative To Asct For Consolidation Following Hd-Methotrexate Based Induction In Low-Income Settings? *Radiation Oncology.*, V.17, P.171, 2022.
6. Lage, Luís Alberto De Pádua Covas; Brito, Cláudio Vinícius; Barreto, Guilherme Carneiro; Culler, Hebert Fabrício; **Reichert, Cadiele Oliana**; Levy, Débora; Costa, Renata De Oliveira; Zerbini, Maria Cláudia Nogueira; Rocha, Vanderson; Pereira, Juliana. Up-Front Therapy With Chop Plus Etoposide In Brazilian Nodal Ptcl Patients: Increased Toxicity And No Survival Benefit Compared To Chop Regimen - Results Of A Real-Life Study From A Middle-Income Country. *Clinical Lymphoma Myeloma & Leukemia.*, V.1, P.1, 2022.
7. Freitas, FA; Levy, D; **Reichert, Cadiele Oliana**; Lima-Barros, P; Sampaio-Silva, J; Rokita-Rosa, L; Bydlowski, SP. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Derived from Healthy Donors But Not Those Derived From Acute Myeloid Leukemia Patients Are Able To Affect Proliferation And Death Of Leukemic Cell Lineages K562 And K562 Lucena. *Cytotherapy.*, V.23, P.5 - , 2021.

8. **Reichert, Cadiele Oliana**; Levy, Debora; Bydlowski, Sergio P. Paraoxonase Role In Human Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants.*, V.10, P.11 - , 2021.
9. Levy, Debora; Ferreira, Mari Cleia M. R.; **Reichert, Cadiele Oliana.**; De Almeida, Lis Vilela; Brocardo, Graciela; Lage, Luis Alberto P. C.; Culler, Hebert F.; Nukui, Youko; Bydlowski, Sergio P.; Pereira, Juliana. Cell Cycle Changes, Dna Ploidy, And Pttg1 Gene Expression In Htlv-1 Patients. *Frontiers In Microbiology.*, V.11, P.1778 -, 2020.
10. **Reichert, Cadiele Oliana**; De Freitas, Fábio Alessandro; Sampaio-Silva, Juliana; Rokita-Rosa, Leonardo; Barros, Priscila De Lima; Levy, Debora; Bydlowski, Sérgio Paulo. Ferroptosis Mechanisms Involved in Neurodegenerative Diseases. *International Journal Of Molecular Sciences.*, V.21, P.8765 - , 2020.
11. Valadares, Daniela F.; Soares, Rosangela R.P.; Di Giacomo, Giovanna; Rocha, Tania; **Reichert, Cadiele Oliana.**; Bydlowski, Sergio P. Von Willebrand Factor And Factor Viii In A Healthy Brazilian Population. Association With Abo Blood Groups. *Thrombosis Research.*, V.188, P.49 - 51, 2020.
12. Levy, Débora; **Reichert, Cadiele Oliana**; Bydlowski, Sérgio Paulo. Paraoxonases Activities and Polymorphisms In Elderly And Old-Age Diseases: An Overview. *Antioxidants.*, V.8, P.118 - , 2019.
13. **Reichert, Cadiele Oliana**; De Macedo, Carolina Garcia; Levy, Débora; Sini, Bruno Carnevale; Monteiro, Andréia Moreira; Gidlund, Magnus; Maselli, Luciana Morganti Ferreira; Gualandro, Sandra Fátima Menosi; Bydlowski, Sérgio Paulo. Paraoxonases (Pon) 1, 2, And 3 Polymorphisms And Pon-1 Activities In Patients With Sickle Cell Disease. *Antioxidants.*, V.8, P.252 - , 2019.
14. Paz, Jessica Liliane; Levy, Debora; Oliveira, Beatriz Araujo; De Melo, Thatiana Correia; De Freitas, Fabio Alessandro; **Reichert, Cadiele Oliana**; Rodrigues, Alessandro; Pereira, Juliana; Bydlowski, Sergio Paulo. 7-Ketocholesterol Promotes Oxiapoptophagy In Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell From Patients With Acute Myeloid Leukemia. *Cells.*, V.8, P.482 - , 2019.
15. Levy, Debora; De Melo, Thatiana Correa; Oliveira, Beatriz A.; Paz, Jessica L.; De Freitas, Fabio A.; **Reichert, Cadiele Oliana.**; Rodrigues, Alessandro; Bydlowski, Sergio P. 7-Ketocholesterol And Cholestane-Triol Increase Expression Of Smo And Lxr; Signaling Pathways In A Human Breast Cancer Cell Line. *Biochemistry And Biophysics Reports.* , V.16, P.1 - 6, 2018.
16. **Reichert, Cadiele Oliana**; De Freitas, Fabio A.; Levy, Débora; Bydlowski, Sergio P. Oxysterols And Mesenchymal Stem Cell Biology In: *Vitamins and Hormones.*1, 2021, V.116, P. 409-436.

8. REFERÊNCIAS

1. Puckrin R, Atenafu EG, Claudio JO, Chan S, Gupta V, Maze D, *et al.* Measurable residual disease monitoring provides insufficient lead-time to prevent morphological relapse in the majority of patients with core-binding factor acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2021;
2. Tan SF, Dunton W, Liu X, Fox TE, Morad SAF, Desai D, *et al.* Acid ceramidase promotes drug resistance in acute myeloid leukemia through NF- κ B-dependent P-glycoprotein upregulation. *J Lipid Res*. 2019;60(6):1078–86.
3. Bouvy C, Wannez A, Laloy J, Chatelain C, Dogné JM. Transfer of multidrug resistance among acute myeloid leukemia cells via extracellular vesicles and their microRNA cargo. *Leuk Res*. 2017;62(April):70–6.
4. Tsuji K, Wang YH, Takanashi M, Odajima T, Lee GA, Sugimori H, *et al.* Overexpression of lung resistance-related protein and P-glycoprotein and response to induction chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *Hematol Rep*. 2012;4(3):56–9.
5. Zheng J, Asakawa T, Chen Y, Zheng Z, Chen B, Lin M, *et al.* Synergistic Effect of Baicalin and Adriamycin in Resistant HL-60/ADM Leukaemia Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;43(1):419–30.
6. Ji D, He Y, Lu W, Rong Y, Li F, Huang X, *et al.* Small-sized extracellular vesicles (EVs) derived from acute myeloid leukemia bone marrow mesenchymal stem cells transfer miR-26a-5p to promote acute myeloid leukemia cell proliferation, migration, and invasion. *Hum Cell*. 2021;(0123456789).
7. Chen X, Li N, Weng J, Du X. Senescent Mesenchymal Stem Cells in Myelodysplastic Syndrome: Functional Alterations, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Strategies. *Front Cell Dev Biol*. 2021;8(February):1–8.
8. Yuan B, Dana F El, Ly S, Yan Y, Ruvolo V, Shpall EJ, *et al.* Bone marrow stromal cells induce an ALDH⁺ stem cell-like phenotype and enhance therapy resistance in AML through a TGF- β -p38-ALDH2 pathway. *PLoS One*. 2020;15(11 November):1–20.
9. Zhang X, Yang Y, Yang Y, Chen H, Tu H, Li J. Exosomes from Bone Marrow Microenvironment-Derived Mesenchymal Stem Cells Affect CML Cells Growth and Promote Drug Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors. *Stem Cells Int*. 2020;2020.
10. Xu H, Zhou S, Tang Q, Xia H, Bi F. Cholesterol metabolism: New functions and therapeutic approaches in cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020;1874(1):188394.
11. Brown AJ, Sharpe LJ, Rogers MJ. Oxysterols: From physiological tuners to pharmacological opportunities. *Br J Pharmacol*. 2020;(March):1–15.
12. Griffiths WJ, Wang Y. Oxysterols as lipid mediators: Their biosynthetic genes, enzymes and metabolites. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2020;147(June 2019).

