

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA  
MESTRADO PROFISSIONAL**



**PATRICIA LAZZAROTTO BELLICANTA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Efeito da Microgravidade Simulada em  
Fibroblastos de Pele Humana**

**Porto Alegre**

**2016**

Patricia Lazzarotto Bellicanta

## **Efeito da Microgravidade Simulada em Fibroblastos de Pele Humana**

Dissertação de Mestrado realizado no Programa de Pós –  
graduação em Mestrado Profissional em Biotecnologia  
Farmacêutica (MPBF), para aquisição do grau de Mestre.  
Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Professora Marlise Araújo dos Santos Ph.D.

**Porto Alegre**

**2016**

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora professora Dra Marlise Araújo dos Santos, pela inspiração, pelo amor a profissão e pelos conhecimentos a mim passados ao longo da vida acadêmica.

Ao meu amigo Dr. Daniel Marinowic pela ajuda, ideias, cooperação, incentivo e coleguismo, sem os quais não seria possível a realização dessa pesquisa.

À equipe do Instituto de Pesquisas Biológicas do Hospital São Lucas da PUCRS, pelo carinho, compreensão e ajuda.

A minha família, em especial minha mãe, Vanda T. Lazzarotto Bellicanta pelo zelo, suporte e carinho.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma colaboraram para realização desse trabalho.

Ao Centro de Microgravidade da PUCRS pela ajuda, parceria e atenção, em especial a Ingrid Gradaschi Lamadrid pelo fundamental auxílio na finalização desse trabalho.

## RESUMO

**Introdução:** As características da plasticidade inerentes das células de fibroblastos humanos os tornam uma ferramenta importante para avaliar os efeitos da microgravidade em um nível celular. Este estudo analisou o comportamento dos fibroblastos fragmento de pele humanas em um ambiente de microgravidade simulada. Métodos: células de fibroblasto humanos em 8<sup>a</sup> e 17<sup>a</sup> passagem, cultivadas em condições normais em incubadora a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub>, foram submetidos à microgravidade simulada em um clinostato-3D por um período de 24h e 40h. Após a exposição, as células de cada passagem foram analisadas e comparadas com o grupo de controle (1G) ensaios de proliferação celular (*population doubling*), ensaios de passagem e análise microscópica, bem como a análise de PCR para a detecção de variações na expressão de genes relacionados com o ciclo celular (p21, p16). Resultado: Antes da exposição microgravidade, células pertencentes à passagem 17<sup>a</sup> apresentaram características de células num estado apoptótico. Depois de 24h e 40h de microgravidade, as células de ambos os grupos se mostraram mais confluentes e alongadas. A análise de PCR demonstrou que a expressão de p21 foi diminuída enquanto p16 aumentou. Além disso, a análise PCR mostrou a diferença na expressão de genes p21 e p16 entre as amostras 24h e 40h. Discussão: A presente pesquisa mostrou que as células de 17<sup>a</sup> passagem tornaram-se mais confluentes e alongadas após a exposição microgravidade, uma característica das células com menor número de passagens, sugerindo alterações no seu citoesqueleto. Este resultado foi confirmado por análise de PCR, onde foi demonstrado uma diminuição na expressão de p21. Esse resultado confirma descobertas anteriores de que entre 588 genes testados, o gene p21 apresentou uma expressão negativa. Por outro lado, o gene p16 mostrou uma expressão positiva. Uma vez que ambos os genes P21 e P16 estão relacionadas com o ciclo celular, estes resultados sugerem a hipótese de alterações importantes tenham ocorrido no citoesqueleto celular e, conseqüentemente, uma provável alteração na produção de proteínas reguladoras do ciclo celular (ciclina). Além disso, a análise de RT-PCR demonstrou uma diferença na expressão do gene p21 e p16 entre as amostras 24h e 40h, indicando a necessidade de uma comparação mais detalhada entre os tempos de exposição. Foram também percebidas alterações no nível de plasticidade dos fibroblastos de 17<sup>a</sup> passagem e 8<sup>a</sup> passagem, devido a expressão de marcadores de pluripotência *Oct4*, *Nanog*.

**PALAVRAS CHAVE:** microgravidade, fibroblastos, ciclo celular, PCR, *population doubling*

## ABSTRACT

**Introduction:** The inherent characteristics of plasticity of human fibroblast cells makes it an important tool for evaluating the effects of microgravity at a cellular level. This study analyzed the behavior of human skin fragment fibroblasts in a simulated microgravity environment. **Methods:** Human fibroblast cells in the 8<sup>th</sup> and 17<sup>th</sup> passage, cultured under standard incubator conditions at 37° C with 5% CO<sub>2</sub>, were submitted to simulated microgravity in a 3D-clinostat for a period of 24h and 40h. After exposure, both passage cells were analyzed and compared with the control group (1G) in population doubling assays, tests of passage and microscopic analysis, as well as PCR analysis for detection of variations in the gene expression related to the cell cycle (p21, p16). **Results:** Before microgravity exposure, cells belonging to the 17th passage presented characteristics of cells in an apoptotic state. After 24h and 40h of microgravity, the cells of both groups showed themselves to be more confluent and elongated. PCR analysis demonstrated that p21 expression was decreased while p16 increased. In addition, PCR analysis showed a difference in expression of p21 and p16 genes between the 24h and 40h samples. **Discussion:** The present research showed cells to be more confluent and elongated after microgravity exposure, a characteristic of cells with fewer passages, suggesting alterations in their cytoskeleton. This result was confirmed by PCR analysis where a decrease in p21 expression was demonstrated. This result corroborates previous findings that among 588 genes tested, the p21 gene presented a negative expression. Conversely, the p16 gene showed a positive expression. Since both the p21 and p16 genes are related to the cell cycle, these results suggest the hypothesis of important changes having occurred in the cellular cytoskeleton and, consequently, a probable alteration in the production of cell cycle regulatory proteins (cyclins). Furthermore, RT-PCR analysis demonstrated a difference in p21 and p16 gene expression between the 24h and 40h samples, indicating the need for a more detailed comparison between the exposure times. Also pluripotency markers were found, Oct4 and Nanog, which suggests alterations in plasticity levels.

**Keywords:** fibroblasts, microgravity, cell cycle, PCR, population doubling

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Sequência de Primers.....	27
---	----

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Disposição dos fragmentos de pele em placa de Petri de 60	22
Figura 2 - Figura representativa do clinostato tridimensional	24
Figura 3 - Cultura de fibroblastos de pele em 17 <sup>o</sup> passagem (1G).	40
Figura 4 - Fibroblastos de pele em 17 <sup>a</sup> passagem 24 h	40
Figura 5 - Fibroblastos de pele em 17 <sup>a</sup> passagem 40 h.	40
Figura 6- Fibroblastos de pele em 8 <sup>a</sup> passagem 1G.	41
Figura 7 - Fibroblastos de pele em 8 <sup>a</sup> passagem 24h	41
Figura 8 - Fibroblastos de pele em 8 <sup>a</sup> passagem40h	41
Figura 9 - Teste de viabilidade celular.	42
Figura 10 - SEM Viabilidade Celular	42
Figura 11 - Ensaio de Crescimento Populacional.	43
Figura 12 - Análise do Crescimento Populacional.	44
Figura 13- Expressão p16	44
Figura 14- Expressão p27	45
Figura 15- Expressão p21	45
Figura16 –Captura de imagem microscopia confocal Nanog	46
Figura 17-Captura de imagem microscopia confocal <i>Oct4</i>	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BDNF</b>	fator neurotrófico derivado de cérebro (do inglês <i>Brain Derived Neurotropic Factor</i> )
<b>CD3</b>	do inglês ( <i>cluster of differentiation 3</i> )
<b>CD28</b>	do inglês ( <i>cluster of differentiation 28</i> )
<b>CD4+</b>	do inglês ( <i>cluster of differentiation 4</i> )
<b>CD73</b>	do inglês ( <i>cluster of differentiation 73</i> )
<b>CD75</b>	do inglês ( <i>cluster of differentiation 75</i> )
<b>CD14</b>	do inglês ( <i>cluster of differentiation 14</i> )
<b>CD34</b>	do inglês ( <i>cluster of differentiation 34</i> )
<b>CD45</b>	do inglês ( <i>cluster of differentiation 45</i> )
<b>cDNA</b>	DNA complementar a um RNA
<b>CDK</b>	(quinase dependente de ciclina)
<b>CMyc</b>	c-mycproto-oncogene
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás Carbônico
<b>DAPI</b>	Corante nuclear (do inglês <i>4',6-diamidino-2-phenilindol</i> )
<b>DMEM</b>	Meio de cultura de células (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
<b>DNase</b>	Enzima que degrada Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
<b>DPBS</b>	Tampão salina (do inglês <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>FGF</b>	Fator de Crescimento de Fibroblastos (do inglês <i>Fibroblast Growth Fator</i> )
<b>FITC</b>	Isotocinato Fluoresceína
<b>G0/G1</b>	Fase de repouso e fase de síntese proteica do ciclo celular
<b>iPSC</b>	Células-Tronco Pluripotentes Induzidas (do inglês: <i>Induced Pluripotent Stem Cell</i> )
<b>ISCI</b>	Iniciativa Internacional de Células-tronco (do inglês <i>International Stem Cell Initiative</i> )
<b>Klf4</b>	<i>Kruppel-like factor 4</i>
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinases
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>Oct4</b>	<i>octamer-binding transcription factor 3 / 4</i>
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia de Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )

<b>PDL</b>	Ensaio de crescimento Populacional (do inglês <i>Population Doubling Level</i> )
<b>PUCRS</b>	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
<b>p16</b>	proteína reguladora negativa do ciclo celular
<b>p21</b>	proteína reguladora negativa do ciclo celular
<b>p27</b>	proteína reguladora negativa do ciclo celular
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i> )
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>Sox2</b>	<i>SRY (sex determining region Y)-x 2</i>
<b>Tyr-15</b>	anticorpo inibidor de fosforilação
<b>XRCC1</b>	gene reparador de DNA

## SUMÁRIO

Resumo.....	4
Abstract.....	5
LISTA DE TABELAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Efeitos da Microgravidade nos Organismos e Tipos Celulares.....	14
2.2 Medicina Regenerativa e Microgravidade.....	16
2.3 Plasticidade dos Fibroblastos na Reprogramação e suas Características.....	18
2.4 Alterações no Ciclo, Expressão Gênica Celular e Microgravidade .....	19
3. OBJETIVOS GERAIS.....	21
3.2 Objetivos Específicos.....	21
4. METODOLOGIA.....	22
4.1 Obtenção dos Fibroblastos.....	22
4.2 Preparação das Culturas Celulares para Exposição à Microgravidade Simulada.....	22
4.3 Simulação da Microgravidade .....	23
4.4 Análise Morfológica das Células.....	24
4.5 Realização de Ensaio de Viabilidade Celular.....	24
4.6 Realização dos Testes de Passagem.....	25
4.7 Imunofluorescência.....	27
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
7. REFERÊNCIAS.....	57

## 1.INTRODUÇÃO

Todos os organismos do Planeta Terra se adaptaram para sobreviver orientados pela força da gravidade <sup>1</sup>. É notório e documentado o entendimento de que a alteração da força gravitacional exerce influência em inúmeros aspectos do organismo humano e de outras espécies, bem como em sementes e plantas <sup>1</sup>. Esses achados científicos, tanto os realizados em simulação de microgravidade como no Espaço propriamente dito, possibilitam a discussão e o uso desta ferramenta para um melhor entendimento da biologia básica essencial para a vida em solo terrestre <sup>2</sup>.

A realização de ensaios em voos parabólicos e em estações espaciais é de difícil alcance, face ao custo envolvido e a baixa disponibilidade. Assim, o uso de modelos experimentais de simulação de microgravidade em Terra, torna-se uma ferramenta essencial para o entendimento de eventos que ocorram no ambiente espacial. Neste contexto é empregado o equipamento Clinostato 3D, cujo viés funcional é baseado no princípio de alteração do vetor gravitacional <sup>3</sup>. Considerando a gravidade um vetor, essa possui magnitude e direção e, desta forma, o efeito causado pelos movimentos do simulador, faz com que a posição das amostras em estudo sofra uma mudança randômica, o que cria uma simulação de ambiente microgravitacional. É relevante salientar que a similaridade entre a microgravidade real e a sua simulação produzida pela clinorrotação do Clinostato 3D já foi comprovada matematicamente <sup>4</sup>.

O primeiro experimento utilizando instrumentos para manipulação da gravidade foi realizado por Thomas Andrew Knight em 1806 <sup>3</sup>. Nos processos biológicos, seu valor tem sido demonstrado através de pesquisas que incluem: avaliar o crescimento e a virulência de microorganismos, no intuito de auxiliar no isolamento de genes relevantes para o desenvolvimento de vacinas; avaliar a permeabilidade de fármacos em células de epitélio pulmonar e cultivar tecidos de diferentes espécies tendo em vista que, em microgravidade, eles se desenvolvem de forma tridimensional, o que beneficia a fidelidade do efeito produzido por fármacos <sup>5</sup>. Recentemente, muitos métodos de clinorrotação vêm sendo desenvolvidos e utilizados para examinar os efeitos da exposição das células e tecidos à simulação microgravidade <sup>6</sup>.

Com o uso do Clinostato 3D, bem fundamentado e estabelecido, descobertas e resultados relacionados ao estudo e utilização da simulação microgravidade vem chamando a atenção da comunidade acadêmica e científica<sup>3</sup>. A investigação de possíveis alterações genéticas e morfológicas causadas pela microgravidade real e simulada em alguns tipos

celulares está sendo conduzida de forma bastante ascendente <sup>7</sup>. Exemplo disso são os experimentos realizados na Estação Espacial Internacional, em órbita desde 1996, a qual abriga em sua estrutura, o Laboratório Columbus, onde são realizadas pesquisas com células e plantas, além de ensaios de biologia molecular. Tendo em vista que os resultados obtidos em órbita podem ser complementados, corroborados ou confrontados com os realizados em Terra, o tema apresenta grande cunho investigativo e relevante.

Atualmente, já se sabe que a utilização da simulação de microgravidade resulta em uma alteração não somente na forma das células cultivadas nesse ambiente, mas também na expressão de proteínas específicas. Além disso, é sabido que a referida simulação pode aumentar o nível de diferenciação das células-tronco mesenquimais, aumentando o potencial de diferenciação em neurônios, o que sugere ser uma nova estratégia de tratamento para doenças do sistema nervoso central <sup>5</sup>.

Complementarmente, tem-se a reprogramação celular. Essa técnica cria células em um estado de indiferenciação -pluripotentes- com auxílio de manipulação genética, através da transdução de fibroblastos primários humanos com vetores virais expressando os genes *Oct4*, *C-Myc*, *Klf4* e *Sox2*. As células resultantes desse processo são as chamadas células tronco pluripotentes induzidas (*iPSC*) <sup>9</sup>. Essas células expressam marcadores de células pluripotentes e são capazes de se diferenciar *in vivo* e *in vitro* em tecidos derivados dos três folhetos embrionários. Assim os fibroblastos mostram-se interessantes alvos de estudo no campo da biologia celular e molecular, representando dessa maneira, um importante avanço no caminho evolutivo da medicina regenerativa. Além disso, é importante salientar que experimentos com a simulação de microgravidade tem demonstrado alterações na forma celular. Bem como nos processos do ciclo celular <sup>10</sup>. Dado o exposto, torna-se instigante o estudo e análise das possíveis alterações morfológicas e de expressão gênica nos fibroblastos de pele humana cultivados sob a influência da microgravidade simulada.

O termo fibroblasto é tradicionalmente empregado para identificar o membro da família de células de origem mesenquimal que sintetiza os componentes fibrilares (colágeno e elastina), e não fibrilares (glicoproteínas e proteoglicanos) da matriz extracelular do tecido conjuntivo. O fibroblasto, como célula imatura com e características de células mesenquimais, é reconhecido como um tipo celular versátil dos tecidos conjuntivo <sup>11</sup>. Além de ser responsável pela formação e remodelação dos tecidos classificados histologicamente como conjuntivos propriamente ditos, participa de modo ativo nos processos de cicatrização e de fibrose em determinadas doenças. Uma vez diferenciados, os fibroblastos ainda exibem

diversidade considerável no que diz respeito às características morfológicas, expressão de receptores de superfície celular específica e capacidade de renovação celular <sup>12</sup>.

