

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Douglas Antunes Bitencourt

**A INFLUÊNCIA DA MICROGRAVIDADE SIMULADA EM CÉLULAS  
ERITROLEUCÊMICAS K562**

Porto Alegre

2019

Douglas Antunes Bitencourt

**A INFLUÊNCIA DA MICROGRAVIDADE SIMULADA EM CÉLULAS  
ERITROLEUCÊMICAS K562**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharelem Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Bos-Mikich

Porto Alegre  
2019

#### CIP - Catalogação na Publicação

Bitencourt, Douglas Antunes  
A influência da microgravidade simulada em células  
eritroleucêmicas k562 / Douglas Antunes Bitencourt. --  
2019.  
56 f.  
Orientadora: Adriana Bos- Mikich.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,  
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Microgravidade simulada. 2. Clinostato. 3. k562.  
4. Cultura de células. 5. Voo espacial. I. Mikich,  
Adriana Bos-, orient. II. Título.

Douglas Antunes Bitencourt

**INFLUÊNCIA DA MICROGRAVIDADE SIMULADA EM CÉLULAS  
ERITROLEUCÊMICAS K562**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 04 de Dezembro de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Elvira Alicia Aparicio Cordero – Hospital Moinhos de Vento

---

Profa. Dra. Marlise Araújo dos Santos – Kings College

---

Profa. Dra. Adriana Bos-Mikich- UFRGS (orientadora)

## RESUMO

A anemia do Voo Espacial é uma condição hematológica que acomete astronautas após longos períodos expostos a hipogravidade. Esta é caracterizada por uma diminuição da concentração de hemoglobina nos eritrócitos e uma redução no hematócrito. Estes astronautas também sofrem outros tipos de alterações fisiológicas, principalmente musculares e ósseas. Com o objetivo de simular a hipogravidade exercida nos astronautas, equipamentos foram desenvolvidos para criar um ambiente de microgravidade simulada. O Clinostato 3D é um equipamento de microgravidade simulada em que é possível realizar experimentos em diversas amostras, como por exemplo em cultura de células. Este equipamento realiza rotações de 360° em torno do seu próprio eixo em diferentes sentidos, assim criando um ambiente em que o vetor gravitacional é alterado aleatoriamente. Estudos utilizando outros tipos de equipamentos para microgravidade simulada em células K562 já relataram uma redução da proliferação celular significativa resultante de uma alteração do ciclo celular destas células. Células K562 possuem características progenitoras hematopoiéticas por serem de linhagem mieloide, pois são células de Leucemia Mielóide Crônica. Estas alterações podem ser explicadas pelas alterações em microfilamentos de F-actina do citoesqueleto das células e proteínas Ciclinas, responsáveis pela regulação do ciclo celular. A utilização do Clinostato 3D vem demonstrando alteração de genes envolvidos no ciclo celular em outros tipos celulares. Devido aos inúmeros estudos já realizados utilizando microgravidade simulada, analisamos células K562 expostas ao Clinostato 3D durante os períodos de 6, 12 e 24 horas em meio de cultivo celular RPMI 1640. Foram analisadas alterações da viabilidade e proliferação celular, sendo que foi encontrado uma redução da proliferação celular em relação ao grupo controle e sendo que a viabilidade celular não apresentou alterações significativas. Houve um aumento da expressão do gene p16, uma redução do gene p21, porém não houve alteração significativa da expressão do gene p27 em relação ao grupo controle. Portanto, células K562 expostas a microgravidade simulada sofrem uma redução da proliferação sem apresentar morte celular, fenômeno possivelmente explicado pela alteração do ciclo celular das células.

Palavras-chave: Microgravidade simulada. Cultura de células. Anemia do voo espacial.

## ABSTRACT

Space Flight Anemia is a haematological condition that affects astronauts after long periods of exposure to hypogravity. This condition is characterized by a decrease in hemoglobin concentration in erythrocytes and a reduction in hematocrit. Astronauts also feature other types of physiological changes, mainly in muscle and bone tissues. In order to mimic hipogravity, equipments were developed to simulate microgravity environment. Clinostato 3D is an experimental microgravity equipment in which assays may be performed with biological samples, such as cell cultures. This equipment rotates 360° on its own axis in different directions, creating an environment in the altered gravitational vector. Studies using different simulated microgravity equipment and K562 cells reported a reduced cell proliferation rate due probably, to an altered cell cycle in these cells. K562 cells have hematopoietic progenitor resources as they belong to a myeloid lineage, Chronic Myeloid Leukemia cells. Cell cycle modifications may be explained by changes in cytoskeleton F-actin microfilaments and Cyclin cell proteins, responsible for cell cycle. In addition, experiments using Clinostato 3D and different cell types demonstrated alterations in gene expression involved in the cell cycle. The present study assessed the effects of simulated microgravity using Clinostato 3D, on K562 cells for periods of 6, 12 and 24 hours in RPMI 1640 cell culture medium. Changes in cell viability and proliferation rate were analyzed. A significant decrease in cell proliferation in relation to controls was observed. However, no significant difference in cell viability was obtained. There was an increase in p16, a reduction in p21 and no significant change in p27 gene expression in comparison to the controls. In conclusion, K562 cells exposed a simulated microgravity present a significant reduction in cell proliferation without cell death, possibly due to an altered cell cycle.

Keywords: Simulated microgravity. Cell culture. Spaceflight anemia.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografia do Clinostato 3D.....	9
Figura 2 – Imagem de microscopia óptica de células K562 em meio de cultura RPMI 1640 em aumento de 400X (A) e 1000X (B).....	24
Figura 3 – Gráfico demonstrando a proliferação celular das células K562 após exposição ao Clinostato 3D.....	27
Figura 4 – Células K562 diferenciadas em eritrócitos após indução por Hemina. Aumento de 400X em microscópio óptico.....	28
Figura 5 – Expressão dos genes p16, p21 e p27 após exposição ao Clinostato 3D.....	29

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Redução da massa de hemoglobina e perfil de reticulócitos em astronautas após voos espaciais em diferentes durações.....	13
Tabela 2 – Sequências de nucleotídeos dos genes testados.....	26

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>8</b>
1.1 MICROGRAVIDADE SIMULADA .....	8
1.2 CULTURA CELULAR.....	10
1.3 ANEMIA DO VOO ESPACIAL.....	11
1.4 JUSTIFICATIVA .....	14
1.5 OBJETIVO GERAL.....	15
<b>1.5.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>2 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>16</b>
<b>3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA UNIFA .....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os organismos que habitam a Terra sofrem adequações e adaptações em virtude da força da gravidade que é exercida sobre os mesmos, Logo, todas as funções fisiológicas dos seres humanos são influenciadas pela gravidade e sujeitas a distúrbios, como a perda de tecido ósseo (COLLET *et al.*, 1997), atrofia muscular esquelética (FITTS *et al.*, 2001), doenças cardiovasculares (WHITE; BLOMQUIST, 1998), desregulação do sistema imunológico (WHITE *et al.*, 2001), desregulação hormonal (STROLLO, 1999), alterações fluidodinâmicas (WATENPAUGH, 2001) e alterações imunohematológicas (COGOLI, 1987; SONNENFELD *et al.*, 2003).

Há evidências que astronautas, após exposição à microgravidade real apresentam perda de até 20% da densidade mineral óssea, principalmente na coluna lombar, pelve e na porção proximal do fêmur (GRIGORIEV *et al.*, 1998).

Um distúrbio hematológico frequente em voos espaciais vem acometendo os astronautas, devido à redução da Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e do Volume Corpuscular Médio (VCM) dos eritrócitos, causando a Anemia do Voo Espacial (BALAKHOVSKIY *et al.*, 1980; LEACH; JOHNSON, 1984) que as causas vêm sendo estudadas.

As Unidades Formadoras de Colônias (CFU) de linhagens mielóides (CFU-gm, BFU-e e CFU-meg) sofrem uma diminuição significativa, bem como as células tronco hematopoiéticas multipotentes na medula óssea de ratos expostos a voos espaciais (DOMARATSKAYA *et al.*, 2002; MICHURINA *et al.*, 1996). Isso indica que o voo espacial é um dos contribuintes para a supressão da eritropoiese, levando a diminuição da concentração de eritrócitos.

### 1.1 MICROGRAVIDADE SIMULADA

Devido à dificuldade e ao alto custo necessário para estudos em estações espaciais, estabeleceram-se alguns modelos experimentais para simulação de microgravidade em solo terrestre, os equipamentos de Sistema de Cultivo de Células Rotativas (RCCS, *Rotary Cell Culture System*), possibilitando, desta forma, a compreensão dos eventos no Espaço (HU *et al.*, 2014). O equipamento Clinostato, demonstrado na Figura 1, é um dos mais utilizados para a simulação de microgravidade. Utilizado desde 1879, quando inventado por Von Sachs, o

Clinostato funciona basicamente por dois princípios. Primeiro, o objeto a ser estudado é submetido a uma rotação de 360° em seu próprio eixo, sendo assim, o vetor de gravidade médio se encontra próximo de zero. Segundo, o objeto estudado responde à mudança de gravidade com uma velocidade menor que a velocidade de rotação.

Figura 1. Fotografia do Clinostato 3D.



Fonte: MARTINELLI (2007)

Existem atualmente dois principais tipos de Clinostatos, os Bidimensionais (2D), que giram em torno de um eixo único em velocidade e direção constantes e os Tridimensionais (3D), que se diferenciam por possuir dois eixos controlados por dois motores independentes entre si, possibilitando a alteração da velocidade e direção individualmente. Conceitualmente, quando os eixos giram em velocidades e direções aleatórias são denominados como Rotação Aleatória em 3D, porém, quando os eixos giram à uma velocidade constante, são caracterizados como Rotação 3D (MARTINELLI, 2007). Ou seja, as células submetidas ao Clinostato 3D irão sofrer os movimentos de rotação e revolução e gerar efeitos de microgravidade similares aos em ambientes de microgravidade no Espaço, pois a união desses dois movimentos geram a perda do vetor gravitacional das amostras, devido a velocidade de rotação ser mais rápida se comparada ao tempo de resposta das células perante a mudança de vetor (MARTINELLI, 2007).

Além do Clinostato, há também outros tipos de RCCS para a simulação de gravidade, como o RWV (*Rotating Wall Vessel*) (GRANET *et al.*, 1998) para cultura de células e as Cabines de Hipogravidade Simulada para testes físicos dentro da cabine com uma esteira paralelamente ao sujeito à 90°, como a LBPP (*Lower Body Positive Pressure*) e LBNP (*Lower*

*Body Negative Pressure*) (SCHLABS *et al.*, 2013). Estes diversos equipamentos possibilitam pesquisas biológicas e outras várias análises, tais como: depressão imunológica à nível celular, crescimento de células cancerígenas, virulência de microrganismos e alteração da expressão gênica (ARASE *et al.*, 2002), o gasto metabólico da deambulação e possíveis efeitos cardiovasculares em ambiente de hipogravidade (BROWN *et al.*, 2018).

Estudos com cultivo celular utilizando a clinorrotação vêm sendo realizados (DUKE *et al.*, 1993). A utilização do Clinostato 3D em diversas pesquisas é ascendente, pois é um equipamento bem validado e comprovado matematicamente a sua similaridade com a microgravidade real (HOSON *et al.*, 1997).

Resultados promissores encontrados no Laboratório Columbus, situado na Estação Espacial Internacional, em órbita desde 1996, na qual realiza estudos avançados em microgravidade real com plantas e cristalização de proteínas (ESPOSITO *et al.*, 1998). A combinação destes estudos em órbita pode ser complementada com os realizados em solo terrestre, com o auxílio de simuladores de microgravidade.

Há indícios que a microgravidade simulada pode resultar no aumento do potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais, principalmente em neurônios (RODRIGUES *et al.*, 2011). Também altera o padrão de expressão gênica das células e sua morfologia, pois este ambiente proporciona que as células flutuem livremente, conseqüentemente, interajam entre si, formando estruturas 3D mais facilmente (GRIMM *et al.*, 2014).

