



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ENGENHARIA

LEONARDO KRÁS BORGES MARTINELLI

**APERFEIÇOAMENTO E VALIDAÇÃO DO CLINOSTATO 3D E SEU USO NO
ESTUDO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE HUMANO**

PORTO ALEGRE
2007

LEONARDO KRAS BORGES MARTINELLI

**APERFEIÇOAMENTO E VALIDAÇÃO DO CLINOSTATO 3D E SEU USO NO
ESTUDO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE HUMANO**

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre,
pelo Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Elétrica da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientadora: Profa Dra Thais Russomano
Co-orientador: Prof Dr Moisés Evandro Bauer

PORTO ALEGRE

2007

LEONARDO KRAS BORGES MARTINELLI

**APERFEIÇOAMENTO E VALIDAÇÃO DO CLINOSTATO 3D E SEU USO NO
ESTUDO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE HUMANO**

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre,
pelo Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Elétrica da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Aprovada em ____ de _____ de _____

Banca Examinadora

Prof Dr Moisés Evandro Bauer - PUCRS

Profa Dra Marlise A Santos - PUCRS

Prof Dr Dario F G de Azevedo - PUCRS

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer as todas s pessoas que contribuíram de uma forma ou outra na elaboração e término deste trabalho. Entretanto gostaria de agradecer em especial a certas pessoas que foram fundamentais para que obtivesse sucesso nessa jornada.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais pelo incentivo e suporte necessário para que continuasse estudando e me aprimorando para que eu me tornar um melhor profissional.

Gostaria de agradecer a minha orientadora Thais Russomano, que sempre acreditou em mim, e que me mostrou a importância da ciência para construção de um futuro melhor.

Gostaria de agradecer ao meu co-orientador Moisés Evandro Bauer, que me aceitou como aluno no decorrer do trabalho e que foi fundamental para que esse trabalho atingisse o nível esperado.

Gostaria de agradecer ao todo pessoal do Centro de Microgravidade, em especial aos amigos Felipe Prehn Falcão e Gustavo Dalmarco, que me ajudaram em diversos momentos importantes tanto na elaboração quanto execução deste projeto.

Gostaria de agradecer ao todo pessoal do Laboratório de Imunologia, que me deu todas as condições para que este trabalho e que me tratou sempre com respeito e amizade.

Gostaria de agradecer por último e não menos importante a minha namorada Ana Paula Foch Furtado, que sempre me incentivou, que sempre acreditou em mim, e que não me deixou desistir quando isso parecia ser a única opção.

RESUMO

A exposição à microgravidade acarreta alterações na atividade do sistema imunológico a nível celular, bem como na maioria dos sistemas fisiológicos do organismo. O ambiente desprovido de força gravitacional inibe funções linfocitárias envolvidas no processo de defesa imune do corpo humano, como locomoção celular e expressão de antígenos. O clinostato é uma das ferramentas utilizadas para simular microgravidade na Terra e estudar os seus efeitos em diversas funções fisiológicas do corpo humano. O presente estudo visou aperfeiçoar o terceiro protótipo do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade/PUCRS, através da adição de componentes eletrônicos, como, por exemplo, microcontrolador, sensor de velocidade rotacional, sensor de temperatura e umidade e transceiver Rádio Freqüência, a fim de aumentar o seu desempenho e simplificar a sua operação. Este estudo também objetivou validar a nova versão do Clinostato 3D. Para tanto, realizou-se um estudo referente a processos imunológicos, o qual incluiu uma avaliação dos efeitos da microgravidade simulada sobre a proliferação e viabilidade de linfócitos T humanos em estimulação ao mitógeno fitohemaglutinina. O terceiro objetivo deste trabalho foi o de estudar o crescimento de células cancerígenas, utilizando-se o Clinostato 3D do Centro de Microgravidade como simulador de microgravidade. Os resultados do aperfeiçoamento do clinostato mostraram que os componentes eletrônicos implementados aumentaram o desempenho do Clinostato 3D e facilitaram a sua operação. No estudo de validação, não houve decréscimo na proliferação e viabilidade celular em 24h de simulação de microgravidade ($p=0,146$). Entretanto, ocorreu uma diminuição significativa ($p=0,012$) na proliferação e viabilidade celular após 48h de rotação no clinostato, o que corrobora pela literatura científica. A comparação dos resultados obtidos na clinorrotação em 24h e 48h revelou uma diferença significativa entre eles ($p=0,003$). Estes resultados validam o Clinostato 3D do Centro de Microgravidade como uma ferramenta capaz de simular microgravidade na Terra. O presente trabalho indica que a depressão imunológica associada aos vôos espaciais não está somente relacionada ao estresse físico e psicológico que o astronauta está sujeito, mas que esta pode ser causada pela microgravidade em si, a qual afeta a proliferação e a viabilidade celular. Os resultados do experimento com células tumorais K562

mostraram um crescimento significativo em relação ao controle estático ($p=0,007$), indicando que mais estudos na área de imunidade a tumores em microgravidade são necessários.

Palavras-chave: microgravidade, clinostato, validação, linfócitos T, células K562.

ABSTRACT

Exposure to microgravity produces changes in the immunological system at cellular level, as well as in the major physiological systems of the body. Weightlessness suppresses lymphocytic functions involved in the immunity process, such as cell locomotion and expression of antigen. The present study aimed at improving the third prototype of the Microgravity Center/PUCRS 3D-Clinostat, a device used to simulate microgravity environment on Earth, by adding to it electronic components, such as a microcontroller, a rotating speed sensor, temperature and humidity sensors and a Radio Frequency transceiver. These were intended to simplify the operation and increase the performance of the device. The present study also aimed to validate this new version of the 3D-Clinostat by investigating whether the proliferation and viability of lymphocytes are reduced by exposure to rotation, used to simulate microgravity for cells. The third objective of this study was to evaluate the growth of K562 tumor cells in simulated microgravity. The results demonstrated that the electronic components added to the Clinostat improved its performance. The validation study indicated a non-significant change in the proliferation and cellular viability to the mitogen stimulation in 24h of simulated weightlessness ($p=0.146$). There was, however, a significant decrease ($p= 0.012$) in proliferation and viability after 48h rotation in the 3D-Clinostat with is in accordance with the current scientific literature. A comparison between 24h and 48h of clinorotation indicated a difference between the results ($p=0.003$). These findings validated the Microgravity Center 3D-Clinostat as a tool capable of simulating weightlessness on Earth. The results also suggested that the immunological depression associated with spaceflight is not just related to the psychological and physical stresses that the astronaut experiences to during a space mission, but it seems to it also be caused by microgravity per se, which affects the proliferation and cellular viability of immune cells. The results of the experiment with K562 cells showed an increase in their growth ($p=0.007$) during microgravity simulation in relation to control values. Future studies have to be done to better clarify the effects of microgravity on tumor immunology.