Estudos recentes com fibroblastos de pele humana submetidos à cultura em clinorrotação 3D demonstraram alterações em 21 diferentes genes <sup>8</sup>. Percebe-se assim que no contexto atual de ida do homem à Marte, as pesquisas com microgravidade simulada e experimentos na Estação Espacial Internacional, alcançaram um maior destaque em âmbito internacional. Esse novo cenário, que compreende a conjugação dos conhecimentos das Ciências Biológicas com os princípios da Física estimulou a realização da presente pesquisa, tendo como objetivo principal analisar as possíveis alterações morfológicas, e de expressão gênica das células sob a influência da microgravidade simulada, com o emprego de um Clinostato 3D.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Nesta revisão serão apresentados os principais aspectos/conceitos envolvidos no desenvolvimento desta dissertação.

### **2.1 Efeitos da Microgravidade nos Organismos e em Tipos Celulares**

Na Terra, os organismos estão permanentemente sujeitos à ação da gravidade <sup>14</sup>, a qual produz um conjunto de estimulações mecânicas essenciais para o funcionamento normal dos tecidos e células. Essa força gravitacional desempenha um papel fundamental na orientação espacial em terra. Dessa forma, muitos aspectos desse ambiente terrestre, incluindo a conformação do corpo humano, são gravitacionalmente polarizados <sup>2</sup>.

Contudo, já é documentado que os voos espaciais e a simulação de microgravidade violam os paradigmas referenciais de orientação característicos da superfície terrestre <sup>14</sup>. Já que a gravidade é uma aceleração linear, a sua falta/redução, exerce uma forte influência no comportamento e correta função dos órgãos. Exemplos clássicos dessa perda de vetor gravitacional no organismo são o enjoo de movimento, ou cinetose, e a desorientação espacial <sup>2</sup>. Outro fenômeno bastante conhecido é o deslocamento do fluxo sanguíneo e dos fluidos corporais dos membros inferiores para a parte superior do corpo, causando um aumento desse fluxo nos membros superiores <sup>15</sup>.

No início da era Espacial, a gravidade não era um assunto de grande interesse na área da Biologia <sup>16</sup>. Porém, com a observação da desmineralização óssea e a atrofia muscular dos primeiros astronautas e cosmonautas, surgiram as primeiras hipóteses de que o sistema orgânico poderia envelhecer mais rapidamente em condições de microgravidade <sup>17</sup>. Com a divulgação dessa teoria, em conjunto com os efeitos já percebidos anteriormente, a comunidade científica percebeu que os organismos vivos, como um todo, e em nível celular, eram suscetíveis a adaptações quando em contato com a microgravidade. Desta forma, estudos com esse enfoque, tomaram uma proporção e evidência maiores, analisando, assim, de forma mais minuciosa essas alterações. Rodionova e Oganov em 2002, verificaram a morfologia e a osteometria de biópsias de osso ilíaco de macacos, as quais permaneceram em órbita por 14 dias. As amostras em situação de microgravidade preservaram a estrutura típica em relação às amostras controle, porém como uma adaptação à falta de força gravitacional, lacunas foram formadas e preenchidas com fibras de colágeno em alguns osteócitos jovens. Já nos osteócitos maduros, foi percebido um aumento no volume no Complexo de Golgi e nos lisossomos, o que foi correlacionado, em um primeiro momento, com uma atividade osteolítica dos osteócitos e a reabsorção da matriz mineralizada das lacunas ósseas. Como consequência da destruição dos osteócitos confirmou-se um aumento

da quantidade de lacunas do tecido ósseo sem preenchimento <sup>18</sup>.

A exposição à microgravidade está associada a inúmeras mudanças fisiológicas nos astronautas incluindo perda óssea do tipo osteoporose. Apesar de muitos estudos *in vivo* e *in vitro* terem sido realizados, o mecanismo pelo qual esse fenômeno ocorre ainda não está esclarecido <sup>17</sup>. Segundo Nabavi e Khandani (2011) , osteoclastos expostos a cinco dias de microgravidade possuem microtúbulos mais curtos e ondulados, menos e menores adesões focais, e fibras de actina corticais mais finas e estressadas. Os osteoblastos submetidos a voos espaciais apresentam um formato celular mais alongado, e o núcleo condensado <sup>17</sup>. Portanto, a redução de gravidade causa um aumento de reabsorção óssea pelos osteoclastos, e uma diminuição da integridade celular dos osteoclastos. Tanto a microgravidade real como sua simulação são conhecidas por romper com o equilíbrio normal da atividade dos osteoclastos em geral, o que pode resultar em uma perda óssea evidente <sup>17</sup>.

Hoje, sabe-se que essas alterações do tecido ósseo são um dos mais relevantes assuntos, no que se refere a estudos relativos a organismos animais e humanos, conduzidos sob a influência da microgravidade <sup>18</sup>. Como a gravidade é um fator constante em todo o período de evolução da vida na Terra, ela moldou a arquitetura de todos os sistemas biológicos <sup>19</sup>. Questões sobre como as funções moleculares e celulares se adaptam, e portanto dependem da gravidade é objeto de muito interesse. Levando-se em consideração o descrito, e além das alterações do organismo já citadas, tem-se a desregulação do sistema imune <sup>20</sup>. Em meados de 1970, 15 dos 29 astronautas da Apollo contraíram infecções virais e bacterianas durante o voo ou logo após retornarem. Desde então alguns experimentos foram feitos, tanto em simuladores como em microgravidade real. Segundo a revisão de 2014 dos autores Hauschild e Tauber foram encontrados resultados interessantes nas pesquisas com células T humanas <sup>19</sup>. Nas últimas três décadas, estudos *in vitro* com linfócitos isolados em microgravidade real e simulada confirmaram os efeitos da redução da gravidade em nível celular e produziram evidências de que as alterações dos mecanismos moleculares e os processos de sinalização transducional são um resultado direto da gravidade alterada. De acordo com os autores a exposição à microgravidade simulada também diminuiu a expressão de genes de reparação de DNA, genes de ciclo celular e anti e pró apoptóticos de células T humanas submetidas a microgravidade simulada por períodos de 4 horas, 72 horas e 7 dias. Com a perda do vetor gravitacional a falta de sedimentação das células imunes pode levar a uma redução da interação célula-célula e célula-substrato, o que por sua vez pode contribuir para uma reduzida resposta proliferativa ao estímulo mitótico observado na microgravidade alterada <sup>19</sup>. Seguindo esse tópico, atualmente na

Estação Espacial Internacional, uma pesquisa analisa o comportamento de células imunes, linfócitos do tipo células T em contato com vírus. Após um ano, os pesquisadores irão comparar os resultados desse experimento entre irmãos gêmeos, os astronautas Scott, em órbita na Estação Espacial Internacional e Mark Kelly em terra. O objetivo do estudo é verificar se ao retornar para a Terra, o sistema imune de Scott sofreu alterações significativas. Apesar de muitas investigações terem sido realizadas, pouco se sabe, até o presente momento sobre os reais mecanismos que levam às mudanças no sistema imune. Borchers e colegas (2002) citam outros fatores que podem estar associados à modulação desse sistema, tais como o estresse, devido ao ambiente de confinamento, uma vez que hormônios relacionados ao estado de desequilíbrio no organismo, encontram-se aumentados durante e após o voo, e a radiação cósmica <sup>21</sup>.

No trabalho apresentado por Martinelli e colegas em 2007, utilizando o mesmo simulador Clinostato 3D, foi visto que a microgravidade pode produzir alterações na performance do sistema imune, atuando nos linfócitos e monócitos. A diminuição de gravidade suprime as funções linfocitárias envolvidas nos processos imunes como locomoção celular e expressão de antígenos. Os resultados obtidos indicaram uma diminuição não significativa na proliferação e viabilidade celular após 24h de microgravidade simulada. No entanto um decréscimo significativo na proliferação e viabilidade celular foi observado após 48 horas de exposição. O estudo mostra que a alteração do sistema imune durante um voo espacial, não está apenas associada com os estresses psicológicos e fisiológicos a que os astronautas estão sujeitos, mas também parece ser causada pela microgravidade real, pois afeta diretamente a viabilidade e proliferação celular <sup>22</sup>.

## **2.2 Medicina Regenerativa e Microgravidade**

Estudos em modelos animais e em seres humanos expostos a microgravidade real ou simulada, podem prover uma nova compreensão acerca de vários aspectos da saúde humana, assim como o aumento do conhecimento a respeito da cultura de células e tecidos nesses ambientes, apresentando assim um forte impacto biotecnológico para a medicina regenerativa<sup>23</sup>. Aliada à essa tendência, as células tronco humanas são um importante objeto de estudo e de trabalho nessa área, justamente pelo fato de possuírem características inerentes que as permitem transformar-se em qualquer célula do corpo. Porém o entendimento do papel da gravidade no desenvolvimento e diferenciação de células-tronco ainda é incipiente <sup>24</sup>.

Assim, a peculiaridade essencial para que a diferenciação celular se torne possível é a célula

encontrar-se em estado de pluripotência ou multipotência. No entanto, esta diferenciação pode ser afetada de forma significativa por estímulos mecânicos, bioquímicos ou interações celulares <sup>25</sup>. Diversos estudos envolvendo células-tronco pluripotentes, multipotentes associados à microgravidade já foram conduzidos, tendo sido percebidos resultados bastante instigantes e interessantes. Estudos em microgravidade simulada realizados por Yuge e colegas (2006), demonstraram que culturas de células-tronco mesenquimais humanas possuem uma forte característica de proliferar e reter a sua habilidade de diferenciar-se em cartilagem hialina após transplante <sup>5</sup>. Nesta mesma linha, a pesquisa de Gershovich e colegas (2009), demonstrou que mudanças no nível de expressão de alguns genes associados aos microfilamentos de actina do citoesqueleto e marcadores de células-tronco, são supostamente um dos mecanismos que contribuem para a adaptação das células na presença da microgravidade, o que pode responder a questão por qual mecanismo genômico a simulação da mesma reduz a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais <sup>26</sup>. Versari e colegas (2012), utilizaram tecidos de células-tronco derivadas do tecido adiposo cultivadas em simulação de microgravidade, em incubadora padrão de laboratório, que resultou na diferenciação e proliferação alteradas. Os autores concluíram que o nível de oxigênio pode modular a sinalização celular e a aderência das células, com a ciência de que a simulação de microgravidade, por si só, pode afetar a forma da célula e também a organização do citoesqueleto <sup>27</sup>.

Por outro lado, mas ainda com o viés da medicina regenerativa a reprogramação de células somáticas adultas em células tronco *iPSC* pluripotentes vem atraído considerável atenção das comunidades públicas e científicas. Essa atenção se dá devido a importância dessas células reprogramadas no *screening* de fármacos, modelagem de doenças, terapia celular e medicina regenerativa <sup>25</sup>. Células somáticas de diferentes espécies: macaco, rato, camundongo, humana tem sido reprogramadas pela superexpressão de fatores de transcrição de pluripotência, tais como *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* e *Klf4* em camundongos e *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* e *Lin28* em células humanas. As *iPSC* humanas são uma importante fonte celular alternativa para terapia celular em pacientes específicos, devido a sua habilidade de auto regeneração ilimitada e pluripotência <sup>25</sup>. Porém, sabe-se que a reprogramação celular é um processo considerado ineficiente, por muitos, devido ao seu alto custo do processo, baixa reprodutibilidade. É sabido que redes regulatórias dos genes das células somáticas protegem as células de alterações mais importantes, e caracterizam barreiras a uma reprogramação eficiente <sup>25</sup>.

### 2.3 Plasticidade dos Fibroblastos na Reprogramação e suas Características.

A integridade do organismo humano depende de certo grau de estabilidade fenotípica das células que formam seus tecidos <sup>11</sup>. Do contrário, a instabilidade de diferenciação marcada pela transformação de um fenótipo celular em outro, é uma das características relativas às mudanças que ocorrem na embriogênese, na cicatrização, e durante as adaptações fisiológicas. Essas mudanças são conhecidas como transdiferenciação ou diferenciação celular, e refletem a plasticidade típica das células <sup>11</sup>.

Os fibroblastos são também bem conhecidos por desempenhar um papel importante na cicatrização de feridas, por conduzir a conversão miogênica e induzir a expressão de genes associados a pluripotência. No entanto, pouco foi relatado sobre sua própria plasticidade na diferenciação direta, particularmente em relação a células pluripotentes induzidas *iPSC* <sup>12</sup>. Em um estudo conduzido por Osonoi e colegas de 2011, foi mostrado que os fibroblastos conseguem se diferenciar diretamente nas derivativas das camadas embrionárias: neurônios (ectoderme), músculo-esqueléticas (mesoderme), e células produtoras de insulina (endoderme). Os autores cultivaram fibroblastos de pele humana em placas de petri cobertas com poli-L-lisina em condições hipóxicas e normais. Em ambas as condições foram obtidos resultados positivos para transdiferenciação. Em apenas dois dias de cultura induzida foram observados neurônios com marcação positiva para o marcador neuronal beta III tubulina. Já na indução de cultura de fibroblastos para obtenção de células músculo-esqueléticas, os fibroblastos cultivados apresentaram uma fusão gradual e formação de miotubos. Com relação à indução de conversão dos fibroblastos em células produtoras de insulina de células, grupos de células foram observados e a presença de insulina nesses agregados foi detectada no final do processo de diferenciação, assim como algumas células isoladas também foram encontradas. No 21º dia foram observados miotubos imaturos e quase maduros. Desta forma, segundo os autores, os fibroblastos de pele humana são dotados de uma maior plasticidade do que o previamente estabelecido, e em comparação com as células tronco mesenquimais. Esse resultado demonstra o potencial desses fibroblastos para serem utilizados como célula precursora em terapia celular, definido com bases empíricas.

As células-tronco mesenquimais e fibroblastos maduros compartilham diversas características morfológicas e funcionais, até mesmo características peculiares de classificação estabelecidas pela Iniciativa Internacional de Células Tronco (do inglês *International Stem Cell Initiative*), como a adesão ao plástico, expressão de moléculas CD73 e CD75 e ausência de expressão das moléculas CD14, CD34 e CD45, além da

diferenciação induzida para linhagem osteogênica e adipogênica <sup>28</sup>. Diversas similaridades entre os fibroblastos e as células-tronco mesenquimais já foram descritas, como a localização dessas células em todos os órgãos do corpo, sendo elas de origem endotelial, epitelial e hematopoiético, com capacidade de sintetizar e remodelar a matriz extra celular <sup>9</sup>. Adicionalmente, características de células indiferenciadas já foram atribuídas aos fibroblastos maduros, como por exemplo, mecanismos de estresse tecidual e inflamação. Alguns fibroblastos atuam no local de ferimentos através de migração, proliferando para restabelecer a homeostasia dos tecidos reduzindo a inflamação local <sup>29</sup>. Porém, o reparo associado aos fibroblastos em um eventual dano continuado, pode causar inflamação crônica e a formação de fibrose, diferente do que é associado ao tratamento de lesões utilizando células-tronco mesenquimais <sup>30</sup>.

Além disso, os fibroblastos são células do estroma mesenquimal e ocorrem em todos os tecidos, e a plasticidade inerente desse tipo celular o fez ser escolhido para o desenvolvimento desta pesquisa.

#### **2.4 Alterações no Ciclo, Expressão Gênica Celular e sua relação com a Microgravidade**

Uma nova perspectiva acerca da fisiologia humana e animal sob condições extremas, como a microgravidade, pode também contribuir para um melhor entendimento da fisiologia das doenças existentes na Terra, como por exemplo, a osteoporose, doenças cardiovasculares, atrofia muscular e disfunções do sistema imune <sup>31</sup>. Muitos eventos em nível celular, vias metabólicas, e vias de sinalização vem sendo determinadas em células em condições de microgravidade, incluindo ciclo celular, sobrevivência celular e apoptose <sup>20</sup>.

A continuidade do ciclo celular é regulada por interações entre ciclinas e CDK's especialmente no que se refere à transição da fase G1 para S, que é regulada pela família de reguladores negativos do ciclo celular CDKI's. Faz parte dessa família o grupo CIP KIP e INK4. A proteína p21 faz parte da família CIP-KIP, e em células diferenciadas ela pode ter um papel crucial no interrompimento do ciclo celular <sup>32</sup>. A proteína p27 inibidora da ciclina quinase dependente é também um regulador crucial do ciclo celular na fase de transição G1 para S e também é responsável por manter a integridade dos microtúbulos <sup>33</sup>. Ambas as proteínas são inibidores não seletivos do ciclo celular, atuando nos diversos tipos de complexos ciclina CDK. Outro regulador negativo do ciclo celular é a proteína p16, que ao ligar-se a CK4 e CK6, causa sua inibição e consequente fosforilação da proteína Rb (retinoblastoma) bloqueando, desta forma, a progressão do ciclo celular <sup>34</sup>.