Outra aplicação interessante da microgravidade simulada, além das pesquisas citadas anteriormente, é na Medicina Regenerativa, com a utilização de *iPSC* (*Induced Pluripotent Stem Cells*) e com o uso de simuladores de gravidade objetiva reprogramar as células de tal forma que se obtenham células com um determinado grau de pluripotência.

Estudos utilizando RCCS/RWV como simulação de microgravidade demonstrou uma proliferação celular reduzida significativamente e uma alteração no ciclo celular, acompanhado por alterações em proteínas ciclina intercelulares, microfilamentos de F-actina e citoesqueletos de microtúbulos desorganizados (YI *et al.*, 2009). Estes achados podem, em parte, explicar a supressão eritropoiética, resultando na Anemia do Voo Espacial.

## 1.2 CULTURA CELULAR

As células K562 são de uma linhagem celular de um paciente com Leucemia Mielóide Crônica em crise blástica (LOZZIO, 1975). Há relatos que esta linhagem celular possui características progenitoras hematopoiéticas multipotentes, capazes de se diferenciar em

eritrócitos, megacariócitos e macrófagos se induzidas com indutores de diferenciações específicos (SUTHERLAND *et al.*, 1986; GREEN *et al.*, 1993), servindo de modelo de estudos de diferenciação e proliferação de células hematopoiéticas (KOEFFLER; GOLDE, 1980).

A análise de genes relacionados ao ciclo celular demonstrou alterações em vinte e um genes diferentes em fibroblastos de pele humana em cultivo celular sob a clinorrotação 3D(DUAN *et al.*, 2005). Estes genes foram separados entre grupos e apenas os genes relacionados aos canais iônicos e transportadores, moduladores da transdução de sinal intracelular e de resposta ao estresse quase não apresentaram alterações em seus níveis de expressão. No entanto, grupos de genes apresentaram alterações consideráveis em seus níveis de expressão, tais como: reguladores do ciclo celular, oncogenes, supressores tumorais, síntese, reparação e recombinação de DNA, apoptose, fatores de transcrição, proteínas de ligação ao DNA, antígenos de superfícies celular, adesão e comunicação celular.

As pesquisas com a simulação de microgravidade em Terra vêm ganhando destaque, uma vez que a ciência biológica nem sempre era prioridade em atividades aeroespaciais, oportunidades de voos em longo prazo são escassas, custo elevado e inviabilidade de coleta de amostras suficientes para estudos são pré-condições que impossibilitam o avanço das pesquisas em biologia celular e engenharia biomédica, pois seriam de maior fidedignidade se realizadas em ambiente de microgravidade real. Sendo assim, o presente estudo tem o objetivo principal de analisar alterações morfológicas e genéticas da linhagem celular K562 em cultivo celular sob influência da microgravidade simulada utilizando o Clinostato 3D.

### 1.3 ANEMIA DO VOO ESPACIAL

Anteriormente aos primeiros voos espaciais já era presumido que ocorreriam alterações do sistema hematopoiético devido à ausência de gravidade, entretanto, só em 1961, após o início de voos sistemáticos de humanos para o espaço que esta informação se tornou científica.

Em condições de microgravidade foi demonstrada uma diminuição do peso corporal, perda de água e coagulação sanguínea (VLADIMIRSKAYA *et al.*, 1966). Posteriormente, foram demonstradas alterações hidroeletrólíticas no metabolismo (GAZENKO *et al.*, 1986) e no volume de sangue circulante (BALAKHOVSKIY *et al.*, 1980).

Há diferenças de sintomas devido aos períodos de tempos dos voos, pois em voos rápidos, cerca de vinte a trinta dias, os astronautas apresentam um quadro de hipovolemia e hemoconcentração devido a adaptação de líquido e à atrofia de sentir sede. Estas alterações no Hematócrito (HCT) dos astronautas, durante os períodos iniciais, refletem principalmente na volemia e não em distúrbios eritropoiéticos (MACHO *et al.*, 2001).

Em contrapartida, em voos à longo prazo, esta dinâmica do HCT é reforçada com dados sobre a diminuição da eritropoiese, concentração de hemoglobina e quantidade de eritrócitos na circulação periférica (KALANDAROVA, 1991; MARKIN *et al.*, 1998).

Estes resultados podem ser consequências de uma estabilização da homeostase durante a longa permanência nestas condições gravitacionais (POLYAKOV *et al.*, 2001).

Astronautas a bordo do Germini-IV estiveram apenas quatro dias em voo espacial e houve uma diminuição da massa eritrocitária, porém, os mecanismos fisiológicos provavelmente não foram ativados devido ao curto período. Portanto, diversos fatores devem ser levados em consideração, tais como o maior teor de oxigênio disponível na cabine espacial ou intensas perturbações dos eritrócitos, descartando a hipótese de diminuição da eritropoiese.

Na tabela 1 pode ser observada uma diminuição da massa de hemoglobina de 2-4% durante voos de até 14 dias e uma redução em mais de 20% durante voos de longo prazo (BALAKHOVSKIY *et al.*, 1980).

Em missões espaciais longas, cerca de 120-438 dias, há uma diminuição do peso corporal de  $1,9 \pm 0,4$  Kg ou  $2,6 \pm 0,5\%$  em média se comparado com valores coletados anteriormente ao voo (HEER *et al.*, 2001). No terceiro dia após a realização do voo espacial, é notável uma diminuição do peso corporal, já demonstrando uma indiscutível hipohidratação corporal.

Alterações morfológicas dos eritrócitos também são observadas em voos de longo prazo, resultando em um aumento de formas celulares irreversíveis, porém, não patogênicas que podem ser explicadas pelo aumento da pressão parcial de oxigênio disponível na cabine espacial e uma possível ativação de processos de lipoperoxidação, assim, desestabilizando a membrana celular eritrocitária.

Após duas semanas ou mais em voo espacial, 13 dos 16 astronautas tiveram uma redução de reticulócitos circulantes (10000-30000/ $\mu$ L). Posteriormente, entre duas e três semanas de readaptação à gravidade Terrestre, o número de reticulócitos sanguíneo foi inúmeras vezes maiores aos valores normais, coincidindo com a queda de concentração de hemoglobina demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Redução da massa de hemoglobina e perfil de reticulócitos em astronautas após voos espaciais em diferentes durações.

Cosmonauts	Flight duration, days	Decrease in hemoglobin mass	The beginning of postflight increase in reticulocytes, day	The peak of postflight increase in reticulocytes, day	Increase in reticulocytes, % of the preflight level
1	16	15	5	5	122
2	16	14	5	5	100
3	18	14	6	6	162
4	18	14	6	6	150
5	30	14	0	12	337
6	30	19	7	7	220
7	49	29	7	15	368
8	49	33	7	15	376
9	63	16	7	16	176
10	63	25	7	16	315
11	96	25	1	12	688
12	96	26	1	12	531
13	140	16	1	25	436
14	140	12	3	41	219
15	175	19	3	11	267
16	175	18	3	11	169

Fonte: BALAKHOVSKY (1980)

Portanto, a massa e concentração de hemoglobina e o HCT diminuem durante voos de longo prazo. A eritrocitopenia e a redução de reticulócitos, seguida de uma reação reticulocitária e da restauração gradativa de eritrócitos, após a aterrissagem, é considerado como uma resposta fisiológica do sistema hematológico.

Este trabalho está vinculado à dissertação de mestrado de 2016, realizado no Programa de Pós-Graduação em Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica (MPBF) da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), intitulado como Efeito da Microgravidade Simulada em Fibroblastos de Pele Humana (BELLICANTA, 2016), disponível em <http://tede2.pucrs.br/tede2/handle/tede/7245>, realizado por Patrícia Lazzaroto Bellicanta, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Marlise Araújo dos Santos Ph.D.

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

Ainda se buscam resultados mais específicos das alterações hematológicas devido à microgravidade, no entanto, é indiscutível que a origem da Anemia do Voo Espacial é de natureza multifatorial, pois além da diferença gravitacional, há a exposição de gás de uma atmosfera artificial, exercícios físicos modificados, preparações farmacológicas, alimentação alterada, estresse e alterações circadianas.

Logo, este estudo visa avaliar possíveis alterações celulares, morfológicas e de expressão gênica de células K562 em microgravidade simulada para a melhor elucidação do desenvolvimento da Anemia do Voo Espacial.

## 1.5 OBJETIVO GERAL

Analisar alterações celulares e genéticas da linhagem celular K562 em cultivo celular sob influência da microgravidade simulada utilizando o Clinostato 3D durante os períodos de seis horas, doze horas e vinte e quatro horas.

### 1.5.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar a proliferação e viabilidade celular através da técnica de coloração por Azul de Trypan;
- b) Analisar a diferenciação celular através da aplicação de Hemina;
- c) Analisar microscopicamente a morfologia das células;
- d) Detectar a presença de genes responsáveis pelo ciclo celular através da técnica de qRT-PCR.

## **2 ARTIGO CIENTÍFICO**

O presente estudo intitulado como “A INFLUÊNCIA DA MICROGRAVIDADE SIMULADA EM CÉLULAS K562” foi formatado conforme as normas de publicação da Revista da Universidade da Força Aérea – UNIFA. Disponível em [http://www2.fab.mil.br/unifa/images/revista/documentos/Norma\\_publicacao.pdf](http://www2.fab.mil.br/unifa/images/revista/documentos/Norma_publicacao.pdf) (Anexo A).

# A INFLUÊNCIA DA MICROGRAVIDADE SIMULADA EM CÉLULAS ERITROLEUCÊMICAS K562

## RESUMO

A anemia do Voo Espacial é uma condição hematológica que acomete astronautas após longos períodos expostos a hipogravidade. Esta é caracterizada por uma diminuição da concentração de hemoglobina nos eritrócitos e uma redução no hematócrito. Estes astronautas também sofrem outros tipos de alterações fisiológicas, principalmente musculares e ósseas. Com o objetivo de simular a hipogravidade exercida nos astronautas, equipamentos foram desenvolvidos para criar um ambiente de microgravidade simulada. O Clinostato 3D é um equipamento de microgravidade simulada em que é possível realizar experimentos com diversas amostras, como por exemplo em cultura de células. Este equipamento realiza rotações de 360° em torno do seu próprio eixo em diferentes sentidos, assim criando um ambiente em que o vetor gravitacional é alterado aleatoriamente. Estudos utilizando outros tipos de equipamentos para microgravidade simulada em células K562 já relataram uma redução da proliferação celular significativa resultante de uma alteração do ciclo celular destas células. Células K562 possuem características progenitoras hematopoiéticas por serem de linhagem mieloide, pois são células de Leucemia Mielóide Crônica. Estas alterações podem ser explicadas pelas alterações em microfilamentos de F-actina do citoesqueleto das células e proteínas Ciclinas, responsáveis pela regulação do ciclo celular. A utilização do Clinostato 3D vem demonstrando alteração de genes envolvidos no ciclo celular em outros tipos celulares. Devido aos inúmeros estudos já realizados utilizando microgravidade simulada, analisamos células K562 expostas ao Clinostato 3D durante os períodos de 6, 12 e 24 horas em meio de cultivo celular RPMI 1640. Foram analisadas alterações da viabilidade e proliferação celular, sendo que foi encontrado uma redução da proliferação celular em relação ao grupo controle e sendo que a viabilidade celular não apresentou alterações significativas. Houve um aumento da expressão do gene p16, uma redução do gene p21, porém não houve alteração significativa da expressão do gene p27 em relação ao grupo controle. Portanto, células K562 expostas a microgravidade simulada sofrem uma redução da proliferação sem apresentar morte celular, fenômeno possivelmente explicado pela alteração do ciclo celular das células.

