



UNIDADE DE ENSINO SUPERIOR DE FEIRA DE SANTANA (UNEF)
BRACHARELADO EM BIOMEDICINA

FABIANE DA SILVA REIS GÓES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROLIFERATIVO DA CÉLULA CRFK (*FELIS*
CATUS, *CAT*) SUBMETIDA AO CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA
DULBECCO SUPLEMENTADO COM VITAMINAS DO COMPLEXO B**

Feira de Santana-Bahia

2020

FABIANE DA SILVA REIS GÓES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROLIFERATIVO DA CÉLULA CRFK (*FELIS
CATUS, CAT*) SUBMETIDA AO CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA
DULBECCO SUPLEMENTADO COM VITAMINAS DO COMPLEXO B**

Projeto de pesquisa apresentado ao curso de Bacharelado em Biomedicina pela Ensino Superior de Feira de Santana, como pré-requisito avaliativo da disciplina de TCC 1. Sob supervisão do prof. Me. Rodolfo Macedo Cruz Pimenta.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo M. Almeida

Co-orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina O. Santana

Prof. Esp. Henrique Emanuel da Silva

Feira de Santana-Bahia

2020

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica a nossa ignorância”

Jonh F. Kennedy

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACCI – acetil-CoA carboxilase I

ACCII - acetil-CoA carboxilase II

APC – complexo promotor da anáfase

ATCC – “*American Type Culture Collection*” – Coleção Americana de Tecidos e Culturas

ATP – trifosfato de adenosina

AUG – Códon de iniciação da proteína - metionina

B¹ - tiamina

B² - riboflavina

B³ - niacina

B⁵ - ácido pantatênico

B⁶ - piridoxina

B⁷ – biotina

B⁹ - ácido fólico

B¹² – cobalamina

BCKDC - complexo de α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada

BHK 2113.S – célula oriunda de rim de hamster *baby* modificada

pH – potencial hidrogênio

Cdc₂₀ – Coenzima ativadora do complexo promotor da anáfase

Cdc₂₅ - Coenzima fosfatase ativadora do complexo cinases dependente de ciclina

CDKs – cinases dependente de ciclinas

CBS - cistationina beta sintase

CGL - cistationina gama-liase

CoA- coenzima A

CoA-SH – coenzima A com uma molécula de tiol

CO₂ – dióxido de carbono

CRKF – célula derivada de rim de felino fêmea da região do córtex

DMEM – meio de cultura Dulbecco

DNA – ácido desoxirribonucleico

dTMP - monofosfato de timidina

dUMP - monofosfato de desoxiuridina

E¹ - piruvato desidrogenase

E² - diidrolipoil transacetilase

E³ - diidrolipoil desidrogenase

Fase S – fase síntese do ácido desoxirribonucleico

Fase G1 – fase onde a célula faz a checagem se a possibilidade para a divisão celular

FAD – flavina adenina dinucleótido – em seu estado oxidado

FADH₂ - flavina adenina dinucleótido com duas moléculas de hidrogênio – em seu estado reduzido

G1/S CdK – cinase ligada a ciclina D

G2 – fase do ciclo celular onde o genoma se encontra duplicado, segundo ponto de controle

GTP – trifosfato de guanina

IDH - isocitrato desidrogenase

MAT- metionina-adenosil transferase

MCC - 3-metilcrotonil-CoA carboxilase

M-CdK – cinase ligada a ciclina B

MDH - malato desidrogenase

mg/L– miligramas por litro

MMA – metilmalônico

MTs - Metalotioneínas

MS - metionina sintase

MTHFR – metiltetra-hidrofolato redutase

NAD - nicotinamida adenina dinucleótido – em seu estado oxidado

NADH₂ - nicotinamida adenina dinucleótido – em seu estado reduzido

PCC - propionil-CoA carboxilase

PEP – fosfoenolpiruvato carboxilase

PD – piruvato desidrogenase

PBS – salina tamponada

RFC1- carreador receptor de folato 1

RF- receptor de folato

RNA – ácido ribonucleico

SAM - S-adenosil metionina

SAH - S-adenodil-homocisteína

SAHH S-adenosil-homocisteína hidrolase

SFB – soro fetal bovino

SCS – succinil-CoA sintase

S/ CdK – cinase ligada a ciclina E

SQR - succinato-coenzima Q redutase

SH - serina hidroximetiltransferase

tHcy – homocisteína

TTP – tiamina pirofosfato

THF - 5-metiltra-hidrofolato

TS - timidilato sintase

µm – micras

UV – luz ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas – Tiamina B¹	49
Tabela II: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas – Riboflavina B²	49
Tabela II: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas – Niacina B₃	49
Tabela IV: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas – Ácido Pantatênico B⁵	50
Tabela V: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas – Piridoxina B⁶	50
Tabela VI: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas –Biotina B⁷	50
Tabela VII: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas –Ácido fólico B⁹	51
Tabela VII: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas – Cobalamina B¹²	51
Tabela IX: Variáveis a serem analisadas para emissão dos resultados.	52

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo do ácido cítrico e metabolismo das vitaminas do complexo B	46
Figura 2: Mapa metabólico do ciclo da metionina e do ácido fólico dentro da célula	47
Figura 3: Desenho da câmara de Neubauer (como se realiza a contagem).	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
	JUSTIFICATIVA	13
3	OBJETIVO	15
3.1	Objetivo específicos.....	15
4	REVISÃO DE LITERÁRIA	16
4.1	Caracterização e histórico do cultivo de células in vitro	16
4.1.1	Histórico da linhagem CRFK	17
4.1.2	Cultura primária.....	18
4.1.3	Cultura secundária	18
4.1.4	Modalidades de cultura.....	18
4.1.5	Cultura de células em monocamada.....	19
4.1.6	Cultura de células em suspensão	19
4.1.7	Métodos de retiradas das células aderidas.....	19
4.2	Ciclo celular (mitose).....	19
4.2.2	Cinases dependentes de ciclinas	20
4.2.3	Pontos de controle do ciclo celular	21
4.2.3	Pontos de controle do ciclo celular	21
4.2.4	Pontos de controle externos.....	22
4.3	Geração de energia das células através de micronutrientes	22
4.3.1	Processo catabólicos das vitaminas do complexo B.....	23
4.3.1.1	Ciclo do ácido cítrico	23
4.3.1.2	Fosforilação oxidativa.....	25
4.3.1.3	Piridoxina	26
4.3.1.4	Biotina	26
4.3.1.5	Ácido fólico.....	27
4.3.1.6	Ciclo da metionina	28
4.3.1.7	Cobalamina.....	29
4.4	Reações anapleróticas	29

5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1	Métodos de pesquisa	31
5.1.1	Materiais utilizados	31
5.1.2	Definição das concentrações das vitaminas do complexo B.....	31
5.1.3	Formulação do meio de cultura e do stock das vitaminas	31
5.1.4	Preparação do ambiente de trabalho.....	32
5.1.5	Preparação do meio de cultura.....	32
5.1.6	Descongelamento da célula.....	33
5.1.7	Repiques da célula	33
5.1.8	Cálculo para quantificar a célula	34
5.1.8.1	Ação do corante eosina amarelada na célula.....	34
5.1.8.3	Diluições realizadas no experimento.....	35
5.2	Testes com a cobalamina	35
5.2.1	Crítérios para a análise das variáveis.....	36
5.3	Análises dos dados.....	36
6	CRONOGRAMA	38
7	ORÇAMENTO.....	40
7.1	Materiais utilizados e despesas do projeto	40
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXO A	46
	ANEXO B	47
	ANEXO C.....	48
	APÊNDECE A	49
	APÊNDECE B.....	50
	APÊNDECE C.....	51
	APÊNDECE D	52

1 INTRODUÇÃO

Cultivo de células consiste em isolar uma determinada células proveniente de órgãos de animais e cultivá-las sob condições controladas e assépticas. A cultura de células surgiu em meados do século XX em experimentos realizados por Roux e Herrison (MIGITA, 2012).

O objeto dos experimentos desses cientistas era em desvendar o funcionamento dos tecidos e das células *in vitro*. A partir de seu experimento Harrison conseguiu provar que os prolongamentos nervosos eram parte das células nervosas, porém esse não foi o único resultado de sua pesquisa, ele conseguiu melhorar a técnica de cultivo realizada por Roux e manteve células vivas *in vitro* sob condições assépticas por mais de três semana. Seu experimento se tornou um marco para a cultura de células (REBELLO, 2014).

Atualmente o cultivo de células é utilizado por todas as áreas das ciências, principalmente na área da biotecnologia por trazer resultados precisos e conhecimentos sobre novas patologias, estudos sobre mecanismos de infecções por microrganismo. Na produção de medicamentos associa-se a biotecnologia à virologia visto que as vacinas existentes, tanto para animais, quanto para seres humanos são fabricadas a partir da técnica de cultura de células para produção dos vírus ou antígenos das vacinas, sendo de suma importância para a saúde pública (BOUSADA E PEREIRA, 2017).

Em outras áreas como a farmacologia a cultura de células é indispensável sendo um modelo *in vitro* para estudos de novos fármacos e análises de seus efeitos nas células dos seres vivos. Pesquisas com células tronco e terapia gênica em biologia molecular é possível pelo cultivo dos tecidos para análises primárias, em seguida esses testes serão realizados a níveis moleculares (ISSAC *et al*, 2012; TORRES e PESSOA, 2018).

Para se obter uma cultura de células saudáveis e fiel ao modelo original, ou seja, o mais parecido possível com o órgão em que as células foram extraídas, o meio de cultura é extremamente importante e indispensável. No meio de cultura deve se ter condições favoráveis para que as células se desenvolvam sem alterações no seu genoma. Os fatores de crescimento são ofertados pelo soro fetal bovino, aminoácidos, sais inorgânicos, glicose e micronutrientes, tais componentes são imprescindíveis para homeostasia celular. Os micronutrientes realizam a função de coenzimas das enzimas necessárias para as reações como geração de energia ou a replicação do genoma, em resumo para a sobrevivência da célula (ALBERT *et al*, 2017).

As vitaminas do complexo B são micronutrientes indispensáveis para a produção de energia e para a replicação do DNA, RNA e síntese proteica. As vitaminas B¹, B², B³ e B⁵ estão diretamente envolvidas na produção de energia do no ciclo do ácido cítrico e transporte dos

elétrons para a cadeia respiratória com objetivo de gerar energia livre na forma de ATP nas reações catabólicas imprescindíveis para a células. As vitaminas B², B³, B⁶, B⁷, B⁹ e B¹² estão envolvidas na metilação e síntese de DNA, RNA, síntese de aminoácidos e de precursores do ciclo de Krebs através do ciclo da metionina/homocisteína e ciclo do folato (MCCULLOUGH *et al*, 2016).

Nas reações anapleróticas as coenzimas derivadas do complexo B, tais como: B¹, B², B³, B⁶, B⁷ são capazes de, quando associadas a enzimas converter moléculas em precursores do ciclo de Krebs que podem ser utilizadas para gerar energia ou serem convertidos em aminoácidos e glicose para outras vias metabólicas da célula (KENNEDY, 2016).

O objetivo do nosso estudo foi submeter a célula CRKF derivada de rim de felino registrada pelo Instituto Adolfo Lutz com a passagem 194 e pela Coleção Americana de Culturas e Tecidos registrada com passagem CCL-94 ao cultivo com meio de cultura Dulbecco normal e suplementado com concentrações extras de vitaminas do complexo B com o intuito de aumentar a energia, através dos micronutrientes, a fim de aumentar a taxa de mitose da célula obtendo-se a confluência em menos tempo sem alterar as características da célula. Diante da importância da produção de célula é importante que as metodologias de cultivo sejam melhoradas.

Os estudos do metabolismo dos micronutrientes trouxe-nos uma visão aprofundada de como são importantes nas funções das células dos mamíferos para o mecanismo de proliferação. O presente estudo possui as seguintes questões norteadoras: com a suplementação do meio de cultura Dulbecco através das vitaminas do complexo B é possível alcançar melhores resultados na proliferação celular em tempo menor? Caso ocorra, qual a concentração ideal do complexo B para uma cultura saudável? Onde ocorrerá o maior rendimento, com o meio Dulbecco suplementado ou não suplementado?