Os efeitos da clinorotação foram analisados por Arase e colegas, com auxílio de um clinostato 3D, os quais investigaram a variação da expressão gênica em fibroblastos de

pele humana de fetos. Após as culturas celulares serem expostas a 24 h de exposição a microgravidade simulada, foram avaliados mais de 588 genes representativos, os quais foram comparados aos Atlas de cDNAs humanos através de ensaio de PCR. Desses, cinco genes tiveram uma expressão aumentada e oito uma expressão diminuída. Segundo os achados, houve uma expressão aumentada *XRCC1*, e uma expressão diminuída do *ERBB12* e *p21*, o que foi confirmado pelo ensaio de PCR. Segundo os autores, os resultados sugerem que a expressão desses genes são moduladas pela variação do vetor gravitacional, causada pelo simulador de microgravidade. Desta forma, esses dados podem servir de base para estudos biológicos de culturas 3D<sup>8</sup>.

Thiel e Paulsen, em 2012, realizaram uma pesquisa com o objetivo de identificar os mecanismos de reação à alteração da gravidade em células de mamíferos, para melhor compreender como a alteração do vetor gravitacional é percebida em um nível celular. Os autores, em uma combinação de experimentos utilizando um clinostato 2D e microgravidade real em voos parabólicos identificaram as reações imediatas que a microgravidade pode causar no mecanismo de regulação do ciclo celular dos linfócitos T. Na simulação de microgravidade, foi detectado um aumento na expressão da *p21*, em minutos após a exposição e menor expressão da proteína *cdc 25 C*, em comparação com os grupos controle. Adicionalmente, ocorreu um atraso e diminuição de fosforilação de Tyr-15 em relação aos grupos controle. Nas células T primárias CD3/CD28, CD4+ e células Jurkat a expressão de mRNA da *p21*, reguladora negativa de ciclo celular foi aumentada depois de 20 segundos de microgravidade real, em comparação com o grupo controle. Com base nesses resultados os autores sugerem que a expressão de proteínas regulatórias do ciclo celular nos linfócitos T requerem a gravidade terrestre, e que a desregulação da expressão dessas proteínas podem ser responsáveis pelas interferências no sistema imune que ocorre no espaço<sup>20</sup>.

Sokolovskaya e Ignashkova, em 2013, verificaram os efeitos da microgravidade no ciclo celular em células endoteliais. Foram analisados alterações no ciclo de células endoteliais de linhagem EAhy 926 expostas a microgravidade simulada em um simulador RPM. Utilizando citometria de fluxo, os autores verificaram um aumento de porcentagem de células em fase G0/G1, após 24 e 94 horas de exposição em comparação com o grupo controle. No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada após 120 horas de exposição a microgravidade simulada. Com relação à fase S, o percentual de células diminuiu significativamente após 24 e 96 horas de exposição. Os autores demonstraram, então que a simulação inibe a progressão do ciclo celular de G0/G1 para a fase S. Foi também observado um efeito de hibernação quando o crescimento das células no simulador

diminuía, mas não parava. Além desses resultados, foi constatado que a microgravidade simulada também interferiu na adesão celular e alterou a expressão de alfa tubulinas <sup>31</sup>. Tendo em vista as alterações gênicas, morfológicas e estruturais celulares geradas pela modificação do vetor gravitacional, como acima descrito, acredita-se que a utilização do Clinostato 3D seja uma ferramenta que viabilize o aprofundamento de estudos e pesquisas da Biologia Celular e Molecular.

### 3. OBJETIVOS GERIAS

Analisar a influência da exposição de fibroblastos de pele humana a microgravidade simulada, através do uso de um clinostato 3D, em relação às alterações morfológicas, capacidade de crescimento, e expressão gênica durante dois diferentes períodos de exposição.

#### 3.1 Objetivos Específicos.

- Determinar o protocolo ótimo de exposição dos fibroblastos de pele humana à microgravidade simulada para análise microscópica, genética, testes de passagem, e ensaio de proliferação celular.
- Estimar o Crescimento Populacional- PDL ( do inglês *-population doubling-level*).
- Realizar testes de passagem, contando o número de vezes que as células foram recultivadas.
- Detectar, através de *qRT-PCR*, a presença de genes relacionados a ciclo celular e senescência celular.
- Detectar a presença de marcadores de pluripotência *Oct4*, *Nanog*.

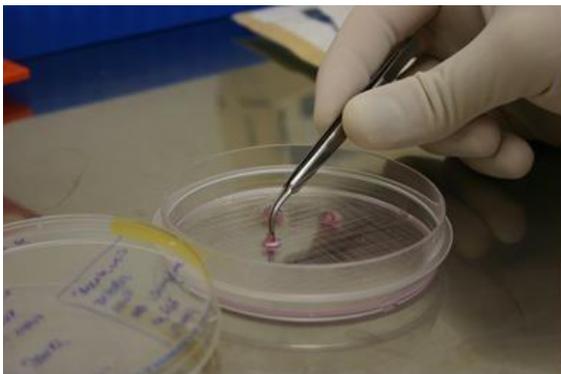
## 4.METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção dos Fibroblastos

Os fibroblastos foram obtidos de biópsias de pele de um paciente maior de idade, saudável, livre de doenças infecciosas, atendido no Programa de Cirurgia Plástica do Hospital São Lucas da PUCRS. Esse procedimento foi realizado após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, TCLE, conforme Apêndice A, pelo paciente. A coleta foi realizada através de biópsia de fragmentos de pele residuais da cirurgia de abdominoplastia, realizada pelo cirurgião responsável. Esse material somente foi utilizado para esta pesquisa após o recebimento de uma carta de autorização do Chefe de Serviço de Cirurgia Geral do HSL-PUCRS. Essa pesquisa foi realizada após a aprovação do Comitê de ética em Pesquisa do PUCRS, protocolo nº CAAE45548315.

Os fragmentos de pele foram conduzidos ao Centro de Terapia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, onde foram fragmentados em pedaços de 10 milímetros quadrados. Os fragmentos foram colocados em uma placa de Petri, na qual foram adicionados 20 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina, 100 µg/mL de gentamicina e 20 ng/mL de fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Os fragmentos foram mantidos em incubadora a 37° C com 5% CO<sub>2</sub> por cerca de 15 dias e após, foram retirados e a camada de células que estava aderida na placa foi mantida em cultura sob as mesmas condições até o momento do experimento (Figura 1).

**Figura 1. Disposição dos fragmentos de pele em placa de Petri de 60 mm.**



Fonte: Ismael Plentz

A placa é inicialmente preparada com ranhuras para fixação do fragmento de pele

### 4.2 Preparação das Culturas Celulares para Exposição à Microgravidade Simulada:

As garrafas de cultura celular foram preparadas um dia antes da exposição à microgravidade simulada, visto que, as células devem já estar aderidas ao fundo da garrafa para que o experimento possa ser realizado. No ensaio, células de 7<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> passagem foram

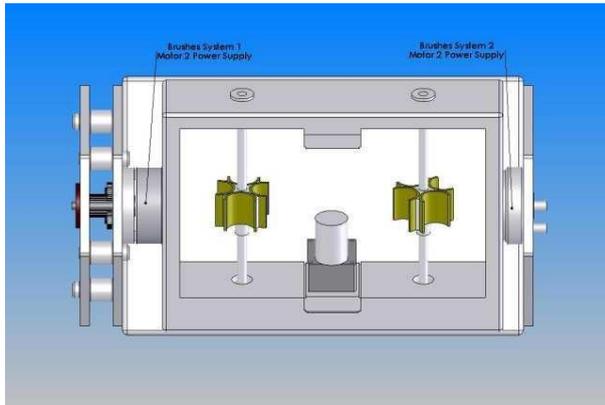
utilizadas. As mesmas estavam previamente preparadas e mantidas em cultura padrão em garrafas de cultura, como anteriormente descrito. Para o início do procedimento, as células foram devidamente tripsinizadas e recultivadas em oito garrafas de cultura, com área de crescimento de 25 cm<sup>2</sup>, e com densidade celular de 2,5.10<sup>6</sup> células. Quatro garrafas foram submetidas à microgravidade simulada e o restante foi utilizado como grupo controle, em condições normais de cultura celular na mesma estufa úmida à 37° C, suplementada com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o processo de tripsinização, os fibroblastos foram recultivados em 5 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de estreptomicina e 0,1% de gentamicina. Após 24 horas, essas mesmas garrafas de cultura foram observadas em microscópio invertido, e estando as células devidamente aderidas, o meio de cultura da garrafa foi trocado e, diferentemente das culturas padrão em garrafas, foi adicionado o volume total da garrafa de 25 cm<sup>2</sup> de área de crescimento, ou seja 50 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de streptomicina e 0,1 % de gentamicina, afim de que as células permanecessem em contato como meio de cultura em questão por durante todo o processo.

É importante salientar que esta pesquisa foi realizada no Instituto de Pesquisas Biológicas (IPB) com células de fibroblasto humano e que apenas as 7<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> passagens provenientes de culturas primárias foram disponibilizadas para a realização deste projeto.

### **4.3 Simulação da Microgravidade**

Para a simulação de microgravidade foi empregado um clinostato tridimensional construído no Centro de Microgravidade FENG/ PUCRS. O clinostato gira a uma velocidade de rotação e de revolução constantes de 1,6 rpm (Figura 2). Foram preparadas, quatro garrafas de cultura celular, de vinte e cinco cm<sup>2</sup> de área de crescimento, com fibroblastos de pele humana. As garrafas do grupo amostra foram inicialmente colocadas no clinostato por 5 horas, 20 horas, 24 horas e 40 horas, sendo esse o protocolo inicial de exposição à microgravidade. O Clinostato 3D e as amostras já devidamente dispostas no aparelho foram colocadas no interior de uma estufa padrão de cultura celular, em condições previamente preconizadas, com temperatura de 37° graus centígrados e fluxo de 5% de CO<sub>2</sub>.

**Figura 2.** Figura representativa do clinostato tridimensional



Fonte: Adaptado de Santos, 2006

#### **4.4 Análise Morfológica das Células**

Logo após a exposição das células ao Clinostato 3D, por 24 horas e 40 horas, foi realizada uma análise morfológica das células em microscópio invertido Zeiss, com aumento de duzentas vezes, com o objetivo de perceber alterações significativas em sua morfologia e confluência. Antes da análise microscópica, o meio de cultura em excesso foi aspirado, para permitir uma melhor visualização das células. A análise foi feita tanto nos grupos amostra, quanto nos grupos controle.

#### **4.5 Realização do Ensaio de Viabilidade Celular**

Para cada período de tempo analisado, foram preparadas placas de 96 poços com 200µL de meio DMEM suplementado contendo  $4,5 \cdot 10^5$  células para cada poço. As células foram cultivadas por 24 horas e após esse período foram lavadas com DPBS® (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline). Após a lavagem, as células foram expostas ao meio, obedecendo ao sistema de triplicata. Como Controle Negativo, livre de toxicidade, foram mantidos poços apenas com cultivos celulares. As células foram então cultivadas por 24h sob as mesmas condições iniciais de cultivo.

Após esse período, o meio de cultura foi aspirado e foi adicionado 200µL de solução MTT na concentração de 5mg/mL em meio DMEM suplementado. As células foram então incubadas por 4 horas a 37 °C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. O MTT foi então solubilizado em 200µL de dimetil sulfoxido (DMSO) para realização da leitura. As Densidades Óticas foram medidas em um comprimento de onda de 570 nm em leitor de ELISA (Bio-Rad Benchmark, Hercules, USA). A viabilidade celular foi então calculada, através da seguinte fórmula: Viabilidade Celular (%) = Média DO do grupo teste X 100 / Média DO do grupo controle.

#### 4.6 Realização dos Testes de Passagem

Para realização dos testes de passagem, as células foram recultivadas em placas de seis poços, logo após o término da exposição à microgravidade simulada. O conteúdo das garrafas foi devidamente tripsinizado, o número de células foi contado com auxílio de uma Câmara de Neubauer, e após a contagem uma densidade  $2.10^5$  células foi inoculada, em cada poço, assim como o grupo controle. O experimento foi realizado em duplicata, sempre sendo inoculados dois poços de cada passagem e cada tempo. As tripsinizações e passagens, foram feitas sem levar em consideração o número de células, ou seja, nesse ensaio não foi realizada contagem.

#### 4.7 Realização dos Ensaio de Crescimento Populacional.

Para realização dos ensaios de Crescimento Populacional, as células também foram recultivadas em placas de seis poços da marca TPP, logo após o término da exposição à microgravidade simulada. O conteúdo das garrafas foi devidamente tripsinizado, o número de células também contado com auxílio da Câmara de Neubauer, e após a contagem uma densidade de  $2.10^5$  células foi inoculada em cada poço. O experimento foi realizado em triplicata, nesse caso, para que uma média de taxa de crescimento fosse obtida. Após o plaqueamento, foram realizadas contagens com intervalos de entre três e seis dias, a análise visual de necessidade de tripsinização das células, em virtude de sua confluência. O cálculo para obtenção do valor de *PDL*- (do inglês *Population Doubling Level*) fornece uma estimativa do número de dias em que a cultura celular levaria para duplicar sua população, haja vista que a cada tripsinização é inoculado metade da densidade que foi trispalizada. No experimento, cada poço foi tripsinizado e ressuspensão em 1000  $\mu$ L, sendo que 500  $\mu$ L desses eram novamente inoculados. apenas com cultivos celulares. As células foram então cultivadas por 24h sob as mesmas condições iniciais de cultivo.

Após esse período, o meio de cultura foi aspirado e foi adicionado 200 $\mu$ L de solução MTT na concentração de 5mg/mL em meio DMEM suplementado. As células foram então incubadas por 4 horas a 37 °C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. O MTT foi então solubilizado em 200 $\mu$ L de dimetil sulfoxido (DMSO) para realização da leitura.

As Densidades Óticas foram, medidas em um comprimento de onda de 570 nm em leitor de ELISA (Bio-Rad Benchmark, Hercules, USA). A viabilidade celular foi então calculada, através da seguinte fórmula: Viabilidade Celular (%) = Média DO do grupo teste X 100 / Média DO do grupo controle.

#### 4.8 Realização da Análise Molecular através de qRT-PCR

Foi realizada análise molecular de genes relacionados ao ciclo celular e a senescência celular, tanto das células que foram expostas a microgravidade simulada como de seus controles. O RNA foi extraído utilizando kit RNA SV-Total (Promega). As amostras foram expostas a um tampão de lise, aquecidas a 70°C por 3 minutos e centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado e ele 200 µL de álcool 95%. O conteúdo foi transferido para uma coluna de sílica e centrifugado a 12000 g por 1 minuto. Adicionalmente foi acrescentado 600 µL de tampão e novamente centrifugado a 12000 g por 1 minuto. Foi adicionado enzima DNase diluída em tampão e cloreto de manganês (MgCl<sub>2</sub>) e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente foi adicionado tampão de bloqueio da enzima e as colunas foram novamente centrifugadas a 12000 g por 1 minuto. As colunas foram então lavadas com tampão de lavagem e o RNA retido na sílica foi eluído com 100 µL de água livre de RNase através de centrifugação a 12000 g por 2 minutos. O RNA extraído foi quantificado utilizando o fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies) conforme orientação do fabricante. Alíquotas e 5 µL de cada amostra de RNA extraído foram adicionados a 195 µL de tampão contendo uma sonda RNA HS Assay (Life Technologies) e realizada a leitura para quantificação.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando SuperScript VILO MasterMix (Life Technologies) conforme orientação do fabricante. Foi adicionado 16 µL de RNA em 4 µL da *master mix* SuperScript VILO e expostas aos ciclos térmicos (25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos e 85°C por 5 minutos) utilizando termociclador Verit (Life Technologies). O DNA complementar ao RNA extraído foi quantificado utilizando o fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies) conforme orientação do fabricante. Alíquotas e 1 µL de cada amostra de cDNA foram adicionados a 199 µL de tampão contendo uma sonda ssDNA Assay (Life Technologies) e realizada a leitura para quantificação.

Para análise da expressão gênica, foi realizada técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real utilizando equipamento *StepOne Plus* (Life Technologies). Foram realizadas amplificações a partir de 20 ng de cDNA para cada amostra. Os ensaios foram realizados em placas individuais para cada gene utilizando o gene GAPDH como controle endógeno de expressão. Para análise do ciclo celular e senescência, foram utilizados *primers* complementares a sequencia dos mRNAs dos seguintes genes: p16, p21, p27. As sequencias de *primers* utilizadas estão descritas na tabela 1. Para a análise de

dados referentes a expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa 2- $\Delta$ ct, sendo o controle endógeno o gene GAPDH, e posteriores análises utilizando o teste ANOVA do software *Graphpad Prim 5*.