**Palavras-chave:** Microgravidade simulada. Cultura de células. Anemia do voo espacial. Células K562.

## ABSTRACT

Space Flight Anemia is a haematological condition that affects astronauts after long periods of exposure to hypogravity. This condition is characterized by a decrease in hemoglobin concentration in erythrocytes and a reduction in hematocrit. Astronauts also feature other types of physiological changes, mainly in muscle and bone tissues. In order to mimic hypogravity, equipments were developed to simulate microgravity environment. Clinostato 3D is an experimental microgravity equipment in which assays may be performed with biological samples, such as cell cultures. This equipment rotates 360° on its own axis in different directions, creating an environment in the altered gravitational vector. Studies using different simulated microgravity equipment and K562 cells reported a reduced cell proliferation rate due probably, to an altered cell cycle in these cells. K562 cells have hematopoietic progenitor resources as they belong to a myeloid lineage, Chronic Myeloid Leukemia cells. Cell cycle modifications may be explained by changes in cytoskeleton F-actin microfilaments and Cyclin cell proteins, responsible for cell cycle. In addition, experiments using Clinostato 3D and different cell types demonstrated alterations in gene expression involved in the cell cycle. The present study assessed the effects of simulated microgravity using Clinostato 3D, on K562 cells for periods of 6, 12 and 24 hours in RPMI 1640 cell culture medium. Changes in cell

viability and proliferation rate were analyzed. A significant decrease in cell proliferation in relation to controls was observed. However, no significant difference in cell viability was obtained. There was an increase in p16, a reduction in p21 and no significant change in p27 gene expression in comparison to the controls. In conclusion, K562 cells exposed a simulated microgravity present a significant reduction in cell proliferation without cell death, possibly due to an altered cell cycle.

**Keywords:** *Simulated microgravity. Cell culture. Spaceflight anemia. K562 Cells.*

## 1 INTRODUÇÃO

Os organismos que habitam a Terra sofrem adequações e adaptações em virtude da força da gravidade que é exercida sobre os mesmos, Logo, todas as funções fisiológicas dos seres humanos são influenciadas pela gravidade e sujeitas a distúrbios, como a perda de tecido ósseo (COLLET *et al.*, 1997), atrofia muscular esquelética (FITTS *et al.*, 2001), doenças cardiovasculares (WHITE; BLOMQUIST, 1998), desregulação do sistema imunológico (WHITE *et al.*, 2001), desregulação hormonal (STROLLO, 1999), alterações fluidodinâmicas (WATENPAUGH, 2001) e alterações imunohematológicas (COGOLI, 1987; SONNENFELD *et al.*, 2003).

Há evidências que astronautas, após exposição à microgravidade real apresentam perda de até 20% da densidade mineral óssea, principalmente na coluna lombar, pelve e na porção proximal do fêmur (GRIGORIEV *et al.*, 1998).

Um distúrbio hematológico frequente em voos espaciais vem acometendo os astronautas, devido à redução da Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e do Volume Corpuscular Médio (VCM) dos eritrócitos, causando a Anemia do Voo Espacial (BALAKHOVSKIY *et al.*, 1980; LEACH; JOHNSON, 1984) que as causas vêm sendo estudadas.

As Unidades Formadoras de Colônias (CFU) de linhagens mielóides (CFU-gm, BFU-e e CFU-meg) sofrem uma diminuição significativa, bem como as células tronco hematopoiéticas multipotentes na medula óssea de ratos expostos a voos espaciais (DOMARATSKAYA *et al.*, 2002; MICHURINA *et al.*, 1996). Isso indica que o voo espacial é um dos contribuintes para a supressão da eritropoiese, levando a diminuição da concentração de eritrócitos.

## 1.1 Microgravidade simulada

Devido à dificuldade e ao alto custo necessário para estudos em estações espaciais, estabeleceram-se alguns modelos experimentais para simulação de microgravidade em solo terrestre, os equipamentos de Sistema de Cultivo de Células Rotativas (RCCS, *Rotary Cell Culture System*), possibilitando, desta forma, a compreensão dos eventos no Espaço (HU *et al.*, 2014). O equipamento Clinostato, demonstrado na Figura 1, é um dos mais utilizados para a simulação de microgravidade. Utilizado desde 1879 quando inventado por Von Sachs, o Clinostato funciona basicamente por dois princípios. Primeiro: o objeto a ser estudado é submetido a uma rotação de 360° em seu próprio eixo, sendo assim, o vetor de gravidade médio se encontra próximo de zero. Segundo: o objeto estudado responde à mudança de gravidade com uma velocidade menor que a velocidade de rotação.

**Figura 1.** Fotografia do Clinostato 3D.



**Fonte:** MARTINELLI (2007)

Existem atualmente dois principais tipos de Clinostatos, os Bidimensionais (2D), que giram em torno de um eixo único em velocidade e direção constantes e os Tridimensionais (3D), que se diferenciam por possuir dois eixos controlados por dois motores independentes entre si, possibilitando a alteração da velocidade e direção individualmente. Conceitualmente, quando os eixos giram em velocidades e direções aleatórias são denominados como Rotação Aleatória em 3D, porém, quando os eixos giram

à uma velocidade constante, são caracterizados como Rotação 3D(MARTINELLI, 2007). Ou seja, as células submetidas ao Clinostato 3D irão sofrer os movimentos de rotação e revolução e gerar efeitos de microgravidade similares aos em ambientes de microgravidade no Espaço, pois a união desses dois movimentos geram a perda do vetor gravitacional das amostras, devido a velocidade de rotação ser mais rápida se comparada ao tempo de resposta das células perante a mudança de vetor(MARTINELLI, 2007).

Além do Clinostato, há também outros tipos de RCCS para a simulação de gravidade, como o RWV (*Rotating Wall Vessel*) (GRANET *et al.*, 1998) para cultura de células e as Cabines de Hipogravidade Simulada para testes físicos dentro da cabine com uma esteira paralelamente ao sujeito à 90°, como a LBPP (*Lower Body Positive Pressure*) e LBNP (*Lower Body Negative Pressure*) (SCHLABS *et al.*, 2013). Estes diversos equipamentos possibilitam pesquisas biológicas e outras várias análises, tais como: depressão imunológica à nível celular, crescimento de células cancerígenas, virulência de microrganismos e alteração da expressão gênica(ARASE *et al.*, 2002), o gasto metabólico da deambulação e possíveis efeitos cardiovasculares em ambiente de hipogravidade (BROWN *et al.*, 2018).

Estudos com cultivo celular utilizando a clinorrotação vêm sendo realizados (DUKE *et al.*, 1993). A utilização do Clinostato 3D em diversas pesquisas é ascendente, pois é um equipamento bem validado e comprovado matematicamente a sua similaridade com a microgravidade real (HOSON *et al.*, 1997).

Resultados promissores encontrados no Laboratório Columbus, situado na Estação Espacial Internacional, em órbita desde 1996, na qual realiza estudos avançados em microgravidade real com plantas e cristalização de proteínas (ESPOSITO *et al.*, 1998). A combinação destes estudos em órbita pode ser complementada com os realizados em solo terrestre, com o auxílio de simuladores de microgravidade.

Há indícios que a microgravidade simulada pode resultar no aumento do potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais, principalmente em neurônios (RODRIGUES *et al.*, 2011). Também altera o padrão de expressão gênica das células e sua morfologia, pois este ambiente

proporciona que as células flutuem livremente, conseqüentemente, interajam entre si, formando estruturas 3D mais facilmente (GRIMM *et al.*, 2014).

Outra aplicação interessante da microgravidade simulada, além das pesquisas citadas anteriormente, é na Medicina Regenerativa, com a utilização de *iPSC (Induced Pluripotent Stem Cells)* e com o uso de simuladores de gravidade objetiva reprogramar as células de tal forma que se obtenham células com um determinado grau de pluripotência.

Estudos utilizando RCCS/RWV como simulação de microgravidade, demonstraram uma proliferação celular reduzida significativamente e uma alteração no ciclo celular, acompanhado por alterações em proteínas ciclinas intercelulares, microfilamentos de F-actina e citoesqueletos de microtúbulos desorganizados (YI *et al.*, 2009). Estes achados podem, em parte, explicar a supressão eritropoiética, resultando na Anemia do Voo Espacial.

## 1.2 Cultura celular

As células K562 são de uma linhagem celular de um paciente com Leucemia Mielóide Crônica em crise blástica (LOZZIO, 1975). Há relatos que esta linhagem celular possui características progenitoras hematopoiéticas multipotentes, capazes de se diferenciar em eritrócitos, megacariócitos e macrófagos se induzidas com indutores de diferenciações específicos (SUTHERLAND *et al.*, 1986; GREEN *et al.*, 1993), servindo de modelo de estudos de diferenciação e proliferação de células hematopoiéticas (KOEFFLER; GOLDE, 1980).

A análise de genes relacionados ao ciclo celular demonstrou alterações em vinte e um genes diferentes em fibroblastos de pele humana em cultivo celular sob a clinorrotação 3D(DUAN *et al.*, 2005). Estes genes foram separados entre grupos e apenas os genes relacionados aos canais iônicos e transportadores, moduladores da transdução de sinal intracelular e de resposta ao estresse quase não apresentaram alterações em seus níveis de expressão. No entanto, grupos de genes apresentaram alterações consideráveis em seus níveis de expressão, tais como: reguladores do ciclo celular, oncogenes, supressores tumorais, síntese, reparação e recombinação

de DNA, apoptose, fatores de transcrição, proteínas de ligação ao DNA, antígenos de superfícies celular, adesão e comunicação celular.

As pesquisas com a simulação de microgravidade em Terra vêm ganhando destaque, uma vez que a ciência biológica nem sempre era prioridade em atividades aeroespaciais, oportunidades de voos em longo prazo são escassas, custo elevado e inviabilidade de coleta de amostras suficientes para estudos são pré-condições que impossibilitam o avanço das pesquisas em biologia celular e engenharia biomédica, pois seriam de maior fidedignidade se realizadas em ambiente de microgravidade real. Sendo assim, o presente estudo tem o objetivo principal de analisar alterações morfológicas e genéticas da linhagem celular K562 em cultivo celular sob influência da microgravidade simulada utilizando o Clinostato 3D.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1. Revisão teórica**

Anteriormente aos primeiros voos espaciais já era presumido que ocorreriam alterações do sistema hematopoiético devido à ausência de gravidade, entretanto, só em 1961, após o início de voos sistemáticos de humanos para o espaço que esta informação se tornou científica.

Em condições de microgravidade foi demonstrada uma diminuição do peso corporal, perda de água e coagulação sanguínea (VLADIMIRSKAYA *et al.*, 1966). Posteriormente, foram demonstradas alterações hidroeletrólíticas no metabolismo (GAZENKO *et al.*, 1986) e no volume de sangue circulante (BALAKHOVSKIY *et al.*, 1980).

Há diferenças de sintomas devido aos períodos de tempos dos voos, pois em voos rápidos, cerca de vinte a trinta dias, os astronautas apresentam um quadro de hipovolemia e hemoconcentração devido a adaptação de líquido e à atrofia de sentir sede. Estas alterações no Hematócrito (HCT) dos astronautas, durante os períodos iniciais, refletem principalmente na volemia e não em distúrbios eritropoiéticos (MACHO *et al.*, 2001).

Em contrapartida, em voos à longo prazo, esta dinâmica do HCT é reforçada com dados sobre a diminuição da eritropoiese, concentração de

hemoglobina e quantidade de eritrócitos na circulação periférica (KALANDAROVA, 1991; MARKIN *et al.*, 1998).

Estes resultados podem ser consequências de uma estabilização da homeostase durante a longa permanência nestas condições gravitacionais (POLYAKOV *et al.*, 2001).

Astronautas a bordo do Gemini-IV estiveram apenas quatro dias em voo espacial e houve uma diminuição da massa eritrocitária, porém, os mecanismos fisiológicos provavelmente não foram ativados devido ao curto período. Portanto, diversos fatores devem ser levados em consideração, tais como o maior teor de oxigênio disponível na cabine espacial ou intensas perturbações dos eritrócitos, descartando a hipótese de diminuição da eritropoiese.

Na tabela 1 pode ser observada uma diminuição da massa de hemoglobina de 2-4% durante voos de até 14 dias e uma redução em mais de 20% durante voos de longo prazo (BALAKHOVSKIY *et al.*, 1980).