A partir da suplementação do meio de cultura Dulbecco com as vitaminas do complexo B almejamos alcançar a indução do ciclo mitótico da célula CRFK pelo aumento da energia celular através dos micronutrientes, fomentando a confluência de 100% em tempo menor, otimizando sua produção.

2 JUSTIFICATIVA

Sendo a cultura de célula indispensável para as pesquisas contemporâneas e biotecnológicas, o melhoramento das técnicas de cultivo de células é imprescindível para resultados cada vez mais rápidos e seguros (MIGITA, 2012).

As técnicas de cultivo celular são utilizadas em vários campos da saúde e da pesquisa, como nas áreas de Virologia para estudos de microrganismos virais desde o tropismo do vírus por determinada célula, sua entrada e multiplicação até as consequências dessa infecção, neste caso a patologia desenvolvida no organismo do hospedeiro, um estudo recente de cultura com células VERO (oriundas de rim de macaco) demonstram o tropismo do ZIKA vírus em estudo do mecanismo de infecção e morfologia, havendo a possibilidade de produção de vacinas (BARRETO-VIEIRA *et al*, 2016; DUARTE, 2016).

Na Medicina Regenerativa a cultura de célula é utilizada como tratamento em pacientes com queimaduras extensas, neste caso, se faz uma retirada de tecido saudável do paciente, sendo cultivado e em seguida esse novo tecido é colocado nas queimaduras, os resultados são incomparavelmente melhores em relação aos tratamentos convencionais (ISSAC *et al*, 2012; TORRES e PESSOA, 2018).

Na síntese de Vacinas Virais, as técnicas de cultura de células são utilizadas em larga escala para produção de vacinas virais. Esse método de produção é utilizado tanto em vacinas virais para animais, bem como, para produção de vacinas para humanos. Atualmente existem muitas linhagens celulares que são utilizadas para produção de vacinas, sendo grande a demanda, pois as células eucarióticas possuem um processo de produção complexa, e portanto, quanto mais seguro e rápido o processo produtivo for, melhores serão os resultados (BOUSADA E PEREIRA, 2017).

Áreas de pesquisas como Citologia, Biologia Molecular e Genética utilizam-se do método de cultivo celular para realizar testes e estudos de distúrbios como defeitos genéticos, comportamento *in situ* das alterações provocadas por patologias genéticas e suas progressões *in vitro*. Em seguida estes testes são realizados *in vivo* caso haja necessidade, seja em animais ou em seres humanos; na Citologia é necessário para o estudo das alterações morfológicas dos cromossomos, principalmente em aconselhamento genético; em Biologia Molecular, a bioenergética da célula é estudada molecularmente em situações patológicas através da eletroforese e proteína C reativa em tempo real (RT-PCR). Neste campo, estudos são extremamente necessários para avaliação das patologias e das condições das células em sua fisiologia normal.

Os estudos são abrangentes na Bioquímica e Fisiologia celular, sendo importantes no conhecimento do mecanismo normal da célula, bem como em situações patológicas. Os estudos são necessários para mapear as alterações causadas por doenças que acometem os seres vivos, sendo necessário o acompanhamento *in vitro* de todos esses mecanismos.

Estudos de novos fármacos, principalmente, associadas a novas doenças são necessários teste *in situ* para avaliar a ação da nova substância a partir da fisiologia celular, e sendo indispensável a cultura da célula para a realização desses testes (LEME, 2016).

Diante do exposto, fica clara a necessidade de estudos e pesquisas no que se referem ao melhoramento das técnicas de cultura celular, pois, as células são importantes para pesquisas em todas as áreas das ciências moderna e da Biotecnologia.

Os estudos são abrangentes na Bioquímica e Fisiologia celular sendo importantes no conhecimento do mecanismo normal da célula, bem como, em situações patológicas os estudos são necessários para mapear as alterações causadas por doenças que acometem os seres vivos, sendo necessário o acompanhamento *in vitro* de todos esses mecanismos.

Estudos de novos fármacos, principalmente, associadas a novas doenças são necessários teste *in situ* para avaliar a ação da nova substância a partir da fisiologia celular, sendo indispensável a cultura da célula para a realização desses testes (LEME, 2016).

Diante do exposto, fica clara a necessidade de estudos e pesquisas no que se referem ao melhoramento das técnicas de cultura celular, pois, as células são pertinentes para pesquisas em todas as áreas das ciências moderna e da Biotecnologia.

3 OBJETIVO

Avaliar o potencial proliferativo da célula CRFK em cultura estática com meio de cultura Dulbecco (DEMEM) suplementado e não suplementado com as concentrações das vitaminas do complexo B.

Avaliar o potencial proliferativo da célula CRFK em cultura estática com meio de cultura Dulbecco (DEMEM) suplementado e não suplementado com as concentrações das vitaminas do complexo B.

3.1 Objetivo específicos

- Avaliar o processo reprodutivo das células CRFK submetida a várias concentrações de vitaminas do complexo B;
- Identificar qual será a concentração mínima necessária para a suplementação do meio Dulbecco comparando com a célula CRFK que não receberá esse tratamento;
- Analisar a confluência da monocamada da célula CRFK a cada 24, 48 e 72 horas após ser submetida em concentrações de vitaminas do complexo B;
- Comparar a mesma célula cultivada em meio Dulbecco não suplementado com as concentrações extras de vitaminas, correlacionando com tempo que a monocamada levará para atingir a confluência de 100%;
- Apontar se há melhores rendimentos tanto da célula que receberá o tratamento, quanto da célula igualmente cultivada sem o tratamento;
- Realizar contagem da célula CRFK no hemocitômetro de Neubauer para confirmar o crescimento e viabilidade da cultura celular.

4 REVISÃO DE LITERÁRIA

4.1 Caracterização e histórico do cultivo de células *in vitro*

Para ALVES e GUIMARÃES [2011 ou 2012] (p. 215) cultivo de célula consiste em isolar determinada célula *in vitro* mantendo algumas características morfofuncionais originais, em recipiente asséptico com meio de cultura que viabiliza a nutrição e fomenta o ciclo mitótico de determinada linhagem celular (REBELLO, 2014). Segundo MIGITA (2012), a cultura de células pode ser classificada em um processo que consiste em manter as células vivas *in vitro* crescendo em recipiente estéril organizadas, normalmente em garrafas de tamanhos variados ou em placas de cultivo celular.

Para realizar uma cultura de células é necessário levar em consideração as necessidades básicas nutricionais do determinado tipo de célula que está em questão, as condições assépticas, o pH do meio de cultura e a composição gasosa da atmosfera do recipiente de cultura e da estufa (CRUZ, 2009).

Segundo ALVES E GUIMARÃES (2012, p. 215 n precisa colocar o número da página) a cultura de tecidos se iniciou no princípio do século XX com Roux (1885), Harrison (1907), e Carrel (1912), e essa técnica foi desenvolvida como um método para estudos de comportamentos de células eucarióticas fora do organismo que as originou, em um meio ambiente controlado e assépticos, e através da observação diária este pudesse ter um conhecimento maior dessa bioquímica celular.

Os pioneiros na cultura de tecidos desenvolveram essa técnica por curiosidade ou porque queriam provar suas teorias (BARBOSA *et al*, 2015). Em meados do século XX Willian Roux (1885) fez seu primeiro experimento de cultivo de células em salina por duas semanas obtendo êxito por mantê-las vivas fora do organismo original pela primeira vez (MIGITA, 2012).

Durante o século XX o cientista Harrison pesquisava células nervosas de anfíbios, com o intuito de provar sua teoria em que os prolongamentos nervosos eram provenientes da célula nervosa. Todavia, era necessário fazer algo além de observar ao microscópio óptico, levando em consideração as necessidades nutricionais básicas de uma célula, Harrison resolveu isolar uma célula nervosa em uma linfa nutritiva e observar o crescimento e desenvolvimento da mesma. Harrison em seu experimento dessecou o tubo medular de um embrião de sapo e o mergulhou em sua linfa fresca. A linfa coagulou logo em seguida, devido a fibrinas e fatores de coagulação presentes (BRETAS, 2011).

Harrison selou o frasco com parafina, observando este experimento todos os dias. A vantagem da preparação de Harrison era a ausência de necessidade de controle de temperatura, já que os anfíbios são animais ectotérmicos. Esse método ficou conhecido como “gota pendente”. O cientista teve o cuidado de manter as condições assépticas quando vedou com parafina, e insolou a cultura do ambiente externo, sendo que, nessas condições foi possível obter células viáveis por mais de um mês, e o resultado foi um marco para a cultura de células. A partir dos resultados de seu experimento, Harrison pode provar sua teoria em que as fibras nervosas são originadas das células nervosas, e isso foi um divisor de águas tanto no cultivo de células como para medicina neurológica. Estudos posteriores de outros tecidos realizados por outros cientistas como Carrel foram baseados no experimento Harrison (ALVES e GUIMARÃES, [2011 ou 2012] p. 216).

Alexis Carrel se interessou pelo trabalho de cultura de célula publicado por Harrison. Carrel firmou uma parceria com Willian Burrows onde pode realizar vários trabalhos, tais como: cultivar tecido de cães e gatos (não só de embrião, mas, também de animal adulto) Cultivaram também células cardíacas de embrião de galinha e puderam observar o ritmo cardíaco que as células emitiam, quanto a morfologia era de fibroblasto. Para essa cultura Carrel utilizou plasma de galinha, isso lhe permitiu maior tempo de cultura se comparado com o trabalho de Harrison (AMARAL, 2011).

Por fim, em 1951 um médico fisiologista chamado George Gey coletou o primeiro fragmento de tecido humano, como o propósito de cultivá-lo, e posteriormente este fragmento deu origem a Linhagem HeLa que era proveniente de células neoplásicas de uma americana chamada Henrietta Lacks, que por sua vez, era portadora de câncer no colón do útero. Essa célula foi um modelo de estudo de células humanas, principalmente no que se diz respeito ao estudo do mecanismo do câncer. A vacina da poliomielite que acometia crianças na década de 1950 foi criada a partir de células HeLa já que as mesmas são vacinas. A célula HeLa é considerada imortal, é de fácil crescimento *in vitro* (BARBOSA *et al*, 2015).

4.1.1 Histórico da linhagem CRFK

A linhagem CRFK (*Felis catus*, *cat*) é oriunda de rim de felino fêmea, a mesma foi insolada pela primeira vez em 1964 no laboratório de Epidemiologia da Força Área Americana. É classificada morfologicamente como fibroblastos, sendo cultivada como células aderentes, ou seja, células que dependem de ancoragem para realizar o processo proliferativo. Essa linhagem possui 37 cromossomos ($2n - 1$) sendo aneuploide em relação a células somáticas dos felinos *in vivo* que possuem 38 pares de cromossomos (CRANDELL; FABRICANT;

NELSON-REES, 1973). Segundo a ATCC® a linhagem CRFK deve ser cultivada com meio de cultura Earle ou Dulbecco em estufa a 37° C com 5% de tensão de CO₂.

4.1.2 Cultura primária

A cultura de célula primária é caracterizada pela retirada de um fragmento de tecido de um animal, através de técnica cirúrgica. Para a individualização das células, o fragmento tecidual é tratado com enzima tripsina ou método mecânico, para promover a degradação tissular. Após ser desfeito o arranjo tecidual as células individualizadas podem ser cultivadas em placas de cultura ou frascos de cultura em meios de cultura nutritivos em temperatura ideal. As células de cultura primária podem ser de origem oncogênica (células imortais) ou de células não oncogênicas. Essa cultura é heterogênea com células em diferenciação e só irão sobreviver aquelas células com maior capacidade proliferativa e adaptativas ao ambiente (BRETAS, 2011).

4.1.3 Cultura secundária

A cultura de célula secundária é derivada da cultura de célula primária com características parecidas, no entanto, pode haver algumas mudanças em seu genótipo, e por consequência no fenótipo. Geralmente, muitas células ao serem submetidas a cultura secundária perdem características, pois o arranjo que agora fazem no substrato é diferente do tecido que as originou. As células de cultivo secundário são homogêneas definindo características próprias (ALVES e GUIMARÃES, [2011 ou 2012] p. 216).

As células que sobreviveram a ação enzima ou mecânica em seu cultivo primário estabelecem-se para formar uma linhagem celular com características proliferativas superior a cultura primária, para sua sobrevivência essas células aderem ao substrato, podendo ser: vidro ou plástico. A velocidade no crescimento celular aumenta, devido a adaptação ao meio e mudanças em proteínas do ciclo celular que poderá ocorrer com a formação de tal linhagem. Essas células que agora tornam-se homogêneas não vivem infinitamente, pois não são ontogênicas. No entanto, possuem maior capacidade de contornar o processo de senescência (FRESHNEY, 2010).