<b>Tabela 1.</b>	<b>Sequência</b>
<b>P16</b>	F: 5'-GGAGCAGCATGGAGCCTTCG-3' R: 5'-TCCCCTGCAAACCTCGTCCTC-3'
<b>P21</b>	F: 5'-CCCGTGAGCGATGGAAC-3' R: 5'-CCTGCCTCCTCCCAACTCAT-3'
<b>P27</b>	F: 5'-CCGACGATTCTTCTACTCAA-3' R: 5'-ATGCTACATCCAACGCTTT-3'
<b>GAPDH</b>	F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3'R:5'-AGAGTAAAAGCAGCCCTGGT-3'

#### 4.9 Imunofluorescência

O meio de cultura indutor foi aspirado e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos. As culturas foram então lavadas duas vezes com tampão DBPS e foi adicionado 1 mL por poço de solução de bloqueio (Soro Fetal Bovino e Albumina Sérica Bovina) (Life Technologies), incubado por uma hora a temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados ou anticorpos anti-*Oct4* e anti-*Nanog* conjugados com FITC ambos marcadores de superfície para pluripotência celular. As culturas foram incubadas a temperatura ambiente por duas horas. As amostras foram lavadas duas vezes com tampão DPBS e adicionado DAPI a 0,01% para marcação nuclear. Imagens das células foram capturadas através de microscópio confocal Zeiss LSM-5 exciter utilizando comprimento de onda de excitação de 488 nm para a marcação do anticorpo e 405 nm para a marcação nuclear por DAPI.

## 5. ARTIGO CIENTÍFICO

#6400 Sinopse

Cadernos de Pesquisa, UFMA

[www.periodicoseletronicos.ufma.br](http://www.periodicoseletronicos.ufma.br)

### Submissão

Autores	Patricia Lazzarotto Bellicanta, Marlise Araújo dos Santos, Thais Russomano, Jaderson Costa da Costa, Daniel Rodrigo Marinowic, Mara Lise Zanini, Ismael Plentz, Gabriela Pallamolla
Título	Efeito da Microgravidade simulada sobre Fibroblastos de Pele Humana
Documento original	<a href="#">6400-19668-1-SM.DOC</a> 2017-02-23
Docs. sup.	Nenhum(a)
Submetido por	Dr Marlise Araújo dos Santos 
Data de submissão	fevereiro 23, 2017 - 11:41
Seção	Artigos
Editor	Nenhum(a) designado(a)

**Seção:** Artigos

Efeito da Microgravidade simulada sobre Fibroblastos de Pele Humana

Effect of Simulated Microgravity on Human Skin Fibroblasts

Efectos de la Microgravedad Simulada en Fibroblastos Humanos

**Autor:** Patricia Lazzarotto Bellicanta

Mestranda do Programa de Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica

**Instituição:** Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Centro de Microgravidade,

**Endereço:** Av. Ipiranga 6681, TECNOPUC, P 96 B, Sala 103, Porto Alegre, RS, CEP - 90619-900, Brasil

**Telefone:** 51 93252569,

**Email:** [patricialazzarotto660@gmail.com](mailto:patricialazzarotto660@gmail.com)

**Autor:** Marlise Araújo dos Santos Ph.D

**Instituição:** Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Centro de Microgravidade,

**Endereço:** Av. Ipiranga 6681, TECNOPUC, P 96 B, Sala 103, Porto Alegre, RS, CEP - 90619-900, Brasil

**Telefone:** 51 3353 6369

**Email:** [marliseas@hotmail.com](mailto:marliseas@hotmail.com)

**Autor:** Thais Russomano, MD, MSc, Ph.D. Médica Aeroespacial,

**Instituição:** Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Centro de Microgravidade,

**Endereço:** Av. Ipiranga 6681, TECNOPUC, P 96 B, Sala 103, Porto Alegre, RS, CEP - 90619-900, Brasil

**Telefone:** 51 3353 4402

**Email:** [trussomano@hotmail.com](mailto:trussomano@hotmail.com)

**Autor:** Daniel Rodrigo Marinowic Ph.D,

**Instituição:** Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer), Laboratório de Neurociências do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB)

**Endereço:** Av. Ipiranga, 6690, Prédio 63, Jardim Botânico, Porto Alegre Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 90610.000.

**Telefone:** 5551 33205919.

**Email:** dmarinowic@gmail.com

**Autor:** Jaderson Costa da Costa, MD, PhD, diretor do InsCer, neurologista, neurocientista e

**Instituição:** Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer),

**Endereço:** Av. Ipiranga, 6690, Prédio 63, Jardim Botânico, Porto Alegre Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 90610.000.

**Telefone:** 5551 33205919.

**Email:** jcc@puers.br

**Autor:** Doutora Mara Lise Zanini

**Instituição:** Faculdade de Química

**Endereço:** Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12, Bloco A, sala 202, CEP 90619900

Porto Alegre,RS, Brasil

**Telefone:** 5133203549

**Email:** mlzanini@puers.br

**Autor:** Ismael Plentz, biólogo

**Instituição:** Laboratório de Neurociências do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB)

**Endereço:** Av. Ipiranga, 6690, Prédio 60, segundo andar Jardim Botânico, Porto Alegre Rio Grande do Sul, Brasil, CEP: 90610.000.

**Telefone:** 5551 3320 3353.

**Email:**Ismael.plentz@gmail.com

**Autor:** Gabriela Pallamolla

**Instituição:** Laboratório de Neurociências do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB)

**Endereço:** Av. Ipiranga, 6690, Prédio 60, segundo andar Jardim Botânico, Porto Alegre Rio Grande do Sul, Brasil, CEP: 90610.000.

**Telefone:** 5551 3320 3353.

**Email:**Gabriela.pallamolla@acad.puers.br

### **Efeito da Microgravidade simulada sobre Fibroblastos de Pele Humana**

**Abstract:** The inherent characteristics of plasticity of human fibroblast cells makes it an important tool for evaluating the effects of microgravity at a cellular level. This study analyzed the behavior of human skin fragment fibroblasts in a simulated microgravity environment. **Methods:** Human fibroblast cells in the 8th and 17th passage, cultured under standard incubator conditions at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, were submitted to simulated microgravity in a 3D-clinostat for a period of 24h and 40h. After exposure, both passage cells were analyzed and compared with the control group (1G) in population doubling assays, tests of passage, microscopic and confocal microscopy analysis for immune fluorescence assay, as well as PCR analysis for detection of variations in the gene expression related to the cell cycle (p21, p16, p27). **Results:** Before microgravity exposure, cells belonging to the 17th passage presented characteristics of cells in an apoptotic state. After 24h and 40h of microgravity, the cells of both groups showed themselves to be more confluent and elongated. PCR analysis demonstrated that p21 expression was decreased while p16 increased. However, alterations on the p27 expression couldn't be seen. In addition, PCR analysis showed a difference in expression of p21 and p16 genes between the 24h and 40h samples. **Discussion:** The present research showed cells to be more confluent and elongated after microgravity exposure, a characteristic of cells with fewer passages, suggesting alterations in their cytoskeleton. This result was confirmed by PCR analysis where a decrease in p21 expression was demonstrated. This result corroborates previous findings that among 588 genes tested, the p21 gene presented a negative expression. Conversely, the p16 gene showed a positive expression. Since both the p21 and p16 genes are related to the cell cycle, these results suggest the hypothesis of important changes having occurred in the cellular cytoskeleton and, consequently, a probable alteration in the production of cell cycle regulatory proteins (cyclins). Furthermore, RT-PCR analysis demonstrated a difference in p21 and p16 gene expression between the 24h and 40h samples, indicating the need for a more detailed comparison between the exposure times. Also, pluripotency markers were found, Oct4 and Nanog, which suggest alterations on plasticity levels of the fibroblasts exposed to simulated microgravity.

**Keywords:** microgravity, fibroblasts, cell cycle, pcr, population doubling

**Resumo:** As características da plasticidade inerentes das células de fibroblastos humanos os tornam uma ferramenta importante para avaliar os efeitos da microgravidade em nível celular. Este estudo analisou o comportamento dos fibroblastos de pele humanas em microgravidade simulada. **Métodos:** células de fibroblasto humanas de 8<sup>a</sup> e 17<sup>a</sup> passagem, cultivadas em condições normais em incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, foram submetidas à microgravidade simulada em um clinostato-3D por um período de 24h e 40h. Após a exposição, as culturas experimentais foram analisadas e comparadas com o grupo controle (1G) em ensaios de proliferação celular (*population doubling*), ensaios de passagem e análise microscópica, bem como por análise de PCR para a detecção de variações na expressão de genes relacionados ao ciclo celular (p21, p16, p27). **Resultado:** Antes da exposição a microgravidade simulada, as células pertencentes à passagem 17<sup>a</sup> apresentaram características de células em estado apoptótico. Após 24h e 40h de microgravidade simulada, as células de ambos os grupos se mostraram mais confluentes e alongadas. A análise de PCR demonstrou que a expressão de p21 foi diminuída enquanto a expressão p16 aumentou. Porém a expressão de p27 não apresentou alterações. Além disso, a análise em PCR mostrou uma diferença na expressão dos genes p21 e p16 entre as amostras expostas por 24h e 40h. **Discussão:** A presente pesquisa mostrou que após a exposição a microgravidade simulada, as células apresentaram-se mais confluentes e de formato alongado, característica esta presente em células com um menor número de passagens, sugerindo que a microgravidade simulada provoca alterações no seu citoesqueleto. Este resultado foi confirmado através da análise de PCR, onde foi demonstrada uma diminuição na expressão de p21. Esse resultado corrobora descobertas anteriores de que entre 588 genes testados, o gene p21 apresentaram uma expressão negativa. Por outro lado, o gene p16 mostrou uma expressão positiva. Uma vez que ambos os genes p21 e p16 estão relacionados com o ciclo celular, estes resultados sugerem a hipótese de que alterações importantes ocorreram no citoesqueleto celular e, conseqüentemente, uma provável alteração na produção de proteínas reguladoras do ciclo celular (ciclina). Além disso, a análise de RT-PCR demonstrou uma diferença na expressão do gene p21 e p16 entre as amostras 24h e 40h, indicando a necessidade de uma comparação mais detalhada entre os tempos de exposição. Foram também percebidas alterações no nível de plasticidade dos fibroblastos de 8<sup>a</sup> expostos à microgravidade simulada, nos testes de imunofluorescência, devido a presença de marcadores de pluripotência *Oct4*, *Nanog*.

**PALAVRAS CHAVE:** microgravidade, fibroblastos, ciclo celular, PCR, *population doubling*.

## 1. Introdução:

Na terra os organismos estão permanentemente sujeitos à ação da gravidade <sup>1</sup>, a qual produz um conjunto de estimulações mecânicas essenciais para um funcionamento normal dos tecidos e células. Essa força gravitacional desempenha um papel fundamental na orientação espacial em terra. Dessa forma, muitos organismos, incluindo os seres humanos são gravitacionalmente polarizados<sup>2</sup>. O primeiro experimento utilizando instrumentos para manipulação da gravidade e, com isso obter conhecimento sobre o impacto de sua força em sistemas biológicos, foi realizado por Sir. Thomas Andrew Knight em 1806 <sup>3</sup>. Nos processos biológicos, seu valor tem sido demonstrado através de pesquisas que incluem: avaliar o crescimento e a virulência de microrganismos, no intuito de auxiliar no isolamento de genes relevantes para o desenvolvimento de vacinas, avaliar a permeabilidade de fármacos em células de epitélio pulmonar <sup>4</sup> e cultivar tecidos de diferentes espécies, tendo em vista que, em microgravidade, eles se desenvolvem de forma tridimensional, melhorando, por exemplo, a fidelidade do efeito produzido pelos fármacos.

O termo fibroblasto é tradicionalmente empregado para identificar o membro da família de células de origem mesenquimal que sintetiza os componentes fibrilares (colágeno e elastina), e não fibrilares (glicoproteínas e proteoglicanos) da matriz extracelular do tecido conjuntivo. O fibroblasto, como célula “imatura” ou de característica mesenquimal, é reconhecido como tipo celular versátil dos tecidos conjuntivos. Além de ser responsável pela formação e remodelação dos tecidos classificados, histologicamente, como conjuntivos propriamente ditos, participa de modo ativo nos processos de cicatrização e de fibrose em determinadas doenças. Uma vez diferenciados como subtipos celulares “maduros”, os fibroblastos ainda exibem diversidade considerável no que diz respeito às características morfológicas, expressão de receptores de superfície celular específica e capacidade de renovação celular.

Chen e colegas em 2011 demonstraram que a simulação de microgravidade resulta em uma alteração não somente na forma das células cultivadas, mas também na liberação de proteínas específicas, além de aumentar o nível de diferenciação das células-tronco mesenquimais em neurônios. Esse resultado, segundo os autores, pode se tornar uma nova estratégia de tratamento para doenças do sistema nervoso central <sup>5</sup>.

Levando em consideração que estudos prévios relacionam alterações na forma celular, bem como nos processos do ciclo celular em simulação de microgravidade, e que os fibroblastos mostram-se tipo celulares dotados de “plasticidade”, mesmo quando maduros <sup>6</sup>, A presente pesquisa utilizou células oriundas de sobras de pele de cirurgia plástica

abdominal, com o objetivo de analisar se ocorrem alterações morfológicas, no crescimento e também na expressão gênica em células cultivadas em Clinostato-3D, e comparar seu comportamento com o cultivo do mesmo tipo celular em cultura celular padrão (em estufa úmida a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>).

O Clinostato 3D é um equipamento validado pela comunidade científica como modelo para simular a microgravidade <sup>7</sup>. O Clinostato 3D empregado neste experimento apresenta dois eixos de movimentação, um que é chamado de eixo de rotação e o segundo é o eixo de revolução. O movimento criado no eixo de rotação caracteriza-se por fazer o recipiente da amostra girar em torno de um eixo paralelo ao seu próprio eixo. O eixo de revolução é perpendicular ao eixo do recipiente da amostra, fazendo com que esse, hora esteja de cabeça para cima e hora de cabeça para baixo. Assim, para simular a microgravidade, o recipiente contendo a amostra é disposto na estrutura interna do Clinostato-3D, que através da composição do movimento entre as rotações nos dois eixos, desorienta as células, de tal maneira que essas perdem a referência do vetor gravitacional, gerando, conseqüentemente, um estresse sobre as mesmas por desorientação <sup>8</sup>.

## **2. Metodologia**

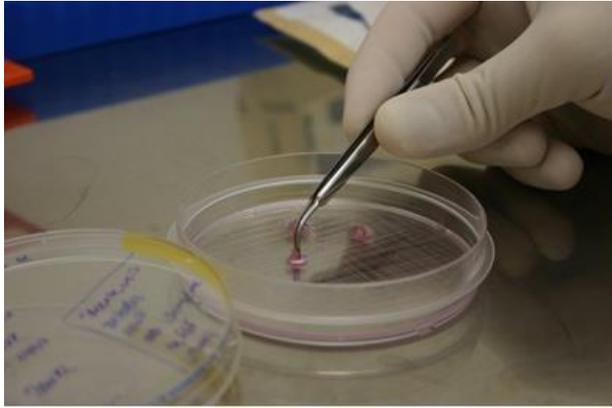
### **2.1 Obtenção dos Fibroblastos**

Os fibroblastos foram obtidos de biópsias de pele de um paciente maior de idade, saudável, livre de doenças infecciosas, atendido no Programa de Cirurgia Plástica do Hospital São Lucas da PUCRS. Esse procedimento foi realizado após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, TCLE, pelo paciente. A coleta foi realizada através de biópsia de fragmentos de pele residuais da cirurgia de abdominoplastia, realizada pelo cirurgião responsável. Esse material somente foi utilizado para esta pesquisa após o recebimento de uma carta de autorização do Chefe de Serviço de Cirurgia Geral do HSL-PUCRS. Essa pesquisa foi realizada após a aprovação do Comitê de ética em Pesquisa do PUCRS, protocolo nº CAAE45548315.

Os fragmentos de pele foram conduzidos ao Centro de Terapia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, onde foram separados em pedaços de 10 milímetros quadrados. Os fragmentos foram colocados em uma placa de Petri, na qual foram adicionados 20 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina, 100 µg/mL de gentamicina e 20 ng/mL de fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Os fragmentos foram mantidos em incubadora a 37° C com 5% CO<sub>2</sub> por cerca de 15 dias e após, foram retirados e a camada de

células que estava aderida na placa foi mantida em cultura sob as mesmas condições até o momento do experimento. Figura 1.