Key-words: microgravity, clinostat, validation, T cells, K562 cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Pré-lançamento do ônibus espacial Atlantis.....	4
Figura 1.2: Estação Espacial Internacional.....	5
Figura 2.1: Vôos parabólicos – microgravidade por queda livre.....	9
Figura 2.2: Cama de inversão postural do Centro de microgravidade.....	10
Figura 2.3: Redistribuição dos fluidos em microgravidade e no retorno à Terra.....	11
Figura 2.4: Modificação no volume de sangue nos membros.....	11
Figura 2.5: Laboratório de flutuabilidade neutra.....	12
Figura 2.6: Suspensão corporal total do Centro de Microgravidade.....	13
Figura 2.7: Clinostato 3D do Centro de Microgravidade/PUCRS.....	15
Figura 2.8: Visualização de linfócito T por microscopia eletrônica.....	22
Figura 2.9: Linhagem celular K562.....	23
Figura 3.1: Primeiro protótipo do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade.....	24
Figura 3.2: Segundo protótipo do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade.....	25
Figura 3.3: Segunda versão do clinostato em uso na Kingston University.....	26
Figura 3.4: Crescimento de hepatócitos em microgravidade e controle.....	27
Figura 3.5: Crescimento de células neurais em microgravidade e controle....	27
Figura 3.6: Modelagem em CAD do Clinostato Tridimensional.....	28
Figura 3.7: Diagrama de blocos do MSP430f149.....	31
Figura 3.8: Montagem da placa de desenvolvimento.....	32
Figura 3.9: Sensor de temperatura e umidade SHT71.....	32

Figura 3.10: Montagem final do adaptador transceiver Rádio Frequência.....	34
Figura 3.11. Diagrama de Blocos do nRF2401.....	34
Figura 3.12: Detalhes do sensor de velocidade rotacional KMI15/4.....	35
Figura 3.13. Esquemático elétrico da ligação do sensor.....	35
Figura 3.14: Tubos modificados posicionados no Clinostato 3D.....	36
Figura 3.15a: Tubo Falcon modificado para estudo com Clinostato 3D.....	37
Figura 3.15b: Vista superior, com os orifícios que possibilitam a troca gasosa.....	37
Figura 3.16: Estufa NuAire do Laboratório de Imunologia/PUCRS.....	38
Figura 3.17: Roteiro do teste de proliferação celular em microgravidade.....	40
Figura 4.1: Microcontrolador, transceiver rádio frequência implementados no clinostato 3D.....	43
Figura 4.2: Ambiente visual de monitoração e controle.....	45
Figura 4.3: Experimento de validação dos tubos modificados.....	46
Figura 4.4: Proliferação das PBMCs após 24h de microgravidade simulada...	48
Figura 4.5: Proliferação das PBMCs após 48h de microgravidade simulada....	48
Figura 4.6: Comparação entre as culturas celulares durante 24h e 48h em microgravidade simulada.....	49
Figura 4.7: Crescimento celular das células tumorais K562 ao longo de quatro.....	51
Figura 5.1: 48h de clinorrotação no Lab de Imunologia/IPB.....	54
Figura 5.2: Diagrama esquemático do eixo HPA.....	56
Figura 5.3: Representação ilustrativa da estrutura básica de um anticorpo.....	58
Figura 5.4: Fórmula estrutural de um nucleotídeo.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Sinopse dos principais aparelhos usados para simular microgravidade em Terra.....	17
Tabela II: Medidas das temperaturas com o sensor do clinostato e da estufa ao longo de uma hora.....	45
Tabela III: Média e desvio padrão das amostras em 24h e 48h de simulação de microgravidade na estimulação por mitógeno.....	48
Tabela IV: Média e desvio padrão das amostras em 24h, 48h, 72h e 96h de simulação de microgravidade e no controle.....	51
Tabela 1.A: Dados completos dos voluntários 1 e 2 no teste de proliferação celular.....	73
Tabela 1.B: Dados completos dos voluntários 3 e 4 no teste de proliferação celular.....	73
Tabela 1.C: Dados completos dos voluntários 5 e 6 no teste de proliferação celular.....	74
Tabela 1.D: Dados completos dos voluntários 7 e 8 no teste de proliferação celular.....	74
Tabela 1.E: Dados completos dos voluntários 9 e 10 no teste de proliferação celular.....	75
Tabela 2.A: Resultados completos do crescimento celular ao longo de 4 dias em simulação de microgravidade.....	76

LISTA DE SIGLAS

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

HDT - Técnica de inversão postural (Sigla para Head Down Tilt)

EVA – Atividade Extra-veicular (Sigla para Extra Vehicular Activities)

ATP –Adenosina tri-fosfato

CBSC – Células tronco do cordão umbilical (Sigla para Cord Blood Stem Cells)

TER – resistência elétrica transepitelial (Sigla para Transepithelial electrical resistance)

CAD – Computer Aid Design

PVC – Poli cloreto de vinila

CRC –Cyclic Redundancy Check

PWM – Pulse width modulation

GPL – General Public License

HIV- Vírus da imunodeficiência humana (Sigla para Human Immunodeficiency Vírus)

PBMC – Célula mononuclear do sangue periférico (Sigla para Peripheral Blood Mononuclear Cell)

PHA – Fitohemaglutina (Sigla para Phytohemagglutinin)

MTT - (3-(4,5-diametil 2-tiazolil) 2,5 difenil-2H-tetrazolium

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

OD – Densidade Óptica (Sigla para Optical Density)

LCD – Monitor de cristal líquido (Sigla para Liquid Crystal Display)

JTAG – Joint Test Action Group

BSL – Boot Strap Loader

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (Sigla
Reverse transcriptase polymerase chain reaction)

IL- 2- Interleucina-2

CD – Região determinante (Sigla para Cluster of differentiation)

HPA- Hipotálamo-pituitária-adrenal

Células NK- células exterminadoras naturais (Sigla para Natural Killers)

LISTA DE SÍMBOLOS

m/s^2 – metros por segundo ao quadrado

km/h – quilômetros por hora

rpm – rotações por minuto

mm - milímetros

V – volt

GHz – gigahertz

m – metro

ml – mililitro

μ L – microlitro

MHz – megahertz

Mbps – megabites por segundo

SUMÁRIO

Capítulo 1

Introdução

1.1 Introdução.....	2
1.2 Justificativa.....	3
1.3 Objetivos.....	6

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 Microgravidade.....	7
2.2 Clinostato.....	13
2.3 Imunidades Inata e Adaptativa – células mononucleares.....	18
2.3.1 Fagócitos e as respostas imunes inatas.....	20
2.3.2 Linfócitos e as respostas imunes adaptativas.....	20

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Evolução do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade.....	23
3.1.1 Primeiro Protótipo do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade.....	23
3.1.2. Segundo Protótipo do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade.....	24
3.1.3 Terceiro Protótipo do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade.....	27