Em missões espaciais longas, cerca de 120-438 dias, há uma diminuição do peso corporal de  $1,9 \pm 0,4$  Kg ou  $2,6 \pm 0,5\%$  em média se comparado com valores coletados anteriormente ao voo (HEER *et al.*, 2001). No terceiro dia após a realização do voo espacial, é notável uma diminuição do peso corporal, já demonstrando uma indiscutível hipohidratação corporal.

Alterações morfológicas dos eritrócitos também são observadas em voos de longo prazo, resultando em um aumento de formas celulares irreversíveis, porém, não patogênicas que podem ser explicadas pelo aumento da pressão parcial de oxigênio disponível na cabine espacial e uma possível ativação de processos de lipoperoxidação, assim, desestabilizando a membrana celular eritrocitária.

Após duas semanas ou mais em voo espacial, 13 dos 16 astronautas tiveram uma redução de reticulócitos circulantes (10000-30000/ $\mu$ L). Posteriormente, entre duas e três semanas de readaptação à gravidade Terrestre, o número de reticulócitos sanguíneo foi inúmeras vezes maiores aos valores normais, coincidindo com a queda de concentração de hemoglobina.

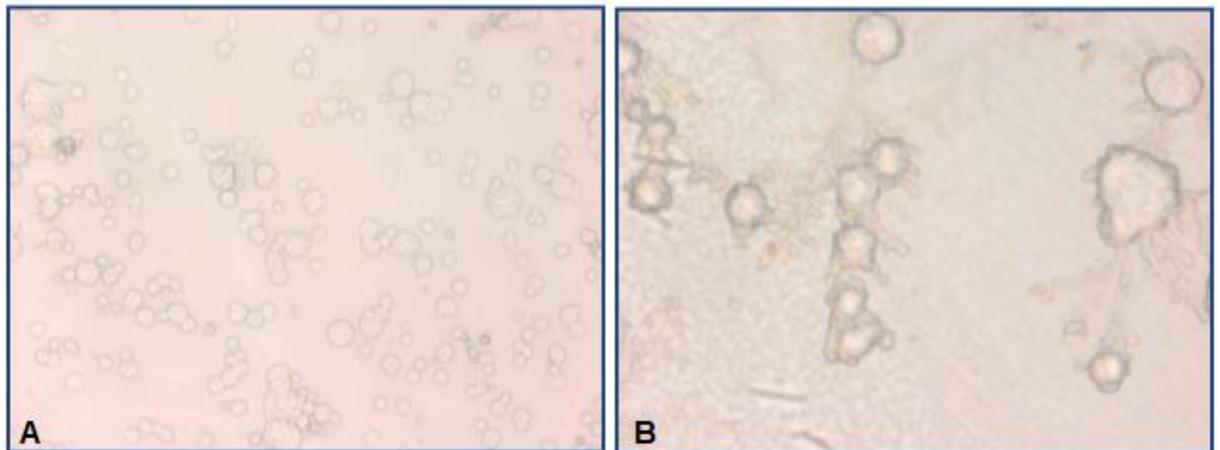
Em resumo, pode-se afirmar que a massa e concentração de hemoglobina e o HCT diminuem durante voos em longo prazo. A eritrocitopenia e a

redução de reticulócitos, seguida de uma reação reticulocitária e da restauração gradativa de eritrócitos, após a aterrissagem, é considerado como uma resposta fisiológica do sistema hematológico.

## 2.2 Materiais e métodos

Foram utilizadas células da linhagem K562 eritroleucêmicas distribuídas em oito garrafas de cultura celular P25 com área de crescimento de 25cm<sup>2</sup> à uma concentração de  $2,5 \cdot 10^6$  células e mantidas à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 100 U/mL de Penicilina, 100 U/mL de Estreptomicina e 100 µg/mL de Gentamicina, conforme mostra a **Figura 2**. Quatro destas garrafas de cultura celular foram separadas para a exposição à microgravidade simulada utilizando o Clinostato 3D e quatro garrafas utilizadas como grupo controle, mantidas na estufa de cultivo celular em Gravidade Terrestre normal (1G).

**Figura 2.** Imagem de microscopia óptica de células K562 em meio de cultura RPMI 1640 em aumento de 400X (A) e 1000X (B).



**Fonte:** O autor.

### 2.2.1 Simulação da microgravidade

Foi utilizado um Clinostato Tridimensional construído no Centro de Microgravidade FENG/PUCRS para a simulação de microgravidade. Os movimentos de rotação e revolução deste equipamento foram de 1,6 rpm constantes durante todo o processo de exposição das células. As quatro

garrafas de cultura celular preparadas anteriormente para exposição ao Clinostato 3D foram submetidas a exposição durante os períodos de 6, 12 e 24 horas, sempre dentro da estufa padrão de cultura celular (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>).

### 2.2.2 Análise morfológica

Foi realizada a análise morfológica das células em microscópio invertido Zeiss em aumento de 200X para análise da morfologia e confluência celular. Esta análise foi realizada tanto para o grupo de teste quanto para o grupo controle.

### 2.2.3 Diferenciação e contagem celular

As células K562 foram diferenciadas através da aplicação de 80 µM do indutor Hemina, 10 µL de uma solução de Benzidina, contendo 1% de Benzidina SIGMA e 15% de Ácido Acético Glacial e posteriormente adicionado 2µL de Peróxido de Hidrogênio. Após incubação de 7 minutos em Temperatura Ambiente foram analisadas em microscópio óptico com o auxílio de uma Câmara de Neubauer e um Hemocitômetro para realizar a contagem. Foram utilizadas alíquotas de 100 µL de suspensão celular para cada período após exposição ao Clinostato e do grupo controle.

### 2.2.4 Ensaio de viabilidade celular

Para cada período analisado foram retiradas amostras em triplicatas e lavadas com *Dulbeco's Phosphate Buffer Saline* (DPBS) para a retirada do meio de cultura, em uma concentração de  $3 \cdot 10^4$  células. As células foram coradas com o Azul de Trypan e a contagem de células vivas e mortas foi realizada em Câmara de Neubauer com o auxílio de um hemocitômetro.

O cálculo de viabilidade celular foi através da fórmula:

Viabilidade Celular (%) = Total de Células Viáveis (não coradas) / Total de Células (coradas e não coradas) X 100.

## 2.2.5 Análise Molecular através da técnica de qRT-PCR

As células expostas a microgravidade simulada e do grupo controle foram analisadas para alguns genes do ciclo celular através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, conforme **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Sequências de nucleotídeos dos genes testados.

Primer	Sequência
<b>P16</b>	F: 5'-GGAGCAGCATGGAGCCTTCG-3' R: 5'-TCCCTGCAAACCTCGTCCTC-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'-AGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT-3'

Fonte: BELLICANTA (2016)

Primeiramente foi extraído o RNA com a utilização do kit comercial RNA SV-Total PROMEGA e logo após, foi adicionado Tampão de Lise, aquecidas à 70°C durante 3 minutos e centrifugadas à 12000g durante 1 minuto à 4°C. Foi coletado o sobrenadante e adicionado 200µL de Álcool 95% para precipitação. A amostra foi transferida para uma coluna de sílica e centrifugada a 12000g durante 1 minuto. Foi adicionado 600µL de Tampão e novamente centrifugada nas mesmas condições anteriormente citadas. A enzima DNase diluída em Tampão e Cloreto de Magnésio MgCl<sub>2</sub> foi adicionada e incubada por 15 minutos à Temperatura Ambiente. Após a incubação foi adicionado o Tampão de Bloqueio da enzima e novamente centrifugada nas mesmas condições. Posteriormente as células foram tratadas com Tampão de Lavagem e o RNA retido na sílica foi eluído com 100µL de Água Livre de RNase por centrifugação à 12000g durante 2 minutos. Este RNA foi quantificado com o Fluorômetro Qubit 2.0 LIFE TECHNOLOGIES conforme orientações do fabricante. Foram separadas alíquotas de 5µL de cada amostra de RNA extraído e adicionado 195µL de Tampão contendo uma sonda RNA HS Assay LIFE TECHNOLOGIES e realizada a quantificação.

O cDNA foi sintetizado utilizando o SuperScript VILO MasterMix LIFE TECHNOLOGIES conforme orientações do fabricante. Foram adicionados 4µL de SuperScript VILO MasterMix a 16µL de RNA e expostas ao Termociclador Verit LIFE TECHNOLOGIES em ciclos térmicos de 25°C por

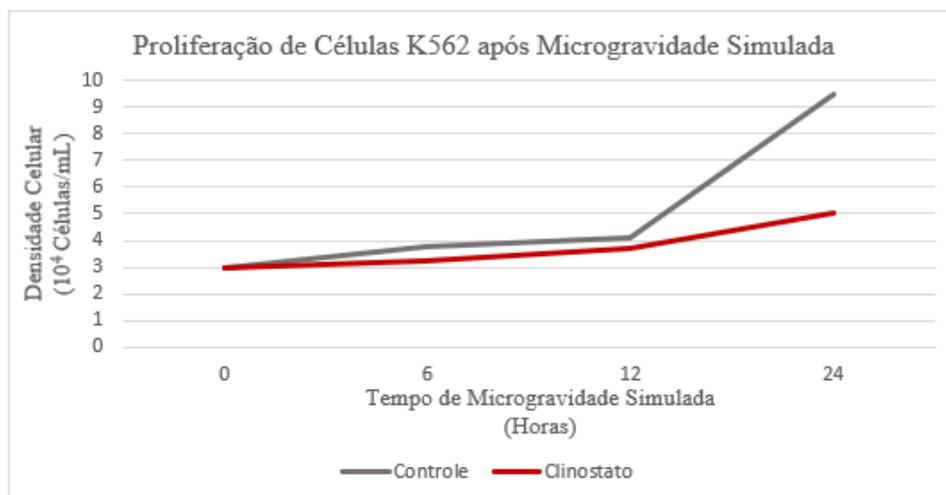
10 minutos, 42°C por 60 minutos e 85°C por 5 minutos. O cDNA foi quantificado com o mesmo fluorômetro conforme orientações do fabricante. Com alíquotas de 1µL de amostra de cDNA foram adicionados 199µL de Tampão com sonda ssDNA Assay LIFE TECHNOLOGIES e quantificado para análise de expressão gênica através da técnica de PCR em Tempo Real no equipamento StepOne Plus LIFE TECHNOLOGIES. As amostras foram amplificadas a partir de 20ng de cDNA de cada amostra. Foram utilizados primers complementares aos mRNAs dos genes p16, p21 e GAPDH como controle endógeno.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Análise Morfológica e Viabilidade Celular

A cultura celular obtida após a exposição ao Clinostato 3D por 6, 12 e 24 horas a uma densidade de  $3 \cdot 10^4$  células/mL resultou em uma diminuição da densidade em comparação ao grupo controle analisado nas mesmas concentrações de  $3 \cdot 10^4$  células/mL. As densidades obtidas das células K562 em microgravidade simulada durante 6, 12 e 24 horas foram de  $3,27 (\pm 0,10)$ ,  $3,69 (\pm 0,09)$  e  $5,03 (\pm 0,18) \times 10^4$  células/mL, respectivamente, enquanto que o grupo controle obteve as densidade de  $3,79 (\pm 0,05)$ ,  $4,08 (\pm 0,24)$  e  $9,45 (\pm 0,12) \times 10^4$  células/mL, conforme o gráfico demonstrado na **Figura 3**.

**Figura 3.** Gráfico demonstrando a proliferação celular das células K562 após exposição ao Clinostato 3D.



Fonte: O autor.

Em comparação ao grupo controle, as células em microgravidade simulada apresentaram 86,27%, 90,44% e 53,22% de densidade nos períodos de 6, 12 e 24 horas, respectivamente.