**Figura 1. Disposição dos fragmentos de pele em placa de Petri de 60 mm.**



Fonte: Ismael Plentz

A placa é inicialmente preparada com ranhuras para fixação do fragmento de pele.

## **2.2 Preparação das Culturas Celulares para Exposição à Microgravidade Simulada:**

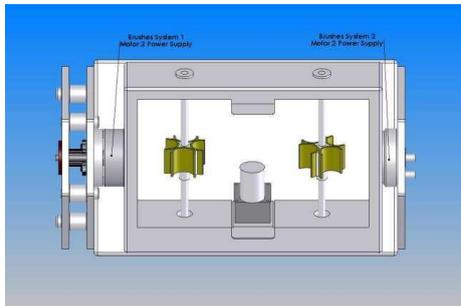
As garrafas de cultura celular foram preparadas um dia antes da exposição à microgravidade simulada, visto que, as células devem já estar aderidas ao fundo das mesmas para que o experimento possa ser realizado. No ensaio, células 7<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> passagem provenientes de culturas primárias foram utilizadas. As mesmas estavam previamente preparadas e mantidas em cultura padrão em garrafas de cultura, como anteriormente descrito. Para o início do procedimento, as células foram devidamente tripsinizadas e recultivadas em oito garrafas de cultura, com área de crescimento de 25 cm<sup>2</sup>, e com densidade celular de  $2,5 \cdot 10^6$  células. Quatro garrafas foram submetidas à microgravidade simulada e o restante foi utilizado como grupo controle, em condições normais de cultura celular na mesma estufa úmida à 37° C, suplementada com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o processo de tripsinização, os fibroblastos foram recultivados em 5 mililitros de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de estreptomicina e 0,1% de gentamicina. Após 24 horas, essas mesmas garrafas de cultura foram observadas em microscópio invertido (grupo reservado para o experimento e grupo controle), e estando as células devidamente aderidas, o meio de cultura da garrafa foi trocado e, diferentemente das culturas padrão em garrafas, foi adicionado o volume total da garrafa de 25 centímetros quadrados de área de crescimento, ou seja 50 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de streptomicina e 0,1 % de gentamicina, afim de que as células

permanecessem em contato como meio de cultura em questão por durante todo o processo. É importante salientar que esta pesquisa foi realizada no Instituto de Pesquisas Biológicas (IPB) com células de fibroblasto humano e que apenas as 8<sup>a</sup> e 17<sup>a</sup> passagens provenientes de culturas primárias foram disponibilizadas para a realização deste projeto.

### 2.3 Simulação da Microgravidade

Para a simulação de microgravidade foi empregado um clinostato tridimensional construído no Centro de Microgravidade FENG/ PUCRS. O clinostato gira a uma velocidade de rotação e de revolução constantes de 1,6 rpm (Figura 2). Foram preparadas, quatro garrafas de cultura celular, de vinte e cinco centímetros quadrados de área de crescimento, com fibroblastos de pele humana. As garrafas do grupo amostra foram inicialmente colocadas no clinostato por 5 h, 20 h, 24h e 40h, sendo esse o protocolo inicial de exposição à microgravidade. O Clinostato 3D e as amostras já devidamente dispostas no aparelho foram colocadas no interior de uma estufa padrão de cultura celular, em condições previamente preconizadas, com temperatura de 37 graus centígrados e fluxo de 5% de CO<sub>2</sub>.

**Figura 2.** Figura representativa do clinostato tridimensional



Fonte: Adaptado de Santos, 2006

### 2.4 Análise Morfológica das Células

Logo após a exposição das células ao Clinostato 3D, por 24 horas e 40 horas, foi realizada uma análise morfológica das células em microscópio invertido Zeiss, com aumento de duzentas vezes, com o objetivo de perceber alterações significativas em sua morfologia e confluência. Antes da análise microscópica, o meio de cultura em excesso foi aspirado, para permitir uma melhor visualização das células. A análise foi feita tanto nos grupos amostra, quanto nos grupos controle.

### 2.5 Realização do Ensaio de Viabilidade Celular

Para cada período de tempo analisado, foram preparadas placas de 96 poços com 200µL de meio DMEM suplementado contendo  $4,5 \cdot 10^5$  células em cada poço. As células foram mantidas por 24 horas e após esse período foram lavadas com DPBS® (*Dulbecco's Phosphate Buffer Saline*). Após a lavagem, as células foram suplementadas novamente com

meio DMEM. O experimento foi realizado em triplicata. Como Controle Negativo, foi empregada solução DPBS .

Após esse período, o meio de cultura foi aspirado e foi adicionado 200µL de solução MTT na concentração de 5mg/mL em meio DMEM suplementado. As células foram então incubadas por 4 horas a 37 °C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. O MTT foi então solubilizado em 200µL de dimetil sulfoxido (DMSO) para realização da leitura. As Densidades Óticas foram, medidas em um comprimento de onda de 570 nm em leitor de ELISA (Bio-Rad Benchmark, Hercules, USA). A viabilidade celular foi então calculada, através da seguinte fórmula: Viabilidade Celular (%) = Média DO do grupo teste X 100 / Média DO do grupo controle.

## **2.6 Realização dos Testes de passagem**

Para realização dos testes de passagem, as células foram recultivadas em placas de seis poços, logo após o término da exposição à microgravidade simulada. O conteúdo das garrafas foi devidamente tripsinizado, o número de células foi contado com auxílio de uma Câmara de Neubauer. Após a contagem uma densidade  $2 \cdot 10^5$  células foi inoculada, em cada poço. Este mesmo procedimento foi realizada com o grupo controle. O experimento foi realizado em duplicata, ou seja, sempre sendo inoculados dois poços de cada passagem e cada tempo. As tripsinizações e passagens subsequentes, foram feitas sem levar em consideração o número de células, ou seja, nesse ensaio não foi realizada contagem do número de células

## **2.7 Realização dos ensaios de Crescimento Populacional.**

Para realização dos ensaios de Crescimento Populacional, as células também foram recultivadas em placas de seis poços da marca TPP<sup>®</sup>, logo após o término da exposição à microgravidade simulada. O conteúdo das garrafas foi devidamente tripsinizado, o número de células contado com auxílio da Câmara de Neubauer, e após a contagem uma densidade de  $2 \cdot 10^5$  células foi inoculada em cada poço. O experimento foi realizado em triplicata, nesse caso, para que uma média de taxa de crescimento fosse obtida. Após o plaqueamento, as células foram ali mantidas até que mediante análise visual houvesse a necessidade de tripsinização, em virtude de sua confluência. Assim, as contagens celulares foram realizadas com intervalos de entre três e seis dias. O cálculo para obtenção do valor de *PDL*- (do inglês *Population Doubling Level*) fornece uma estimativa do número de dias em que a cultura celular levaria para duplicar sua população, haja vista que a cada tripsinização foi inoculada a metade da densidade que foi trispsizada. No experimento, cada poço foi tripsinizado e ressuspenso em 1000 µL, sendo que 500 µL desses eram novamente

inoculados.

Fórmula representativa do Crescimento Populacional PDL:

$Pdl = \frac{\text{Número de dias entre as contagens} \times \log N \times 2}{\log N}$  do número final de células ÷ número inicial de células.

Fonte: ATCC Animal Cell Culture Guide.

## 2.8 Realização da Análise Molecular através de qRT-PCR

Foi realizada análise molecular de genes relacionados ao ciclo celular e a senescência celular, tanto das células que foram expostas a microgravidade simulada como de seus controles. O RNA foi extraído utilizando kit RNA SV-Total (Promega). As amostras foram expostas a um tampão de lise, aquecidas a 70°C por 3 minutos e centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado e ele 200 µL de álcool 95%. O conteúdo foi transferido para uma coluna de sílica e centrifugado a 12000 g por 1 minuto. Adicionalmente foi acrescentado 600 µL de tampão e novamente centrifugado a 12000 g por 1 minuto. Foi adicionado enzima DNase diluída em tampão e cloreto de manganês (MgCl<sub>2</sub>) e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente foi adicionado tampão de bloqueio da enzima e as colunas foram novamente centrifugadas a 12000 g por 1 minuto. As colunas foram então lavadas com tampão de lavagem e o RNA retido na sílica foi eluído com 100 µL de água livre de RNase através de centrifugação a 12000 g por 2 minutos. O RNA extraído foi quantificado utilizando o fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies) conforme orientação do fabricante. Alíquotas de 5 µL de cada amostra de RNA extraído foram adicionados a 195 µL de tampão contendo uma sonda RNA HS Assay (Life Technologies) e realizada a leitura para quantificação.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando SuperScript VILO MasterMix (Life Technologies) conforme orientação do fabricante. Foi adicionado 16 µL de RNA em 4 µL da *master mix* SuperScript VILO e expostas aos ciclos térmicos (25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos e 85°C por 5 minutos) utilizando termociclador Verit (Life Technologies). O DNA complementar ao RNA extraído foi quantificado utilizando o fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies) conforme orientação do fabricante. Alíquotas de 1 µL de cada amostra de cDNA foram adicionados a 199 µL de tampão contendo uma sonda ssDNA Assay (Life Technologies) e realizada a leitura para quantificação Para análise da expressão gênica, foi realizada técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real utilizando equipamento StepOne Plus (Life Technologies). Foram realizadas amplificações a partir de 20 ng de cDNA para cada amostra. Os ensaios foram realizados

em placas individuais para cada gene utilizando o gene GAPDH como controle endógeno de expressão. Para análise do ciclo celular e senescência, foram utilizados *primers* complementares a sequência dos mRNAs dos seguintes genes: p16, p21, p27. As sequências de *primers* utilizadas estão descritas na tabela 1. Para a análise de dados referentes a expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa 2- $\Delta$ ct, sendo o controle endógeno o gene GAPDH, e posteriores análises utilizando o teste ANOVA do software *Graphpad Prim 5*.

**Tabela 1.** Sequências de primers utilizadas na avaliação da expressão de genes relacionados ao ciclo celular.

Primer	Sequência
<b>P16</b>	F: 5'-GGAGCAGCATGGAGCCTTCG-3' R: 5'-TCCCCTGCAAACCTCGTCCTC-3'
<b>P21</b>	F: 5'-CCCGTGAGCGATGGAAC-3' R: 5'-CTGCCTCCTCCCAACTCAT-3'
<b>P27</b>	F: 5'-CCGACGATTCTTCTACTCAA-3' R: 5'-ATGCTACATCCAACGCTTT-3'
<b>GAPDH</b>	F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3' R: 5'-AGAGTAAAAGCAGCCCTGGT-3'

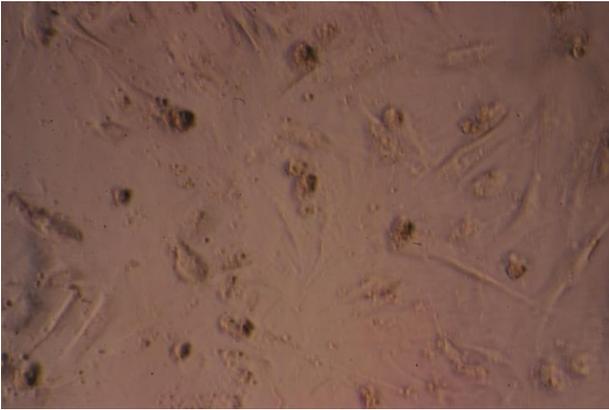
## 2.9 Imunofluorescência

O meio de cultura indutor foi aspirado e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos. As culturas foram então lavadas duas vezes com tampão DBPS e foi adicionado 1 mL por poço de solução de bloqueio (Soro Fetal Bovino e Albumina Sérica Bovina) (Life Technologies), incubado por uma hora a temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados ou anticorpos anti-*Oct4* e anti-*Nanog* conjugados com FITC ambos marcadores de superfície para pluripotência celular. As culturas foram incubadas a temperatura ambiente por duas horas. As amostras foram lavadas duas vezes com tampão DPBS e adicionado DAPI a 0,01% para marcação nuclear. Imagens das células foram capturadas através de microscópio confocal Zeiss LSM-5 exciter utilizando comprimento de onda de excitação de 488 nm para a marcação do anticorpo e 405 nm para a marcação nuclear por DAPI.

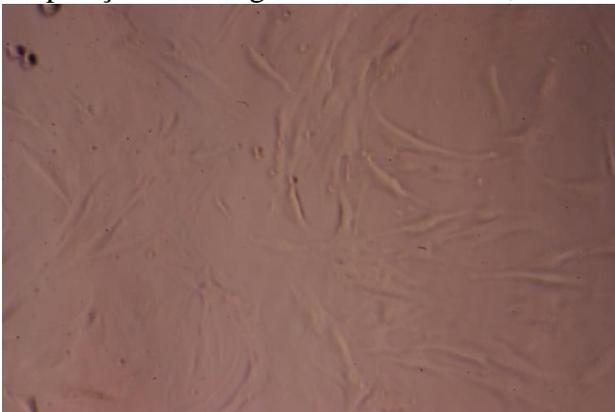
## 3. Resultados

**3.1 Análise Morfológica:** Os fibroblastos em 17<sup>a</sup> passagem apresentaram alteração em sua morfologia após 24 horas de exposição à microgravidade (figura 4); as células mostraram-se mais confluentes e alongadas, quando comparadas com o grupo controle (figura 3), características predominantes de células com menor número de passagem. O mesmo resultado foi verificado em 40 horas de exposição à microgravidade (figura 5). No entanto, o mesmo não foi observado nas células de 8<sup>a</sup> passagem (figuras 7, 8), as quais, quando visualizadas ao microscópio óptico sugerem a mesma estrutura morfológica anterior à exposição ou seja, igual ao grupo controle 1G (figura 6).

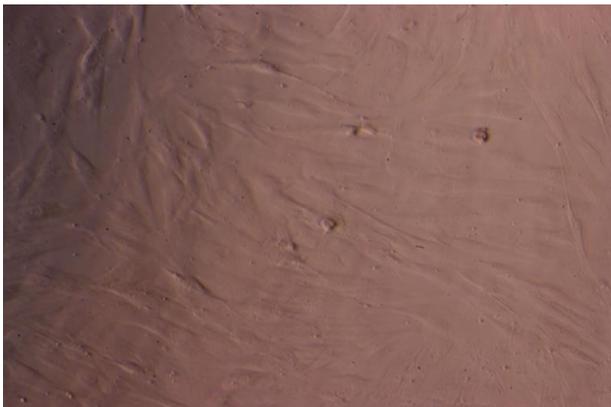
**Figura 3.** Cultura de fibroblastos de pele em 17<sup>a</sup> passagem (1G), aumento de 40x



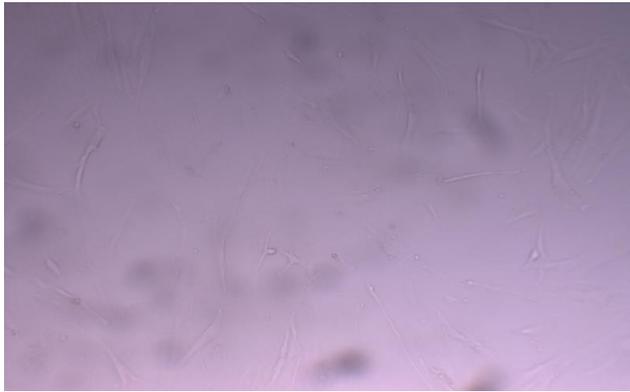
**Figura 4.** Fibroblastos de pele em 17<sup>a</sup> passagem com 24 h de exposição à microgravidade simulada, aumento de 40x



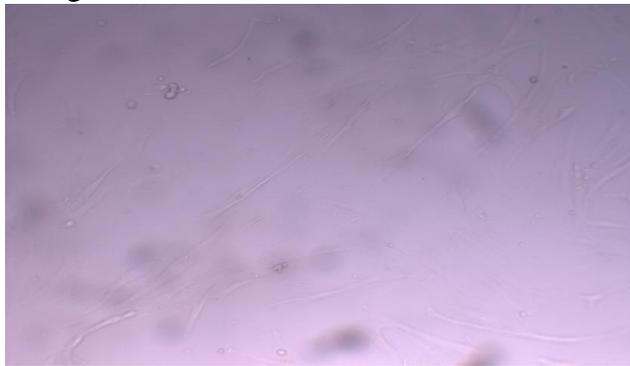
**Figura 5 .**Fibroblastos de pele em 17<sup>a</sup> passagem 40 h de exposição à microgravidade simulada, aumento 40x.