13. Silva SF, Levy D, Ruiz JLM, de Melo TC, Isaac C, Fidelis ML, *et al.* Oxysterols in adipose tissue-derived mesenchymal stem cell proliferation and death. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017.
14. Paz JL, Levy D, Oliveira BA, de Melo TC, de Freitas FA, Reichert CO, *et al.* 7-Ketocholesterol Promotes Oxiapoptophagy in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell from Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Cells*. 2019;
15. Fu ZH, Liu SQ, Qin M Bin, Huang JA, Xu CY, Wu WH, *et al.* NIK- and IKK β -binding protein contributes to gastric cancer chemoresistance by promoting epithelial-mesenchymal transition through the NF- κ B signaling pathway. *Oncol Rep*. 2018;
16. Levi M, Salaroli R, Parenti F, De Maria R, Zannoni A, Bernardini C, *et al.* Doxorubicin treatment modulates chemoresistance and affects the cell cycle in two canine mammary tumour cell lines. *BMC Vet Res*. 2021;17(1):1–15.
17. Kadioglu O, Saeed M, Mahmoud N, Azawi S, Mrasek K, Liehr T, *et al.* Identification of potential novel drug resistance mechanisms by genomic and transcriptomic profiling of colon cancer cells with p53 deletion. *Arch Toxicol*. 2021;95(3):959–74.
18. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9).
19. Joyce H, McCann A, Clynes M, Larkin A. Influence of multidrug resistance and drug transport proteins on chemotherapy drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2015;11(5):795–809.
20. Ueda K, Cornwell MM, Gottesman MM, Pastan I, Roninson IB, Ling V, *et al.* The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986;141(3):956–62.
21. Goto S, Kawabata T, Li TS. Enhanced Expression of ABCB1 and Nrf2 in CD133-Positive Cancer Stem Cells Associates with Doxorubicin Resistance. *Stem Cells Int*. 2020;2020.
22. da Silveira Júnior LS, Soares V de L, Jardim da Silva AS, Gil EA, Pereira de Araújo M das G, Mercês Gonçalves CA, *et al.* P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-1 expression in acute myeloid leukemia: Biological and prognosis implications. *Int J Lab Hematol*. 2020;42(5):594–603.
23. Wang X, Song Y, Wu D, Li Q, Lu S, Li X, *et al.* Inter-individual variations and modulators of MDR1 transport activity in human placenta. *Placenta*. 2020;97(June):46–50.
24. Lopez JP, Brivio E, Santambrogio A, De Donno C, Kos A, Peters M, *et al.* Single-cell molecular profiling of all three components of the HPA axis reveals adrenal ABCB1 as a regulator of stress adaptation. *Sci Adv*. 2021;7(5):1–18.
25. Wojtowicz K, Januchowski R, Nowicki M, Zabel M. VPARP adjusts MVP expression in drug-resistant cell lines in conjunction with MDR proteins. *Anticancer Res*. 2017;
26. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: The power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009.

27. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;
28. Wilkens S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep.* 2015;
29. Locher KP. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nature Structural and Molecular Biology.* 2016.
30. Locher KP. Structure and mechanism of ABC transporters. *Current Opinion in Structural Biology.* 2004.
31. He ZX, Zhao TQ, Gong YP, Zhang X, Ma LY, Liu HM. Pyrimidine: A promising scaffold for optimization to develop the inhibitors of ABC transporters. *Eur J Med Chem.* 2020;200:112458.
32. Wang JQ, Yang Y, Cai CY, Teng QX, Cui Q, Lin J, *et al.* Multidrug resistance proteins (MRPs): Structure, function and the overcoming of cancer multidrug resistance. *Drug Resistance Updates.* 2021;54(December 2020):100743.
33. Janulienė D, Moeller A. Cryo-EM of ABC transporters: an ice-cold solution to everything? *FEBS Lett.* 2020;594(23):3776–89.
34. Furuta T. Structural dynamics of ABC transporters: molecular simulation studies. 2021;(February):405–14.
35. Lewinson O, Orelle C, Seeger MA. Structures of ABC transporters: handle with care. *FEBS Lett.* 2020;594(23):3799–814.
36. Kerr ID, Hutchison E, Gerard L, Aleidi SM, Gelissen IC. Mammalian ABCG-transporters, sterols and lipids: To bind perchance to transport? *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2021;1866(3):158860.
37. Kadioglu O, Saeed MEM, Munder M, Spuller A, Greten HJ, Efferth T. Effect of ABC transporter expression and mutational status on survival rates of cancer patients. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2020;131:110718.
38. Jaramillo AC, Cloos J, Lemos C, Stam RW, Kaspers GJL, Jansen G, *et al.* Ex vivo resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia: Correlations between BCRP, MRP1, MRP4 and MRP5 ABC transporter expression and intracellular methotrexate polyglutamate accumulation. *Leuk Res.* 2019;79(November 2018):45–51.
39. Arthur N, Vivi M. *Pharmacogenomics.* 2017;18:235–44.
40. Li G, Shi P, Wang Y. Evolutionary dynamics of the ABCA chromosome 17q24 cluster genes in vertebrates. *Genomics.* 2007;89(3):385–91.
41. Albrecht C, Viturro E. The ABCA subfamily - Gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. *Pflugers Arch.* 2007;453(5):581–9.
42. Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, Nguyen D, Dhanasekaran P, Saito H, *et al.* Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *Journal of Biological Chemistry.* 2007;282(34):25123–30.

43. Nagao K, Tomioka M, Ueda K. Function and regulation of ABCA1 - Membrane meso-domain organization and reorganization. *FEBS Journal*. 2011.
44. Jacobo-Albavera L, Domínguez-Pérez M, Medina-Leyte DJ, González-Garrido A, Villarreal-Molina T. The role of the atp-binding cassette a1 (Abca1) in human disease. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1–30.
45. Pasello M, Giudice AM, Scotlandi K. The ABC subfamily A transporters: Multifaceted players with incipient potentialities in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2020;60(July 2019):57–71.
46. Hedditch EL, Gao B, Russell AJ, Lu Y, Emmanuel C, Beesley J, *et al*. ABCA transporter gene expression and poor outcome in epithelial ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(7).
47. Aguirre-Portolés C, Feliu J, Reglero G, Ramírez de Molina A. ABCA1 overexpression worsens colorectal cancer prognosis by facilitating tumour growth and caveolin-1-dependent invasiveness, and these effects can be ameliorated using the BET inhibitor apabetalone. *Mol Oncol*. 2018;12(10):1735–52.
48. Jin W. Role of JAK/STAT3 Signaling in the Regulation of Metastasis, the Transition of Cancer Stem Cells, and Chemoresistance of Cancer by Epithelial-Mesenchymal Transition. Vol. 9, *Cells*. NLM (Medline); 2020.
49. Torres-Adorno AM, Vitrac H, Qi Y, Tan L, Levental KR, Fan YY, *et al*. Eicosapentaenoic acid in combination with EPHA2 inhibition shows efficacy in preclinical models of triple-negative breast cancer by disrupting cellular cholesterol efflux. *Oncogene*. 2019;38(12):2135–50.
50. Slot AJ, Molinski S V., Cole SPC. Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs). *Essays Biochem*. 2011;50(1):179–207.
51. Gu X, Manautou JE. Regulation of hepatic ABCC transporters by xenobiotics and in disease states. *Drug Metabolism Reviews*. 2010.
52. Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, *et al*. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* (1979). 1992;258(5088):1650–4.
53. Gil-Martins E, Barbosa DJ, Silva V, Remião F, Silva R. Dysfunction of ABC transporters at the blood-brain barrier: Role in neurological disorders. *Pharmacol Ther*. 2020;213:107554.
54. Pascolo L, Ferneti C, Pirulli D, Crovella S, Amoroso A, Tiribelli C. Effects of maturation on RNA transcription and protein expression of four MRP genes in human placenta and in BeWo cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;303(1):259–65.
55. Lorico A, Bertola A, Fodstad O, Rappa G, Lorico A, Rappa G, *et al*. Role of the multidrug resistance protein 1 in protection from heavy metal oxyanions: Investigations in vitro and in MRP1-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;291(3):617–22.