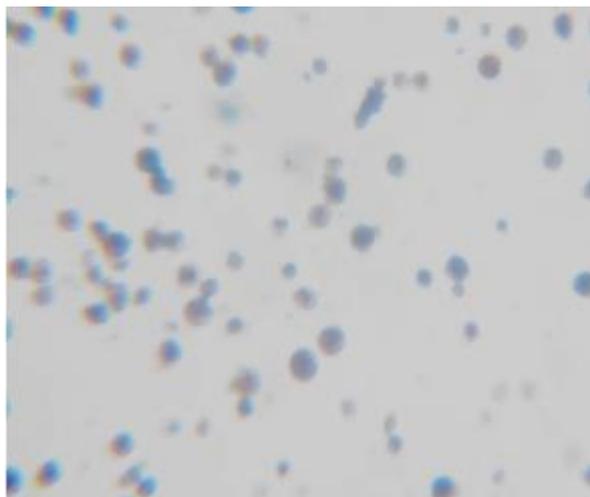
As células K562 expostas ao Clinostato 3D ao longo de cada 6 horas apresentaram uma proliferação de 1.09, 1.13 e 1.29 vezes nos períodos de 6, 12 e 24 horas, respectivamente, enquanto o grupo controle obteve 1.26, 1.07 e 2.31 vezes a cada 6 horas, nos mesmos períodos.

Entretanto, a análise pela coloração de Azul de Trypan não obteve resultados significativos, menos de 4% de células mortas em comparativo ao grupo controle.

### 2.3.2 Diferenciação Celular

Após a aplicação do indutor de diferenciação celular Hemina e reagentes para oxidação do grupamento Heme dos eritrócitos, pode-se observar a diferenciação celular em Eritrócitos conforme mostra a **Figura 4** logo abaixo.

**Figura 4.** Células K562 diferenciadas em eritrócitos após indução por Hemina. Aumento de 400X em microscópio óptico.



**Fonte:** O autor.

Visualmente houve uma redução da concentração de células diferenciadas em relação ao grupo controle, porém não significativa.

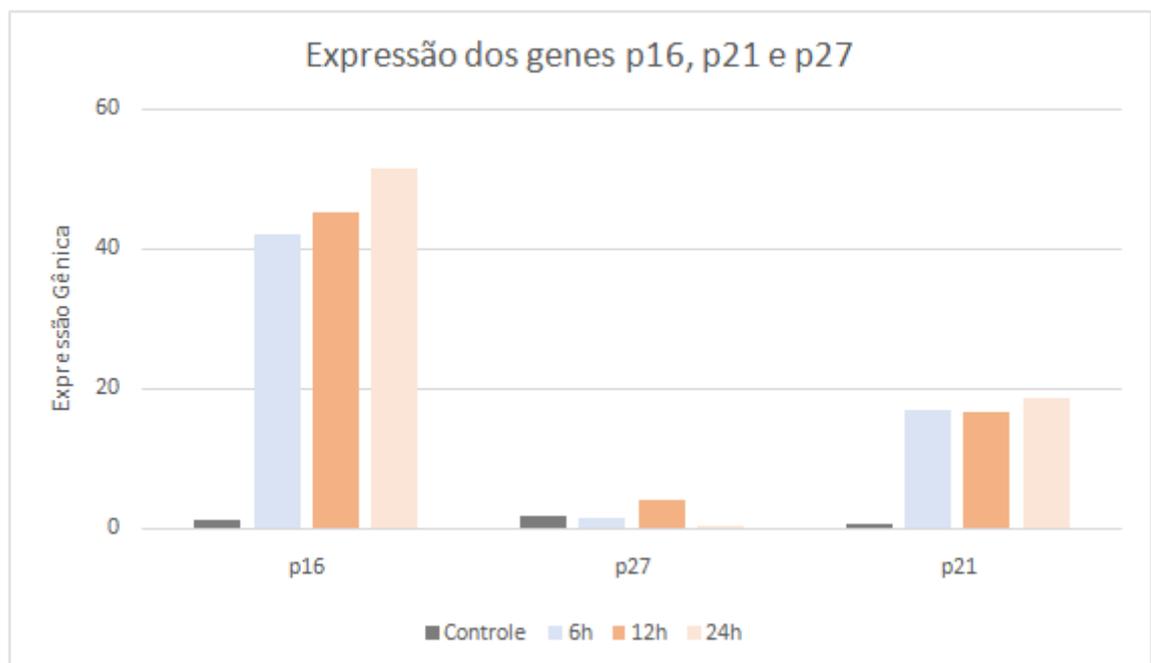
### 2.3.3 Análise Molecular através de qRT-PCR

As células obtiveram um aumento da expressão relativa ao gene p16 de 35.12, 37.56 e 42.83 vezes após a exposição ao Clinostato 3D nos períodos de 6, 12 e 24 horas, respectivamente.

Já para o gene p27, a expressão gênica não apresentou alteração significativa em qualquer período de exposição à microgravidade simulada.

A análise do gene p21 em células K562 após a exposição de 6, 12 e 24 horas no Clinostato 3D foram de 33.6, 32.89 e 37.24 vezes menor em comparação ao grupo controle.

**Figura 5.** Expressão dos genes p16, p21 e p27 após exposição ao Clinostato 3D.



Fonte: O autor.

## 2.4. Discussão e perspectivas

O presente estudo demonstrou uma inibição significativa da proliferação celular da linhagem K562 da exposição destas células à microgravidade simulada exercida pelo Clinostato 3D. Esta inibição proliferativa pode estar relacionada ao surgimento da Anemia do Voo Espacial.

A inibição na proliferação celular pós exposição à microgravidade simulada já foi demonstrada em células de medula óssea, células tronco mesenquimais, linfócitos, células de carcinoma prostático, entre outros. Porém, o efeito da microgravidade simulada já resultou em efeito contrário, ou seja, uma proliferação aumentada em alguns tipos celulares, como em células tronco originais de cordão umbilical, células de carcinoma colorretal, entre outros. Em alguns relatos, a utilização do Clinostato 3D induziu a apoptose de linfócitos de Jurkat, células de carcinoma tireoidiano, células endoteliais vasculares, entre outras. Assim, nestes casos, foi sugerido que a apoptose é a responsável pela inibição proliferativa.

Entretanto, a análise com Azul de Trypan, demonstrou que a utilização do Clinostato 3D em células K562 não causou morte celular. Logo, estes resultados corroboram a observação de que a proliferação celular reduzida não é causada pela apoptose celular. A quantidade de células diferenciadas em eritrócitos por Hemina diminuíram minimamente. Esta redução de eritrócitos já era esperada devido a redução da densidade celular. Este resultado também foi encontrado em células K562 em microgravidade simulada através de RCC (YI *et al.*, 2009).

De acordo com alguns relatos, a microgravidade simulada proveniente de diferentes aparelhos pode obter resultados diferentes, porém, o emprego de diferentes tipos celulares também pode explicar estas divergências entre aumento e diminuição da proliferação celular.

A microgravidade simulada possivelmente altera o ciclo celular das células expostas, diminuindo a quantidade de células na fase G0/G1 e, conseqüentemente, aumentando as células em fase S nas primeiras 12 horas de exposição. Em células CD34+ expostas à microgravidade simulada por RWV durante 24 horas foi observada uma fase S mais lenta (PLETT *et al.*, 2004).

Em leucócitos primários (COGOLI-GREUTER *et al.*, 1996) e células Jurkat (LEWIS *et al.*, 1998) em condições de microgravidade real ficou demonstrado que há uma desaceleração do ciclo celular. Células de carcinoma prostático (CLEJAN *et al.*, 1996) e células ROS 17/2.8 (GUIGNANDON *et al.*, 2001) apresentaram uma diminuição parcial na fase G0/G1 após exposição à microgravidade simulada, porém, células do

músculo liso vascular e células de câncer de mama MCF-7 (COINU *et al.*, 2006) apresentaram uma diminuição parcial na fase G2/M.

Proteínas reguladoras do ciclo celular possuem um papel fundamental nestes resultados, pois o ciclo celular é regulado por complexos quinases, compostos por uma subunidade catalítica e uma subunidade regulatória, as Quinases Dependentes de Ciclinas (*Cyclins Dependent Kinases* - CDK) e a Ciclina, respectivamente. Existem diversos tipos de Ciclinas e CDK, que irão regular as atividades de algumas proteínas fundamentais no ciclo celular através de fosforilações.

Para iniciar a fase G1 do ciclo celular as Ciclinas do tipo D são essenciais, pois estas ligam-se à CDK4 e CDK6, formando complexos CDK-Ciclina D. Para a regulação da progressão da fase G1 para a fase S, a associação das Ciclinas E à CDK2 são necessárias. Este mesmo CDK2 pode ser associado à Ciclina A, atuando durante a fase S. Para a passagem da fase G2 à M, as Ciclinas A e B formam um complexo com a CDK1 (VERMEULEN *et al.*, 2003).

Em células K562 expostas à microgravidade simulada por RCC observou-se uma diminuição da Ciclina A, gerando mais células em fase S e um aumento na Ciclina B, D1 e E, levando ao acúmulo de células em fase S (YI *et al.*, 2009).

Uma redução da capacidade das células progredirem da fase S foi demonstrado em células BM CD34+ cultivadas em RWV, pois houve uma reduzida expressão de Ciclinas A, B e do gene p21, além disso, não houve alteração na expressão de Ciclina D1, D2, D3, Ciclina E, CDK2 e do gene p27 (PLETT *et al.*, 2004). Fibroblastos humanos expostos ao Clinostato 3D demonstraram um *down-regulation* de p21 (RASE *et al.*, 2002). Portanto, sugere-se que estas alterações do ciclo celular causadas pela microgravidade simulada é devido a diminuição de Ciclina A e outros reguladores específicos do ciclo celular.

A proteína p21 interfere no crescimento celular, sendo caracterizada como uma reguladora negativa do ciclo celular, ou seja, é uma proteína inibidora de CDK. Caracteriza-se as proteínas p21 como específicas dos complexos Ciclina-CDK4e Ciclina-CDK6, atuantes na fase G1 (BURAVKOVA, 2001). A expressão reduzida de p21 encontrada no presente estudo pode

sugerir uma inativação funcional de p53, considerando que a expressão de p21 é regulada pela p53 (DULIC, 1993), esta alteração pode ser a causa de alterações epigenéticas ou instabilidades genômicas.

Neste estudo foi observada uma expressão positiva de p16 nas células K562 expostas ao Clinostato 3D, que pode ser devido à algum dano no DNA destas células ou reações oxidativas, pois a p16 é induzida por diversos estímulos. As causas referidas do aumento de p16 podem resultar em uma redução no crescimento celular, caracterizando o estado de senescência celular, independente da estrutura ou tamanho dos telômeros.

Uma alteração na expressão de p53 é consequente de telômeros disfuncionais, portanto, correlaciona-se com a alteração na expressão do gene p21. Estudos mais específicos para analisar a senescência celular são recomendados.

Entretanto, as células K562 expostas à microgravidade simulada apresentaram um aumento na expressão de p16 e uma diminuição de p21 em relação ao grupo controle. Este achado pode ser resultado de algum nível de estresse mecânico causado pela clinorrotação, alterando assim, a expressão destes genes citados anteriormente e possivelmente sem alterações nos telômeros ou danos no DNA destas células, o que resultaria em uma superexpressão de p53 e consequentemente aumento da expressão de p21.

A proteína p27 é responsável pela ativação da via MAPK, que atua na produção de Ciclinas. O presente estudo não demonstrou alteração na expressão do gene p27, talvez devido ao fato de que a p27 é inespecífica na regulação negativa do ciclo celular, isto quer dizer que esta proteína pode atuar em diversos complexos de Ciclina-CDK (FABRIS, 2015).

Além disto, o citoesqueleto íntegro é fundamental para o processo do ciclo celular. Há a ruptura do citoesqueleto em vários tipos celulares, tanto em voos espaciais quanto em microgravidade simulada. Este fenômeno foi demonstrado em células MC3T3-E1 após um voo espacial de quatro dias, onde houve uma acentuada redução do número de fibras de estresse e perda de aderências focais (HUGHES-FULDRD, 2002). Células endoteliais da veia umbilical humana (CARLSSON *et al.*, 2003) e células C6 (UVA *et al.*, 2002a, b) apresentaram uma desorganização e perda completa de fibras de actina e alteração na morfologia celular quando expostas à microgravidade simulada,

explicando parcialmente o estacionamento na fase G0/G1. Células K562 expostas à RCC apresentaram desigual distribuição dos microfilamentos e desorganização dos microtúbulos (YI *et al.*, 2009).