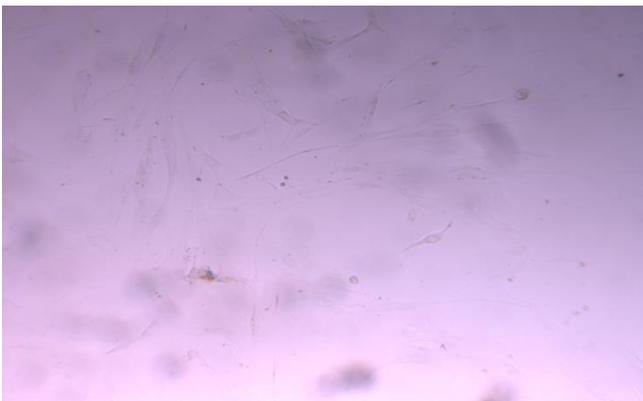
**Figura 6.** Cultura de fibroblastos de pele em 8ª passagem (1G), aumento 40x



**Figura 7.** Fibroblastos de pele em 8ª passagem com 24 horas de exposição a microgravidade simulada.

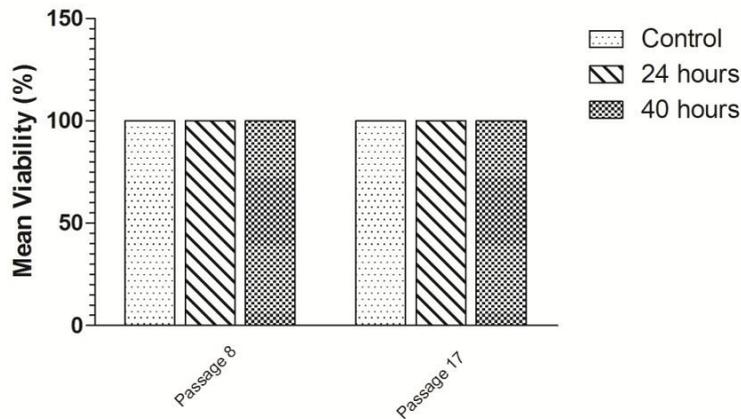
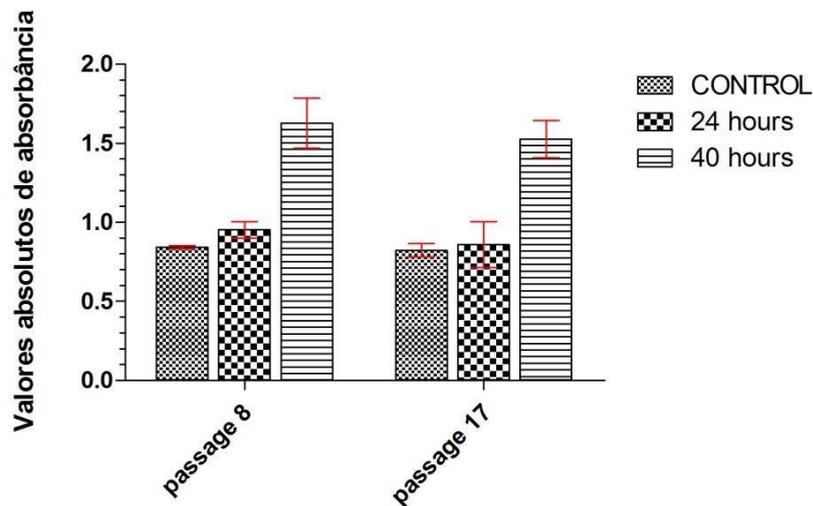


**Figura 8.** Fibroblastos de pele em 8ª passagem com 40 horas de exposição a microgravidade simulada.



### 3.2 Teste de Viabilidade Celular

Os resultados relacionados à viabilidade celular após exposição ao clinostato apresentaram índices de 100% de viabilidade nos fibroblastos de ambas as passagens (8ª e 17ª) em análise 24 h e 40 h de exposição (Figura 9,10).

**Figura 9.** Viabilidade Celular**Figura 10.** SEM Viabilidade Celular

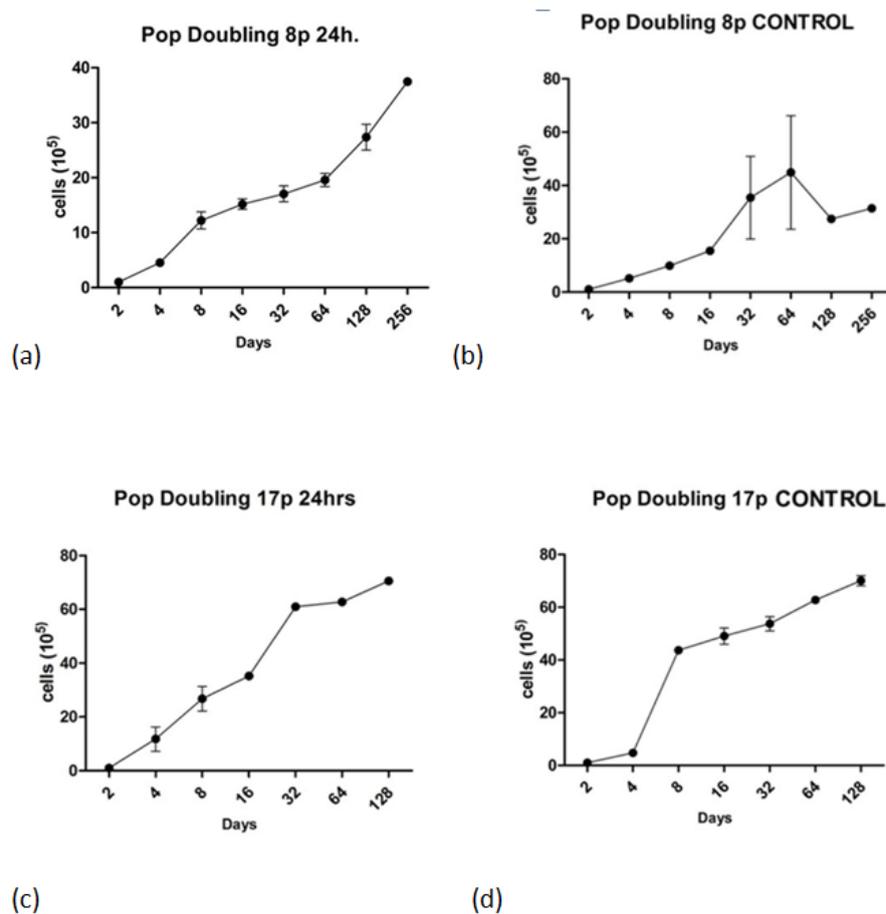
### 3.3 Testes de Passagem

As culturas celulares foram mantidas em condições padrão de cultura celular, ou seja, em estufa à 37° C, com 5% de CO<sub>2</sub>. As células de 17<sup>a</sup> passagem com 40 horas e 24 horas de exposição à microgravidade foram mantidas em cultivo até a 41<sup>a</sup> passagem, enquanto os seus respectivos controles (1G) foram mantidos apenas até a 22<sup>a</sup> passagem. As células de 8<sup>a</sup> passagem submetidas à 24 horas de microgravidade simulada foram mantidas até a 37<sup>a</sup> passagem, enquanto seu respectivo controle (1G), apenas a 24<sup>a</sup> passagem. No entanto, as células de 8<sup>a</sup> submetidas à 40 horas de microgravidade simulada forma mantidas por um período de tempo um pouco menor, ou seja, até 33<sup>a</sup> passagem e, seu controle, (1G) sobreviveu até a 25<sup>a</sup> passagem.

### 3.4 Ensaio de Crescimento Populacional PDL

O ensaio de crescimento populacional não apresentou diferença significativa nas análises após 24 horas e 40 horas de exposição ao Clinostato-3D tanto para os fibroblastos em 8<sup>a</sup> passagem quanto para os fibroblastos em 17<sup>a</sup> passagem (Figura 11).

**Figura 11.** Crescimento Populacional

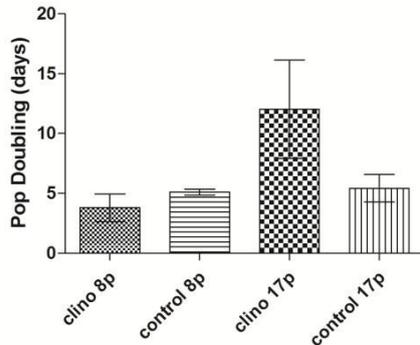


**Figura 11.** Gráfico (a) representa o crescimento populacional das células de fibroblasto em 8<sup>a</sup> passagem, após 24 horas de exposição ao clinostato. Gráfico (b), representa o crescimento populacional das células de fibroblasto humano do grupo controle de 8<sup>a</sup> passagem (1G). Gráfico (c) representa o crescimento populacional das células de fibroblasto em 17<sup>a</sup> passagem, após 24 horas de exposição ao clinostato. Gráfico (d), representa o crescimento populacional das células de fibroblasto humano do grupo controle de 17<sup>a</sup> passagem (1G).

A média em dias para que a população celular dobre a sua quantidade foi de 5 (DP) dias para os fibroblastos em 8<sup>a</sup> passagem e 4,5 (DP) dias para os fibroblastos em 8<sup>a</sup> passagem após a exposição ao clinostato. Os fibroblastos em 17<sup>a</sup> passagem apresentaram uma média em dias para que a população celular dobre sua quantidade de 6,5 (DP) e 11,5 (DP) após a exposição ao clinostato (Figura 12). Os fibroblastos em 17<sup>a</sup> passagem após a exposição ao clinostato apresentaram uma redução no potencial de proliferação celular, porém sem

diferença estatisticamente significativa quando comparado a fibroblastos de mesma passagem sem exposição ao clinostato.

**Figura 12.** Análise do ensaio de crescimento populacional

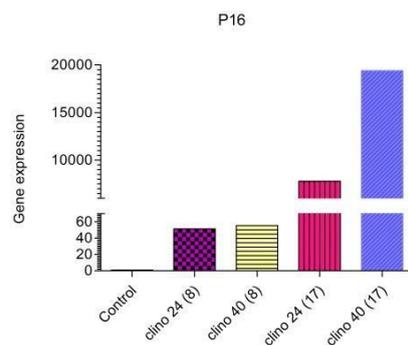


O gráfico representa o tempo em dias para que as células dobrassem sua quantidade inicial. As células em 17ª passagem apresentaram um maior tempo necessário para alcançarem o dobro da populações porém sem diferença estatisticamente significativa.

### 3.5 Análise Molecular através de qRT-PCR

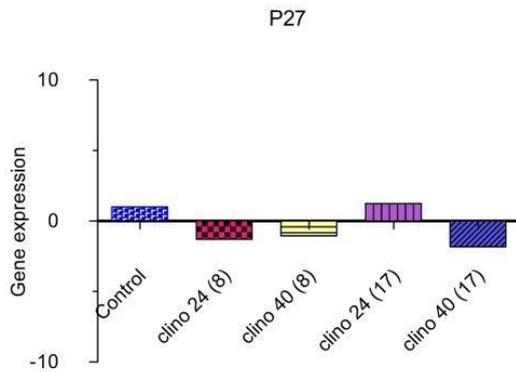
Após 24 horas de exposição ao Clinostato 3D, os fibroblastos em 8ª passagem apresentaram um aumento de 51,5 vezes a expressão relativa do gene p16 e após 40 horas de exposição um aumento de 55,4 vezes. Os fibroblastos que estavam em 17ª passagem apresentaram um aumento na expressão relativa de p16 de 7.785 vezes após 24 horas de exposição ao clinostato e 19.421 vezes após 40 horas de exposição (Figura 13)

**Figura 13 .** Expressão de P16



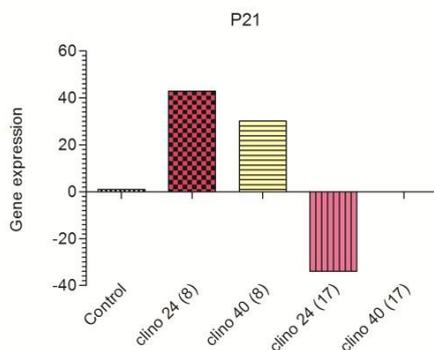
Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene p16.

A análise do gene p27 não apresentou alteração na expressão relativa em ambos dos tempos de exposição ao clinostato, tanto em fibroblastos em 8ª passagem quanto em fibroblastos em 17ª passagem (Figura14).

**Figura 14.** Expressão de p27

Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene p27.

Em análise do gene p21, os fibroblastos em 8ª passagem apresentaram um aumento de 42 vezes a expressão do gene p21 após 24 horas de exposição ao clinostato e um aumento de 30 vezes após 40 horas de exposição. Os fibroblastos em 17ª passagem após 24 horas de exposição ao clinostato apresentaram expressão relativa de p21 34 vezes menor quando comparado ao fibroblasto controle e após 40 horas de exposição os níveis de expressão relativa de p21 foram indetectáveis. (figura 15)

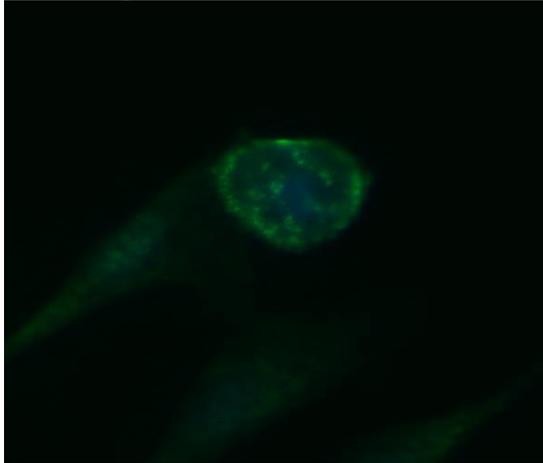
**Figura 15.** Expressão de p21

Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene p21.

### 3.6 Imunofluorescência

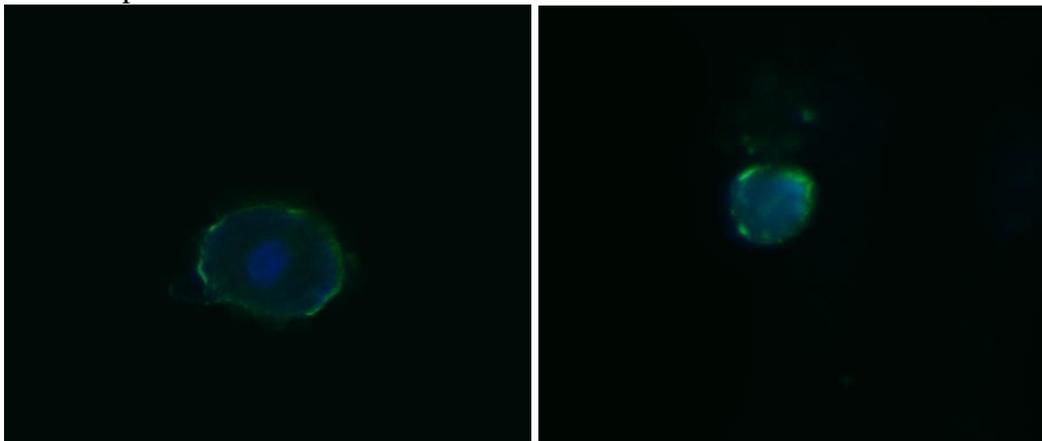
Foram encontradas positivities para os marcadores de pluripotência *Oct4* e *Nanog* através de imunofluorescência nos fibroblastos em 8º passagem após 24 horas e 40 horas de exposição ao clinostato. Não foi possível realizar quantificação de área ou intensidade de fluorescência, pois os achados positivos foram insólitos. A distribuição da marcação fluorescente e a morfologia das células positivas foram bastante atípicas para cultivos primários de fibroblastos.

**Figura 16.** Captura de imagem da caracterização da imunofluorescência através de microscopia confocal



Marcação nuclear (azul) com DAPI. Marcação positiva para Nanog (verde) por FITC.

**Figura 17.** Captura de imagem da caracterização da imunofluorescência através de microscopia confocal.



Marcação nuclear (azul) com DAPI. Marcação positiva para Oct4 (verde) por FITC.