56. Wiese M, Stefan SM. The A-B-C of small-molecule ABC transport protein modulators: From inhibition to activation—a case study of multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1). *Med Res Rev.* 2019;39(6):2031–81.
57. Hu P, Ting-Yat Wong P, Zhou Q, Sheng L, Niu W, Chen S, *et al.* Clinical relevance of the multidrug resistance-associated protein 1 gene in non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncol Rep.* 2018;40(5):3078–91.
58. Kunadt D, Dransfeld C, Dill C, Schmiedgen M, Kramer M, Altmann H, *et al.* Multidrug-related protein 1 (MRP1) polymorphisms rs129081, rs212090, and rs212091 predict survival in normal karyotype acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2020;99(9):2173–80.
59. Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006;2(3):351–66.
60. Van Der Schoor LWE, Verkade HJ, Kuipers F, Jonker JW. New insights in the biology of ABC transporters ABCC2 and ABCC3: Impact on drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2015;11(2):273–93.
61. Keppler D. The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia. *Drug Metabolism and Disposition.* 2014;42(4):561–5.
62. Gerk PM, Vore M. Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2002;302(2):407–15.
63. Holzinger A, Kammerer S, Roscher AA. Primary structure of human PMP69, a putative peroxisomal ABC-transporter. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237(1):152–7.
64. Holzinger A, Roscher AA, Landgraf P, Lichtner P, Kammerer S. Genomic organization and chromosomal localization of the human peroxisomal membrane protein-1-like protein (PXMP1-L) gene encoding a peroxisomal ABC transporter. *FEBS Lett.* 1998;426(2):238–42.
65. Kawaguchi K, Morita M. ABC Transporter Subfamily D: Distinct Differences in Behavior between ABCD1-3 and ABCD4 in Subcellular Localization, Function, and Human Disease. *Biomed Res Int.* 2016;2016.
66. Fettelschoss V, Burda P, Sagné C, Coelho D, De Laet C, Lutz S, *et al.* Clinical or ATPase domain mutations in ABCD4 disrupt the interaction between the Vitamin B12-trafficking proteins ABCD4 and LMBD1. *Journal of Biological Chemistry.* 2017;292(28):11980–91.
67. Coelho D, Kim JC, Miousse IR, Fung S, Du Moulin M, Buers I, *et al.* Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nat Genet.* 2012;44(10):1152–5.
68. Choi YM, Kim Y Il, Choi JH, Bhandari S, Nam IK, Hong KH, *et al.* Loss of *abcd4* in zebrafish leads to vitamin B12-deficiency anemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;514(4):1264–9.

69. Takeichi T, Hsu CK, Yang HS, Chen HY, Wong TW, Tsai WL, *et al.* Progressive hyperpigmentation in a Taiwanese child due to an inborn error of vitamin B12 metabolism (cblJ). *British Journal of Dermatology*. 2015;172(4):1111–5.
70. Deme JC, Hancock MA, Xia X, Shintre CA, Plesa M, Kim JC, *et al.* Purification and interaction analyses of two human lysosomal vitamin B12 transporters: LMBD1 and ABCD4. *Mol Membr Biol*. 2014;31(7–8):250–61.
71. Kawaguchi K, Okamoto T, Morita M, Imanaka T. Translocation of the ABC transporter ABCD4 from the endoplasmic reticulum to lysosomes requires the escort protein LMBD1. *Sci Rep*. 2016;6(December 2015):1–12.
72. Kusuvara H, Sugiyama Y. ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch*. 2007;453(5):735–44.
73. Jakobsson T, Venteclef N, Toresson G, Damdimopoulos AE, Ehrlund A, Lou X, *et al.* GPS2 Is Required for Cholesterol Efflux by Triggering Histone Demethylation, LXR Recruitment, and Coregulator Assembly at the ABCG1 Locus. *Mol Cell*. 2009;34(4):510–8.
74. Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Nakayama A, Ikebuchi Y, *et al.* Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: A function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci Transl Med*. 2009;1(5).
75. Austin Doyle L, Yang W, Abruzzo L V., Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(26):15665–70.
76. Qin Z, Dai L, Bratoeva M, Slomiany MG, Toole BP, Parsons C. Cooperative roles for emmprin and LYVE-1 in the regulation of chemoresistance for primary effusion lymphoma. *Leukemia*. 2011;25(10):1598–609.
77. Zhou S, Liao L, Chen C, Zeng W, Liu S, Su J, *et al.* CD147 mediates chemoresistance in breast cancer via ABCG2 by affecting its cellular localization and dimerization. *Cancer Lett*. 2013;337(2):285–92.
78. Dai L, Guinea MC, Slomiany MG, Bratoeva M, Grass GD, Tolliver LB, *et al.* CD147-Dependent heterogeneity in malignant and chemoresistant properties of cancer cells. *American Journal of Pathology*. 2013;182(2):577–85.
79. Saison C, Helias V, Ballif BA, Peyrard T, Puy H, Miyazaki T, *et al.* Null alleles of ABCG2 encoding the breast cancer resistance protein define the new blood group system Junior. *Nat Genet*. 2012;44(2):174–7.
80. Liu Y, Cui P, Chen J, Li W. Isolation and phenotypic characterization of side population cells in oral squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep*. 2015;11(5):3642–6.
81. Zhang W, Yu F, Wang Y, Zhang Y, Meng L, Chi Y. Rab23 promotes the cisplatin resistance of ovarian cancer via the Shh-Gli-ABCG2 signaling pathway. *Oncol Lett*. 2018;