4.1.4 Modalidades de cultura

A cultura de célula pode ser realizada em modalidades diferentes, tais como: em monocamada, em suspensão ou cultura tridimensional. Tudo irá depender das características das células cultivadas (CRUZ *et al*, 2009).

4.1.5 Cultura de células em monocamada

As culturas de células em monocamada são realizadas com células dependentes de ancoragem, devido a sua necessidade fisiológica de realizar ancoragem para se proliferar. Essas células são oriundas de órgãos duros, e dessa forma a célula necessita manter características de origem. Os fibroblastos são células dependentes de ancoragem, na fase S da mitose as células necessitam está com 90% de aderência no substrato, placas de cultura ou garrafas de cultura (ALBERT *et al*, 2017).

4.1.6 Cultura de células em suspensão

Consiste em cultura de células hematopoiéticas derivadas de tecidos moles e não dependentes de ancoragem para sua proliferação ou cultura de células que se adaptaram a essa modalidade de cultura. São elas: células como os linfócitos, célula BHK 2113.S que sofreu transformação e se adaptou. Essas células necessitam ser constantemente homogeneizadas com auxílio de agitadores e barras magnéticas (CRUZ *et al*, 2009).

4.1.7 Métodos de retiradas das células aderidas

Existe duas formas de retirar células aderidas em frascos de cultura, são elas: método mecânico e método enzimático. O método mecânico consiste em raspagem do tapete ou monocamada celular; no entanto esse método causa lesões às células e acaba perdendo uma quantidade considerável de células ((ALVES e GUIMARÃES, [2011 ou 2012] p. 217 a 218).

Já no método enzimático é utilizado a enzima tripsina na concentração 0,2%, que realiza proteólise dos receptores de membrana que fazem a ligação da célula com a garrafa. Esse método é o mais indicado por permitir melhor individualização sem lizar a célula respeitando o pH e temperatura de 37° C. Além disso, esse método é o mais indicado para uma cultura homogênea que gera melhor individualização celular (CRUZ *et al*, 2009).

4.2 Ciclo celular (mitose)

Para a cultura de célula é primordial que ocorra em um tempo estimado de ciclos de divisão celular. Em mamíferos, o ciclo dura de 12 a 14 horas se não houver interrupções e ambiente favorável. A mitose ocorre em células somáticas dos animais, e é a partir desse evento que o organismo mantém a homeostasia necessária para a realização das reações que promove uma estabilidade no crescimento das células dos eucariotos. Contudo, a mitose é um processo complexo por envolver inúmeras proteínas (enzimas e coenzimas), além de fatores de

crescimento e micronutrientes proveniente de via exógenas (alimentação) e vias endógenas. O equilíbrio desses mecanismos também depende das células vizinhas que emitem sinais positivos e desencadeiam toda cadeia de sinais e reações para que ocorra a divisão celular (ALBERT *et al*, 2017).

4.2.2 Cinases dependentes de ciclinas

Para que ocorra o ciclo celular de forma correta a célula possui um mecanismo molecular que é responsável por desencadear sinais. Estes sinais são mediados pelas proteínas cinases dependentes de ciclinas (CDKs). Esse complexo de enzimas e coenzimas são responsáveis pelas etapas da mitose propriamente dita (ALBERT *et al*, 2004, JORDA *et al*, 2017). No início da fase G1 a CdK liga-se a ciclina D que inicia as reações do ciclo celular. Em seguida CdK se liga à ciclina que é responsável pelo começo da transcrição do DNA; na fase S a CdK se liga à ciclina E dando continuidade à replicação do DNA. A célula alcança a fase G2 com duas cromátides irmãs idênticas, ou seja, todo o genoma replicado (MALUMBRES, 2014).

Na fase G2 a CDK realiza ligação com a ciclina A. Após o DNA ser completamente replicado, a célula entra em mitose propriamente dita quando CdK liga-se à ciclina B. Esse complexo é um dos principais, devido à sua capacidade de realizar inúmeras atividades proteolíticas, tais como: clivagem das proteínas da lâmina que recobre a carioteca (membrana nuclear) liberando os cromossomos que serão condensados pelas condensinas, a M – CdK também está envolvida nos eventos da formação dos fusos mitóticos (BALDASSARE, 2016).

Assim, com os microtúbulos posicionados no fuso mitótico a célula entra na metáfase onde os cromossomos estão no centro da célula. Dessa forma, para que os cromossomos se separem será necessário a clivagem das coesinas (proteínas que ligam as cromátides irmãs). A proteína responsável pela clivagem das coesinas é a enzima separase que está no seu estado inativo; a separase é ativada pelo Complexo Promotor da Anáfase - APC (ubiquitina - ligase) que na presença de M – CdK, sofre fosforilação em seguida a APC liga-se a coenzima Cdc20 formando um complexo ativo que irá clivar a securina. A securina inibe a enzima separase (MALUMBRES, 2014).

As cromátides irmãs são segregadas pela enzima separase que é ativada pela fosforilação da securina. O complexo APC – Cdc20 realiza a ubiquitinação da securina, dessa forma a separase cliva as coesinas e as cromátides irmãs sofrem segregação indo cada uma para polos da célula distintos (VALDESPINO-GÓMEZ *et al*, 2015).

O complexo da M – CdK reorganiza o citoesqueleto e o complexo de Golgi preparando as organelas duplicadas para o evento da citocinese (que consiste na individualização das células filhas). Para que ocorra o fim da mitose, a M – CdK é inativada pelo complexo da APC através da fosforilação da ciclina. Após esse processo a membrana nuclear se forma novamente e os fusos mitóticos são desativados, ocorrendo a citocinese que gera duas células filhas idênticas (BALDASSARE, 2016).

4.2.3 Pontos de controle do ciclo celular

O ciclo celular funciona de forma controlada por um sistema biológico altamente organizado mediado por enzimas e coenzima, além dos micronutrientes que fornecem a porção nutricional para que a célula realize suas atividades (ALBERT *et al*, 2017). Em G1 ocorre o primeiro ponto de checagem para analisar as condições favoráveis para que a célula entre em processo de divisão, e nesse ponto, a célula recebe sinal positivos caso o ambiente esteja favorável. A célula só conseguirá passar desse ponto se houver nutrientes suficientes e necessidade de divisão para regenerações. Em casos de sinais negativos, a checagem é realizada para correção do problema por proteínas especializadas (BALDASSARE, 2016).

No final da fase G2 o segundo ponto de checagem ocorre para analisar as condições favoráveis do ambiente e se o DNA foi completamente replicado. Dessa forma, não ocorrendo a sinalização positiva, o ciclo celular para até que o problema seja solucionado pelas proteínas de controle. Além disso, se não houver nutrientes suficiente o ciclo celular é interrompido. Já no final da mitose, o último ponto de checagem analisa se todos os cromossomos estão ligados ao fuso mitótico para que não haja mutações genéticas (VALDESPINO-GÓMEZ *et al*, 2015).

Os micronutrientes também estão diretamente envolvidos na síntese de DNA e RNA indispensáveis para que ocorra a replicação do DNA e a transcrição do RNA. As vitaminas são extremamente importantes para a geração de energia da célula, e assim fica evidente que quanto mais energia uma célula tem maior são as chances de entrar em divisão celular (NELSON e COX, 2014).

4.2.3 Pontos de controle do ciclo celular

O ciclo celular funciona de forma controlada por um sistema biológico altamente organizado mediado por enzimas e coenzima, além dos micronutrientes que fornecem a porção nutricional para que a célula realize suas atividades (ALBERT *et al*, 2017). Em G1 ocorre o primeiro ponto de checagem para analisar as condições favoráveis para que a célula entre em processo de divisão, e nesse ponto, a célula recebe sinal positivos caso o ambiente esteja

favorável. A célula só conseguirá passar desse ponto se houver nutrientes suficientes e necessidade de divisão para regenerações. Em casos de sinais negativos a checagem é realizada para correção do problema por proteínas especializadas (BALDASSARE, 2016).

No final da fase G2 o segundo ponto de checagem ocorre para analisar as condições favoráveis do ambiente e se o DNA foi completamente replicado. Dessa forma, não ocorrendo a sinalização positiva, o ciclo celular para até que o problema seja solucionado pelas proteínas de controle. Além disso, se não houver nutrientes suficiente o ciclo celular é interrompido. Já no final da mitose, o último ponto de checagem analisa se todos os cromossomos estão ligados ao fuso mitótico para que não haja mutações genéticas (VALDESPINO-GÓMEZ *et al*, 2015).

Os micronutrientes também estão diretamente envolvidos na síntese de DNA e RNA indispensáveis para que ocorra a replicação do DNA e a transcrição do RNA. As vitaminas são extremamente importantes para a geração de energia da célula, assim fica evidente que quanto mais energia uma célula tem maior são as chances de entrar em divisão celular (NELSON e COX, 2014).

4.2.4 Pontos de controle externos

Sinalizações químicas são emitidas por celular vizinha informando a necessidade da entrada da célula no ciclo celular. Também existem os mitógenos como fatores de crescimento que se ligam a receptores de membrana específicos. Os mitógenos são responsáveis por desencadear vias de sinalização intrínseca que promove uma cascata de reações proteicas específicas que agem no DNA aumentando a expressão gênica de proteínas como as cíclicas (ALBERT *et al*, 2017).

4.3 Geração de energia das células através de micronutrientes

Os micronutrientes são extremamente importantes para o metabolismo celular, e sem eles as células entram em *stress* metabólico, no qual pode ocorrer mutações gerando patologias diversas (MCCULLOUGH *et al*, 2016).

As vitaminas do complexo B são compreendidas em oito vitaminas distintas, sendo hidrossolúveis e que desempenham papel chave no metabolismo celular. Além disso, essas vitaminas fazem parte da maioria das reações metabólicas e catabólicas da célula dos eucariotos. Esse complexo funciona como coenzimas que se ligam a outras proteínas (enzimas) para que possam realizar suas atividades, e estão diretamente envolvidos na síntese de DNA e RNA, na metilação do DNA, síntese de precursores de diversas vias metabólicas, síntese de

proteínas de membranas, e também na participação das reações oxidativas para gerar energia livre (KENNEDY, 2016).

A cobalamina B12 e o folato B9 estão ligados diretamente na síntese de DNA e RNA, ou seja, na divisão celular. Quando os níveis de cobalamina e folato estão reduzidos ou são insuficientes na célula o nível de homocisteína (tHcy) aumenta, e isso causa perturbação nas vias metabólicas das células. A cobalamina em níveis insatisfatórios leva ao aumento do ácido metilmalônico, prejudicando assim o ciclo de Krebs. A cobalamina presente na enzima metilmalonil-CoA mutase converte o MMA em succinil-CoA, um intermediário do ciclo de Krebs (quarta reação), e indispensável para a geração de elétrons de hidrogênio utilizados pelas células posteriormente na fosforilação oxidativa (processo esse, que gera energia livre para a célula na forma de ATP) (ULAK, *et al*, 2014).

4.3.1 Processo catabólicos das vitaminas do complexo B

As vitaminas tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3) e ácido pantatênico (B5) são indispensáveis para as reações metabólicas da mitocôndria, tais como: a oxidação do acetil – CoA e fosforilação oxidativa. Uma deficiência nessas enzimas provocaria graves alterações metabólicas podendo levar a célula a apoptose ou a alterações gênicas (NELSON e COX, 2014). As vitaminas do complexo B possuem participação direta na glicólise, no ciclo do ácido cítrico e na cadeia respiratória atuando na transferência de seus elétrons vindo do ciclo de Krebs. Dessa forma, sendo esses processos responsáveis pela geração de energia em forma de trifosfato de adenosina (moeda de energia da célula - ATP), fica claro a extrema importância dessas coenzimas para a divisão da célula (KENNEDY, 2016).

A oxidação de moléculas de glicose, ácidos graxos e aminoácidos dependem de coenzimas, sendo elas do complexo B. Desde a glicólise até a fosforilação oxidativa, processo final do catabolismo da respiração celular, independentemente do percussor sempre irá ocorrer o envolvimento das coenzimas do complexo B (NELSON e COX, 2014).