#### 4. Discussão

Os fibroblastos humanos tem uma habilidade finita de se replicar *in vitro*, o que interfere no potencial de *population doubling* dessas células, fato que segundo Wistrom e Villeponteau <sup>9</sup> está inversamente relacionada à idade do doador <sup>9</sup>. É também sabido que, células com maior número de passagens foram submetidas a um maior número de processos de tripsinização do que células com menor número de passagens. Desta forma, a cada processo de tripsinização, as células entram em contato com a tripsina, que é uma protease, e que portanto, hidrolisa proteínas <sup>10</sup>. A cada contato com a enzima, as proteínas que fixam a célula ao frasco de cultura são clivadas, permitindo que se possam ser ressuspendê-las em uma nova solução e transferi-las para outro frasco de cultura, o que caracteriza o processo de passagem celular. Porém, nesse procedimento como as células também entram em

contato com a enzima, as proteínas das mesmas são hidrolisadas, causando, portanto, dano às proteínas constituintes da estrutura celular <sup>11</sup>. As células de fibroblasto, empregadas nesse estudo foram provenientes de um paciente de 41 anos de idade. Foi então observado que ao ser utilizada a 8ª passagem houve uma redução de 0,5 dia no *population doubling time* em comparação com o grupo controle. No entanto, quando o experimento foi realizado com fibroblastos de 17ª passagem o *population doubling time* aumentou em relação o controle, de 5 dias para 11 dias, sugerindo que as informações supracitadas seriam as responsáveis pelos diferentes *population doubling time* resultantes das passagens empregadas. De acordo com Rabinovitch, os fibroblastos humanos exibem discrepância em tempos estimados de *population doubling*, os quais se mostram bastante afetados em células com número de passagens maiores, quando as mesmas atingem seus limites de crescimento proliferativo <sup>12</sup>.

Os fibroblastos humanos cessam seu crescimento após um número finito de *population doublings*, e a determinação do nível de dano de DNA é possível de ser analisada utilizando como marcadores a 8-oxoguanina e a 8-oxo-2'-deoxiguanina. Um dos produtos mais freqüentes da oxidação do DNA é a 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoguanina). Essa lesão danifica a estrutura por fazer com que a guanina oxidada possa parear erroneamente com uma adenina, o que ocasiona uma mutação por transversão do par de bases. Esse reparo por excisão de base é um processo celular indispensável na remoção da 8-oxoguanina. O reparo por excisão de base cliva apenas a base, deixando no DNA o esqueleto de açúcar-fosfato e um sítio básico, a 8-oxoguanina que é removida pela 8-oxoguanina DNA glicosilase, o que permite que outras enzimas adicionem uma guanina normal substituindo a guanina oxidada <sup>13</sup>. Desta forma os autores relacionam esse dano como causa do interrompimento do crescimento de fibroblastos humanos IMR-90. As células senescentes excisam 4 vezes mais 8-oxoguanina do DNA, por dia, do que células mais jovens. Os níveis de 8-oxo-2'-deoxiguanosina são 35% maiores em células senescentes do que em células jovens <sup>13</sup>. Os resultados desse estudo sugerem a hipótese de que o dano oxidativo ao DNA contribui para o fim da replicação das células de fibroblasto humano <sup>13</sup>. Baseado nesse trabalho, muitos dos primeiros pesquisadores acreditavam que células normais, e cultivadas *in vitro*, seriam imortais e que os fatores de inibição no soro seriam as possíveis causa do envelhecimento *in vivo*.

Em estudos mais recentes foi provado que os fibroblastos humanos e de galinha tem uma capacidade proliferativa limitada *in vitro* <sup>9,15</sup>. Hoje em dia já é aceito que as células

eucarióticas normais tem uma capacidade proliferativa limitada *in vitro* que não é dependente do meio de cultura celular. Os autores Wistrom e Villeponteau realizaram testes com culturas de linhagem de fibroblastos MRC- 5, cultivados em DMEM F-12 , suplementado com 1% de soro fetal bovino e com 10% de modo comparativo, e não verificaram diferença no tempo de vida útil das células cultivadas sob essas condições <sup>9</sup> .

Os fibroblastos, como dito anteriormente, tem um tempo de vida limitado em cultura, e tem se tornado um modelo valioso para a análise das bases moleculares do envelhecimento em nível celular <sup>15</sup>. Os resultados encontrados nessa pesquisa, sugerem que a exposição dos fibroblastos à microgravidade simulada não altera o tempo estimado de *population doubling* das células. Um discreto melhor tempo de *population doubling* pode ser percebido nas células de 8ª passagem com 24 horas de exposição à microgravidade .Os resultados obtidos no ensaio de *population doubling* demonstram essa diferença no número estimado de dias para que a população dobre, visto que as células de 17ª passagem tiveram uma média de dias de 6,5 (DP) e 11,5 (DP) após a exposição ao clinostato. No presente estudo não foi possível detectar qual o limite de crescimento proliferativo, pois para tal presunção seriam necessários testes em cada passagem celular, ou seja, todas as passagens entre as 8ª e 17ª passagens. Para tal análise, por motivos de logística e resultados mais acurados, a realização do ensaio de *Population Doubling* utilizando Citometria de Fluxo garantiria resultados mais concisos e precisos.

O tempo de vida *in vitro* define o número de *population doublings* que as células de cultura primária podem ter em cultura segundo Rizzo e Evangelista, os quais reportaram que células de fibroblasto embriônica de rato (MEF), submetidas a um protocolo de passagens da linhagem de fibroblastos 6T3, de passagens realizadas a cada três dias conseguem alcançar quatro *population doublings* antes que a célula adquira o *status* de célula senescente. Os autores perceberam que com a alteração desse regime para o 6T15, com passagens a cada 15 dias, as MEF tiveram uma desaceleração no crescimento, no início, sem alcançar uma completa proliferação celular, e recomeçaram essa proliferação celular após a 3ª passagem. Foi também observado um aumento da expressão da proteína p21 que, segundo os autores, sugere uma provável ativação da proteína p53, o que favoreceria a interrupção do ciclo celular. Interessante notar que a expectativa de vida *in vitro* da MEF foi entendida tanto em termos de *population doubling* quanto em termos de dias em cultura. É importante levar-se em consideração a hipótese de que a ativação de p53, induz, dessa forma, a quiescência mais do que a senescência, podendo assim, aumentar o tempo de vida útil da célula, ou seja, a sua imortalização, sugerindo, portanto, que esse

processo não depende somente do número de *population doublings* e ou do tempo que a célula permanece em cultura <sup>17</sup>.

Os fibroblastos cultivados para os testes de passagem, em 17<sup>a</sup> passagem, permaneceram em cultivo até o fim dessa pesquisa, e apresentaram um tempo de vida maior que os fibroblastos expostos a microgravidade pelo mesmo tempo, porém com um número de passagens menor (8<sup>a</sup> passagem). Os últimos permaneceram sob cultivo até 37<sup>a</sup> e 33<sup>a</sup> passagem depois de 24 horas e 40 horas de exposição à microgravidade simulada respectivamente. Pode-se inferir, nesse caso que a exposição a essas condições possa ter alterado o ciclo celular, de tal forma que sua capacidade proliferativa e de crescimento também tenha sido afetada, sugerindo uma certa tendência a imortalização <sup>17; 18</sup>.

Tanto a microgravidade real como a simulada, tem mostrado induzir alterações na expressão gênica de vários tipos celulares <sup>19</sup>. No estudo de Arase e Nomura de 2002, células de fibroblasto humano foram expostas a microgravidade simulada, com o auxílio de um Clinostato 3D. O gene da proteína p21, importante regulador negativo do ciclo celular apresentou uma regulação negativa, indo ao encontro do resultado encontrado na presente pesquisa.

O ciclo celular é governado por complexos de quinase formados por uma subunidade catalítica, a CDK (quinase dependente de ciclina) e uma subunidade regulatória, a ciclina. As ciclinas ativam as CDK's formando complexos moleculares ciclinas-CDK que regulam a atividade de outras proteínas cruciais no ciclo celular, fosforilando-as nos seus locais reguladores. A fosforilação funciona como um interruptor para a atividade enzimática e as quinases são responsáveis por ligar e/ou desligar este interruptor, de modo a permitir o retorno ao nível anterior de estimulação quando o sinal hormonal termina. Desta forma, não é necessário sempre degradar proteínas e transcrever/traduzir novas proteínas toda vez que a célula precisa alterar seu metabolismo: basta apenas ativar ou inibir as proteínas de acordo com a necessidade não havendo uma regra para qual estado é o ligado, ou seja, uma fosforilação pode tanto ativar quanto desativar uma proteína <sup>20</sup>. A p21, por ser reguladora negativa do ciclo, pode interferir no crescimento celular, justamente por controlar a progressão do ciclo <sup>19</sup> já que é uma proteína inibidora de CDK. A mesma controla a transição entre as fases do ciclo celular, é do tipo específica, pois é seletiva sobre os complexos ciclina D-CDK4 e ciclina D-CDK6 que atuam na fase G1 <sup>17</sup>. A expressão negativa de p21 sugere uma possível inativação funcional de p53, visto que a expressão de p21 é regulada e expressa pela p53 <sup>21</sup>. O resultado desse estudo também sugere uma tendência da célula a imortalização, pois a característica mais notável de uma célula

imortalizada é sua expressão negativa de p21, o que pode estar associada a uma instabilidade genômica ou alterações epigenéticas art<sup>17</sup>.

Os fibroblastos humanos em senescência tem um tempo de vida proliferativo finito, o que faz com que as células não entrem em fase S devido a estimulação mitogênica da célula, mesmo que ela permaneça viva por vários meses<sup>22</sup>. Ou seja, os fibroblastos de pele tem seu crescimento irreversivelmente cessado após um número finito de divisões<sup>23</sup>.

Já a p16, proteína reguladora negativa do ciclo celular específica, apresentou uma expressão positiva. Em culturas de fibroblastos de passagens menores, a expressão de p16 é baixa mesmo quando os telômeros são relativamente longos. É de conhecimento da comunidade científica que a p21 inicia a parada do ciclo celular, enquanto que a p16 é a responsável por manter a parada desse ciclo. No entanto, a relação precisa entre o tempo de vida replicativo da célula, o *status* das vias p53 e p16 ainda não está claro, no que diz respeito aos fibroblastos<sup>23</sup>. Sabe-se que a p16 é induzida por vários estímulos, incluindo dano ao DNA, reações oxidantes e alguns fármacos quimioterápicos. Nesses casos a p16 media uma resposta de senescência celular independente de telomerase, o que pode ser determinado como senescência prematura ou acelerada. Já é de conhecimento que muitos estímulos como o referido dano ao DNA e o estresse oxidativo podem causar uma parada no crescimento celular, com um fenótipo de célula senescente, independentemente do tamanho de telômero ou sua estrutura. Telômeros disfuncionais, se assemelham ao dano de DNA e, portanto, também desencadeiam uma expressão de p53, como resposta a esse dano. De acordo com essa idéia, em células de fibroblasto humano senescentes a expressão de p53 está alterada e a expressão de p21, por consequência também.

Na presente pesquisa, os fibroblastos de pele de 17ª passagem, submetidos a 40h de microgravidade simulada, apresentaram uma expressão positiva de p16, e uma expressão negativa de p21, quando comparadas com o grupo controle. O que sugere que possa ter ocorrido uma tendência da célula a imortalização celular, com algum nível de estresse mecânico capaz de desencadear uma expressão aumentada de p16, mas sem causar qualquer disfunção nos telômeros, ou um possível dano ao DNA, o que causaria um aumento de expressão de p53, e um conseqüente aumento de p21.

A expressão do gene p27, não apresentou diferença em relação ao grupo controle. p27 também é um regulador negativo do ciclo celular, porém inespecífica, pois atua em vários tipos de complexos ciclina CDK<sup>24</sup>. Um estudo realizado por Fabris e Berton mostrou que a p27 controla a ativação da via MAPK, responsável pela produção das ciclinas responsáveis pelo controle do ciclo celular. De um ponto de vista molecular, foi

observado que a p27, controlando a estabilidade dos microtúbulos do citoesqueleto, restringindo, dessa forma, a total ativação da via. O eixo regulatório que modula a transição de fase G1-S é dependente da regulação da estabilidade dos microtúbulos pela p27, controlando, assim, a ativação da via de sinalização Ras - MAPK <sup>24; 25</sup>.

A relação causa e efeito de uma resposta celular anômala e a estrutura do citoesqueleto em ambiente de microgravidade ainda não está totalmente esclarecida. A descoberta da importância da gravidade na conformação dos microtúbulos sustenta a nova evidência de que respostas celulares anormais, na ausência de gravidade, estão ligadas a mudanças na dinâmica, estrutura e função do citoesqueleto. Os microtúbulos parecem estar alterados em células que foram expostas à microgravidade. Lewis et al em 1998, verificaram que os Linfócitos T ( Jurkat) tinham os microtúbulos do citoesqueleto alterados após 4 horas de exposição a microgravidade. Analisando esses estudos, pode-se inferir que as mudanças na actina e microtúbulos do citoesqueleto podem estar envolvidas nas alterações na expressão de genes dos osteoblastos <sup>26</sup>. Essas informações levam a um entendimento que há uma diminuição do estímulo anabólico na ausência de gravidade, pois existem vários sinais anabólicos que são regulados pelo estresse mecânico, e esses sinais podem estar negativamente regulados na microgravidade <sup>27</sup>.

As alterações morfológicas, notadas nos fibroblastos expostos à 24 horas e 40 horas microgravidade simulada dessa pesquisa, podem estar relacionadas a essas mudanças no citoesqueleto das células, percebidas em estudos anteriores. Culturas de células de endotélio vascular mostraram-se alteradas após a exposição a clinorotação <sup>18</sup>. Já é de entendimento que a microgravidade altera a organização do citoesqueleto, os mecanismos de sinalização intracelular, e possui efeitos controversos sobre a apoptose celular <sup>27</sup>.

A marcação positiva para os anticorpos específicos de células pluripotentes permite sugerir que o grau de plasticidade celular dos fibroblastos foi alterado pela exposição ao clinostato. Não existem critérios mínimos de exigência para caracterização de células pluripotentes, assim como são tratadas as células-tronco mesenquimais, por exemplo <sup>28</sup>; entretanto, alguns marcadores são essenciais para que se possa confirmar a pluripotência

A Iniciativa Internacional de Células-tronco (*ISCI*) sugeriu um conjunto de marcadores para células pluripotentes baseado no que já foi verificado como característica de pluripotência em 59 linhagens de células embrionárias humanas. São eles: *NANOG*, *TDGF*, *Oct4*, *GABRB3*, *DNMT3B*, *TRA-1-60*, *TRA-1-81*, *SSEA3* e *SSEA4* [3]. Além desses marcadores, células embrionárias também podem ser caracterizadas através da detecção de *SOX2*, *Rex1*, expressão da *hTERT*, bem como a atividade da fosfatase alcalina <sup>29</sup>. Os

anticorpos *Oct4* e *Nanog* utilizados nesse estudo fazem parte da lista de sugestão de marcadores para caracterização de pluripotência. A imunofluorescência dos cultivos de fibroblastos pós exposição ao clinostato partiram de um plaqueamento de  $2.10^5$  células por  $\text{cm}^2$  em placas de seis poços, perfazendo um total de  $2,7.10^5$  células plaqueadas em cada poço. Somente um número pouco expressivo e qualitativo de células foi positivo para os marcadores de pluripotência. A efetividade dos protocolos de gerações de pluripotência a células somáticas por transfecção viral são bastante reduzidas, variando na escala de 1 a 0,1% do total de células expostas<sup>30; 31</sup>. As células positivas para os marcadores de pluripotência também apresentaram alterações na morfologia, sendo essa característica também considerada nos protocolos de caracterização de pluripotência<sup>32</sup>. Acredita-se que nesse estudo possivelmente algumas células expostas ao clinostato alteraram seu nível de plasticidade, tornando-se mais indiferenciadas do que inicialmente se apresentavam. Protocolos de isolamento das células positivas para os marcadores *Oct4* e *Nanog* e/ou com alteração morfológica podem ser utilizados para manter o cultivo unificado das células que alcançaram esse nível de plasticidade, estudando dessa forma a população celular alterada pela exposição ao Clinostato 3D de forma isolada.