82. Balbuena J, Pachon G, Lopez-Torrents G, Aran JM, Castresana JS, Petriz J. ABCG2 is required to control the sonic hedgehog pathway in side population cells with stem-like properties. *Cytometry Part A*. 2011;
83. Kim JE, Singh RR, Cho-Vega JH, Drakos E, Davuluri Y, Khokhar FA, *et al*. Sonic hedgehog signaling proteins and ATP-binding cassette G2 are aberrantly expressed in diffuse large B-Cell lymphoma. *Modern Pathology*. 2009;
84. Sims-Mourtada J, Izzo JG, Ajani J, Chao KSC. Sonic Hedgehog promotes multiple drug resistance by regulation of drug transport. *Oncogene*. 2007;
85. Lu X, Wang Z, Huang H, Wang H. Hedgehog signaling promotes multidrug resistance by regulation of ABC transporters in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2020;
86. Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJLM, *et al*. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *American Journal of Pathology*. 1996;148(3):877–87.
87. Lange C, Walther W, Schwabe H, Stein U. Cloning and initial analysis of the human multidrug resistance-related MVP/LRP gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;278(1):125–33.
88. Tanaka H, Tsukihara T. Structural studies of large nucleoprotein particles, vaults. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2012;88(8):416–33.
89. Du X, Yang H. Endosomal cholesterol trafficking : protein factors at a glance Niemann-Pick type C Proteins. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013;45(1):11–7.
90. Levy D, de Melo TC, Ruiz JLM, Bydlowski SP. Oxysterols and mesenchymal stem cell biology. *Chem Phys Lipids*. 2017;207:223–30.
91. Griffiths W, Jörnvall H. Oxysterols. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;446(3):645–6.
92. Massey JB, Pownall HJ. Structures of biologically active oxysterols determine their differential effects on phospholipid membranes. *Biochemistry*. 2006;45(35):10747–58.
93. Brown AJ, Sharpe LJ, Rogers MJ. Oxysterols: From physiological tuners to pharmacological opportunities. *Br J Pharmacol*. 2020;(March):1–15.
94. Ruiz JLM, Fernandes LR, Levy D, Bydlowski SP. Interrelationship between ATP-binding cassette transporters and oxysterols. *Biochemical Pharmacology*. 2013.
95. Patel RP, Diczfalusy U, Dzeletovic S, Wilson MT, Darley-Usmar VM. Formation of oxysterols during oxidation of low density lipoprotein by peroxynitrite, myoglobin, and copper. *J Lipid Res*. 1996;37(11):2361–71.
96. Kandutsch AA, Chen HW, Heiniger HJ. Biological activity of some oxygenated sterols. *Science (1979)*. 1978;201(4355):498–501.
97. Vurusaner B, Leonarduzzi G, Gamba P, Poli G, Basaga H. Oxysterols and mechanisms of survival signaling. *Mol Aspects Med*. 2016;49:8–22.

98. Nury T, Zarrouk A, Yammine A, Mackrill JJ, Vejux A, Lizard G. Oxiaoptophagy: A type of cell death induced by some oxysterols. *Br J Pharmacol*. 2020;1(March):1–9.
99. Nury T, Zarrouk A, Mackrill JJ, Samadi M, Durand P, Riedinger JM, *et al*. Induction of oxiaoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7 β -hydroxycholesterol-, or 24(S)-hydroxycholesterol: Protective effects of α -tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3). *Steroids*. 2015;99(PB):194–203.
100. Levy D, de Melo TC, Oliveira BA, Paz JL, de Freitas FA, Reichert CO, *et al*. 7-Ketocholesterol and cholestane-triol increase expression of SMO and LXR α signaling pathways in a human breast cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;19.
101. Levy D, Correa de Melo T, Ohira BY, Fidelis ML, Ruiz JLM, Rodrigues A, *et al*. Oxysterols selectively promote short-term apoptosis in tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;
102. Radhakrishnan A, Ikeda Y, Hyock JK, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(16):6511–8.
103. Ma L, Nelson ER. Oxysterols and nuclear receptors. *Mol Cell Endocrinol*. 2019;484(January):42–51.
104. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev*. 1995;9(9):1033–45.
105. Traversari C, Sozzani S, Steffensen KR, Russo V. LXR-dependent and -independent effects of oxysterols on immunity and tumor growth. *Eur J Immunol*. 2014;44(7):1896–903.
106. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, *et al*. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR α and LXR β . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(1):266–71.
107. Reichert CO, Marafon F, Levy D, Maselli LMF, Bagatini MD, Blatt SL, *et al*. Influence of Hepcidin in the Development of Anemia. *Current Topics in Anemia*. 2018;
108. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, *et al*. A PPAR α -LXR-ABCA1 Pathway in Macrophages Is Involved in Cholesterol Efflux and Atherogenesis We provide evidence here for convergence of PPAR α . *Mol Cell*. 2001;7:161–71.
109. Khovidhunkit W, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR. Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages: Differential role of LXR. *J Lipid Res*. 2003;44(9):1728–36.
110. Yvan-charvet L, Wang N, Tall AR. The role of HDL, ABCA1 and ABCG1 transporters in cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(2):139–43.

111. Pommier AJC, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, Sion B, *et al.* Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene*. 2010;
112. Wu Y, Yu DD, Yan DL, Hu Y, Chen D, Liu Y, *et al.* Liver X receptor as a drug target for the treatment of breast cancer. *Anti-Cancer Drugs*. 2016.
113. Jeng KS, Chang CF, Lin SS. Sonic hedgehog signaling in organogenesis, tumors, and tumor microenvironments. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3).
114. Bangs F, Anderson K V. Primary cilia and Mammalian Hedgehog signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(5):1–21.
115. Gorojankina T. Hedgehog signaling pathway: A novel model and molecular mechanisms of signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73(7):1317–32.
116. Byrne EFX, Sircar R, Miller PS, Hedger G, Luchetti G, Nachtergaele S, *et al.* Structural basis of Smoothed regulation by its extracellular domains. *Nature*. 2016;535(7613):517–22.
117. Deshpande I, Liang J, Hedeem D, Roberts KJ, Zhang Y, Ha B, *et al.* Smoothed stimulation by membrane sterols drives Hedgehog pathway activity. *Nature*. 2019;571(7764):284–8.
118. Qi X, Liu H, Thompson B, McDonald J, Zhang C, Li X. Cryo-EM structure of oxysterol-bound human Smoothed coupled to a heterotrimeric Gi. *Nature*. 2019;571(7764):279–83.
119. Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. Structural Basis of Wnt. *Science (1979)*. 2012;337(July):59–64.
120. Myers BR, Sever N, Chong YC, Kim J, Belani JD, Rychnovsky S, *et al.* Hedgehog pathway modulation by multiple lipid binding sites on the smoothed effector of signal response. *Dev Cell*. 2013;26(4):346–57.
121. Alman BA. The role of hedgehog signalling in skeletal health and disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(9):552–60.
122. Yang J, Andre P, Ye L, Yang YZ. The Hedgehog signalling pathway in bone formation. *Int J Oral Sci*. 2015;7(2):73–9.
123. Behr B, Ko SH, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2010;126(4):1163–71.
124. Somuncu ÖS, Taşlı PN, Şişli HB, Somuncu S, Şahin F. Characterization and Differentiation of Stem Cells Isolated from Human Newborn Foreskin Tissue. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015;177(5):1040–54.
125. Baker CL, Pera MF. Capturing Totipotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2018;22(1):25–34.