4.3.1.1 Ciclo do ácido cítrico

Compreende uma gama de reações metabólicas e é considerado o eixo central do metabolismo celular, onde a energia é gerada na forma de ATP. Esse ciclo é composto de oito reações gerando 7 intermediários, todos importantes para a geração de energia e por serem percussores em outras via catabólicas (DEVLIN, 2007).

Ao final da glicólise se obtém duas moléculas de piruvato, entretanto, o piruvato não consegue entrar através da membrana da mitocôndria, devido a existência do grupo carboxila presente na molécula. Para que ocorra a entrada do piruvato no ciclo de Krebs essa molécula precisa ser transformada em acetil-CoA (perdendo o grupo carboxila, através da descarboxilação oxidativa) pelo complexo da piruvato desidrogenase, e que é composto por três enzimas, são elas: piruvato desidrogenase (E^1); diidrolipoil transacetilase (E^2) e diidrolipoil desidrogenase (E^3), contudo esse complexo necessita de co-fatores ou coenzimas para realizar estas reações. As coenzimas que compõem esse complexo são: tiamina pirofosfato - TPP (B^1), niacina - NAD^+ (B^3), riboflavina - FAD^+ (B^2), ácido pantatênico - coenzima A (B^5) e o lipoato que é a única coenzima não originada do complexo B (NELSON e COX, 2014).

As reações da piruvato desidrogenase ocorre em cinco etapas: o piruvato se liga ao complexo da piruvato desidrogenase reagindo com a TPP (trifosfato de tiamina B_1). Em seguida, sofre uma descarboxilação e resulta em um intermediário chamado de hidroxietil. Esse intermediário é transferido do TPP para a lipoamida através da enzima transacetilase, ocorrendo a oxidação da carboxila e a redução da lipoamida. Na terceira reação é necessário a entrada da coenzima A (ácido pantatênico B^5) que se unirá a molécula de acetillipoamida promovendo a formação do acetil-CoA (KENNEDY, 2016).

Assim, a molécula de dihidrolipoamida em seguida sofre redução através da ligação com FAD^+ (B^2) formando lipoamida e $FADH_2$, por fim $FADH_2$, doa seus hidrogênios para NAD^+ (B^3) (forma oxidada), que sofre redução transformando-se em NADH. Após a reação da piruvato desidrogenase a molécula de acetil-CoA entra no ciclo do ácido cítrico e os hidrogênios gerado irão para a cadeia respiratória (NELSON e COX, 2014).

Segundo DEVLIN, 2007 na junção a reação da molécula de oxalacetato ao acetil-CoA é realizada pela enzima citrato sintase onde ocorre hidrólise liberando uma molécula de água e a CoA (B^5) essa reação é irreversível, sendo um ponto de controle da célula. Na segunda não há envolvimento de vitaminas, é uma reação reversível, porém não menos importante, a molécula de citrato se transforma em isocitrato pela ação da enzima aconitase hidratase adicionando uma molécula de água no cis-aconitato. Na terceira reação o isocitrato irá se converter em α -cetoglutarato pela enzima isocitrato desidrogenase e coenzima NAD^+ que se converterá em $NADH + H$, nessa reação também ocorre a perda de uma molécula de CO_2 , sendo uma reação reversível (KENNEDY, 2016).

A oxidação do α -cetoglutarato em succinil-CoA ocorre mediante a presença do complexo multienzimático α -cetoglutarato desidrogenase. Esse complexo é idêntico ao da piruvato desidrogenase, onde é composto por três enzimas (E^1 , E^2 e E^3) e cinco coenzimas (B_1 ,

B², B³, B⁵ e lipoato), a única diferença entre o complexo da piruvato desidrogenase e da α -cetoglutarato desidrogenase é que há uma sequência distinta de aminoácidos na enzima E¹, permitindo a ligação da α -cetoglutarato, no entanto, as reações são iguais. A quarta reação é um segundo ponto de controle do ciclo de Krebs, sendo irreversível e dependente das quatro coenzimas do complexo B e lipoato, os produtos gerados são: uma molécula de CO₂ e NADH+H. A B⁵ fica ligada na molécula formando succinil originando a succinil-CoA (MARTÍNEZ-REYES *et al*, 2016).

Na quinta reação ocorre a conversão de succinil-CoA em succinato mediada pela enzima succinil-CoA sintase. A molécula de CoA ligada ao succinil é hidrolisada liberando energia suficiente para formar uma molécula de trifosfato de guanina (GTP). Os produtos provenientes dessa reação são: GTP e CoA-SH, ou seja, a B⁵ sai da reação (SHARPLEY R. M.N.S *et al*, 2017).

Na próxima reação succinato é convertida em fumarato pela enzima, succinato-desidrogenase, onde FAD⁺ é utilizada como coenzima transportando hidrogênio formando FADH² através do centro de ferro-enxofre, sendo uma reação dependente de B² e reversível. Na reação seguinte a molécula de fumarato sofre hidratação através da enzima fumarase que transfere uma molécula de água para o fumarato convertendo-o em malato (MARTÍNEZ-REYES *et al*, 2016; SHARPLEY R. M.N.S *et al*, 2017).

Na oitava e última reação a enzima malato desidrogenase ligada ao NAD catalisa a ligação do malato em oxaloacetato, dessa forma, a molécula de oxaloacetato é regenerada novamente, pronta para mais uma volta no ciclo de Krebs ou para ser utilizado em outras vias metabólicas da célula. Nessa reação é gerado moléculas de hidrogênio que são transportadas para a cadeia respiratória por B³ (MARTÍNEZ-REYES *et al*, 2016).

4.3.1.2 Fosforilação oxidativa

Segundo NELSON e COX (2014), a fosforilação oxidativa ou cadeia respiratória ocorre na mitocôndria, sendo a parte final do metabolismo para a geração de energia livre na célula em forma de ATP. A fosforilação oxidativa é composta de 5 complexos, sendo o primeiro complexo onde NADH² lança seus elétrons e o complexo II onde FADH² libera seus elétrons transportados do ciclo de Krebs. Os elétrons, uma vez dentro dos complexos serão transportados pelas quinonas e citocromos até o quarto complexo, e no quinto é onde ocorre a produção do ATP. Esse processo ocorre mediante a ação das vitaminas B² e B³ que carregam hidrogênios e elétrons do ciclo do ácido cítrico para a cadeia respiratória, e esse processo ocorre na

mitocôndria nos eucariotos. A molécula de O_2 sofre redução a H_2O pela doação de moléculas de hidrogênio do $FADH_2$ e $NADH_2$ (DEVLIN, 2007).

O NAD^+ ou $NADP^+$ nas suas formas oxidadas podem sofrerem redução quando carregam elétrons tornando-se $NADH_2$ e $NADPH_2$. O NAD ou $NADP$ estão diretamente envolvidos com as enzimas desidrogenases realizando reações reversíveis. O $NADH$ em sua forma reduzida participa de processos catabólicos, ou seja, na oxidação de moléculas, já o $NADPH$ participa de reações anabólicas na construção de grandes moléculas a partir de moléculas precursoras (MARTÍNEZ-REYES *et al*, 2016).

As flavoproteínas são FMN E FAD são fortemente ligados, o nucleotídeo da flavina liga-se aos elétrons originando $FADH_2$ ou FMN. O transporte de elétrons pelo FAD ocorre devido a poder oxidativo dessa molécula. Ao final do processo de geração de energia se obtém 32 moléculas de ATP, para ser utilizada pela célula em inúmeras reações. Dessa forma, o processo de produção de energia é concluída sendo vital para a homeostasia celular. Sem a geração de energia a célula entraria em apoptose (SHARPLEY R. M.N.S *et al*, 2017).

4.3.1.3 Piridoxina

A piridoxina é conhecida como vitamina B6, existe três vitâmeros dessa vitamina, são eles: piridoxina (encontradas nos vegetais), piridoxal e piridoxamina (derivadas de alimentos de origem animal), todas são oriundas da piridina. As três formas da piridoxina são utilizadas como precursoras para a forma ativa da vitamina: a coenzima piridoxal-fosfato (SCHIEFERDECKER *et al*, 2016).

A B6 é uma coenzima utilizada no ciclo da metionina utilizada na conversão de homocisteína a α -cetoglutarato. Essa vitamina associa-se a cistationina beta sintase e cistationina gama-liase para realizarem essas reações. O α -cetoglutarato é um precursor importante do ciclo do ácido cítrico, indispensável para a geração de energia. A B6 é necessária para a de síntese de aminoácidos e geração de energia, estando envolvida no ciclo do folato (DEVLIN, 2007).

4.3.1.4 Biotina

A biotina (B7) $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ é uma vitamina do complexo B que está envolvida em reações anapleróticas (ela faz parte de um conjunto de moléculas envolvidas em reações anabólicas para que não falte moléculas precursoras do ciclo de Krebs). A B7 é carreadora de carboxil ligada covalentemente atuando como coenzimas de cinco enzimas que realizam

carboxilação nas células, são elas: piruvato carboxilase I (ACCI); acetil-CoA carboxilase II (ACCII); 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (MCC); propionil-CoA carboxilase (PCC). A B7 tem participação sinalização intracelular, regulação epigenética e faz parte da estrutura das cromátides irmãs do DNA (LARA *et al*, 2014; CHIEFERDECKER *et al*, 2016).

Em reações envolvendo a piruvato carboxilase, segundo NELSON e COX (2014), a biotina transporta moléculas de um carbono. Para que ocorra essa reação o grupo carboxila são ativados promovendo a quebra do ATP, tornando possível a ligação da molécula de CO₂ a B7 que por sua vez encontra se ligada covalentemente a enzima piruvato carboxilase

No ciclo de Krebs, a B7 possui papel importante, pois, para converter a molécula de piruvato a B7 une-se a enzima piruvato carboxilase e converte piruvato em oxalacetato. Mediante a níveis baixos do oxaloacetato na mitocôndria para que o ciclo do ácido cítrico não pare (KENNEDY, 2016).

A biotina possui papel fundamental no metabolismo celular quando associada a enzima MCC para catabolizar o aminoácido leucina (essencial); e estando na presença de PCC participa do metabolismo de colesterolis ácidos graxos e colesterolis (LARA *et al*, 2014).

4.3.1.5 Ácido fólico

O ácido fólico C₁₉H₁₉N₇O₆ (B⁹) é uma vitamina do complexo B hidrossolúvel que está envolvido em vários processos catabólicos e metabólicos das células. Essa vitamina é indispensável para a proliferação celular, pois a mesma está envolvida na síntese de DNA, RNA e algumas proteínas. Todas essas vias geram moléculas primordiais para a vida da célula (FONTES, 2015).

Essa vitamina é constituída por um anel pteridina ligado a um ácido p-aminobenzoico e a um ou mais ácidos glutâmicos. Os subtipos de vitaminas encontradas são determinados pelo total de resíduos de glutamato, conhecidos como folato (pteroilpoliglutamatos) ou ácido fólico (ácido pteroilmonoglutâmico). As formas ativas do folato no organismo são o 5-metiltetra-hidrofolato e 5,10-meteniltetra-hidrofolato convertidos pela enzima metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR) (SCHIEFERDECKER *et al*, 2016).

Segundo PADMANABHAN *et al*, (2013) o ácido fólico é um doador de grupos de metila, estando em sua forma 5-metil THF, seu grupo metil é transferido para homocisteína convertendo-a em metionina por ação da enzima metionina sintase. Assim, a metionina é percussora S-adenosilmetionina que posteriormente doará grupos de metila para a síntese de moléculas de DNA, RNA e proteínas (FONTES, 2015).

A molécula de dihidrofolato é absorvido pela célula, porém para entrar nas vias metabólicas ele precisa ser convertido em tetrahidrofolato, sendo utilizados na formação de pirimidinas ou pode ser convertido na forma de 5,10-metileno-tetrahidrofolato (SCHIEFERDECKER *et al*, 2016).

O 5,10-metiltetra-hidrofolato pode seguir duas vias metabólicas principais, são elas: o primeiro é doar grupo metila sintetizando uracil, posteriormente originando timina que será utilizada na síntese de DNA ou no reparo do mesmo; o segundo caminho é que a molécula de 5-metil THF em presença da enzima MHFR é convertido em 5, 10-metil THF para síntese de DNA, RNA através da ação enzimática da timidilato sintase que resumirá em monofosfato de deoxitimidina (dUMP) e monofosfato de deoxiuridina (dTMP) sendo, posteriormente convertidas em bases nitrogenadas (BASSOLI, 2009).