3.2 Materiais e Métodos.....	30
3.2.1 Descrição do Clinostato 3D.....	30
3.2.2 Micro-controlador.....	30
3.2.3 Sensor de Umidade e Temperatura.....	32
3.2.4 Transceiver de Rádio Freqüência.....	33
3.2.5 Sensor de velocidade rotacional.....	34
3.2.6 Tubo Modificado.....	36
3.2.7 Estufa NuAire US Autoflow	37
3.3 Ensaio sobre proliferação e viabilidade celular em microgravidade simulada.....	38
3.3.1 Ética.....	39
3.3.2 Sujeitos.....	39
3.3.3 Coleta de sangue periférico e isolamento das células mononucleares do sangue periférico.....	39
3.3.4 Culturas celulares em microgravidade simulada.....	40
3.3.5 Ensaio da proliferação/viabilidade celular.....	41
3.3.6 Estudo com células tumorais K562 em simulação de microgravidade.....	41
3.3.7 Análise Estatística.....	42

Capítulo 4

Resultados

4.1 Aperfeiçoamento do Clinostato 3D.....	43
---	----

4.1.1 Transceiver Rádio Freqüência.....	44
4.1.2 Sensor de velocidade rotacional.....	44
4.1.3 Sensor de umidade e temperatura.....	44
4.1.4 Software de controle.....	45
4.2 Validação do tubo Falcon modificado.....	47
4.3 Proliferação e viabilidade celular das PBMCs em simulação de microgravidade.....	48
4.4 Crescimento das células tumorais K562 em simulação de microgravidade.....	51

Capítulo 5

Discussão

5.1 Aperfeiçoamento do Clinostato 3D.....	53
5.2 Ensaio de proliferação e viabilidade das células mononucleares do sangue periférico.....	54
5.3 Ensaio do crescimento de células K562 em simulação de microgravidade.....	61

Capítulo 6

Conclusão

6.1 Aperfeiçoamento do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade...	63
6.2 Validação do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade.....	64
6.3 O efeito da microgravidade simulada no crescimento de células tumorais K562.....	65

7 – Referências Bibliográficas.....	66
--	-----------

8 – Anexos

8.1 Dados individuais do teste de proliferação celular com células mononucleares em simulação de microgravidade.....	73
8.2 Dados individuais do teste de crescimento de células K562 em simulação de microgravidade.....	76

CAPÍTULO 1

1.1-Introdução

Este trabalho irá abordar temas importantes para a continuidade da exploração espacial e para o planejamento de missões mais longas, como, por exemplo, os efeitos da microgravidade no sistema imunológico do astronauta.

No espaço, os astronautas experimentam diferentes tipos de estresses, incluindo mudanças na força gravitacional, isolamento, confinamento, conflito psico-social, ansiedade e privação do sono (Kaur, 2005). Nessas missões, o estresse acaba afetando diversos aspectos da fisiologia humana, incluindo o sistema imune (Mehta, 2001).

Uma vez que a microgravidade altera diferentes funções do corpo humano, é necessário estudar-se mais detalhadamente essas mudanças para se determinar a intensidade com que elas se processam.

Serão abordados nessa dissertação tópicos referentes a métodos de simulação de microgravidade em Terra, os quais constituem ferramentas importantes para o estudo dos efeitos da redução da força gravitacional terrestre nas funções fisiológicas humanas e celulares. Dentre essas ferramentas, encontra-se o Clinostato 3D, usado para simular a microgravidade para células, plantas e pequenos animais. Essa dissertação apresentará o Clinostato 3D projetado e desenvolvido no centro de microgravidade, sua evolução, incluindo os primeiros protótipos, e os estudos que o validam como um equipamento capaz de simular a microgravidade para células humanas em Terra.

1.2-Justificativa

Esse estudo justifica-se por se tratar de um trabalho de caráter inovador no Brasil, visando a promover a área de pesquisa espacial no país e incentivar a interação das áreas da saúde com áreas da engenharia, através do desenvolvimento de projetos inéditos e de grande valia.

A fim de pesquisar o efeito da microgravidade no sistema imunológico do ser humano, utilizou-se o método de clinorrotacao. O Clinostato 3D foi desenvolvido inteiramente no Centro de Microgravidade/PUCRS, Brasil, porém nunca tinha sido testado em solo nacional, uma vez que protótipos anteriores foram utilizados em experimentos no Reino Unido em estudos de validação dos mesmos.

Este trabalho apresenta as modificações feitas no Clinostato 3D, a fim de melhorar o desempenho do aparelho e facilitar a sua operação, além de implementar um sistema computacional que permita o seu uso em diferentes protocolos de pesquisa.

Este trabalho também serve para discutir a validação do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade/PUCRS como uma ferramenta capaz de simular o ambiente de microgravidade em Terra.

À medida que vôos espaciais (Figura 1.1) estão se tornando cada vez mais freqüentes, é necessário um aumento de pesquisas dos efeitos do ambiente de microgravidade sobre as funções fisiológicas. Estudos prévios mostraram que mudanças dos fluidos corporais e atrofia muscular e óssea ocorrem em seres humanos expostos à falta de gravidade. Embora estas alterações fisiológicas grosseiras sugiram que outros sistemas fisiológicos e metabólicos no corpo humano possam também ser afetados pela

microgravidade, elas não predizem necessariamente como irá se processar a reação a uma infecção durante uma situação de redução ou ausência da força gravitacional terrestre (Lu et al, 2002).



Figura 1.1: Pré-lançamento do ônibus espacial Atlantis em agosto de 2006
Fonte: www.nasa.gov

A influência da gravidade na função celular pode auxiliar o entendimento de eventos correspondentes na Terra, bem como projetar os efeitos a longo prazo a nível celular que podem dificultar, restringir ou mesmo impedir a exploração espacial e interplanetária futura (Piepmeier et al, 1997).

É plausível pensar-se que as alterações que ocorrem em plantas, células e organismos secundários à exposição a ambientes onde a força gravitacional é virtualmente nula, como em uma nave espacial, só podem ser comprovadas durante a missão em si, as quais, porém, são de acesso muito limitado e

possuem um alto custo. Isto estimula o uso de métodos de simulação de microgravidade em terra.

O estudo de funções imunológicas no espaço se justifica pelo fato de existir o risco de se contrair uma infecção numa missão espacial, uma vez que os tripulantes, entre 5 e 8 por missão, convivem e trabalham num ambiente fechado que utiliza ar e água reciclados.

Com o aumento da duração dos vôos espaciais de 20 dias, em média, na era dos ônibus espaciais, para mais de seis meses na Estação Espacial Internacional (Figura 1.2), o risco potencial para a saúde da tripulação também é esperado que aumente (Mehta, 2001). Além disso, sabe-se que a microgravidade age em certos microrganismos aumentando a sua virulência, como, por exemplo, a *Salmonella* entérica, ou aumentando a produção de toxinas, como foi comprovada que ocorre na *Escherichia coli*. Esses estudos são essenciais para o melhor entendimento da interação entre bactérias e hospedeiro, particularmente no contexto tanto de vôos espaciais quanto de colônias espaciais (Chopra, 2006).