126. Lim H, Choi IY, Hyun SH, Kim H, Lee G. Approaches to characterize the transcriptional trajectory of human myogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2021;(0123456789).
127. Cheng MT, Yang HW, Chen TH, Lee OKS. Isolation and characterization of multipotent stem cells from human cruciate ligaments. *Cell Prolif*. 2009;42(4):448–60.
128. Wu C, Chen L, Huang Y zhou, Huang Y, Parolini O, Zhong Q, *et al*. Comparison of the proliferation and differentiation potential of human urine-, placenta decidua basalis-, and bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells Int*. 2018;2018.
129. Rowland TJ, Miller LM, Blaschke AJ, Doss EL, Bonham AJ, Hikita ST, *et al*. Roles of integrins in human induced pluripotent stem cell growth on matrigel and vitronectin. *Stem Cells Dev*. 2010;19(8):1231–40.
130. M. Golubovskaya V. FAK and Nanog Cross Talk with p53 in Cancer Stem Cells. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013;13(4):576–80.
131. Man Y, Yao X, Yang T, Wang Y. Hematopoietic Stem Cell Niche During Homeostasis, Malignancy, and Bone Marrow Transplantation. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(January):1–11.
132. Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: Historical overview and concepts. *Hum Gene Ther*. 2010;21(9):1045–56.
133. Foster CS, Dodson A, Karavana V, Smith PH, Ke Y. An introduction to stem cells. Vol. 197, *Journal of Pathology*. 2002. p. 419–23.
134. Quesenberry PJ, Wen S, Goldberg LR, Dooner MS. The universal stem cell. *Leukemia*. Springer Nature; 2022.
135. Birbrair A, Frenette PS. Niche heterogeneity in the bone marrow. Vol. 1370, *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc.; 2016. p. 82–96.
136. Méndez-Ferrer S, Michurina T V., Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, *et al*. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829–34.
137. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;505(7483):327–34.
138. Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebé L, Papadaki HA. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties and Their Role in Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Stem Cell Rev Rep*. 2011;7(3):569–89.
139. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
140. Baghaei K, Hashemi SM, Tokhanbigli S, Rad AA, Assadzadeh-Aghdai H, Sharifian A, *et al*. Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2017;10(3):208–13.

141. Wang J, Chen Z, Sun M, Xu H, Gao Y, Liu J, *et al.* Characterization and therapeutic applications of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Tissue Cell.* 2020;64(126):101330.
142. Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: Reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells fro. *J Cell Biochem.* 2011;112(4):1206–18.
143. Mahmoudifar N, Doran PM. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Methods in Molecular Biology.* 2015;1340:53–64.
144. Li T, Xia M, Gao Y, Chen Y, Xu Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: An overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(9):1293–306.
145. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells.* 2019;8(8):886.
146. Fracchiolla NS, Fattizzo B, Cortelezzi A. Mesenchymal Stem Cells in Myeloid Malignancies: A Focus on Immune Escaping and Therapeutic Implications. *Stem Cells Int.* 2017;2017.
147. Tremblay D, Yacoub A, Hoffman R. Overview of Myeloproliferative Neoplasms: History, Pathogenesis, Diagnostic Criteria, and Complications. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2021;35(2):159–76.
148. Teitell MA, Pandolfi PP. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2009;4:175–98.
149. Hoffbrand AV, Higgs DR, Keeling DM, Mehta AB. WHO Classification: Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2016;885–7.
150. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol.* 2014;89(5):547–56.
151. Forghieri F, Luppi M, Potenza L. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematology.* 2015;20(10):618–9.
152. Saußebe S, Silver RT. Management of chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Ann Hematol.* 2015;94(2):159–65.
153. Rose-Inman H, Kuehl D. Acute leukemia. *Emerg Med Clin North Am.* 2014;32(3):579–96.
154. Arber D, Orazi A. The Updated WHO Classification Of Hematological Malignancies: The 2016 revision to the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *The Blood Journal.* 2016;2(20):58–71.
155. Hwang SM. Classification of acute myeloid leukemia. *Blood Res.* 2020;55(S1):1–4.

156. Murphy T, Yee KWL. Cytarabine and daunorubicin for the treatment of acute myeloid leukemia. *Expert Opin Pharmacother*. 2017;18(16):1765–80.
157. Economides MP, McCue D, Borthakur G, Pemmaraju N. Topoisomerase II inhibitors in AML: past, present, and future. *Expert Opin Pharmacother*. 2019;20(13):1637–44.
158. Di Francia R, Crisci S, De Monaco A, Cafiero C, Re A, Iaccarino G, *et al*. Response and toxicity to cytarabine therapy in leukemia and lymphoma: From dose puzzle to pharmacogenomic biomarkers. *Cancers (Basel)*. 2021;13(5):1–39.
159. Hasserjian RP. Acute myeloid leukemia: Advances in diagnosis and classification. *Int J Lab Hematol*. 2013;35(3):358–66.
160. Schroeder T, Geyh S, Germing U, Haas R. Mesenchymal stromal cells in myeloid malignancies. *Blood Res*. 2016;51(4):225–32.
161. Pleyer L, Valent P, Greil R. Mesenchymal stem and progenitor cells in normal and dysplastic hematopoiesis—Masters of survival and clonality? *Int J Mol Sci*. 2016;17(7):1–67.
162. Lopez-Villar O, Garcia JL, Sanchez-Guijo FM, Robledo C, Villaron EM, Hernández-Campo P, *et al*. Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q-syndrome. *Leukemia*. 2009;23(4):664–72.
163. Varga G, Kiss J, Várkonyi J, Vas V, Farkas P, Pálóczi K, *et al*. Inappropriate Notch activity and limited mesenchymal stem cell plasticity in the bone marrow of patients with myelodysplasia syndromes. *Pathology and Oncology Research*. 2007;13(4):311–9.
164. Quéré R, Andradottir S, Brun ACM, Zubarev RA, Karlsson G, Olsson K, *et al*. High levels of the adhesion molecule CD44 on leukemic cells generate acute myeloid leukemia relapse after withdrawal of the initial transforming event. *Leukemia*. 2011;25(3):515–26.
165. Diaz de la Guardia R, Lopez-Millan B, Lavoie JR, Bueno C, Castaño J, Gómez-Casares M, *et al*. Detailed Characterization of Mesenchymal Stem/Stromal Cells from a Large Cohort of AML Patients Demonstrates a Definitive Link to Treatment Outcomes. *Stem Cell Reports*. 2017;8(6):1573–86.
166. Salvador JAR, Carvalho JFS, Neves MAC, Silvestre SM, Leitão AJ, Silva MMC, *et al*. Anticancer steroids: Linking natural and semi-synthetic compounds. Vol. 30, *Natural Product Reports*. Royal Society of Chemistry; 2013. p. 324–74.
167. Carvalho JFS, Silva MMC, Moreira JN, Simões S, Sá E Melo ML. Selective cytotoxicity of oxysterols through structural modulation on rings A and B. Synthesis, in vitro evaluation, and SAR. *J Med Chem*. 2011 Sep 22;54(18):6375–93.
168. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
169. Silva SF, Levy D, Ruiz JLM, de Melo TC, Isaac C, Fidelis ML, *et al*. Oxysterols in adipose tissue-derived mesenchymal stem cell proliferation and death. Vol. 169, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd; 2017. p. 164–75.