O 5,10-metil THF pode se convertido em 5-metil THF na presença da enzima serina hidroximetiltransferase associada a B⁶. Em seguida o 5-metil THF doará grupo metis, remetilando homocisteína para metionina na presença de B², B¹² acoplados a enzima MS. A metionina na presença da enzima metionina adenosiltransferase reage com ATP formando SAM (que é um doador universal de grupos metis) (PANIZ, 2015).

4.3.1.6 Ciclo da metionina

A metionina é um aminoácido indispensável para a síntese de proteínas, pois, os ribossomos a reconhece como o código de iniciação de qualquer proteína (AUG), se a metionina não se fazer presente no mRNA, a proteína não poderá ser transcrita, sendo o primeiro aminoácido na cadeia proteica de toda proteína (ALBERT *et al*, 2017).

Para que ocorra a síntese de metionina é necessário o envolvimento de outras vitaminas do complexo, são elas: piridoxina (B₆) que age como coenzima da enzima hidroximetil transferase e que converte tetra-hidrofolato em 5,10-metilenotetra-hidrofolato. No próximo passo o 5,10-metileno THF é convertido em 5-metiltetra-hidrofolato na presença de metilenotetra-hidrofolato redutase associada a vitamina B₂. Em seguida, sob ação enzimática da metionina sintase e cobalamina B₁₂, a homocisteína é convertida em metionina (SCHIEFERDECKER *et al*, 2016).

No ciclo da metionina existe duas principais vias para o metabolismo da metionina, são elas: metionina na presença da enzima metionina adenosil transferase reage (MAT) com ATP sintetizando a S-adenosil metionina que em seguida poderá ser utilizada na metilação de DNA, RNA, lipídeos e proteínas; ou seguir para a segunda via que depende da enzima oxido nítrico

sintase que converterá SAM em S-adenodil-homocisteína (SAH). Dessa forma, a SAH sofrerá hidrólise pela enzima S-adenosil-homocisteína hidrolase (SAHH), e tendo como coenzima a B3 regenerando a molécula de homocisteína. A tHcy pode ter duas vias, ou irá se converter em metionina na presença das enzimas citadas, ou ainda se converterá em cistationina sobre ação da enzima cistationa beta sintase (CBS) associada a vitamina B6. A molécula de cistationa sofrerá ação da enzima cistationa gama liase (CGL), tendo como coenzima a B6, convertendo-a em α -cetoglutarato - molécula percussora do ciclo de Krebs (BASSOLI, 2009; GOMES, 2013).

4.3.1.7 Cobalamina

É uma vitamina do complexo B, em vias catabólicas do metabolismo celular. Contudo, a B₁₂ é sintetizada exclusivamente por microrganismos como as bactérias (adquirida por via exógena), sendo posteriormente convertida em coenzimas ativas são: a metil-cobalamina e a desoxiadenosil-cobalamina, essenciais para o crescimento celular e a replicação (VANNUCCHI e MONTEIRO, 2010).

Dentro da célula a cobalamina sofre ação das redutases, após a redução, pode seguir duas vias metabólicas, sendo elas: na mitocôndria, onde origina a desoxiadenosil-cobalamina, coenzima na qual se une à metilmalonil-CoA mutase, enzima que converte Metilmatonico-CoA em succinil-CoA, um precursor do ciclo de Krebs (reação anaplerótica). O succinil-CoA também é indispensável para a conversão de alguns aminoácidos, tais como: Metionina, valina e isoleucina (VANNUCCHI; MONTEIRO; TAKEUCHI, 2017).

No citosol, onde forma a metilcobalamina, que une se como coenzima a metionina sintase na conversão da homocisteína em metionina no ciclo da metionina, simultaneamente participa do ciclo do folato regenerando a molécula de hidrofolato THF. Dessa forma a B¹² participa de dois ciclos muito importantes no citoplasma (Ciclos da metionina e do ácido fólico) e de reações anaplerótica na mitocôndria para formar succinil-CoA (ULAK *et al*, 2014).

4.4 Reações anapleróticas

As reações anapleróticas são compostas de ações bioquímicas mediadas por enzimas e coenzimas capazes de transformar uma molécula em outra simples para serem utilizadas em outras vias metabólicas distintas. A homocisteína pode ser convertida a α -cetoglutarato essa reação ocorre na presença das enzimas CBS e CGL associadas a B⁷ pode gerar um precursor do ciclo de Krebs (KENNEDY, 2016).

Dependendo da necessidade metabólica da célula o α -cetoglutarato pode ser convertido a succinil-CoA. No primeiro passo sob influência do complexo de α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada acoplado as vitaminas B¹, B², B³ e B⁵, a molécula de α -cetoglutarato é convertido a propionil-CoA, e em seguida a enzima propionil-CoA carboxilase acoplado com B⁷ converte o propionil-CoA em metilmalonil-CoA através da enzima metilmalonil-CoA mutase, que na presença da coenzima B12 o converte em succinil-CoA - intermediário importante do ciclo de Krebs. (SCHIEFERDECKER *et al*, 2016).

Assim, fica claro a importância das coenzimas do complexo B para o eixo central do metabolismo celular, sendo indispensável nas concentrações ideais. A molécula de piruvato, na ausência da molécula de oxaloacetato (molécula primordial para início do ciclo de Krebs), pode ser convertido a oxaloacetato sob ação da enzima piruvato desidrogenase associada à sua coenzima B⁷ célula utiliza-se desse recurso a todo momento (DEVLIN, 2007).

As moléculas de oxaloacetato e α -cetoglutarato que são bastante requisitadas pela célula para serem utilizadas em outras vias metabólicas como precursoras para formação de aminoácidos. O oxaloacetato pode ser transformado pela enzima PEP carboxilase em fosfoenolpirunato, que posteriormente pode ser convertido em glicose ou em aminoácidos, tais como: serina, cistina, glicina, fenilalanina, tirosina e triptofano. Tudo irá depender da necessidade metabólica da célula. Devido a esses fatores é imprescindível manter os níveis das coenzimas na célula para homeostasia metabólica e para proliferação da mesma (ULAK *et al*, 2014).

Dessa forma, fica clara a necessidade do complexo B para o metabolismo das células de mamíferos que é o objetivo do nosso estudo. Com a suplementação do meio de cultura Dulbecco pretendemos aumentar a biodisponibilidade de micronutrientes, consequentemente elevaremos a proliferação celular. Através da ação das vitaminas, tanto na geração de energia a partir do ciclo de Krebs, quanto nas sínteses de DNA, RNA, proteínas, além do metabolismo dos aminoácidos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Métodos de pesquisa

Foram revisados artigos da literatura indexados nas bases de dados Biblioteca Virtual de Saúde (BVS), Science Direct, Scielo (Scientific Electronic Library Online), usando os seguintes critérios: artigos publicados entre 2009 a 2018 e escritos em Inglês, Português e Espanhol. Os descritores utilizados foram: histórico da cultura de célula, técnicas de cultura de células, cultura de células em monocamada, células dependentes de ciclinas, Cdc25, ciclo do ácido cítrico, metabolismo das vitaminas do complexo B, metabolismo da Riboflavina, metabolismo do ácido fólico B⁹, cobalamina B¹², metabolismo da biotina, metabolismo da piridoxina.

5.1.1 Materiais utilizados

As vidrarias que serão utilizadas para a filtração do meio de cultura, stock de vitaminas e cultivo das células nos experimentos serão esterilizadas por calor seco em estufa a 180° C por 3 horas ou calor úmido em autoclave a 121° C por duas horas.

5.1.2 Definição das concentrações das vitaminas do complexo B

Para formular o meio de cultura utilizado para o crescimento das células, é preciso definir as concentrações das vitaminas utilizadas. Para isso, deve-se determinar o estoque das mesmas. Dessa maneira, analisou-se a bula do meio de cultura Dulbecco (DEMEM) e decidiu-se preparar a solução de vitamina nas concentrações de 8 mg/L, 16 mg/L, 32 mg/L e 320 mg/L como concentração adicional se for algo a mais tem que explicar a concentração (Timina, nicotinamida, ácido pantotênico, piridoxina, ácido fólico, cobalamina), com exceção da riboflavina que será adicionada na concentração de 0,8 mg/L, 1,6 mg/L, 3,2 mg/L e 32mg/L e da biotina com as concentrações 14,4 mg/L, 28,8 mg/L, 57,6 mg/ por já estarem na fórmula do meio de cultura em concentrações distintas das outras vitaminas. Os cálculos serão realizados dobrando os valores e chegando-se à concentração ideal do químico para cada cultura de célula, e a última concentração será aumentada em dez vezes mais.

5.1.3 Formulação do meio de cultura e do stock das vitaminas

Na formulação do meio de cultura utilizaremos água deionizada (livre de íons), meio de cultura DMEM e bicarbonato de sódio. Também utilizaremos os seguintes materiais: 2 frascos

schott de 2 litros; barra magnética para auxiliar na homogeneização dos químicos, balança de precisão, espátulas plásticas para pesagem das matérias primas e agitador magnético. Em seguida o meio de cultura será clarificado na capela de fluxo laminar com filtro pressa em capela de fluxo laminar com membrana da Millipore de 0,45 μm (retirando partículas maiores) e filtração com membrana de 0,22 μm (para impedir a passagem de microrganismos, esterilizando o meio de cultura). Este será fracionado em frasco schott de 1.000 ml e passará 72 horas em estufa como teste de esterilidade até o momento do uso.

As vitaminas serão formuladas separadamente do meio de cultura, pois serão preservadas em frasco âmbar por serem fotossensíveis. Todas as vitaminas serão pesadas em balança de precisão com auxílio de espátulas e papel manteiga e em seguida serão colocadas no béquero de vidro com água deionizada sob agitação com barra magnética. Ao final da formulação o *stock* de vitaminas será esterilizado no filtro hidrofílico 0,22 μm com 13 mm de diâmetro (filtro seringa) em frasco âmbar posteriormente estéreis e vedado com tampa de borracha aro 20 cm em capela de fluxo laminar. Após a filtração, os frascos serão identificados e preservados no freezer a -18°C .

5.1.4 Preparação do ambiente de trabalho

As atividades realizadas com materiais estéreis serão em capela de fluxo laminar, em sala com controle de partícula por filtros e unidades de ventilação e controle de pressão da sala é monitora por manômetro.

Antes das atividades, a capela de fluxo laminar será higienizada com detergente neutro a 3% e micropure estéril, em seguida usaremos o álcool a 70% como sanitizante. A limpeza deve ser realizada com movimentos em um sentido único retirado resíduos, e após a limpeza, a luz ultravioleta deve ser ligada por 15 minutos para eliminar esporos de microrganismos. A roupa utilizada para realizar as atividades será esterilizada em autoclave a 121°C por 30 minutos, além das luvas utilizadas serem estéreis.

5.1.5 Preparação do meio de cultura

Para o descongelamento da célula será utilizado um frasco schott de 500 ml, pipetas graduadas, micropure estéril, meio de cultura Dulbecco e antibióticos. Para preparar o meio de cultura no frasco, serão utilizados penicilina (antibacteriano) na concentração de 2%, anfotericina B (antifúngico) a 2%, soro fetal bovino (SFB) na concentração de 10%, tudo será homogeneizado com barra magnética.

5.1.6 Descongelamento da célula

A célula utilizada será a CRFK oriunda de rim de felino registrada com passagem 194 pelo Instituto Adolfo Lutz banco referência e pela ATCC® como CCL-94. A célula que está criopreservada em nitrogênio líquido a -196° C será descongelada em banho maria a 37° C, sendo uma ampola de 3,6 ml de célula que será colocada no frasco de cultura T25 contendo 15 ml de meio de cultura sem a quantidade extra de vitaminas.

Segundo a ATCC® a célula deverá ser descongelada da seguinte forma: A ampola subcultivada (cultura secundária) deve ser imersa no banho maria a 37°C com suaves movimentos de vai e vem, porém cuidadosamente para que a ampola não fique submersa no banho maria evitando contaminações. Quando a célula for totalmente descongelada, a ampola deverá ser limpa com álcool a 70% e tecido estéril para descontaminar a superfície da ampola.