Figura 1.2: Última configuração da Estação Espacial Internacional, 2005
Fonte: www.spaceflight.esa.int

1.3-Objetivos

O primeiro objetivo deste trabalho foi o de aperfeiçoar o terceiro protótipo do clinostato do Centro de Microgravidade para implementar um método de controle da rotação e comunicação com o computador, o qual permitirá a visualização de seu funcionamento.

O segundo objetivo visou à validação do uso do clinostato como ferramenta para simular a microgravidade em Terra no Brasil. Para tanto, realizou-se um estudo referente a processos imunológicos, o qual incluiu uma avaliação dos efeitos da microgravidade simulada sobre a proliferação e viabilidade de linfócitos T humanos em estimulação ao mitógeno fitohemaglutina.

O terceiro objetivo deste trabalho foi o de estudar o crescimento de células cancerígenas, utilizando-se o Clinostato 3D do Centro de Microgravidade como simulador de microgravidade.

O próximo capítulo se concentrará na revisão bibliográfica referente à microgravidade e seus métodos de simulação em Terra. Ainda, ele abordará uma revisão sobre o uso do clinostato em pesquisas. Por fim, aspectos do sistema imunológico humano pertinentes a esta dissertação também serão abordados.

CAPÍTULO 2 - Revisão Bibliográfica

2.1-Microgravidade

A microgravidade pode ocorrer de três maneiras. A primeira é encontrada ao se observar um corpo qualquer em um ponto hipotético do espaço cósmico, tão longe de qualquer corpo celeste, que os efeitos das forças gravitacionais entre ele e os outros astros seriam completamente desprezíveis. Assim, este corpo estaria livre de acelerações e manteria um estado de movimento natural (Halliday, 1993).

A segunda maneira seria posicionar um corpo em pontos estratégicos entre dois corpos celestes, como, por exemplo, entre a Terra e a Lua. Nestes pontos, conhecidos como Pontos Lagrangianos, existe um equilíbrio entre as forças gravitacionais da Terra e da Lua, com cada uma anulando os efeitos da outra reciprocamente. Estes pontos foram previstos teoricamente no século XVIII pelo matemático francês Lagrange. O exemplo mais conhecido é o dos asteróides troianos, que, ocupando pontos lagrangianos entre dois corpos celestes, permanecem em equilíbrio relativo a ambos os astros (Barcelos Neto, 2004).

A terceira e mais comum maneira de se observar a microgravidade é visualizando um corpo em queda livre. Um exemplo clássico desta situação é a do elevador cujo cabo de sustentação é rompido. Quando isto acontece, o elevador começa a acelerar em direção ao centro de massa da Terra com uma intensidade ou módulo igual a $9,81\text{m/s}^2$. Desta forma, um passageiro que estiver dentro do elevador não sofrerá mais a ação da força normal gerada pelo

assoalho do mesmo e passará a cair também, com o mesmo vetor de aceleração g (Barcelos Neto, 2004).

Outro exemplo comum de queda livre, onde os efeitos da microgravidade podem ser visualizados por períodos ilimitados de tempo, são os veículos espaciais em órbita do nosso planeta. Erroneamente, pensa-se que eles estão livres da força gravitacional da Terra, ao se observar os astronautas flutuando dentro destes veículos, por não apresentarem nenhum peso aparente (Serway, 2004).

O fato dos astronautas flutuarem dentro das espaçonaves é análogo ao caso do elevador. Uma vez que a nave está em órbita ao redor do planeta, a gravidade não acelera apenas sua tripulação em direção ao piso da nave, ela acelera os tripulantes e a nave com o mesmo vetor correspondente à aceleração gravitacional. De tal forma, tanto a espaçonave, como cada objeto solto em seu interior, terá sua própria órbita ao redor do planeta.

O termo microgravidade vem do fato de não existir um ambiente de gravidade zero dentro de um veículo orbital. Uma série de efeitos produz acelerações diferentes para cada objeto. Somente se o objeto estiver localizado exatamente no centro de massa da nave, ele terá a mesma órbita desta. A atmosfera residual existente na altitude da órbita irá exercer um efeito de freamento na nave e, como um objeto no seu interior não está sujeito a esta desaceleração, haverá uma aceleração aparente mínima do objeto em relação à nave (Agência Espacial Brasileira, 2004).

Os vôos parabólicos também são exemplos de microgravidade por queda livre, porém por um período de tempo limitado, ao contrário dos astronautas nos veículos espaciais. Durante estes vôos, o avião efetua primeiro uma subida

vertiginosa, a 47° , de 20 mil a 28 mil pés, o que gera uma aceleração de 1,8g (ou seja, 1,8 vezes a aceleração da gravidade terrestre) durante 20 segundos. O piloto reduz progressivamente a velocidade de 800 Km/h para 390 Km/h, fazendo com que o avião descreva uma parábola. O avião continua a subir até atingir o ponto de inflexão da parábola, e logo depois começa a descer. Na curva da parábola, tudo que está no interior do avião fica flutuando, devido à queda livre criada pela queda livre do avião. Quando o ângulo com a horizontal atinge os 45° , o piloto acelera novamente e o avião retoma o vôo horizontal estável. Estas manobras são repetidas 30 vezes por vôo. A Figura 2.1 ilustra a parábola realizada pelo avião a fim de reproduzir a microgravidade