170. Dergunov AD, Baserova VB. Different Pathways of Cellular Cholesterol Efflux. Vol. 80, Cell Biochemistry and Biophysics. Springer; 2022. p. 471–81.
171. Kawaguchi K, Morita M. ABC Transporter Subfamily D: Distinct Differences in Behavior between ABCD1-3 and ABCD4 in Subcellular Localization, Function, and Human Disease. Vol. 2016, BioMed Research International. Hindawi Limited; 2016.
172. Litviakov N v., Cherdyntseva N v., Tsyganov MM, Denisov E v., Garbukov EY, Merzliakova MK, *et al.* Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013 Jan;71(1):153–63.
173. Duz MB, Karatas OF. Expression profile of stem cell markers and ABC transporters in 5-fluorouracil resistant Hep-2 cells. *Mol Biol Rep.* 2020 Jul 1;47(7):5431–8.
174. Czornyj L, Lazarowski A. ABC-transporters as stem-cell markers in brain dysplasia/tumor epilepsies. Vol. 19, *Frontiers in Bioscience.* 2014.
175. Tiwari AK, An X, Chen ZS. The role of stem cell markers in multidrug resistance mediated by ABC transporters. Vol. 34, *Leukemia Research.* 2010. p. 696–7.
176. Niebergall-Roth E, Frank NY, Ganss C, Frank MH, Kluth MA. Skin-Derived ABCB5+ Mesenchymal Stem Cells for High-Medical-Need Inflammatory Diseases: From Discovery to Entering Clinical Routine. Vol. 24, *International journal of molecular sciences.* NLM (Medline); 2022.
177. Tu SM, Guo CC, Chow DSL, Zacharias NM. Stem Cell Theory of Cancer: Implications for Drug Resistance and Chemosensitivity in Cancer Care. *Cancers (Basel).* 2022 Mar 1;14(6).
178. Erdei Z, Lorincz R, Szabéni K, Péntek A, Varga N, Likó I, *et al.* Expression pattern of the human ABC transporters in pluripotent embryonic stem cells and in their derivatives. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014;86(5):299–310.
179. Tang L, Bergevoet SM, Gilissen C, de Witte T, Jansen JH, van der Reijden BA, *et al.* Hematopoietic stem cells exhibit a specific ABC transporter gene expression profile clearly distinct from other stem cells [Internet]. 2010. Available from: <http://www.escellinternational>.
180. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors [Internet]. 2002. Available from: <http://www.gene.ucl.ac.uk/users/hester/abc.html>
181. Barbet R, Peiffer I, Hutchins JRA, Hatzfeld A, Garrido E, Hatzfeld JA. Expression of the 49 human ATP binding cassette (ABC) genes in pluripotent embryonic stem cells and in early- and late-stage multipotent mesenchymal stem cells: Possible role of ABC plasma membrane transporters in maintaining human stem cell pluripotency. *Cell Cycle.* 2012 Apr 15;11(8):1611–20.

182. Wang Z, Li X, Yang J, Gong Y, Zhang H, Qiu X, *et al.* Single-cell rna sequencing deconvolutes the in vivo heterogeneity of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Int J Biol Sci.* 2021;17(15):4192–206.
183. Ning K, Yang B, Chen M, Man G, Liu S, Wang DE, *et al.* Functional Heterogeneity of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Subpopulations in Physiology and Pathology. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI; 2022.
184. Röszer T. Transcriptional control of apoptotic cell clearance by macrophage nuclear receptors. *Apoptosis.* 2017 Feb 1;22(2):284–94.
185. Fond AM, Lee CS, Schulman IG, Kiss RS, Ravichandran KS. Apoptotic cells trigger a membrane-initiated pathway to increase ABCA1. *Journal of Clinical Investigation.* 2015 Jul 1;125(7):2748–58.
186. Kaneko T, Kanno C, Ichikawa-Tomikawa N, Kashiwagi K, Yaginuma N, Ohkoshi C, *et al.* Liver X receptor reduces proliferation of human oral cancer cells by promoting cholesterol efflux via up-regulation of ABCA1 expression [Internet]. Vol. 6, *Oncotarget.* Available from: www.impactjournals.com/oncotarget/
187. Gao J, Jung M, Williams RT, Hui D, Russell AJ, Naim AJ, *et al.* Suppression of the ABCA1 Cholesterol Transporter Impairs the Growth and Migration of Epithelial Ovarian Cancer. *Cancers (Basel).* 2022 Apr 1;14(8).
188. Chou JL, Huang RL, Shay J, Chen LY, Lin SJ, Yan PS, *et al.* Hypermethylation of the *tgf-β* target, *abca1* is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *Clin Epigenetics.* 2015 Jan 14;7(1).
189. Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S, *et al.* ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science (1979).* 2010 Jun 25;328(5986):1689–93.
190. Dasari B, Prasanthi JRP, Meiers C, Singh BB, Ghribi O. Differential effects of the estrogen receptor agonist estradiol on toxicity induced by enzymatically-derived or autoxidation-derived oxysterols in human ARPE-19 cells. *Curr Eye Res.* 2013 Nov;38(11):1159–71.
191. Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ. CD147 Immunoglobulin Superfamily Receptor Function and Role in Pathology.
192. Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ. CD147 Immunoglobulin Superfamily Receptor Function and Role in Pathology.
193. Han YK, Park HY, Park SG, Hwang JJ, Park HR, Yi JM. Promoter Methylation of Cancer Stem Cell Surface Markers as an Epigenetic Biomarker for Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 1;23(23).
194. Zheng NS, Zhao XY, Wei D, Miao JL, Liu ZK, Yong Y le, *et al.* CD147-specific chimeric antigen receptor T cells effectively inhibit T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett.* 2022 Aug 28;542.

195. Tseng H chi, Xiong W, Badeti S, Yang Y, Ma M, Liu T, *et al.* Efficacy of anti-CD147 chimeric antigen receptors targeting hepatocellular carcinoma. *Nat Commun.* 2020 Dec 1;11(1).
196. Lai X, Guo Y, Chen M, Wei Y, Yi W, Shi Y, *et al.* Caveolin1: its roles in normal and cancer stem cells. Vol. 147, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 3459–75.
197. Slier LS, Brown AJ, Stanley KK. Interaction of caveolin with 7-ketocholesterol [Internet]. Vol. 159, *Atherosclerosis.* 2001. Available from: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis
198. Dong X, Akuetteh PDP, Song J, Ni C, Jin C, Li H, *et al.* Major Vault Protein (MVP) Associated With BRAF V600E Mutation Is an Immune Microenvironment-Related Biomarker Promoting the Progression of Papillary Thyroid Cancer via MAPK/ERK and PI3K/AKT Pathways. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Mar 31;9.
199. Xiao YS, Zeng D, Liang YK, Wu Y, Li MF, Qi YZ, *et al.* Major vault protein is a direct target of Notch1 signaling and contributes to chemoresistance in triple-negative breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2019 Jan 1;440–441:156–67.
200. de Figueiredo-Pontes LL, Pintão MCT, Oliveira LCO, Dalmazzo LFF, Jácomo RH, Garcia AB, *et al.* Determination of P-glycoprotein, MDR-related protein 1, breast cancer resistance protein, and lung-resistance protein expression in leukemic stem cells of acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008 May;74(3):163–8.
201. Tomiyasu H, Watanabe M, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Ohno K, Sugano S, *et al.* Regulation of expression of ABCB1 and LRP genes by mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway and its role in generation of side population cells in canine lymphoma cell lines. *Leuk Lymphoma.* 2013 Jun;54(6):1309–15.
202. Liu Z, Zhang W, Phillips JB, Arora R, McClellan S, Li J, *et al.* Immunoregulatory protein B7-H3 regulates cancer stem cell enrichment and drug resistance through MVP-mediated MEK activation. *Oncogene.* 2019 Jan 3;38(1):88–102.
203. Noh KH, Lee SH, Lee H, Jeong AJ, Kim KO, Shin HM, *et al.* Novel cancer stem cell marker MVP enhances temozolomide-resistance in glioblastoma. *Transl Oncol.* 2022 Jan 1;15(1).
204. Plakhova N, Panagopoulos V, Vandyke K, Zannettino ACW, Mrozik KM. Mesenchymal stromal cell senescence in haematological malignancies. *Cancer and Metastasis Reviews.* Springer; 2023.
205. Miari KE, Williams MTS, Thomas M, Williams S. Stromal Bone Marrow Fibroblasts and Mesenchymal Stem Cells Support Acute Myeloid Leukaemia Cells and Promote Therapy Resistance. Available from: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.16028>
206. Weickert MT, Hecker JS, Buck MC, Schreck C, Rivière J, Schiemann M, *et al.* Bone marrow stromal cells from MDS and AML patients show increased adipogenic potential with reduced Delta-like-1 expression. *Sci Rep.* 2021 Dec 1;11(1).