Com a capela de fluxo laminar previamente preparada em área controlada a ampola deve ser aberta e com pipeta estéril, e a alíquota de célula será coletada. Em seguida, as células serão dispersadas no meio de cultura devidamente preparado com SFB, antifúngicos e antibactericida. Após o processo de descongelamento a célula será colocada em estufa a 37° C com tenção de 5% de CO₂.

Serão realizados repiques da célula com 10 % SFB meio de cultura Dulbecco, 2% de anfotericina B e penicilina G potássica de acordo a recomendação da ATCC®, e seguirá com essa metodologia até atingirmos o número de quatro garrafas o que é equivalente a três passagens. Sendo mantido o critério de avaliação apenas da monocamada a cada 24, 48 e 72 horas, e quando a monocamada atingir 100% de confluência repicaremos a células.

5.1.7 Repiques da célula

O repique será realizado da seguinte forma: a célula em estufa será retirada para a capela de fluxo laminar, onde se desprezará o meio saturado em recipiente estéril pelo lado oposto da monocamada para evitar desprendimento celular. O tapete celular deverá ser lavado com salina tamponada com pH 7,0 PBS para a retirada de resíduos do SFB, pois existe proteínas que inibe a enzima tripsina que será utilizada para quebras proteolíticas dos receptores de adesão da célula com a garrafa.

A tripsina irá clivar as cadeias polipeptídicas nos radicais lisil-arginil originando terminações de clivagem éster e amida. Ocorrendo essa reação o citoesqueleto da célula fica desorganizado, pois a matriz extracelular é clivada nessa reação, assim a célula não consegue se ligar ao substrato por um período pequeno, pois seus receptores de superfície celular estão

desorganizados, para que ocorra nova aderência a célula precisa reorganizar seu citoesqueleto. O objetivo do método enzimático é individualizar as células sem lisá-las obtendo uma cultura mais homogênea para melhores resultados (ALVES e GUIMARÃES, [2011 ou 2012] p.230).

5.1.8 Cálculo para quantificar a célula

O método mais utilizado para quantificar a célula é com a câmara de Neubauer. O método de quantificação serve para expressar o resultado do crescimento de uma determinada célula em cultivo, ou seja, é para obter o número de células por mL presente em cada garrafa de cultura. O hemocitômetro de Neubauer é dividido em nove quadrados com 1 mm² de área. Na contagem celular só serão utilizados os quadrantes maiores, sendo realizada em três dos quatro quadrantes (tirando a média). A contagem é feita em L, e as células que se encontrarem fora dos quadrantes não serão consideradas no momento da contagem (ALVES e GUIMARÃES, [2011 ou 2012] p. 234 a 235).

Contudo, para realizar a contagem é necessário utilizar uma lamínula por cima do hemocitômetro, com objetivo de criar um espaço de 0,1 mm³ para ser preenchido com a suspensão da célula diluída no corante. Após o desprendimento da célula será retirada 0,5 ml de célula e diluiremos a mesma no corante, em 4 ml de eosina amarelada com diluição de 1:8. Para realizarmos os cálculos será necessário levarmos em consideração os valores encontrados nos seis quadrantes da câmara, somá-los e divide-los por seis, dessa forma obteremos o valor da média.

O valor da média será multiplicamos pelo fator de correção da câmara e em seguida pela diluição do corante com a célula. Dessa forma obteremos o número das células por mL. As células que estiverem fora dos limites dos quadrantes não serão consideradas e também as grandes róseas não serão consideradas, pois estão mortas ou em casos das células grandes, provavelmente estarão com alterações genéticas, e devido a esse fato serão excluídas.

Esquema de contagem

$$\frac{Q1 + Q2 + Q3 + Q4 + Q5 + Q6}{6} \times 10^4 \times \text{fator de diluição} = \text{nº de células / ml}$$

5.1.8.1 Ação do corante eosina amarelada na célula

A eosina é um corante utilizado para testar a viabilidade de células em cultura, além da eosina o azul de tripan é bastante usufruído. A ação da eosina na célula morta é caracterizada

pela coloração rósea das mesmas, de contra partida, as células vivas são visualizadas refringentes possibilitando a quantificação das culturas em células por ml.

A eosina é um corante com característica ácida, sendo assim, cora apenas o citoplasma das células mortas, pois, quando as células entram em apoptose, devido a diversos fatores sua membrana é desintegrada pela digestão das suas proteínas, dessa forma, a eosina entra por dentro da membrana citoplasmática e atinge o citoplasma que por possuir pH básico se deixa corar pela eosina.

5.1.8.2 Condições do cultivo

Todas as células submetidas ao experimento serão cultivadas sob as mesmas condições, tais como: temperatura 37° C com controle de temperatura pelo termo higrômetro (aparelho capaz de medir a temperatura máxima e mínima), e essa temperatura será verificada três vezes ao dia. O pH do meio de cultura deve estar entre 6,4 a 6,6.

5.1.8.3 Diluições realizadas no experimento

As diluições serão realizadas para todas as concentrações de vitaminas que as células serão submetidas, a célula que não receberá as concentrações extras de vitaminas (cultivada, apenas com o meio Dulbecco) também será submetida as mesmas diluições a fim de compararmos os resultados seguindo as mesmas variáveis para a fidedignidade do experimento e se haverá melhor rendimento da cultura suplementada ou não.

As diluições serão realizadas fundamentadas na bula do meio Dulbecco, iremos dobrar as concentrações das vitaminas por três vezes e por último realizaremos um teste com a última concentração aumentaremos dez vezes mais a fim de identificar qual será a concentração mínima necessária para obtermos melhores resultados levando em consideração o custo benefício. Os valores da concentração de vitamina respectivamente encontram-se em tabelas no apêndice.

5.2 Testes com a cobalamina

Os testes realizados com concentrações extras de vitaminas serão feitos separadamente, devido ao fato, que no meio DMEM não contém essa vitamina. No entanto a partir dos estudos sobre as vitaminas observou-se que a cobalamina é muito importante para a proliferação celular por estar envolvida diretamente na metilação do DNA, RNA, síntese proteica e reações anapleróticas da célula.

Diante de tanta importância decidiu-se que submeteremos o meio de cultura suplementado com as outras sete vitaminas (B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9) que estarão em testes incluindo a cobalamina previamente identificada com os valores de contração que serão acompanhadas. O acompanhamento da célula cultivada apenas com o meio Dulbecco seguirá os mesmos critérios de análises.

5.2.1 Critérios para a análise das variáveis

Esse método é baseado na exclusão de células coradas pela eosina que, consequentemente estão mortas, assim, os rendimentos da célula serão confirmados pela contagem da célula no hemocitômetro de Neubauer e pelas análises da monocamada celular realizada a cada 24, 48 e 72 de cultivo. A morfologia celular deve estar normal em todas as diluições, pois teremos o controle positivo da cultura.

5.3 Análises dos dados

Os resultados obtidos serão analisados pelo programa Excel (para tabulação dos dados) e GraphPadPrism para análise estatística dos mesmos. Utilizaremos a metodologia de gráficos para expressar os achados distinguindo os testes de acordo com a método utilizado, tais como: faremos os gráficos da curva de crescimento da célula sob o tempo de cultivo; gráfico para esclarecer o tempo de diluição sob rendimento.

5.4 Riscos

Os riscos que o experimento oferece em relação as condições de crescimento celular, podendo não ocorrer uma resposta positiva dos testes, devido a vários fatores que podem interferir nas condições do cultivo celular, tais como: temperatura, pH do meio. No entanto é provável que haja uma resposta positiva, levando em consideração a eficiências e função dos químicos utilizados no estudo.

5.4.1 Benefícios

O presente estudo tem como principais objetivos: abrir novos horizontes no que se diz respeito ao cultivo de células, em relação a qualidade do meio de cultura e de como ele pode ser um fator determinante no processo de cultura celular; A abordagem das necessidades nutricionais da célula em cultivo e de como esse processo pode ser melhorado com a atualização das suas metodologias empregadas na produção de células. Diante da

importância da produção de célula são indispensáveis a atualização das técnicas metodologias de cultivo celular, assim espera-se contribuirá para a comunidade científica e para a área da biotecnologia.

5.5 Resultados esperados

Com a suplementação do meio de cultura Dulbecco espera-se alcançar melhores resultados na produção de células em larga escala para fins diversos, tais como: produção de vacinas virais; produção de anticorpos; pesquisas de novas doenças; realização de estudos em relação aos mecanismos celulares; medicina regenerativa. Almeja-se melhor reprodução (aumento do potencial proliferativo) a partir da suplementação com as vitaminas do complexo B utilizando uma quantidade mínima necessária para obter esses resultados.

6 CRONOGRAMA

ANO 2018						
SEMESTRE		2018.2				
Atividades	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
Escolha do orientador	X					
Escolha do Co-orientador	X					
Escolha do tema	X					
Pesquisa de artigos	X	X	X	X	X	
Encontros com orientador e Co-orientador	X	X	X	X	X	X
Definição do problema		X				
Definição dos objetivos		X				
Introdução		X				
Revisão de literatura		X	X	X	X	
Metodologia			X	X	X	
Orçamento				X		
Cronograma				X		
Revisão e correção do texto					X	
Entrega do projeto de pesquisa / parte I					X	
Apresentação do projeto de pesquisa						X

ANO 2019						
SEMESTRE		2019.1				
Atividades	Jan	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.
Pesquisa de novos artigos	X	X	X	X	X	
Encontros com orientador e Co-orientador	X	X	X	X	X	X
Formulação do meio de cultura	X	X	X	X		
Formulação do stock de vitaminas	X	X	X	X		
Início dos testes com a célula	X	X	X	X		
Análises dos resultados					X	X

ANO 2019						
SEMESTRE		2019.2				
Atividades	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
Pesquisa de novos artigos	X	X	X	X	X	
Encontros com orientador e Co-orientador	X	X	X	X	X	X
Formulação do meio de cultura	X	X	X	X		
Formulação do stock de vitaminas	X	X	X	X		
Início dos testes com a célula	X	X	X	X		
Análises dos resultados					X	X

ANO 2020						
SEMESTRE		2020.1				
Atividades	Jan	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.
Encontros com orientador e coorientador	X	X	X	X	X	
Pesquisa de novos artigos	X	X	X	X	X	
Revisão da metodologia			X	X		
Resultados e discussões		X	X	X	X	
Conclusão					X	X
Defesa do projeto						

7 ORÇAMENTO

7.1 Materiais utilizados e despesas do projeto

MATERIAIS PERMANENTES DE LABORATÓRIO			
Itens	Quantidade	R\$ Valor / Unidades	R\$ Valor Total
Vidrarias			
Pipetas graduadas 10 ml	20	15,25	305,00
Pipetas graduadas 5 ml	10	15,25	152,50
Pipetas pauster	20	0,30	6,07
Hemocitômetro de Neubauer	01	350,00	350,00
Lamínula	1 caixa	5,23	5,23
Frascos âmbar	10	5,50	55,00
Frasco Schott	04	42,90	171,60
Becker de vidro 200 ml	04	18,99	75,96
Equipamentos			
Banho maria	01	890,00	890,00
Botijão de nitrogênio líquido para criopreservação	01	5.000,00	5.000,00
Capela de fluxo laminar	01	8.000,00	8.000,00
Luz ultravioleta (UV)	01	78,88	78,88
Pipetador automático	01	3.008,50	3.008,50
Microscópio óptico invertido	01	4.000,00	4.000,00
Balança eletrônica de precisão	01	129,90	129,90
Câmara-fria	01	20.000,00	20.000,00
Agitador magnético	01	585,90	585,90
Estufa com 5% de tensão de Co2	01	6.000,00	6.000,00
Estufa para esterilização e secagem	01	7.525,00	7.525,00
Freezer – 80° C	01	4.258,00	4.258,00
Freezer – 18° C	01	3.139,99	3.139,99
Seladora	01	1.529,00	1.529,00
pHmetro	01	2.158,99	2.158,99
Condutivímetro	01	1.221,70	1.221,70
Autoclave	01	20.000,00	20.000,00
Filtro pressa pequeno	01	299,99	299,99
EPI's prementes			
Macacão	10	20,00	200,00
Outros materiais não laboratoriais			
Impressora	01	300,00	300,00
Notebook	01	1.500,00	1.500,00