Células K562 são células suspensas e não dependem exclusivamente dos microfilamentos para a progressão da fase G1, devido à ausência de ancoragem, portanto, não seria esperado uma parada na fase G0, G1 nas células com microfilamentos alterados pela exposição à microgravidade simulada (YI *et al.*, 2009).

Conclui-se que a cultura de células de linhagem eritroleucêmica K562 expostas à microgravidade simulada por Clinostato 3D resultou em uma diminuição significativa da proliferação celular, porém, sem acarretar morte celular, possivelmente devido à uma alteração no ciclo celular. Estes achados podem ser responsáveis pelo surgimento da Anemia do Voo Espacial. As células K562 podem servir de modelo para futuras pesquisas envolvendo o sistema hematopoiético, em microgravidade real ou simulada.

## 2 CONCLUSÃO

Conclui-se que a cultura de células de linhagem eritroleucêmica K562 expostas à microgravidade simulada por Clinostato 3D resulta em uma diminuição significativa da proliferação celular, porém, sem acarretar morte celular, possivelmente devido à uma alteração no ciclo celular. Estes achados podem ser responsáveis pelo surgimento da Anemia do Voo Espacial. As células K562 podem servir de modelo para pesquisas futuras em microgravidade real ou simulada.

## REFERÊNCIAS

ARASE, Yoshiko 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.

BALAKHOVSKIY, I. S.; LEGENKOV, V. I.; KISELEV, R. K. **Changes in hemoglobin mass during real and simulated space flights.** Kosm. Biol. Aviakosmicheskaya Med.,(USSR), v. 14, n. 6, p. 14-20, 1980.

BELLICANTA, Patrícia Lazzarotto et al. **Efeito da microgravidade simulada em fibroblastos de pele humana.** 2016

BROWN, Elliot et al. **The Metabolic Cost of Walking in Simulated Martian Gravity and its Implications.** Journal of Exercise Physiology Online, v. 21, n. 1, 2018

BURAVKOVA, L. B.; ROMANOV, Yu A. **The role of cytoskeleton in cell changes under condition of simulated microgravity.** Acta astronautica, v. 48, n. 5-12, p. 647-650, 2001.

COGOLI, A. **Hematological and immunological changes during space flight.** Acta astronautica, v. 8, n. 9-10, p. 995-1002, 1981.

COLLET, P. H. et al. **Effects of 1-and 6-month spaceflight on bone mass and biochemistry in two humans.** Bone, v. 20, n. 6, p. 547-551, 1997.

DOMARATSKAYA, E. I. et al. **Studies on clonogenic hemopoietic cells of vertebrate in space: problems and perspectives.** Advances in Space Research, v. 30, n. 4, p. 771-776, 2002.

DUAN, Jianming et al. **Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involves DNA-damage-and-repair genes**

**and telomere shortening.** The international journal of biochemistry & cell biology, v. 37, n. 7, p. 1407-1420, 2005.

DUKE, P. Jackie; DAANE, Elizabeth L.; MONTUFAR-SOLIS, Dina. **Studies of chondrogenesis in rotating systems.** Journal of cellular biochemistry, v. 51, n. 3, p. 274-282, 1993.

DULIĆ, V. et al. **Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 90, n. 23, p. 11034-11038, 1993.

ESPOSITO, L. et al. **Protein crystal growth in the advanced protein crystallization facility on the LMS mission: a comparison of Sulfolobus solfataricus alcohol dehydrogenase crystals grown on the ground and in microgravity.** Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, v. 54, n. 3, p. 386-390, 1998.

FABRIS, Linda et al. **p27kip1 controls H-Ras/MAPK activation and cell cycle entry via modulation of MT stability.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 112, n. 45, p. 13916-13921, 2015.

FITTS, Robert H.; RILEY, Danny R.; WIDRICK, Jeffrey J. **Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity.** Journal of Experimental Biology, v. 204, n. 18, p. 3201-3208, 2001.

GAZENKO, O. G.; GRIGOR'EV, A. I.; NATROCHIN, IuV. **Water-salt homeostasis and space flight. Problemy kosmicheskoi biologii**, v. 54, p. 1, 1986.

GRANET, C. et al. **Rotating-wall vessels, promising bioreactors for osteoblastic cell culture: comparison with other 3D conditions**. *Medical and Biological Engineering and Computing*, v. 36, n. 4, p. 513-519, 1998.

GREEN, A. R. et al. **Induced myeloid differentiation of K562 cells with downregulation of erythroid and megakaryocytic transcription factors: a novel experimental model for hemopoietic lineage restriction**. *Experimental hematology*, v. 21, n. 4, p. 525-531, 1993.

GRIGORIEV, A. I. et al. **Clinical and physiological evaluation of bone changes among astronauts after long-term space flights. Aviakosmicheskaja i ekologicheskaja meditsina= Aerospace and environmental medicine**, v. 32, n. 1, p. 21-25, 1998.

GRIMM, Daniela et al. **Growing tissues in real and simulated microgravity: new methods for tissue engineering**. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 20, n. 6, p. 555-566, 2014.

HEER, Martina et al. **Body mass changes, energy, and protein metabolism in space**. *American journal of kidney diseases*, v. 38, n. 3, p. 691-695, 2001.

HOSON, Takayuki et al. **Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness**. *Planta*, v. 203, n. 1, p. S187-S197, 1997.

HU, Lifang et al. **Response and adaptation of bone cells to simulated microgravity**. Acta Astronautica, v. 104, n. 1, p. 396-408, 2014.

KALANDAROVA, M. P. **Changes in hematologic indicators in personnel testing during 370-day anti-orthostatic hypokinesia**. Kosmicheskaia biologii i aviakosmicheskaia meditsina, v. 25, n. 3, p. 15-18, 1991.

KOEFFLER, H. P.; GOLDE, D. W. **Human myeloid leukemia cell lines: a review**. Blood, v. 56, n. 3, p. 344-350, 1980.

LEACH, Carolyn S.; JOHNSON, Philip C. **Influence of spaceflight on erythrokinetics in man**. Science, v. 225, n. 4658, p. 216-218, 1984.

LOZZIO, Carmen B.; LOZZIO, Bismarck B. **Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome**. Blood, v. 45, n. 3, p. 321-334, 1975.

MACHO, L. et al. **Plasma hormone levels in human subject during stress loads in microgravity and at readaptation to Earth's gravity**. Journal of gravitational physiology: a journal of the International Society for Gravitational Physiology, v. 8, n. 1, p. P131-2, 2001.

MARKIN, Andrei et al. **The dynamics of blood biochemical parameters in cosmonauts during long-term space flights**. Acta astronautica, v. 42, n. 1-8, p. 247-253, 1998.

MARTINELLI, Leonardo Krás Borges et al. **Aperfeiçoamento e validação do clinostato 3D e seu uso no estudo de células do sistema imune humano.** 2007.

MICHURINA, T. V. et al. **Blood and clonogenic hemopoietic cells of newts after the space flight.** Advances in Space Research, v. 17, n. 6-7, p. 295-298, 1996.

PLETT, P. Artur et al. **Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells.** Experimental hematology, v. 32, n. 8, p. 773-781, 2004.

POLYAKOV, Valerie V.; LACOTA, Natasha G.; GUNDEL, Alexander. **Human thermohomeostasis onboard “Mir” and in simulated microgravity studies.** Acta astronautica, v. 49, n. 3-10, p. 137-143, 2001.

RODRIGUES, Carlos AV et al. **Stem cell cultivation in bioreactors.** Biotechnology advances, v. 29, n. 6, p. 815-829, 2011.

SCHLABS, Thomas et al. **Comparison of cardiovascular and biomechanical parameters of supine lower body negative pressure and upright lower body positive pressure to simulate activity in 1/6 G and 3/8 G.** Journal of Applied Physiology, v. 115, n. 2, p. 275-284, 2013.

SONNENFELD, Gerald; BUTEL, Janet S.; SHEARER, William T. **Effects of the space flight environment on the immune system.** Reviews on environmental health, v. 18, n. 1, p. 1-18, 2003.

STROLLO, Felice. **Hormonal changes in humans during spaceflight.**

In: *Advances in space biology and medicine*. Elsevier, 1999. p. 99-129.

SUTHERLAND, Judy A. et al. **Differentiation of K562 leukemia cells along erythroid, macrophage, and megakaryocyte lineages.** *Journal of biological response modifiers*, v. 5, n. 3, p. 250-262, 1986.

VLADIMIRSKAYA, E. B. et al. **Proliferative activity of leukemic cells in acute leukemia.** *Federation proceedings. Translation supplement; selected translations from medical-related science*, v. 25, n. 4, p. 633-636, 1966.

WATENPAUGH, Donald E. **Fluid volume control during short-term space flight and implications for human performance.** *Journal of Experimental Biology*, v. 204, n. 18, p. 3209-3215, 2001.

WHITE, Ronald J.; AVERNER, Maurice. **Humans in space.** *Nature*, v. 409, n. 6823, p. 1115, 2001.

WHITE, Ronald J.; BLOMQUIST, C. Gunnar. **Central venous pressure and cardiac function during spaceflight.** *Journal of Applied Physiology*, v. 85, n. 2, p. 738-746, 1998.

YI, Zong-Chun et al. **Simulated microgravity inhibits the proliferation of K562 erythroleukemia cells but does not result in apoptosis.** *Advances in Space Research*, v. 44, n. 2, p. 233-244, 2009.

### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo demonstrou uma inibição significativa da proliferação celular da linhagem K562 quando exposta à microgravidade simulada exercida pelo Clinostato 3D. Esta inibição proliferativa pode estar relacionada ao surgimento da Anemia do Voo Espacial.

A inibição na proliferação celular pós exposição à microgravidade simulada já foi demonstrada em outros tipos celulares, tais como células de medula óssea, células tronco mesenquimais, linfócitos, células de carcinoma prostático, entre outros. Porém, o efeito da microgravidade simulada já resultou em efeito contrário, ou seja, uma proliferação aumentada em alguns tipos celulares, como em células tronco originas de cordão umbilical, células de carcinoma colorretal, entre outros. Em alguns relatos, a utilização do Clinostato 3D induziu a apoptose de linfócitos de Jurkat, células de carcinoma tireoidiano, células endoteliais vasculares, entre outras. Assim, nestes casos, foi sugerido que a apoptose é a responsável pela inibição proliferativa.

A análise com Azul de Trypan, mostrou que a utilização do Clinostato 3D em células K562 não causou morte celular, corroborando resultados que demonstraram que a proliferação celular reduzida não é causada pela apoptose celular. A quantidade de células diferenciadas em eritrócitos por Hemina diminuíram minimamente. Esta redução de eritrócitos já era esperada devido a redução da densidade celular. Este resultado também foi encontrado em células K562 em microgravidade simulada através de RCC (YI *et al.*, 2009).

De acordo com alguns relatos, a microgravidade simulada proveniente de diferentes aparelhos pode obter resultados diferentes, porém, os diversos tipos celulares também podem resultar nestas divergências entre aumento e diminuição da proliferação celular.

A microgravidade simulada possivelmente altera o ciclo celular das células expostas, diminuindo a quantidade de células na fase G0/G1 e, conseqüentemente, aumentando as células em fase S nas primeiras 12 horas de exposição. Em células CD34+ expostas a microgravidade simulada por RWV durante 24 horas resultou em uma fase S mais lenta (PLETT *et al.*, 2004). Na microgravidade real foi demonstrado em leucócitos primários (COGOLI-GREUTER *et al.*, 1996) e células Jurkat (LEWIS *et al.*, 1998) uma desaceleração do ciclo celular. Em células de carcinoma prostático (CLEJAN *et al.*, 1996) e células ROS 17/2.8 (GUIGNANDON *et al.*, 2001) observou-se uma diminuição parcial na fase G0/G1 após exposição à microgravidade simulada, porém, em célula do músculo liso vascular e

células de câncer de mama MCF-7 (COINU *et al.*, 2006) constatou-se uma diminuição parcial na fase G2/M.