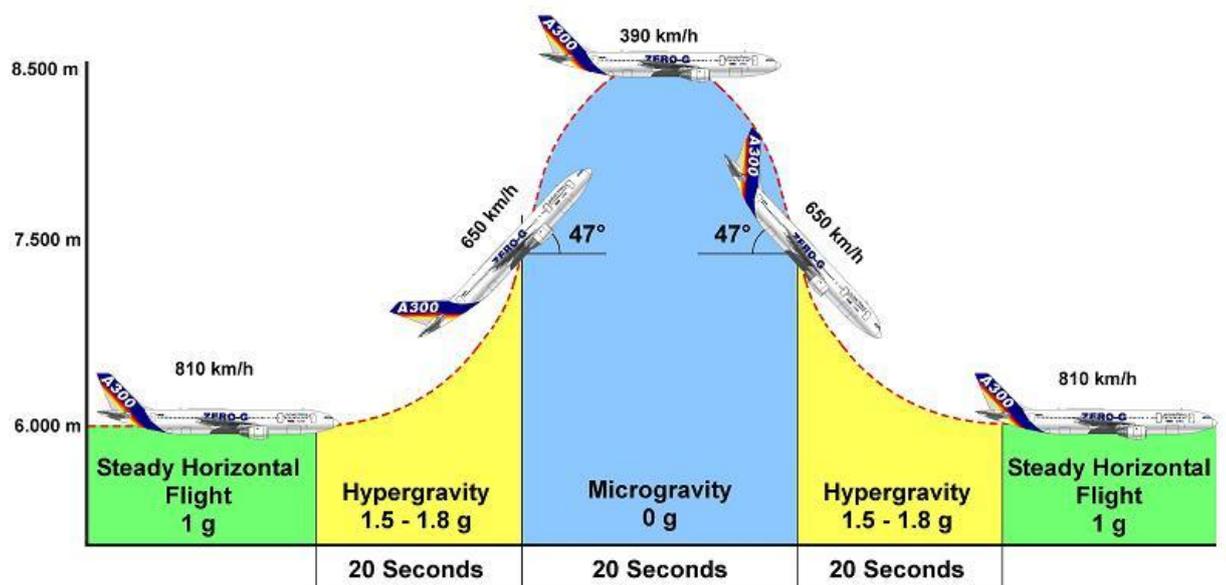


Figura 2.1: Vôos parabólicos – microgravidade por queda livre
 Fonte: Adaptado de figura da Agência Espacial Européia (www.esa.int)

Na Terra, existem alguns métodos de simular a microgravidade em humanos, como a cama de simulação de microgravidade. Esta cama utiliza a técnica de inversão postural, Head Down Tilt (HDT). Existem ainda a imersão

na água, criando um sistema de flutuabilidade neutra, a suspensão corporal total ou parcial e, para pequenos organismos, o clinostato.

A cama de simulação de microgravidade utiliza o princípio da inversão postural ou Head Down Tilt (HDT) (Figura 2.2) para simular a microgravidade em vários sistemas fisiológicos do corpo humano. Este tipo de cama apresenta um sistema que possibilita a inclinação do voluntário num ângulo convencionalmente negativo, pois os pés do voluntário ficam situados acima da cabeça, em um determinado ângulo.

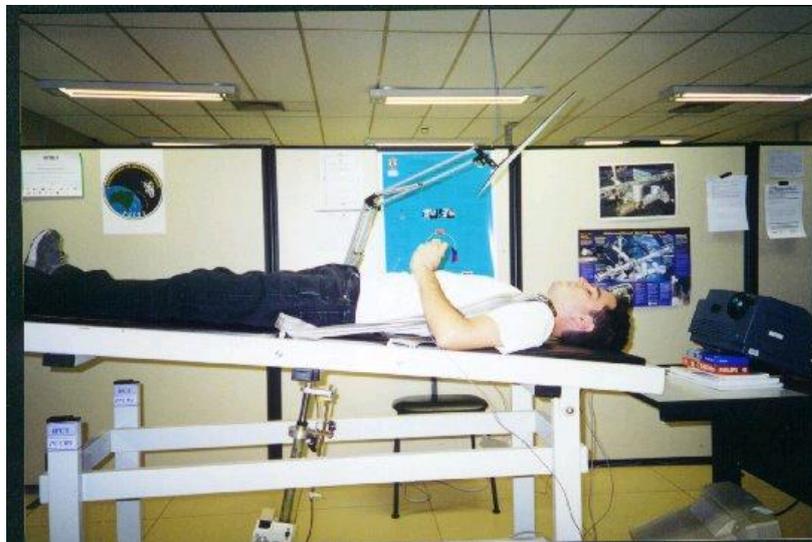


Figura 2.2: Cama de inversão postural do Centro de microgravidade
Fonte: www.pucrs.br/feng/microg

Para cada sistema do corpo humano e dependendo do protocolo de pesquisa a ser utilizado, são aplicados diferentes ângulos para simular a microgravidade.

No caso do sistema cardiovascular, a técnica de HDT é usada por causar uma redistribuição de fluidos corporais e do sangue similar a que se passa na microgravidade. A Figura 2.3 mostra uma visão esquemática da distribuição de fluidos corporais na Terra (1), na inserção na microgravidade

(2), na adaptação ao espaço – perda de fluido corporal (3) e no retorno à gravidade terrestre

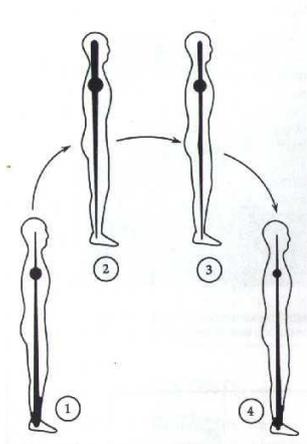


Figura 2.3: Redistribuição dos fluidos em microgravidade e no retorno à Terra (Charles & Lathers, 1991).

A inversão postural proporciona uma nova distribuição dos fluidos corporais, principalmente do sangue, os quais migram para a parte superior do corpo, simulando o mesmo efeito que ocorre no corpo de um astronauta chegando ao espaço. A Figura 2.4 mostra a mudança nos volumes de sangue nos membros superiores e inferiores ao longo do vôo espacial.

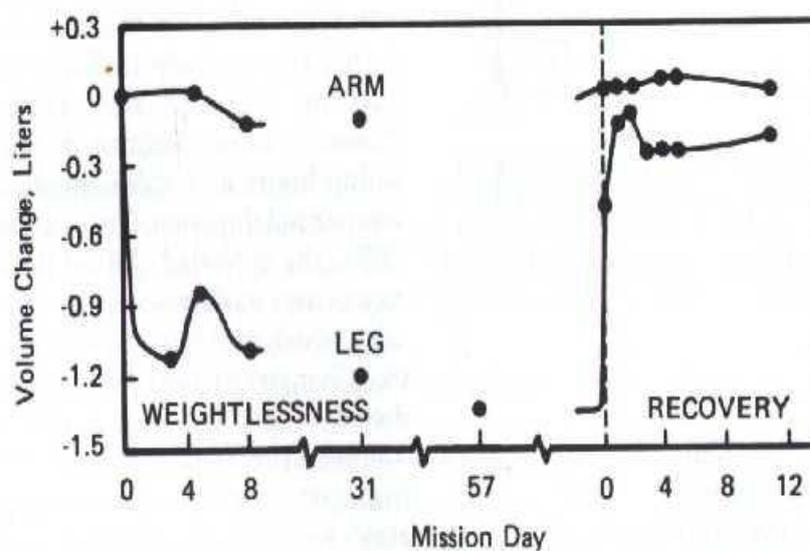


Figura 2.4: Modificação no volume de sangue nos membros
Fonte: Adaptado de Charles & Lathers (1991)

Outra forma de simulação de microgravidade é um sistema de flutuabilidade neutra, demonstrado na Figura 2.5, ou seja, um corpo imerso num líquido produz empuxo, que é a reação ao peso do líquido deslocado causado pela presença do corpo imerso, determinada pela lei de Arquimedes. Se a massa do corpo for regulada para que esse empuxo anule o peso, tem-se um sistema que irá flutuar ainda que imerso.