MATERIAIS DE CONSUMO LABORATORIAL			
Itens	Quantidade	R\$ Valor / Unidades	R\$ Valor Total
Reagentes químicos			
Penicilina	02	20,00	40,00
Anfotericina	02	18,00	36,00
Meio de cultura Dulbecco	500 g	600,00	600,00
Água deionizada	10.000 ml	2,59	25,90
Tiamina (B ₁)	10 g	0,73	7,30
Riboflavina (B ₂)	10 g	0,80	8,00
Nicotinamida (B ₃)	10 g	1,00	10,00
Ácido pantatênico (B ₅)	10 g	0,80	8,00
Piridoxina (B ₆)	10 g	0,93	9,30
Biotina (B ₇)	10 g	0,73	7,30
Ácido fólico (B ₉)	10 g	3,63	36,30
Cobalamina (B ₁₂)	10 g	1,30	13,00
Nitrogênio líquido	10.000 ml	12,00	120,00
Dimetilsufóxido (DMSO)	1.000 ml	121,00	121,00
Eosina amarelada	0,4 mg	0,42	4,20
Outros materiais laboratoriais			
Micropure	100	2,00	200,00
Membranas Millipore 0,45 µm	04	15,76	63,04
Membranas Millipore 0,22 µm	04	20,00	80,00
Filtro de seringa 0,22 µm	04	5,26	21,04
Grau cirúrgico	01	48,98	48,98
Lamínulas	01 caixa	0,24	12,00
Seringas 1 ml	40	0,36	14,40
Papel crepado para esterilização	50	0,21	10,5
Bobina de papel de manteiga	02	3,95	7,90
Frascos para cultura de células (T ₂₅)	50	5,40	270,00
Pulverizadores	02	4,50	9,00
Bobina papel alumínio	05	2,00	10,00
Mangueiras de silicone	10 m	2,00	20,00
EPI's descartáveis			
Luvas estéreis	100 pares	2,78	278,00
Máscaras	100	0,15	15,00
Toucas	50	0,18	9,00
Outros materiais não laboratoriais			
Canetas esferográficas	05	0,89	4,45
Borrachas brancas	02	0,40	0,80
Caderno	01	9,99	9,99

SERVIÇOS TERCEIRIZADOS			
Itens	Quantidade	R\$ Valor / Unidades	R\$ Valor Total
Xeros	150	0,20	30,00
Encadernação	02	2,50	5,00
Impressão	02	0,50	20,00

OUTROS SERVIÇOS			
Item	Quantidade	R\$ Valor / Unidades	R\$ Valor Total
Gasolina	50 L	4,45	222,5

CUSTOS DAS PESQUISA			
Materiais prementes	Materiais de consumo	Serviços terceirizados	Outros serviços
R\$ 90.766,91	R\$ 11.130,40	R\$ 55,00	R\$ 222,50
TOTAL DE TODAS AS DESPESAS: R\$102.154,81			

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. A; GUIMARÃES, A. C. R. In: Cultivo Celular. (Org.). *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, [2011 ou 2012]. p. 216-253.
- ALBERT. B. *et al.* *Biologia Molecular da Célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- AMARAL J. B. *et al.* A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Revista Naturalia**. Rio Claro, v. 34, p. 1-20, 2011.
- BALDASSARE, JJ. Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases. **Encyclopedia of Cell Biology**. Nova York, v.3, p. 423-431, 2016.
- BARRETO-VIEIRA *et al.* Ultrastructure of Zika virus particles in cell cultures. **Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 8, p. 532-534, 2016.
- BARBOSA, B. S. *et al.* Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. São Paulo, v. 9, n. 2, p. 334-347, 2015.
- BASSOLI, B. K. *Ácido fólicos efeitos paradoxais na promoção da hepatocarcinogênese*. 2009. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos Área de Nutrição Experimental) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BRETAS, R. M. *Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais*. 2011. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- BOUSADA G. M; PEREIRA, E. L. PRODUÇÃO DE VACINAS VIRAIS PARTE I: engenharia de bioprocessos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 15, n. 1, p. 309-332, 2017.
- CARVALHO A. C. A. *et al.* Estratégias regenerativas da bioengenharia tecidual e aspectos éticos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 9, n. 1, p. 20-27, 2010.
- Coleção Americana de Culturas e Tecidos – ATCC. Credible Leads to Incredible. 2017 disponível em: <<https://www.atcc.org/en.aspx>>. Acesso em: 08 de ago. de 2018.
- CRANDELL, R. A.; FABRICANT, C. G.; NELSON-REES W. A. Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*felis catus*) renal cell line (CRFK). **Revista Society for In Vitro Biology**. São Paulo, v. 9, n. 3, p. 176-185, 1973.
- CRUZ, M. *et al.* Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. Coimbra, v. 14, n. 4, p. 669-682, 2009.

DEVLIN, T. M. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*. 6. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2007.

DUARTE, L. L. *Cultura de Células Embrionárias de Carrapatos do Gênero Rhipicephalus para Cultivo de Ehrlichia Canis e Anaplasma Marginale*. 2017. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses) – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FRESHNEY, I. R. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 6. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2010.

GOMES, T. D. *Efeitos Da concentração de metionina na dieta durante o período pré e pós-natal sobre o estress oxidativo, a instabilidade genômica e expressão de RNAm Matal, Bhmt e Cbs em camundongos*. 2013. Tese (Programa de Pós-Graduação em toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ISAAC, C. *et al.* Construção de substituto da pele composto por matriz de colágeno porcino povoada por fibroblastos dérmicos e queratinócitos humanos: avaliação histológica. **Revista Brasileira de Cirurgias Plásticas**. São Paulo, v. 27, n. 4, p. 503-508, 2012.

KENNEDY, D. O. Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy—A Review. **Revista Nutrients**. Newcastle upon Tyne, v. 68, n. 8, p.1-29, 2016.

LARA, M. T. *et al.* Deficiência de biotinidase: aspectos clínicos, diagnósticos e triagem neonatal. **Revista Medicina de Minas Gerais**. Belo Horizonte, v. 24, n. 3, p. 388-396, 2014.

LEME, J. *Cultivo de célula bhk 21 c13 em meio de cultura livre de soro fetal bovino adaptado para crescimento em suspensão*. 2016. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-farmacêutica) – Departamento de Tecnologia Bioquímico-farmacêutica, (Programa de Tecnologia Bioquímico-farmacêutica) Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARTÍNEZ-REYES *et al.* Deficiência de biotinidase: TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions. **Revista CellPress**. Dalas, v. 61, n. 7, p. 1-11, 2016.

MALUMBRES, M. Cyclin-dependente Kinases. **Revista Genome Biology**. Madrid, v. 15, n. 6, p. 1-10, 2016.

MCCULLOUGH, L. E. *et al.* Maternal B vitamins: effects on offspring weight and DNA methylation at genomically imprinted domains. **BioMed Central – Clinical Epigenetics**. Chapel Hill, v. 8, n. 8, p.1-11, 2016.

MIGITA, A. N. “*Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares*”. 2012. Monografia (Graduação em Ciências Biomédicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

NELSON, D. L.; COX, M. M. B. *Princípios da Bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

PADMANABHAN, N. *et al.* Mutation in Folate Metabolism Causes Epigenetic Instability and Transgenerational Effects on Development. **CellPress**. Cambridge, v. 08, n. 68, p.81-93, 2013.

PANIZ, C. *Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm dos genes de DHFR, MTHFR. Interferon- γ , $tnf-\alpha$ e interleucina-8, e na citotoxicidade das células NK.* 2015. Tese (Programa de Pós-Graduação em Farmácia) – Área de Análises Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RABELLO, M. A. *Fundamentos da Cultura de Tecidos e Células Animais*. 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2014.

SHIEFERDECKER, M. E. M. *et al.* *Vitaminas, Minerais e Eletrólitos – aspectos fisiológicos, nutricionais e dietéticos*. 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016.

SHARPLEY R. M.N.S *et al.* Nuclear Localization of Mitochondrial TCA Cycle Enzymes as a Critical Step in Mammalian Zygotic Genome Activation. **Revista CellPress Gerais**. Belo Horizonte, v. 168, n. 9, p. 210-223, 2017.

TORREA, C. B. B.; PESSOA, W. S. Células-tronco pluripotentes induzidas e edição de genes: avanços tecnológicos da pesquisa em medicina regenerativa e terapia gênica. *Jornal Interdisciplinar de Biociências*, Terezina, 21 fev. 2018. v.3, n.1, p. 52-56.

ULAK, M. *et al.* Cobalamin and Folate Status in 6 to 35 Months Old Children Presenting with Acute Diarrhea in Bhaktapur, Nepal. **journal.pone.0090079**. Melbourne, v. 09, n. 3, p.1-10, 2014.

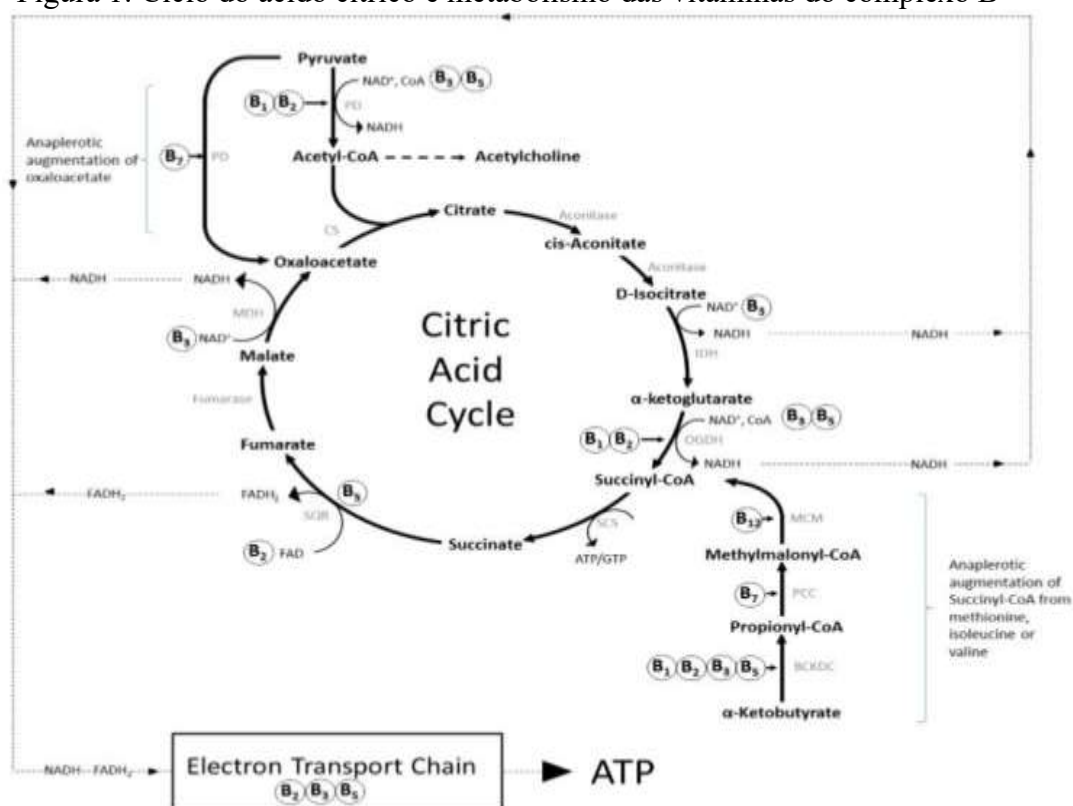
VALDESPINO-GÓMEZ, V. M.; VALDESPINO-CASTILLO P. M.; VALDESPINO-CASTILLO V. E. Interacción de las vías de señalización intracelulares participantes en la proliferación celular: potencial blanco de intervencionismo terapéutico. **Cirugía y Cirujanos**. São Paulo, v. 83, n. 2, p. 165-174, 2015.

VANNUCCHI, H.; MONTEIRO, T. M. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes. Ácido Fólico. BRASIL, F.-T. A. F. E. S. C. D. N. I. São Paulo: ILSI – International Life Science Institute. 10. 2010.

VANNUCCHI, H.; MONTEIRO, T. M.; TAKEUCHI, P. L. Cobalamina (vitamina B₁₂). BRASIL: **ILSI – International Life Science Institute**. São Paulo, 2. ed. v. 13 p. 4-36, 2017.