Proteínas reguladoras do ciclo celular possuem um papel fundamental nestes resultados, pois o ciclo celular é regulado por complexo quinases, compostos por uma subunidade catalítica e uma subunidade regulatória, as Quinases Dependentes de Ciclinas (CDK, do inglês *Cyclins Dependent Kinases*) e a Ciclina, respectivamente. Existem diversos tipos de Ciclinas e CDK's, que irão regular as atividades de algumas proteínas fundamentais no ciclo celular através de fosforilações.

Para iniciar a fase G1 do ciclo celular as Ciclinas do tipo D são essenciais, pois estas ligam-se à CDK4 e CDK6, formando complexos CDK-Ciclina D. Para a regulação da progressão da fase G1 para a fase S, a associação das Ciclinas E à CDK2 são necessárias. Este mesmo CDK2 pode ser associado à Ciclina A, sendo necessário durante a fase S. Para a passagem da fase G2 à M, as Ciclinas A e B formam um complexo com a CDK1 (VERMEULEN *et al.*, 2003).

Em células K562 expostas a microgravidade simulada por RCC há uma diminuição da Ciclina A, promovendo células em fase S e um aumento na Ciclina B, D1 e E, causando acúmulo de células em fase S (YI *et al.*, 2009).

Uma redução da capacidade das células progredirem da fase S foi demonstrado em células BM CD34+ cultivadas em RWV, pois houve uma reduzida expressão de Ciclinas A, B e do gene p21. Além disso, não houve alteração na expressão de Ciclina D1, D2, D3, Ciclina E, CDK2 e do gene p27 (PLETT *et al.*, 2004). Em fibroblastos humanos expostos ao Clinostato 3D constatou-se uma *down-regulation* de p21 (RASE *et al.*, 2002). Portanto, sugere-se que estas alterações do ciclo celular causadas pela microgravidade simulada podem estar sendo causadas por uma diminuição de Ciclina A e outros reguladores específicos do ciclo celular.

A proteína p21 interfere no crescimento celular, pois é caracterizada como uma reguladora negativa do ciclo celular, ou seja, é uma proteína inibidora de CDK. Sendo específicas dos complexos Ciclina-CDK4e Ciclina-CDK6, atuantes na fase G1 (BURAVKOVA, 2001). A expressão reduzida de p21 encontrada no presente estudo pode sugerir uma inativação funcional de p53, sabendo que a expressão de p21 é expressa e regulada pela p53 (DULIC, 1993), esta alteração pode ser a causa de alterações epigenéticas ou instabilidades genômicas.

Foi observada uma expressão positiva de p16 nas células K562 expostas ao Clinostato 3D, que pode ser devido à algum dano no DNA destas células ou reações oxidativas, pois a

p16 é induzida por diversos estímulos. As causas referidas do aumento de p16 podem resultar uma redução no crescimento celular, caracterizando o estado de senescência celular, independente da estrutura ou tamanho dos telômeros. Uma alteração na expressão de p53 é consequente de telômeros disfuncionais, portanto, correlaciona-se com a alteração na expressão do gene p21.

Por outro lado, células K62 expostas à microgravidade simulada apresentaram um aumento na expressão de p16 e uma diminuição de p21 em relação ao grupo controle. Este fenômeno pode ter resultado de algum nível de estresse mecânico causado pela clinorrotação, assim, alterando a expressão destes genes citados anteriormente e possivelmente sem alterações nos telômeros ou danos no DNA destas células, o que resultaria em uma superexpressão de p53 e conseqüentemente aumento da expressão de p21.

A proteína p27 é responsável pela ativação da via MAPK, que atua na produção de Ciclinas. O presente estudo não demonstrou alteração do gene p27, devido a p27 ser inespecífica na regulação negativa do ciclo celular, isto quer dizer que esta proteína pode atuar em diversos complexos de Ciclina-CDK (FABRIS, 2015).

Além disto, o citoesqueleto íntegro é fundamental para o processo do ciclo celular. Há a ruptura do citoesqueleto em vários tipos celulares, tanto em voos espaciais quanto em microgravidade simulada, como demonstrado em células MC3T3-E1 após um voo espacial de quatro dias, onde houve uma acentuada redução do número de fibras de estresse e perda de aderências focais (HUGHES-FULDRD, 2002). Em células endoteliais da veia umbilical humana (CARLSSON *et al.*, 2003) e células C6 (UVA *et al.*, 2002a,b) apresentaram uma desorganização e perda completa de fibras de actina e alteração na morfologia celular quando expostas à microgravidade simulada, explicando parcialmente o estacionamento na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Células K562 expostas à RCC apresentaram desigual distribuição dos microfilamento e desorganização dos microtúbulos (YI *et al.*, 2009).

Células K562 são células suspensas e não dependem exclusivamente dos microfilamentos para a progressão da fase G<sub>1</sub>, devido a ausência de ancoragem, portanto, não há parada na fase G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub> nas células com microfilamentos alterados pela exposição à microgravidade simulada (YI *et al.*, 2009).

Conclui-se que a cultura de células de linhagem eritroleucêmica K562 expostas à microgravidade simulada por Clinostato 3D resultou em uma diminuição significativa da proliferação celular sem acarretar morte celular, possivelmente devido à uma alteração no ciclo celular. Estes achados podem ser responsáveis pelo surgimento da Anemia do Voo

Espacial. As células K562 podem servir de modelo para pesquisas futuras em microgravidade real ou simulada.

## REFERÊNCIAS

ARASE, Yoshiko 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.

BALAKHOVSKIY, I. S.; LEGENKOV, V. I.; KISELEV, R. K. Changes in hemoglobin mass during real and simulated space flights. **Kosm. Biol. Aviakosmicheskaya Med.,(USSR)**, v. 14, n. 6, p. 14-20, 1980.

BELLICANTA, Patrícia Lazzarotto et al. Efeito da microgravidade simulada em fibroblastos de pele humana. 2016

BROWN, Elliot et al. The Metabolic Cost of Walking in Simulated Martian Gravity and its Implications. **Journal of Exercise Physiology Online**, v. 21, n. 1, 2018

BURAVKOVA, L. B.; ROMANOV, Yu A. The role of cytoskeleton in cell changes under condition of simulated microgravity. **Acta astronautica**, v. 48, n. 5-12, p. 647-650, 2001.

COGOLI, A. Hematological and immunological changes during space flight. **Acta astronautica**, v. 8, n. 9-10, p. 995-1002, 1981.

COLLET, P. H. et al. Effects of 1-and 6-month spaceflight on bone mass and biochemistry in two humans. **Bone**, v. 20, n. 6, p. 547-551, 1997.

DOMARATSKAYA, E. I. et al. Studies on clonogenic hemopoietic cells of vertebrate in space: problems and perspectives. **Advances in Space Research**, v. 30, n. 4, p. 771-776, 2002.

DUAN, Jianming et al. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 7, p. 1407-1420, 2005.

DUKE, P. Jackie; DAANE, Elizabeth L.; MONTUFAR-SOLIS, Dina. Studies of chondrogenesis in rotating systems. **Journal of cellular biochemistry**, v. 51, n. 3, p. 274-282, 1993.

DULIĆ, V. et al. Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 23, p. 11034-11038, 1993.

ESPOSITO, L. et al. Protein crystal growth in the advanced protein crystallization facility on the LMS mission: a comparison of *Sulfolobus solfataricus* alcohol dehydrogenase crystals grown on the ground and in microgravity. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 54, n. 3, p. 386-390, 1998.

FABRIS, Linda et al. p27kip1 controls H-Ras/MAPK activation and cell cycle entry via modulation of MT stability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 45, p. 13916-13921, 2015.

FITTS, Robert H.; RILEY, Danny R.; WIDRICK, Jeffrey J. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 18, p. 3201-3208, 2001.

GAZENKO, O. G.; GRIGOR'EV, A. I.; NATROCHIN, IuV. Water-salt homeostasis and space flight. **Problemy kosmicheskoi biologii**, v. 54, p. 1, 1986.

GRANET, C. et al. Rotating-wall vessels, promising bioreactors for osteoblastic cell culture: comparison with other 3D conditions. **Medical and Biological Engineering and Computing**, v. 36, n. 4, p. 513-519, 1998.

GREEN, A. R. et al. Induced myeloid differentiation of K562 cells with downregulation of erythroid and megakaryocytic transcription factors: a novel experimental model for hemopoietic lineage restriction. **Experimental hematology**, v. 21, n. 4, p. 525-531, 1993.

GRIGORIEV, A. I. et al. Clinical and physiological evaluation of bone changes among astronauts after long-term space flights. **Aviakosmicheskaja i ekologicheskaja meditsina= Aerospace and environmental medicine**, v. 32, n. 1, p. 21-25, 1998.

GRIMM, Daniela et al. Growing tissues in real and simulated microgravity: new methods for tissue engineering. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 20, n. 6, p. 555-566, 2014.

HEER, Martina et al. Body mass changes, energy, and protein metabolism in space. **American journal of kidney diseases**, v. 38, n. 3, p. 691-695, 2001.

HOSON, Takayuki et al. Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness. **Planta**, v. 203, n. 1, p. S187-S197, 1997.

HU, Lifang et al. Response and adaptation of bone cells to simulated microgravity. **Acta Astronautica**, v. 104, n. 1, p. 396-408, 2014.

KALANDAROVA, M. P. Changes in hematologic indicators in personnel testing during 370-day anti-orthostatic hypokinesia. **Kosmicheskaja biologija i aviakosmicheskaja meditsina**, v. 25, n. 3, p. 15-18, 1991.

KOEFFLER, H. P.; GOLDE, D. W. Human myeloid leukemia cell lines: a review. **Blood**, v. 56, n. 3, p. 344-350, 1980.

LEACH, Carolyn S.; JOHNSON, Philip C. Influence of spaceflight on erythrokinetics in man. **Science**, v. 225, n. 4658, p. 216-218, 1984.

LOZZIO, Carmen B.; LOZZIO, Bismarck B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. **Blood**, v. 45, n. 3, p. 321-334, 1975.

MACHO, L. et al. Plasma hormone levels in human subject during stress loads in microgravity and at readaptation to Earth's gravity. **Journal of gravitational**

**physiology: a journal of the International Society for Gravitational Physiology**, v. 8, n. 1, p. P131-2, 2001.

MARKIN, Andrei et al. The dynamics of blood biochemical parameters in cosmonauts during long-term space flights. **Acta astronautica**, v. 42, n. 1-8, p. 247-253, 1998.

MARTINELLI, Leonardo Krás Borges et al. Aperfeiçoamento e validação do clinostato 3D e seu uso no estudo de células do sistema imune humano. 2007.

MICHURINA, T. V. et al. Blood and clonogenic hemopoietic cells of newts after the space flight. **Advances in Space Research**, v. 17, n. 6-7, p. 295-298, 1996.

PLETT, P. Artur et al. Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells. **Experimental hematology**, v. 32, n. 8, p. 773-781, 2004.

POLYAKOV, Valerie V.; LACOTA, Natasha G.; GUNDEL, Alexander. Human thermohomeostasis onboard “Mir” and in simulated microgravity studies. **Acta astronautica**, v. 49, n. 3-10, p. 137-143, 2001.

RODRIGUES, Carlos AV et al. Stem cell cultivation in bioreactors. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 815-829, 2011.

SCHLABS, Thomas et al. Comparison of cardiovascular and biomechanical parameters of supine lower body negative pressure and upright lower body positive pressure to simulate activity in 1/6 G and 3/8 G. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 2, p. 275-284, 2013.

SONNENFELD, Gerald; BUTEL, Janet S.; SHEARER, William T. Effects of the space flight environment on the immune system. **Reviews on environmental health**, v. 18, n. 1, p. 1-18, 2003.