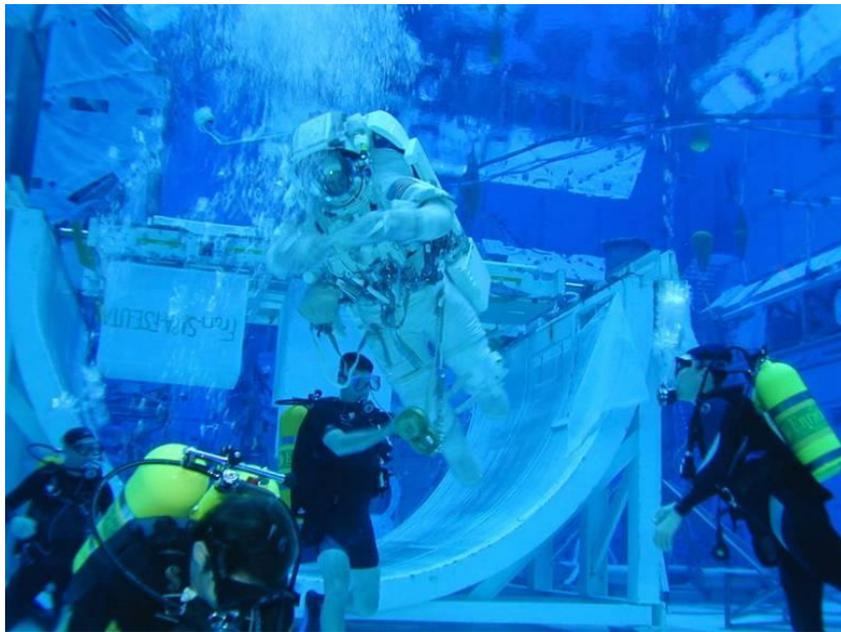


Figura 2.5: Laboratório de flutuabilidade neutra
Fonte: www.nasa.gov

Esta técnica é utilizada por várias agências espaciais para simular as condições de microgravidade em Atividades Extra-Veiculares (EVA, sigla em inglês para Extra Vehicular Activities). As maiores piscinas já construídas no mundo são utilizadas para este fim. Nestas, maquetes de naves espaciais e satélites em tamanho real são imersas totalmente para que os astronautas, vestindo seus trajes espaciais, possam fazer treinamentos específicos para cada missão.

Na técnica de suspensão corporal total faz-se uso do princípio da anulação de forças para simular a microgravidade. No caso da Suspensão Corporal Total, vista na Figura 2.6, tem-se um voluntário fixado num sistema de contrapesos, o qual é regulado para o peso do próprio voluntário, criando-se assim um sistema no qual não existe força resultante.



Figura 2.6: Suspensão corporal total do Centro de Microgravidade
Fonte: www.pucrs.br/feng/microg

A Suspensão Corporal Total é utilizada principalmente para simulação de microgravidade em atividades que requerem uma interação do voluntário com outras pessoas ou objetos sem que este tenha seus movimentos restritos pelo meio ou pela posição em que se encontra.

2.2-Clinostato

A prática de rodar plantas em torno de um eixo horizontal como meio de estudar o geotropismo tem sua origem no final do século XVIII. Aparelhos que realizam essa manipulação mecânica são chamados de clinostato, termo

somente estabelecido em 1882 (Klaus, 2001, Audus, 1962). O ambiente criado na Terra com o clinostato é chamado de microgravidade simulada e pode ser usada sem restrição de tempo. Clinostatos podem ser de rotação lenta ou rápida com um ou dois eixos. Os clinostatos de rotação lenta devem rodar com uma velocidade angular constante, ao redor de 2 rpm a 4 rpm, e as plantas ou células devem estar suficientemente bem centralizadas nos dois eixos do clinostato para evitar o efeito de centrifugação (Dedolph e Dipert, 1971).

O Clinostato 3D desenvolvido no Centro Microgravidade/PUCRS (Figura 2.7) é o tema central desta dissertação e será detalhado no capítulo referente a materiais e métodos. Em termos gerais, no entanto, ele apresenta dois eixos de movimentação, um que será chamado de eixo de rotação e o segundo será o eixo de revolução. Para simular a microgravidade, frascos contendo uma determinada cultura celular ou microorganismos são dispostos na estrutura interna do clinostato, que através da composição entre rotações nos dois eixos desorienta o objeto em teste de tal maneira que se perde a referência do vetor gravitacional. Esta desorientação é responsável pela não adaptação quanto ao vetor gravitacional de toda a cultura de célula que se encontra dentro dos frascos, causando, por consequência, a simulação de microgravidade, já que, no espaço, esses organismos não iriam se adaptar à gravidade por esta lá não existir.

O movimento criado no eixo de rotação caracteriza-se por fazer o frasco girar em torno do próprio eixo longitudinal. O eixo de revolução é responsável pelo movimento do frasco ao longo do seu eixo longitudinal, fazendo com que o frasco hora esteja de “cabeça para cima” e hora de “cabeça para baixo”.



Figura 2.7: Clinostato 3D do Centro de Microgravidade/PUCRS
Fonte: www.pucrs.br/feng/microg

Clinostatos, entretanto, não podem reproduzir completamente a falta de deformação estrutural, o deslocamento de componentes, tanto intracelulares quanto intercelulares, e/ou redução nos processos de transferência no meio extracelular que ocorre na real falta de peso (Forraz et al, 2004). Apesar disto, são diversas as aplicações do clinostato para a realização de estudos em microgravidade simulada, indo desde os mais variados tipos de células e microrganismos (vírus e bactérias), passando por pequenos animais, plantas, alimentos, fármacos, proteínas, enzimas, DNA, até a pesquisa da associação do efeito da radiação cósmica em espécimes biológicas com a microgravidade (Dedolfph e Dipert, 1971).

Diversos estudos já foram realizados utilizando-se tanto clinostato de alta rotação quanto o clinostato de baixa rotação. O clinostato de alta rotação tem sido empregado em biologia gravitacional desde 1965 para investigar os efeitos da microgravidade simulada. Usando-se um microscópio, o comportamento das células e suas organelas sobre condições de microgravidade podem ser diretamente observados durante a rotação. Experimentos com diversas células mamárias e organismos unicelulares mostraram que diferentes funções são afetadas em microgravidade simulada, como um aumento do crescimento de microrganismos em simulação de microgravidade, porém não foi observada nenhuma mudança no desenvolvimento biológico dessas amostras (Cogoli, 1992).

Para culturas de células suspensas, um estado denominado de microgravidade funcional pode ser alcançado, rodando-se um frasco cheio com líquido numa velocidade constante em um clinostato. Após um curto período inicial, a velocidade de rotação da parede do frasco é transferida radial e internamente até que não exista mais movimento do fluido. Ele então passa a rodar como um corpo rígido com suas partículas suspensas sendo distribuídas de forma aleatória enquanto percorrem pequenos caminhos circulares (Dedolfph e Dipert, 1971).