**5. Conclusão:** De acordo com os resultados encontrados nessa pesquisa, é possível sugerir que culturas primárias de fibroblastos expostas a microgravidade simulada podem estar sujeitas a alterações morfológicas e de expressão dos genes relacionados ao controle de ciclo celular p16, p21, p27, e alterações no nível de plasticidade expressando marcadores de pluripotência. A exposição a microgravidade em células de 17<sup>a</sup> passagem apresentou uma possível tendência a um aumento de longevidade celular através do teste de passagens. No que diz respeito ao seu potencial de crescimento populacional, a exposição a clinorrotação não causou alterações na taxa de *PDL* (do inglês *population doubling level*). As alterações morfológicas nas células em 17<sup>a</sup> passagem foram bem expressivas quando comparadas com o grupo controle, bem como a alteração na expressão dos genes correlatos ao ciclo celular. Importante destacar que os testes de imunofluorescência não foram realizados com as células em 17<sup>a</sup> passagem. As células em 8<sup>a</sup> passagem não apresentaram alterações em sua morfologia, nem apresentaram uma possível tendência a um aumento de sua longevidade. Porém, a expressão dos genes relacionados ao ciclo celular e os níveis de plasticidade celular mostraram-se alterados.

## 6. Referências

- 1 BLABER, E. A. et al. Microgravity Reduces the Differentiation and Regenerative Potential of Embryonic Stem Cells. **Stem Cells Dev**, v. 24, n. 22, p. 2605-21, Nov 15 2015. ISSN 1547-3287.
- 2 LACKNER, J. R.; DIZIO, P. Human orientation and movement control in weightless and artificial gravity environments. **Exp Brain Res**, v. 130, n. 1, p. 2-26, Jan 2000. ISSN 0014-4819 (Print)0014-4819.
- 3 VAN LOON, J. J. W. A. Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. **Advances in Space Research**, v. 39, n. 7, p. 1161-1165, // 2007. ISSN 0273-1177. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273117707000786>>.
- 4 YUGE, L. et al. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. **Stem Cells and Development**, v. 15, n. 6, p. 921-929, Dec 2006. ISSN 1547- 3287. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243752900016>.
- 5 CHEN, J. et al. The simulated microgravity enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into neurons. **Neuroscience Letters**, v. 505, n. 2, p. 171-175, Nov 14 2011. ISSN 0304-3940. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297614600023>.
- 6 CARLSSON, S. I. M. et al. Endothelial stress by gravitational unloading: effects on cell growth and cytoskeletal organization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1642, n. 3, p. 173-179, 10/21/ 2003. ISSN 0167-4889. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488903001241>>.
- 7 MARRIOT, M. A. D. S. B. F. C. **Evaluation of an intranasal scopolamine formulation for spacemotion sickness**. 2006. (Ph.D). London, UK.
- 8 MARTINELLI, L. K. B. Aperfeiçoamento e Validação do clinostato 3D e seu uso no estudo de células do sistema imune humano. v. 01, p. 76, 2007.
- 9 WISTRON, C.; VILLEPONTEAU, B. Long-term growth of diploid human fibroblasts in low serum media. **Exp Gerontol**, v. 25, n. 2, p. 97-105, 1990. ISSN 0531-5565(Print)0531-5565.
- 10 RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. [2] Families of serine peptidases. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 244, 1994. p.19-61. ISBN 0076-6879.
- 11 TEHNOLOGIES, S. **Trypsin EDTA 0,25%** 2015.
- 12 RABINOVITCH, P. S. Regulation of human fibroblast growth rate by both noncycling

cell fraction transition probability is shown by growth in 5-bromodeoxyuridine followed by Hoechst 33258 flow cytometry. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 10, p. 2951-5, May 1983. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424.

- 13 LUO, J. et al. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated DNA repair is associated with Rho GTPase activation and  $\alpha$ -smooth muscle actin polymerization. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 73, p. 430-438, 8// 2014. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584914001476> >.
- 14 CHEN, Q. et al. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 10, p. 4337-4341, 1995. ISSN 0027-8424/1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC41939/> >.
- 15 HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp Cell Res**, v. 25, p. 585-621, Dec 1961. ISSN 0014-4827 (Print)0014-4827.
- 16 RIZZO, M. et al. Immortalization of MEF is characterized by the deregulation of specific miRNAs with potential tumor suppressor activity. **Aging (Albany NY)**, v. 3, n. 7, p. 665-71, Jul 2011. ISSN 1945-4589.
- 17 L.B.BURAVKOVA MD, P., YU.A.ROMANOV PHD. THE ROLE OF CYTOSKELETON IN CELL CHANGES UNDER CONDITION OF SIMULATED MICROGRAVITY. **Acta Astronautica**, v. Vol. 48., p. pp. 647-650, 2001.
- 18 ARASE, Y. et al. EFFECTS OF 3-D CLINO-ROTATION ON GENE EXPRESSION IN HUMAN FIBROBLAST CELLS. **Cell Biology International**, v. 26, n. 3, p. 225-233, 2002. ISSN 1095-8355. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/cbir.2001.0833> >.
- 19 PISU, M.; CONCAS, A.; CAO, G. A novel quantitative model of cell cycle progression based on cyclin-dependent kinases activity and population balances. **Computational Biology and Chemistry**, v. 55, p. 1-13, 4// 2015. ISSN 1476-9271. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1476927115000031> >.
- 20 FANG, J. Y.; LU, Y. Y. Effects of histone acetylation and DNA methylation on p21(WAF1) regulation. **World J Gastroenterol**, v. 8, n. 3, p. 400-5, Jun 2002. ISSN 1007-9327 (Print)1007-9327.
- 21 DULIC, V. et al. Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 23, p. 11034-8, Dec 1 1993. ISSN 0027-8424 (Print)
- 22 ITAHANA, K. et al. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 1, p. 389-401, Jan 2003. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306

- <sup>23</sup> FLORES, J. M.; MARTIN-CABALLERO, J.; GARCIA-FERNANDEZ, R. A. p21 and p27 a shared senescence history. **Cell Cycle**, v. 13, n. 11, Jun 1 2014. ISSN 1538-4101. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000336662100002 >.
- <sup>24</sup> FABRIS, L. et al. p27kip1 controls H-Ras/MAPK activation and cell cycle entry via modulation of MT stability. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 45, p. 13916-21, Nov 10 2015. ISSN 0027- 8424.
- <sup>25</sup> HUGHES-FULFORD, M. Function of the cytoskeleton in gravisensing during spaceflight. **Advances in Space Research**, v. 32, n. 8, p. 1585-1593, 10// 2003. ISSN 0273-1177. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273117703903991>>. Function of the cytoskeleton in gravisensing during spaceflight. **Adv Space Res**, v. 32n. 8, p. 1585-93, 2003. ISSN 0273-1177(Print)0273-1177.
- <sup>26</sup> DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006. ISSN 1465-3249 (Print)1465-3249.
- <sup>27</sup> ASPRER, J. S.; LAKSHMIPATHY, U. Current methods and challenges in the comprehensive characterization of human pluripotent stem cells. **Stem Cell Rev**, v. 11, n. 2, p. 357-72, Apr 2015. ISSN 1550-8943.
- <sup>28</sup> FUSAKI, N. et al. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, v. 85, n. 8, p. 348-62, 2009. ISSN 0386-2208.
- <sup>29</sup> LI, H. O. et al. A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. **J Virol**, v. 74, n. 14, p. 6564-9, Jul 2000. ISSN 0022- 538X (Print)0022-538x.
- <sup>30</sup> ADEWUMI, O. et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. **Nat Biotechnol**, v. 25, n. 7, p. 803-16, Jul 2007. ISSN 10870156 (Print)1087-0156.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No atual contexto histórico, onde a Biologia e os conceitos da Física respaldam o campo de estudo da Biologia Espacial, a presente pesquisa vem complementar e incentivar questionamentos para uma melhor compreensão da Biologia basilar celular em Terra e no espaço, de forma complementar e recíproca.

Os resultados encontrados apontam, que é possível sugerir que culturas primárias de fibroblastos expostas a microgravidade simulada podem estar sujeitas a alterações morfológicas e de expressão dos genes relacionados ao controle de ciclo celular p16, p21, p27, e alterações no nível de plasticidade expressando marcadores de pluripotência. O que torna uma análise mais minuciosa acerca dos componentes fundamentais do citoesqueleto celular, bem como de anticorpos associados a essas estruturas, e dos genes associados ao ciclo celular e senescência, necessária para uma resposta mais concreta.

A exposição a microgravidade em células de 17<sup>a</sup> passagem apresentou uma possível tendência a um aumento de longevidade celular através do teste de passagens. No que diz respeito ao seu potencial de crescimento populacional, a exposição a clinorrotação não causou alterações na taxa de *PDL* (do inglês *population doubling level*).

Dessa maneira, cada resultado aqui alcançado instiga uma análise mais profunda e pontual em cada aspecto abordado na biologia molecular e celular. Nasce a ímpeto pela continuidade dessa pesquisa, que vem ao encontro do atual anseio por novas terapias celulares, e seu estudo e pesquisa aliado a microgravidade simulada.

## 7. REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> HU, L. et al. Response and adaptation of bone cells to simulated microgravity. **Acta Astronautica**, v. 104, n. 1, p. 396-408, 11// 2014. ISSN 0094-5765. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0094576514001684> >.
- <sup>2</sup> LACKNER, J. R.; DIZIO, P. Human orientation and movement control in weightless and artificial gravity environments. **Exp Brain Res**, v. 130, n. 1, p. 2-26, Jan 2000. ISSN 0014-4819 (Print)0014-4819.
- <sup>3</sup> VAN LOON, J. J. W. A. Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. **Advances in Space Research**, v. 39, n. 7, p. 1161-1165, // 2007. ISSN 0273-1177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273117707000786> >.
- <sup>4</sup> HOSON, T. et al. Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. **Planta**, v. 203 Suppl, p. S187-97, 1997. ISSN 0032-0935 (Print)0032-0935.
- <sup>5</sup> YUGE, L. et al. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. **Stem Cells Dev**, v. 15, n. 6, p. 921-9, Dec 2006. ISSN 1547-3287 (Print)1547-3287.
- <sup>6</sup> DUKE, P. J.; DAANE, E. L.; MONTUFAR-SOLIS, D. Studies of chondrogenesis in rotating systems. **J Cell Biochem**, v. 51, n. 3, p. 274-82, Mar 1993. ISSN 0730-2312 (Print)0730-2312.
- <sup>7</sup> RODRIGUES, C. A. V. et al. Stem cell cultivation in bioreactors. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 815-829, 11// 2011. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011000851> >. Acesso em: 2011/12//.
- <sup>8</sup> ARASE, Y. et al. EFFECTS OF 3-D CLINO-ROTATION ON GENE EXPRESSION IN HUMAN FIBROBLAST CELLS. **Cell Biology International**, v. 26, n. 3, p. 225-233, 2002. ISSN 1095-8355. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/cbir.2001.0833> >.
- <sup>9</sup> TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-76, Aug 25 2006 ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674.
- <sup>10</sup> PISU, M.; CONCAS, A.; CAO, G. A novel quantitative model of cell cycle progression based on cyclin-dependent kinases activity and population balances. **Computational Biology and Chemistry**, v. 55, p. 1-13, 4// 2015. ISSN 1476-9271. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1476927115000031> >.

- 11 EYDEN, B. Fibroblast phenotype plasticity: relevance for understanding heterogeneity in "fibroblastic" tumors. **Ultrastruct Pathol**, v. 28, n. 5-6, p. 307-19, Sep-Dec 2004. ISSN 0191-3123 (Print)0191-3123.
- 12 OSONOI, M. et al. Fibroblasts have plasticity and potential utility for cell therapy. **Hum Cell**, v. 24, n. 1, p. 30-4, Mar 2011. ISSN 0914-7470.
- 13 CARLSSON, S. I. M. et al. Endothelial stress by gravitational unloading: effects on cell growth and cytoskeletal organization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1642, n. 3, p. 173-179, 10/21/ 2003. ISSN 0167-4889. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488903001241> >.
- 14 BLABER, E. A. et al. Microgravity Reduces the Differentiation and Regenerative Potential of Embryonic Stem Cells. **Stem Cells Dev**, v. 24, n. 22, p. 2605-21, Nov 15 2015. ISSN 1547-3287.
- 15 NAGATOMO, F.; KOUZAKI, M.; ISHIHARA, A. Effects of microgravity on blood flow in the upper and lower limbs. **Aerospace Science and Technology**, v. 34, p. 20-23, 4// 2014. ISSN 1270-9638. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1270963814000200> >.
- 16 LE BOURG, E. A review of the effects of microgravity and of hypergravity on aging and longevity. **Exp Gerontol**, v. 34, n. 3, p. 319-36, Jun 1999. ISSN 0531-5565(Print)0531-5565.
- 17 NABAVI, N. et al. Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion. **Bone**, v. 49, n. 5, p. 965-974, 11// 2011. ISSN 8756-3282. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328211011380> >.
- 18 RODIONOVA, N. V.; OGANOV, V. S.; ZOLOTOVA, N. V. Ultrastructural changes in osteocytes in microgravity conditions. **Advances in Space Research**, v. 30, n. 4, p. 765-770, // 2002. ISSN 0273-1177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273117702003939> >.
- 19 HAUSCHILD, S. et al. T cell regulation in microgravity – The current knowledge from in vitro experiments conducted in space, parabolic flights and ground-based facilities. **Acta Astronautica**, v. 104, n. 1, p. 365-377, 11// 2014. ISSN 0094-5765. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0094576514001799> >.
- 20 THIEL, C. S. et al. Rapid alterations of cell cycle control proteins in human T lymphocytes in microgravity. **Cell Commun Signal**, v. 10, n. 1, p. 1, 2012. ISSN 1478-811X (Electronic)1478-811X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22273506> >.

- 21 BORCHERS, A. T.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Microgravity and immune responsiveness: implications for space travel. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 889-98, Oct 2002. ISSN 0899-9007 (Print)0899-9007.
- 22 MARTINELLI, L. K. et al. Effect of microgravity on immune cell viability and proliferation. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine**, v. 28, n. 4, p. 85-90, 2009. ISSN0739-5175.
- 23 REA, G. et al. Microgravity-driven remodeling of the proteome reveals insights into molecular mechanisms and signal networks involved in response to the space flight environment. **Journal of Proteomics**, ISSN 1874-3919. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391915301780> >.
- 24 BURAVKOVA, L. B. et al. Cultured stem cells are sensitive to gravity changes. **Acta Astronautica**, v. 63, n. 5-6, p. 603-608, 9// 2008. ISSN 0094-5765. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0094576508001562> >.
- 25 EBRAHIMI, B. Reprogramming of adult stem/progenitor cells into iPSCs without reprogramming factors. **Journal of Medical Hypotheses and Ideas**, v. 9, n. 2, p. 99-103, 12// 2015. ISSN 2251-7294. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2251729415000154> >.
- 26 GERSHOVICH, P. M. et al. Cytoskeletal proteins and stem cell markers gene expression in human bone marrow mesenchymal stromal cells after different periods of simulated microgravity. **Acta Astronautica**, v. 70, p. 36-42, 1// 2012. ISSN 0094-5765. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0094576511002402> >. Acesso em: 2012/2//.
- 27 VERSARI, S. et al. Influence of Oxygen in the Cultivation of Human Mesenchymal Stem Cells in Simulated Microgravity: An Explorative Study. **Microgravity Science and Technology**, v. 25, n. 1, p. 59-66, 2012. ISSN 1875-0494. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12217-012-9333-6> >.
- 28 ARIEL, A.; SERHAN, C. N. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. **Trends Immunol**, v. 28, n. 4, p. 176-83, Apr 2007. ISSN 1471-4906 (Print)1471-4906.
- 29 WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810-3, Feb 27 1997. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836.
- 30 RAJASINGH, J. et al. Cell-free embryonic stem cell extract-mediated derivation of multipotent stem cells from NIH3T3 fibroblasts for functional and anatomical ischemic tissue repair. **Circ Res**, v. 102, n. 11, p. e107-17, Jun 6 2008. ISSN 0009-7330.

- <sup>31</sup> SOKOLOVSKAYA, A. A. et al. Effects of simulated microgravity on cell cycle in human endothelial cells. **Acta Astronautica**, v. 99, p. 16-23, 6// 2014. ISSN 0094-5765. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0094576514000484> >. Acesso em: 2014/7//.
- <sup>32</sup> FANG, J. Y.; LU, Y. Y. Effects of histone acetylation and DNA methylation on p21( WAF1) regulation. **World J Gastroenterol**, v. 8, n. 3, p. 400-5, Jun 2002. ISSN 1007-9327 (Print)1007-9327.
- <sup>33</sup> FABRIS, L. et al. p27kip1 controls H-Ras/MAPK activation and cell cycle entry via modulation of MT stability. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 45, p. 13916-21, Nov 10 2015. ISSN 0027-8424.
- <sup>34</sup> SALEHINEJAD, J. et al. Immunohistochemical expression of p16 protein in oral squamous cell carcinoma and lichen planus. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 18, n. 4, p. 210-213, 8// 2014. ISSN 1092-9134. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1092913414000355> >.