207. Haga CL, Boregowda S v., Booker CN, Krishnappa V, Strivelli J, Cappelli E, *et al.* Mesenchymal stem/stromal cells from a transplanted, asymptomatic patient with Fanconi anemia exhibit an aging-like phenotype and dysregulated expression of genes implicated in hematopoiesis and myelodysplasia. *Cytotherapy*. 2022;
208. Falconi G, Galossi E, Fabiani E, Pieraccioli M, Travaglini S, Hajrullaj H, *et al.* Impairment of FOXM1 expression in mesenchymal cells from patients with myeloid neoplasms, de novo and therapy-related, may compromise their ability to support hematopoiesis. *Sci Rep*. 2022 Dec 1;12(1):21231.
209. Su YC, Li SC, Wu YC, Wang LM, Chao KSC, Liao HF. Resveratrol downregulates interleukin-6-stimulated sonic hedgehog signaling in human acute myeloid leukemia. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013.
210. Owen HC, Appiah S, Hasan N, Ghali L, Elayat G, Bell C. Phytochemical Modulation of Apoptosis and Autophagy: Strategies to Overcome Chemoresistance in Leukemic Stem Cells in the Bone Marrow Microenvironment. In: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc.; 2017. p. 249–78.
211. Liu P, Chen L. Inhibition of sonic hedgehog signaling blocks cell migration and growth but induces apoptosis via suppression of FOXQ1 in natural killer/T-cell lymphoma. *Leuk Res*. 2018 Jan 1;64:1–9.
212. Berretta A, Gowing EK, Jasoni CL, Clarkson AN. Sonic hedgehog stimulates neurite outgrowth in a mechanical stretch model of reactive-astroglia. *Sci Rep*. 2016 Feb 23;6.
213. Sever N, Mann RK, Xu L, Snell WJ, Hernandez-Lara CI, Porter NA, *et al.* Endogenous B-ring oxysterols inhibit the hedgehog component smoothed in a manner distinct from cyclopamine or side-chain oxysterols. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 May 24;113(21):5904–9.
214. Wang F, Stappenbeck F, Parhami F. Inhibition of hedgehog signaling in fibroblasts, pancreatic, and lung tumor cells by Oxy186, an oxysterol analogue with drug-like properties. *Cells*. 2019 May 1;8(5).
215. Wang F, Stappenbeck F, Matsui W, Parhami F. Inhibition of Pancreatic Cancer Cell-Induced Paracrine Hedgehog Signaling by Liver X Receptor Agonists and Oxy16, a Naturally Occurring Oxysterol. *J Cell Biochem*. 2017 Mar 1;118(3):499–509.
216. Levy D, de Melo TC, Oliveira BA, Paz JL, de Freitas FA, Reichert CO, *et al.* 7-Ketocholesterol and cholestane-triol increase expression of SMO and LXRA signaling pathways in a human breast cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Sep 1;19.
217. Nachtergaele S, Mydock LK, Krishnan K, Rammohan J, Schlesinger PH, Covey DF, *et al.* Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothed. *Nat Chem Biol*. 2012;8(2):211–20.
218. Nedelcu D, Liu J, Xu Y, Jao C, Salic A. Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothed in Hedgehog signaling. *Nat Chem Biol*. 2013 Sep;9(9):557–64.

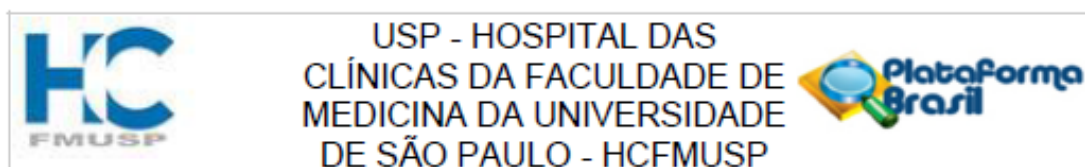
219. Dwyer JR, Sever N, Carlson M, Nelson SF, Beachy PA, Parhami F. Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Mar 23;282(12):8959–68.
220. Zhang J, Liu Z, Jia J. Mechanisms of smoothed regulation in hedgehog signaling. *Cells*. 2021 Aug 1;10(8).
221. Moreira ES, Brasch NE, Yun J. Vitamin B12 protects against superoxide-induced cell injury in human aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med [Internet]*. 2011 Aug;51(4):876–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584911003509>
222. Shatalin Y v., Shubina VS, Solovieva ME, Akatov VS. Differences in the Formation of Reactive Oxygen Species and Their Cytotoxicity between Thiols Combined with Aqua- and Cyanocobalamins. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 1;23(19).
223. Mascarenhas R, Li Z, Gherasim C, Ruetz M, Banerjee R. The human B12 trafficking protein CblC processes nitrocobalamin. *Journal of Biological Chemistry*. 2020 Jul 10;295(28):9630–40.
224. Wen GM, Xu XY, Xia P. *Metabolism in Cancer Stem Cells: Targets for Clinical Treatment*. Vol. 11, *Cells*. MDPI; 2022.
225. Panieri E, Pinho SA, Afonso GJM, Oliveira PJ, Cunha-Oliveira T, Saso L. *NRF2 and Mitochondrial Function in Cancer and Cancer Stem Cells*. Vol. 11, *Cells*. MDPI; 2022.
226. Guan S, Zhao L, Peng R. *Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes: From Structure to Function*. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov 10;23(22):13880.
227. Cogliati S, Lorenzi I, Rigoni G, Caicci F, Soriano ME. *Regulation of Mitochondrial Electron Transport Chain Assembly*. Vol. 430, *Journal of Molecular Biology*. Academic Press; 2018. p. 4849–73.
228. Qiu J, Gjini J, Arif T, Moore K, Lin M, Ghaffari S. Using mitochondrial activity to select for potent human hematopoietic stem cells. *Blood Adv*. 2021 Mar 23;5(6):1605–16.
229. Pernas L, Scorrano L. *Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function*. Vol. 78, *Annual Review of Physiology*. Annual Reviews Inc.; 2016. p. 505–31.
230. Pagliuso A, Cossart P, Stavru F. *The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery*. Vol. 75, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2018. p. 355–74.
231. Farmer T, Naslavsky N, Caplan S. *Tying trafficking to fusion and fission at the mighty mitochondria*. Vol. 19, *Traffic*. Blackwell Munksgaard; 2018. p. 569–77.
232. Lemieux H, Blier PU. *Exploring Thermal Sensitivities and Adaptations of Oxidative Phosphorylation Pathways*. Vol. 12, *Metabolites*. MDPI; 2022.
233. Dang E v., McDonald JG, Russell DW, Cyster JG. Oxysterol Restraint of Cholesterol Synthesis Prevents AIM2 Inflammasome Activation. *Cell*. 2017 Nov 16;171(5):1057–1071.e11.