O clinostato é um dos aparelhos utilizados para simular o ambiente de microgravidade na Terra. Outros aparelhos incluem a máquina de posicionamento aleatório, o vaso de rotação e a máquina de queda livre. A Tabela I mostra um resumo destes aparelhos com os seus princípios para alcançar a microgravidade, principais qualidades e defeitos (Manti, 2006).

Tabela I – Sinopse dos principais aparelhos usados para simular microgravidade em Terra. (Manti, 2006)

Aparelho	Princípio de operação	Principais Qualidades	Defeitos
<i>Clinostat</i>	rotação axial	ambiente fluido	sem troca gasosa
<i>Random Positioning Machine</i>	randomização direcional	ambiente fluido	sem troca gasosa
<i>Rotating Wall Vessel</i>	rotação de corpos sólidos	baixa deformação de corpos	aceleração oscilatória
<i>Free Fall Machine</i>	Queda livre por tempo Limitado	condições de queda livre	estresse mecânico
<i>Centrifuge Free Fall Machine</i>	Queda livre acoplada com centrifugação	possível gravidade parcial	tempo reduzido
<i>Chemostat</i>	neutralização dinâmica da sedimentação	pequena dependência do tamanho da célula	criação de bolhas
<i>Neutral Buoyancy</i>	neutralização estática da sedimentação	pequena dependência do tamanho da célula	crescimento celular baixo

Clinostatos já foram utilizados por Colla (2007) para avaliar o crescimento e a qualidade dos tomates-cereja em condições de microgravidade simulada. As características morfológicas e de crescimento destes tomates foram modificadas durante a clinorrotação. O rendimento da fruta, o peso e o tamanho da raiz dos tomates em microgravidade simulada foram menores do que o controle.

A fim de estudar o crescimento de plantas no ambiente espacial, amostras de pólen de plantas recém florescidas foram coletadas e testadas em simulação de microgravidade. Após o período de simulação, o percentual de germinação e a direção de crescimento do tubo do pólen foram observados. Os resultados indicaram que a microgravidade afeta o desenvolvimento do tubo e

que a seleção de espécies através de experimentos com o clinostato pode ser uma ferramenta útil para o crescimento de plantas no espaço (De Micco, 2006).

Zhang (2003), utilizando o clinostato para simular microgravidade, estudou seu efeito em embriões de galinhas, especificamente na atividade da fosfatase alcalina e da ATP sintase mitocondrial, e na concentração de cálcio intracelular e na formação do citoesqueleto celular. Os resultados sugeriram que a microgravidade simulada prejudica a formação do citoesqueleto celular e pode afetar a atividade da fosfatase alcalina, entretanto não houve modificações significativas na atividade da ATP sintase mitocondrial, indicando que o metabolismo energético não foi afetado pela microgravidade celular.

2.3-Imunidades Inata e Adaptativa – células mononucleares

Sabe-se que fatores físicos, como a gravidade, são reguladores importantes no desenvolvimento fisiológico. Entretanto, como as células do organismo humano sentem estes sinais e os traduzem em respostas bioquímicas ainda é desconhecido. Estudos em células imunológicas realizados em vôos espaciais e em microgravidade simulada indicam alterações na formação do citoesqueleto, na motilidade celular, e expressão de moléculas de adesão (Buravkova, 2005). Sonnenfeld (1999) observou uma diminuição na blastogênese de linfócitos, na produção de citocinas e na atividade das células natural killers em vôos espaciais. Entretanto, ainda há diversos aspectos do sistema imune que não foram estudados em microgravidade, como por exemplo, a produção de anticorpos, o que torna discutível a realização de missões espaciais de longa duração.

Qualquer resposta imune envolve, primeiramente, o reconhecimento do patógeno ou outro material estranho e, em segundo lugar, a elaboração de uma reação dirigida a este elemento, com a finalidade de eliminá-lo do organismo. De uma maneira mais ampla, os diferentes tipos de resposta imune enquadram-se em duas categorias: respostas inatas (ou não adaptativas) e respostas imunes adaptativas (Janeway, 2002).

A principal diferença entre estes dois tipos de resposta é que a resposta imune adaptativa é altamente específica para um dado patógeno. Além disto, embora a resposta inata não se altere mediante exposição repetida a um dado agente infeccioso, a resposta adaptativa torna-se mais eficiente após cada encontro subsequente com o mesmo agressor. Na realidade, o sistema imune “memoriza” o agente infeccioso, evitando, desta forma, que este mesmo patógeno venha posteriormente causar a doença. Por exemplo, doenças como sarampo e difteria induzem respostas imunes adaptativas que geram uma imunidade prolongada após a infecção. Sendo assim, as duas principais características de uma resposta imune adaptativa são a memória e a especificidade (Paul, 1993).

As respostas imunes são elaboradas primariamente pelos leucócitos, que compreendem vários tipos celulares diferentes. As células do sistema imunológico se dividem em células polimorfonucleares, como por exemplo, os neutrófilos, eosinófilos e basófilos e células mononucleares, como os linfócitos e monócitos.

Entre as mononucleares, também chamadas de agranulócitos, a principal célula é o linfócito. Os linfócitos possuem um papel importantíssimo na imunidade adaptativa. Eles são divididos em linfócitos T que se maturam no

timo e linfócitos B que se maturam na medula óssea. Outro tipo de células mononucleares são os monócitos, envolvidos em diversas funções da defesa humana.

2.3.1-Fagócitos e as respostas imunes inatas

Um grupo importante de leucócitos compreende as células fagocitárias, como os monócitos, macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares. Os monócitos e macrófagos ligam-se aos microrganismos, englobam estes agentes e os destroem e, uma vez que se utilizam de sistemas de reconhecimento primitivos e inespecíficos, eles são responsáveis pelas respostas imunes inatas. Com efeito, eles agem como nossa primeira linha de defesa contra as infecções.

2.3.2-Linfócitos e as respostas imunes adaptativas

Um outro grupo importante de células mononucleares são os linfócitos. Estas são as células centrais das respostas imunes adaptativas, uma vez que reconhecem, especificamente, patógenos individuais quer eles estejam localizados no interior das células do hospedeiro quer se situem nos fluidos teciduais ou no sangue. Existem vários tipos diferentes de linfócitos, os quais podem ser enquadrados em duas categorias básicas: linfócitos T (ou células T) (Figura 2.8) e linfócitos B (ou células B). Os linfócitos B combatem patógenos extracelulares e seus produtos através da liberação do anticorpo, uma molécula que, especificamente, reconhece uma determinada molécula alvo, chamada antígeno, que se liga a ele. Esse, por sua vez, pode ser uma molécula na superfície de um patógeno ou uma toxina produzida pelo patógeno. Já os linfócitos T possuem uma ampla variedade de atividades.