STROLLO, Felice. Hormonal changes in humans during spaceflight. In: **Advances in space biology and medicine**. Elsevier, 1999. p. 99-129.

SUTHERLAND, Judy A. et al. Differentiation of K562 leukemia cells along erythroid, macrophage, and megakaryocyte lineages. **Journal of biological response modifiers**, v. 5, n. 3, p. 250-262, 1986.

VLADIMIRSKAYA, E. B. et al. Proliferative activity of leukemic cells in acute leukemia. **Federation proceedings. Translation supplement; selected translations from medical-related science**, v. 25, n. 4, p. 633-636, 1966.

WATENPAUGH, Donald E. Fluid volume control during short-term space flight and implications for human performance. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 18, p. 3209-3215, 2001.

WHITE, Ronald J.; AVERNER, Maurice. Humans in space. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1115, 2001.

WHITE, Ronald J.; BLOMQUIST, C. Gunnar. Central venous pressure and cardiac function during spaceflight. **Journal of Applied Physiology**, v. 85, n. 2, p. 738-746, 1998.

YI, Zong-Chun et al. Simulated microgravity inhibits the proliferation of K562 erythroleukemia cells but does not result in apoptosis. **Advances in Space Research**, v. 44, n. 2, p. 233-244, 2009.

## **ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA UNIFA**

### **1 ESCOPO DA PUBLICAÇÃO**

Publicada desde 1985, a Revista da UNIFA é um periódico científico, semestral, avaliado às cegas por pares. Em seu escopo constam os estudos do Poder Aeroespacial que têm por elementos constitutivos a Força Aérea, a Aviação Civil, a Infraestrutura Aeroespacial, a Indústria Aeroespacial e o Complexo Científico-Tecnológico Aeroespacial, e outros, que no interesse do Comando da Aeronáutica venham substanciar os referidos estudos. Dado o alto grau de complexidade desses estudos, são agregados outros campos do conhecimento, tais como as grandes áreas definidas pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a saber: Ciências Biológicas, Ciências da Saúde, Engenharias, Ciências Humanas, Ciências Sociais Aplicadas, a área Multidisciplinar, entre outras.

### **2 REGRAS GERAIS**

As regras da Revista da UNIFA são baseadas nas normas de Documentação e Informação da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), entre elas a NBR 6023, NBR 6028, NBR 10520, etc. A Editoria Científica se reserva o direito de publicar apenas artigos inéditos. Por necessidade de padronização, o Editor-Chefe, sem alterar o sentido e o conteúdo, poderá fazer pequenas alterações no texto original. Os direitos autorais serão cedidos à Universidade da Força Aérea, sem ônus para esta instituição, de acordo com a autorização preenchida pelo(s) autor(es), conforme anexo A. Os conceitos e opiniões expressos nos artigos, a exatidão e a procedência das citações são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

### **3 ANONIMATO DO(S) AUTOR(ES)**

Considera-se quebra de anonimato:

- a) qualquer referência explícita da autoria no corpo do texto ou em rodapé;
- b) marcas de revisão presentes no texto, oriundas de ferramentas de informática, como as marcas inteligentes que permitem a identificação da autoria;
- c) nome do usuário cadastrado no programa Microsoft Word®;
- d) citação vinculada ao nome do autor, do orientador da dissertação, tese do autor ou outra obra/publicação; e
- e) qualquer referência dos autores dos trabalhos em relação às respectivas participações em grupos de pesquisa.

## 4 ARQUIVO ELETRÔNICO

O autor deverá eliminar qualquer elemento que permita o reconhecimento da autoria do artigo, seja no corpo do texto ou na propriedade do Software do sistema operacional.

## 5 TIPOS DE ARTIGOS ACEITOS

### 5.1 Artigos originais

Trabalhos científicos que comunicam resultados de pesquisas concluídas ou em andamento, que discutem ideias, métodos, técnicas, processos e resultados e que apresentam dados originais de descobertas com relação a aspectos experimentais, observacionais ou documentais, com autoria declarada, das diversas áreas do conhecimento.

#### 5.1.1 Tamanho do artigo

É permitido entre 4000 e 6000 palavras, incluindo o resumo, as referências, tabelas e ilustrações. A numeração deverá ocorrer a partir da segunda página, no canto superior direito, em fonte 10.

#### 5.1.2 Estrutura formal

Introdução, desenvolvimento (deve conter uma revisão da literatura, os materiais e métodos utilizados, os resultados e/ou discussões obtidos), conclusão e referências.

#### 5.1.3 Formatação

Arquivos em 1 (uma) coluna em *Word for Windows*, páginas com formato A4; margens superior, inferior, esquerda e direita a 3 cm, 2 cm, 3 cm, 2 cm, respectivamente; fonte Arial, tamanho 12, com espaçamento entre linhas de 1,5.

#### 5.1.4 Título e subtítulo

O artigo deve ser precedido por título e, se houver, subtítulo, separado por dois-pontos. O título e o subtítulo deverão estar em negrito, na língua do texto, em formato justificado, fonte Arial e tamanho 16. O título deverá ter somente a primeira letra da primeira palavra maiúscula e o subtítulo deverá estar com letras minúsculas, salvo regras gramaticais. O título e o subtítulo, em inglês e em espanhol, seguem a mesma padronização da estrutura gramatical do título e subtítulo em português, exceto pela apresentação da fonte, que deverá ser itálica, sem negrito, em Arial e tamanho 14. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título e subtítulo. Quando imprescindível, inserir nota de rodapé explicativa.

#### 5.1.5 Dados de identificação e afiliação

Será solicitado o minicurrículo dos autores quando iniciado o processo de avaliação.

#### 5.1.6 Apoio/Agradecimento institucional

O apoio/agradecimento institucional, quando aplicável, deverá ser descrito em nota de rodapé. Entende-se por apoio/agradecimento institucional a informação que demonstre a participação de instituições em prol da realização da pesquisa, excluindo-se qualquer dúvida quanto a eventuais conflitos de interesses.

#### 5.1.7 Resumo em Português

Deve ser constituído de 100 a 250 palavras, um só parágrafo, em espaçamento simples e fonte Arial, tamanho 10, seguido, logo abaixo, das palavras representativas do conteúdo do trabalho, isto é, palavras-chave e/ou descritores.

As siglas e abreviaturas deverão ser precedidas do significado por extenso. Os resumos enviados poderão, também, sofrer pequenas alterações pelos revisores.

#### 5.1.8 Palavras-chave

Devem ser apresentadas 4 (quatro) palavras-chave, em português, separadas por ponto. Limitam-se as expressões a até 3 (três) palavras, sendo que somente a primeira letra da primeira palavra ficará em maiúscula. Siglas poderão ser empregadas, desde que estejam definidas, por extenso, no resumo.

#### 5.1.9 Resumos e palavras-chave em inglês e espanhol

Seguem as mesmas regras do resumo e das palavras-chave em português. Adicionalmente, utiliza-se a fonte itálica.

#### 5.1.10 Numeração progressiva

Em relação a essa numeração, a Revista da UNIFA segue a ABNT NBR 6024. A composição do texto em seções é numerada progressivamente, iniciando-se com a primeira seção INTRODUÇÃO até a CONCLUSÃO, não se enumerando apenas a REFERÊNCIA. Somente será permitida a subdivisão até a seção terciária e os destaques para a numeração progressiva das seções deverão ser:

**1 SEÇÃO PRIMÁRIA** (Todas as letras em maiúsculas e em negrito);

**1.1 Seção secundária** (Somente a primeira letra maiúscula e em negrito); e

1.1.1 Seção terciária (Somente a primeira letra maiúscula, sem negrito e sem sublinhado).

#### 5.1.11 Tabelas e Ilustrações

Para tabelas, seguir as orientações das normas de apresentação tabular do IBGE (1993). O quantitativo de tabelas e ilustrações (quadros, figura, fotografia, fluxograma, etc.) não poderá ultrapassar o número total de 15 por artigo.

As tabelas e ilustrações devem ter numeração em arábico. Títulos estar posicionados acima, as fontes, abaixo e ambos alinhados à esquerda e grafados em Arial 10.

No caso de a fonte ser o(s) próprio(s) autor(es), deverá ser declarada, obrigatoriamente, neste formato. Ex. **Fonte:** O autor.

Imagens, desenhos, figuras e gráficos deverão estar digitalizados em Grayscale (tom de cinza), com resolução mínima de 300 dpi e nos formatos .TIFF ou .JPEG.

#### 5.1.12 Notas de rodapé

Não são aceitas citações em nota de rodapé, a exceção das notas de rodapé explicativas. Se imprescindíveis, para esclarecimentos adicionais do texto, essas notas não poderão exceder 5 (cinco) linhas por página.

Não poderão ser inseridas referências bibliográficas neste espaço, visto que estas são contempladas em espaço próprio, nas Referências.

#### 5.1.13 Abreviaturas, Siglas e Acrônimos

Abreviaturas, siglas e acrônimos, em português e demais línguas, devem contar sem a forma de plural. Em se tratando de acrônimo, deverá ser adotada a forma apresentada pela instituição de origem.

#### 5.1.14 Nomes representativos de marcas

Em caso de marca é aceita a forma apresentada pela instituição de origem da marca.

Ex: CRUZEX

#### 5.1.15 Nomes de produtos e sistemas

Cada um dos termos desses nomes deverá apresentar a primeira letra em maiúsculo e as demais em formato minúsculo. Em se tratando de termos de língua estrangeira, estes deverão constar em itálico. Ex: *Data Link*

#### 5.1.16 Nomes de instituições ou nomes próprios na língua estrangeira

Devem seguir estes exemplos.

*Royal Air Force* (RAF – Força Aérea Real)

Força Aérea Real (*Royal Air Force* – RAF)

Quando imprescindível, devem ser iniciados pela sigla.

Ex: A Câmara de Hipóxia Normobárica também pode ser utilizada para treinamentos de atletas e em exame HAST (*Hypoxia-Altitude Simulation Test*).

#### 5.1.17 Citações

Todas as citações devem estar baseadas na NBR 10520 da ABNT (Citações em Documentos – Apresentação), utilizando o sistema autor-data. As citações diretas com mais de três linhas devem ser digitadas em fonte Arial, tamanho 10, com recuo de 4,0 cm da margem esquerda, sem espaçamento entre parágrafos.

#### 5.1.18 Anexos e Apêndices

A Revista da UNIFA não publica Anexos e/ou Apêndices. Os mesmos devem ser integrados (esclarecidos) no corpo do artigo.

#### 5.1.19 Negrito e itálico

Utilizar **NEGRITO** para:

- a) título do artigo;
- b) títulos das referências;
- c) palavras designativas (resumo, *resumen*, *abstract*, palavras-chave, *palavrasclave*, *keywords*, ilustração, fonte, etc.); e
- d) realce de palavra ou texto.

Empregar *ITÁLICO* para palavras estrangeiras.

### 5.1.20 Referências

As referências, em um mínimo de 10 (dez), devem ser reunidas no final do artigo, em ordem alfabética, e alinhadas à margem esquerda do texto, em espaço simples e separadas entre si por espaço duplo, de acordo com a NBR 6023 da ABNT (Referências – Elaboração).

Exemplos:

VIANNA, H. **Estudos de história colonial**. São Paulo: Nacional, 1948. 289 p. (Biblioteca pedagógica brasileira. Série 5, Brasiliana, v. 261).

FUNDAÇÃO GETÚLIO VARGAS. Centro de Pesquisa e Documentação de História Contemporânea do Brasil. **Movimento tenentista**. Rio de Janeiro, [2008?]. Disponível em: <<http://cpdoc.fgv.br/producao/dossies/AEraVargas1/anos20/CrisePolitica/MovimentoTenentista>>. Acesso em: 06 abr. 2012.

REICHMANN, T. Transferência cultural e tradução na internet. **Revista Brasileira de Linguística Aplicada**, Belo Horizonte, v. 2, n. 2, p. 83-91, jul. 2002