234. Griffiths H, Irundika D, Lip G, Spickett C, Polidori C. Oxidised LDL lipids, statins and a blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med*. 2014 Oct;75:S15–6.
235. Zheng HC. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers [Internet]. Vol. 8. 2017. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
236. Ploumaki I, Triantafyllou E, Koumprentziotis IA, Karampinos K, Drougkas K, Karavolias I, *et al*. Bcl-2 pathway inhibition in solid tumors: a review of clinical trials. *Clinical and Translational Oncology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2023.
237. Holz C, Lange S, Sekora A, Knuebel G, Krohn S, Murua Escobar H, *et al*. Combined BCL-2 and PI3K/AKT Pathway Inhibition in KMT2A-Rearranged Acute B-Lymphoblastic Leukemia Cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Jan 10;24(2):1359. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/2/1359>
238. Kanwar JR, Kamalapuram SK, Kanwar RK. Survivin Signaling in Clinical Oncology: A Multifaceted Dragon. *Med Res Rev*. 2013 Jul;33(4):765–89.
239. Frazzi R. BIRC3 and BIRC5: multi-faceted inhibitors in cancer. Vol. 11, *Cell and Bioscience*. BioMed Central Ltd; 2021.
240. Ghzaïel I, Zarrouk A, Nury T, Libergoli M, Florio F, Hammouda S, *et al*. Antioxidant properties and cytoprotective effect of pistacia lentiscus l. Seed oil against 7 β -hydroxycholesterol-induced toxicity in c2c12 myoblasts: Reduction in oxidative stress, mitochondrial and peroxisomal dysfunctions and attenuation of cell death. *Antioxidants*. 2021 Nov 1;10(11).
241. Levy D, de Melo TC, Oliveira BA, Paz JL, de Freitas FA, Reichert CO, *et al*. 7-Ketocholesterol and cholestane-triol increase expression of SMO and LXR α signaling pathways in a human breast cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Sep 1;19.
242. de Freitas FA, Levy D, Zarrouk A, Lizard G, Bydlowski SP. Impact of oxysterols on cell death, proliferation, and differentiation induction: Current status. Vol. 10, *Cells*. MDPI; 2021.
243. Levy D, Ruiz JLM, Celestino AT, Silva SF, Ferreira AK, Isaac C, *et al*. Short-term effects of 7-ketocholesterol on human adipose tissue mesenchymal stem cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Apr 11;446(3):720–5.
244. Favero GM, Maranhão RC, Maria DA, Levy D, Bydlowski SP, Paulo Bydlowski S, *et al*. BR Synthetic nanoemulsion resembling a protein-free model of 7-ketocholesterol containing low density lipoprotein: In vitro and in vivo studies. Vol. 43, *Biol Res*. 2010.
245. Singh RR, Reindl KM. Glutathione s-transferases in cancer. Vol. 10, *Antioxidants*. MDPI; 2021.
246. Li Y chao, Zheng J, Wang X zi, Wang X, Liu W jing, Gao J lu. Mesenchymal stem cell-derived exosomes protect trabecular meshwork from oxidative stress. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1).

247. Lipopolysaccharide-stimulated bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes inhibit H₂O₂-induced cardiomyocyte inflammation and oxidative stress via regulating miR-181a-5p/ATF2 axis.
248. Liu H, Wang T, Huang K. Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol-induced reactive oxygen species production promotes mitochondrial dysfunction in isolated mice liver mitochondria. *Chem Biol Interact.* 2009 May 15;179(2–3):81–7.

9. ANEXOS

Anexo 01. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de oxisteróis na expressão de proteínas transportadoras ABC relacionadas ao fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) em células-tronco mesenquimais derivadas de medula de indivíduos portadores de Leucemia Mielóide Aguda (LMA)

Pesquisador: Sergio Paulo Bydlowski

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30797820.4.0000.0068

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.011.280

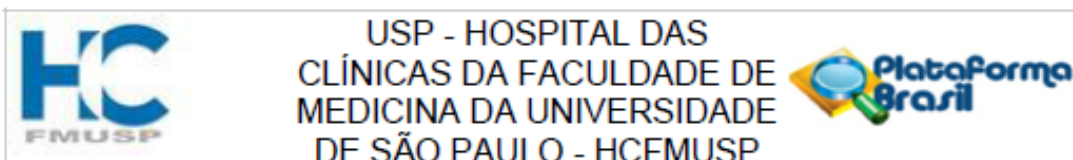
Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo que utilizará células-tronco mesenquimais para avaliar a influência dos oxisteróis na expressão das proteínas transportadoras ABC (ATP-binding cassette), relacionadas ao fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), em células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas da medula óssea de indivíduos portadores de leucemia mielóide aguda (LMA). Serão avaliadas células-tronco provenientes de 10 indivíduos que fazem parte do Biorrepositório do Grupo de Lípidos, Oxidação e Biologia Celular do Laboratório de Imunologia (LIM-19) do InCor, HC-FMUSP. Sendo, 5 pacientes portadores de Leucemia Mielóide Aguda e 5 indivíduos saudáveis (controles). Para tanto, as células serão descongeladas e utilizadas uma única vez após o descongelamento para a realização dos experimentos, e não serão armazenadas novamente.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Verificar a influência dos oxisteróis na expressão das proteínas transportadoras ABC, relacionadas ao fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR), em células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas da medula óssea de indivíduos portadores de leucemia mielóide aguda (LMA).

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:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.011.280

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco será mínimo uma vez que essas células já fazem parte do biorrepositório do Grupo de Lípidos, Oxidação e Biologia Celular do laboratório de Imunologia (LIM-19), e somente o pesquisador responsável possui os dados de identificação de cada indivíduo. Os benefícios estão relacionados com o conhecimento específico da interação das células-tronco mesenquimais e a resistência a múltiplos fármacos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nenhum.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores solicitam a dispensa do TCLE, uma vez que as células-tronco mesenquimais que serão avaliadas são provenientes de indivíduos incluídos do biorrepositório do Grupo de Lípidos, Oxidação e Biologia Celular do Laboratório de Imunologia (LIM-19) do InCor, HC-FMUSP.

Recomendações:

Recomendo que seja enviado a aprovação do biorrepositório do Grupo de Lípidos, Oxidação e Biologia Celular do Laboratório de Imunologia (LIM-19) do InCor, HC-FMUSP antes do início do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Solicito o envio da aprovação do biorrepositório antes do início do estudo. Adequado para aprovação.

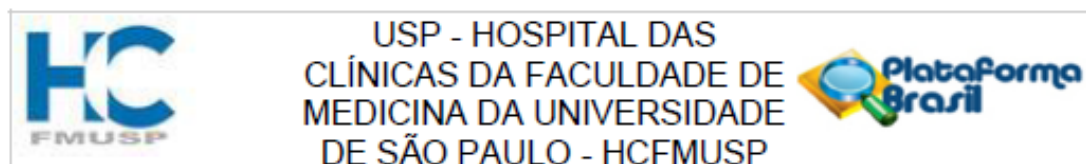
Considerações Finais a critério do CEP:

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
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Rua Ovidio 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: 4.011.280

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1531544.pdf	16/04/2020 13:14:31		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1531544.pdf	16/04/2020 11:55:33		Aceito
Folha de Rosto	FR.pdf	16/04/2020 10:50:59	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	16/04/2020 10:48:18	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_resumido_.docx	30/03/2020 15:53:45	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_brochura.pdf	30/03/2020 15:53:33	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Declaração de Pesquisadores	decla_prof.pdf	30/03/2020 15:51:51	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Declaração de Pesquisadores	decla_CAPPesp.pdf	30/03/2020 15:51:35	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Declaração de Pesquisadores	decla_Cadiele.pdf	30/03/2020 15:50:26	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Declaração de Pesquisadores	dados_digitais.pdf	30/03/2020 15:49:57	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	30/03/2020 15:47:21	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Outros	Cadiele.pdf	30/03/2020 15:45:49	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 06 de Maio de 2020

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