ANEXO A

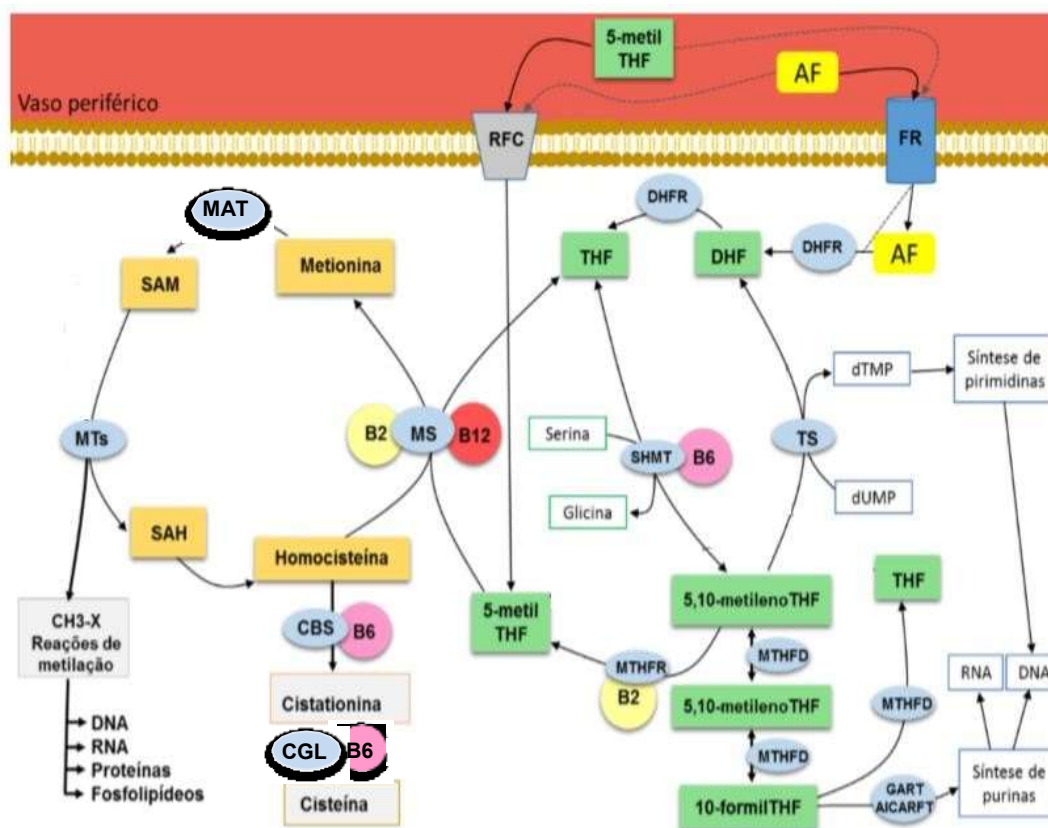
Figura 1: Ciclo do ácido cítrico e metabolismo das vitaminas do complexo B



FONTE: KENNEDY, 2016. O ciclo do ácido cítrico é o eixo central da bioenergética da célula, de imprescindível para a geração de energia na célula, está envolvido em várias reações, inclusive gerando intermediários ou precursores para outras vias metabólicas. Para que ocorra o ciclo do ácido cítrico a molécula de piruvato sofre descarboxilação oxidativa pelo complexo da piruvato desidrogenase sofrendo descarboxilação pela TTP o complexo da piruvato desidrogenase é composto de três enzimas e cinco coenzimas (sendo quatro delas do complexo B). Após sofrer a descarboxilação a molécula de acetilipoamida uniu-se a CoA promovendo a formação do acetil-CoA, molécula precursora do ciclo de Krebs a piruvato desidrogenase associada a B³ realizará o transporte dos hidrogênios produzidos nessa reação. Após a entrada da molécula de acetil-CoA na presença da enzima citrato sintase promoverá a síntese de citrato a partir do oxaloacetato e acetil CoA, nessa reação a vitamina B⁵ existe na molécula de acetil-CoA. Na reação seguinte não há presença de vitaminas. Na terceira reação a B³ associada à enzima isocitrato desidrogenase promove a desidrogenação, ou seja, retira moléculas de hidrogênio e CO₂ da molécula, a B³ transporta os H. Na quarta reação o complexo da α-cetoglutarato desidrogenase possui as mesmas três enzimas e as cinco vitaminas do complexo da piruvato desidrogenase com uma diferença, pois tem um aminoácido diferente da enzima E¹ que atrai a molécula de α-cetoglutarato é uma reação irreversível. Na próxima reação a vitamina B⁵ sai da molécula succinil através da ação enzimática da succinil-CoA sintase. Na sexta reação a vitamina B² associada à enzima succinil Q redutase converte succinato em fumarato gerando energia. Na seguinte reação não ocorre envolvimento das vitaminas. Na oitava e última reação a molécula de oxaloacetato é regenerada sob ação da enzima malato desidrogenase associada a B³.

ANEXO B

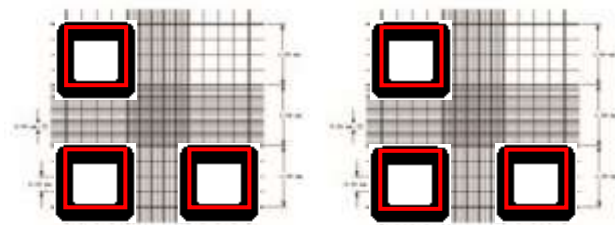
Figura 2: Mapa metabólico do ciclo da metionina e do ácido fólico dentro da célula.



FONTE: Adaptado de PANIZ, 2015. A entrada da molécula de ácido fólico é realizada por dois receptores distintos: o carreador receptor de folato 1 (RFC1) transporta para dentro da célula as moléculas reduzidas, através da troca iônica trabalhando na condição de pH 7,4. O receptor de folato (RF) age diferente e capta a molécula de ácido fólico por endocitose. No mapa visualizamos o ciclo da metionina interligado ao ciclo do ácido fólico pela molécula de 5-metil THF metionina sintase e vitaminas B² e B¹² que regeneram a molécula de 5-metil THF a THF e posteriormente pode ser convertido em serina e glicina através da enzima metilenotetra-hidrofolato redutase e B⁶ ou ser convertido em 5,10-metileno THF dependendo da necessidade metabólica da célula sobre presença da metilenotetra-hidrofolato desidrogenase. Em duas etapas a enzima glicinamida ribonucleotídeo transformilase que converte a 10-formil THF em seguida a molécula é utilizada para a síntese purinas e pirimidinas para ser utilizado na formação de DNA e RNA. Essa via também pode ser realizada pela timidilato sintase que converte em moléculas de dUMP/ dTMP sendo utilizadas na síntese de pirimidinas. No ciclo da metionina o 5-metil THF é utilizado para síntese de metionina na presença de B² e B¹² metionina adenosil transferase é convertida a metionina a SAM que em seguida sob influência da enzima Metalotioneínas (MTs) doa molécula de um carbono (CH₃) para síntese de moléculas como: DNA, RNA, proteínas e fosfolípidos, pode seguir uma segunda via em que: SAH converte a molécula SAM a homocisteína que em seguida pode seguir vias metabólicas de formação de aminoácidos na presença de CBS e CGL e B⁶.

ANEXO C

Figura 3: Desenho da câmara de Neubauer (como se realiza a contagem)



Adaptado de Alves e Guimarães, [2011 ou 2012] p. 235. Só serão consideradas as células que estão dentro do limite dos quadrantes destacados em vermelho, fora desses limites as células não serão consideradas.

APÊNDECE A

Tabela I: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas – Tiamina **B¹**

Células	Concentrações extra de vitaminas	Concentração existente no meio Dulbecco	Diluições
Tiamina B¹		4 mg/L	
Não suplementadas	4 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	8 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	16 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	32 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	320 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6

Fonte: próprio autor.

Tabela II: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas – Riboflavina **B²**

Células	Concentrações extra de vitaminas	Concentração existente no meio Dulbecco	Diluições
Riboflavina B²		0,4 mg/L	
Não suplementadas	0,4 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	0,8 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	1,6 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	3,2 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	32 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6

Fonte: próprio autor.

Tabela III: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas – Nicotinamida **B³**

Células	Concentrações extra de vitaminas	Concentração existente no meio Dulbecco	Diluições
Nicotinamida B³		4 mg/L	
Não suplementadas	4 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	8 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	16 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	32 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	320 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6

Fonte: próprio autor.

APÊNDECE B

Tabela IV: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas – Ácido pantatênico **B⁵**

Células	Concentrações extra de vitaminas	Concentração existente no meio Dulbecco	Diluições
	Ácido pantatênico B⁵	4 mg/L	
Não suplementadas	4 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	8 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	16 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	32 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	320 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6

Fonte: próprio autor.

Tabela V: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas – Piridoxina **B⁶**

Células	Concentrações extra de vitaminas	Concentração existente no meio Dulbecco	Diluições
	Piridoxina B⁶	4 mg/L	
Não suplementadas	4 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	8 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	16 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	32 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	320 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6

Fonte: próprio autor.

Tabela VI: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas – Ácido Biotina **B⁷**

Células	Concentrações extra de vitaminas	Concentração existente no meio Dulbecco	Diluições
	Biotina B⁷	7,2 mg/L	
Não suplementadas	7,2 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	14,4 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	28,8 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	57,6 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	576 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6

Fonte: próprio autor.

APÊNDECE C

Tabela VII: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas – Ácido fólico **B⁹**

Células	Concentrações extra de vitaminas	Concentração existente no meio Dulbecco	Diluições
	Ácido fólico B⁹	4 mg/L	
Não suplementadas	4 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	8 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	16 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	32 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	320 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6

Fonte: próprio autor.

Tabela VIII: Concentrações de vitaminas e diluições em que as células serão submetidas – Cobalamina **B¹²**

Células	Concentrações extra de vitaminas	Concentração existente no meio Dulbecco	Diluições
	Cobalamina B¹²	Não contém	
Não suplementadas	Não contém		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	8 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	16 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	32 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6
Suplementadas	320 mg/L		1:2 / 1:4 / 1:6

Fonte: próprio autor.

APÊNDECE D

Tabela IX: Variáveis a serem analisadas para emissão dos resultados.

Células	Vitaminas	Diluições realizadas	Concentrações	Tempo de Cultivo X Confluência	Diluição X Rendimento
CRFK	B ¹	1:2 / 1:4 / 1:6	8 mg/L; 16 mg/L; 32 mg/L; 320 mg/L	24/ 48 e 72 horas X Confluência	1:2 / 1:4 / 1:6 X quantidade de células/ml
CRFK	B ²	1:2 / 1:4 / 1:6	0,8 mg/L; 1,6 mg/L; 3,2 mg/L; 32 mg/L	24/ 48 e 72 horas X Confluência	1:2 / 1:4 / 1:6 X quantidade de células/ml
CRFK	B ³	1:2 / 1:4 / 1:6	8 mg/L; 16 mg/L; 32 mg/L; 320 mg/L	24/ 48 e 72 horas X Confluência	1:2 / 1:4 / 1:6 X quantidade de células/ml
CRFK	B ⁵	1:2 / 1:4 / 1:6	8 mg/L; 16 mg/L; 32 mg/L; 320 mg/L	24/ 48 e 72 horas X Confluência	1:2 / 1:4 / 1:6 X quantidade de células/ml
CRFK	B ⁶	1:2 / 1:4 / 1:6	8 mg/L; 16 mg/L; 32 mg/L; 320 mg/L	24/ 48 e 72 horas X Confluência	1:2 / 1:4 / 1:6 X quantidade de células/ml
CRFK	B ⁷	1:2 / 1:4 / 1:6	14,4 mg/L; 28,8 mg/L; 57,6 mg/L; 576 mg/L	24/ 48 e 72 horas X Confluência	1:2 / 1:4 / 1:6 X quantidade de células/ml
CRFK	B ⁹	1:2 / 1:4 / 1:6	8 mg/L; 16 mg/L; 32 mg/L; 320 mg/L	24/ 48 e 72 horas X Confluência	1:2 / 1:4 / 1:6 X quantidade de células/ml
CRFK	B ¹²	1:2 / 1:4 / 1:6	8 mg/L; 16 mg/L; 32 mg/L; 320 mg/L	24/ 48 e 72 horas X Confluência	1:2 / 1:4 / 1:6 X quantidade de células/ml

Fonte: próprio autor.