Assim, alguns estão envolvidos no controle do desenvolvimento dos linfócitos B e na produção de anticorpos, outros interagem com as células fagocitárias, auxiliando-as na destruição dos patógenos capturados e um terceiro grupo de linfócitos reconhece e destrói células infectadas por vírus (Knight e Stagg, 1993).

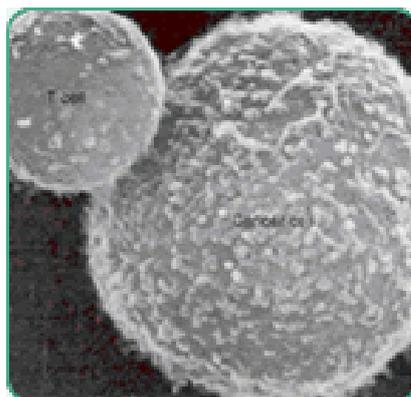


Figura 2.8: Visualização de linfócito T por microscopia eletrônica
Fonte: www.hipocampo.org

Para exercerem sua função na imunidade adaptativa, linfócitos específicos para antígenos raros devem proliferar extensamente antes de se diferenciarem em células efetoras funcionais, visando a gerar quantidade suficiente de células efetoras de uma dada especificidade (Weir, 1996). Assim, a análise da proliferação linfocítica induzida é um tema central no estudo do efeito da microgravidade sobre as células mononucleares.

Uma vez testada a proliferação linfocítica em microgravidade, experimentos com células “anormais” do corpo humano podem ser realizados, como testes com células tumorais. A linhagem celular K562 (Figura 2.9) é uma linhagem de células de eritroleucemia derivadas de um paciente com leucemia mielóide crônica em crise blástica (Klein, 1976).

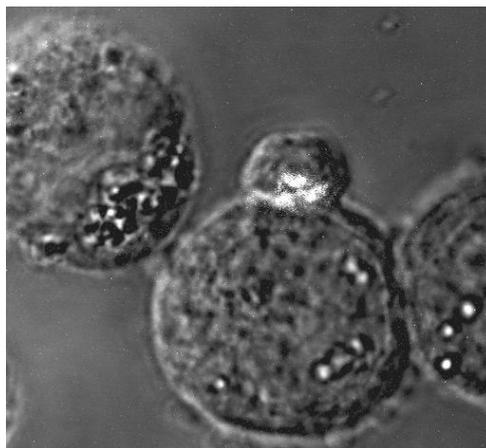


Figura 2.9: Linhagem celular K562
Fonte: www.orangelab.org

Neste capítulo, foram abordados os conteúdos referentes ao tema da dissertação que serão necessários para a compreensão dos objetivos, resultados e discussão da mesma. Assim, a revisão bibliográfica contém aspectos referentes à microgravidade e seus métodos de simulação em Terra. Ainda, ele aborda uma revisão sobre o uso do clinostato em pesquisas. Por fim, aspectos imunológicos referentes à dissertação foram revisados aqui.

No capítulo seguinte, serão descritos em detalhes os materiais e os métodos utilizados nessa dissertação.

CAPITULO 3

3.1-Evolução do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade

3.1.1-Primeiro Protótipo do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade

O primeiro protótipo do Clinostato 3D desenvolvido no Centro de Microgravidade possuía as dimensões 490mm X 270mm X 170mm. Seus materiais predominantes eram a madeira e o plástico, o que tornava inviável seu uso prolongado em estufas. Ele não possuía nenhum tipo de sistema de engrenagens ou correias e sua velocidade era superior a 10 rpm, não havendo possibilidade de alterá-la para uso em diferentes protocolos. Esse protótipo foi um modelo experimental, não tendo sido utilizado em nenhum estudo (Figura 3.1).

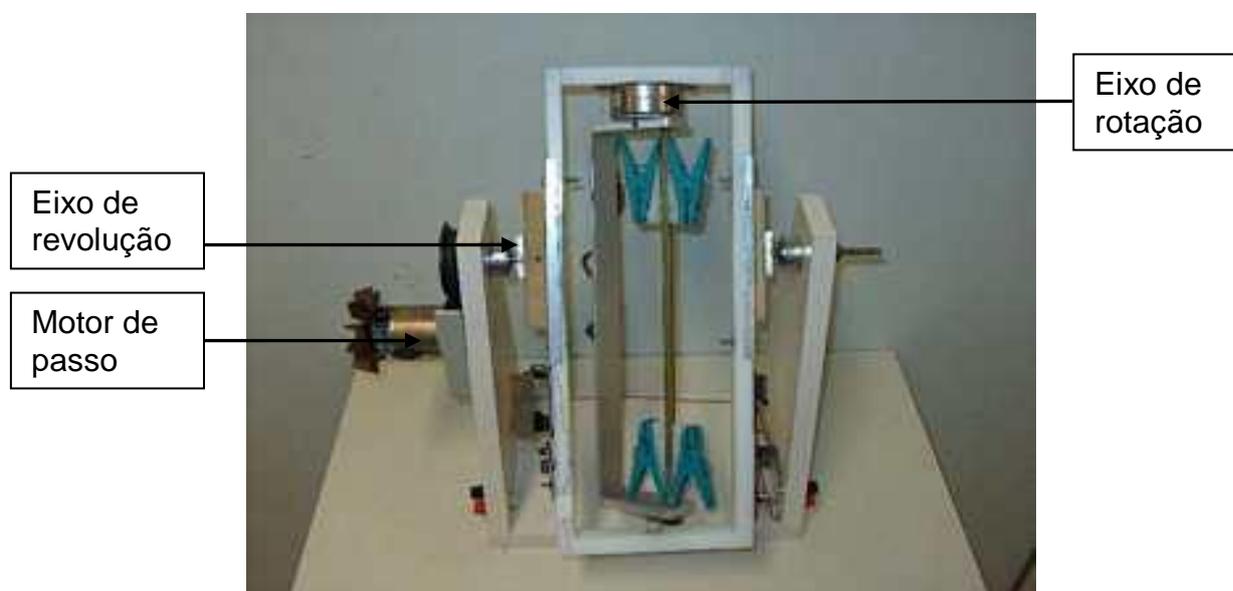


Figura 3.1: Primeiro protótipo do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade

Fonte: www.pucrs.br/feng/microg

3.1.2-Segundo Protótipo do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade

O segundo modelo de Clinostato 3D do Centro de Microgravidade apresentava melhorias em relação ao primeiro (Figura 3.2). Um sistema de engrenagens foi adicionado ao clinostato, suas dimensões foram reduzidas, tornando seu uso mais prático, e o material foi modificado de madeira para alumínio, a fim de evitar deterioração quando usado em estufas com alto teor de umidade (Figura 3.2).

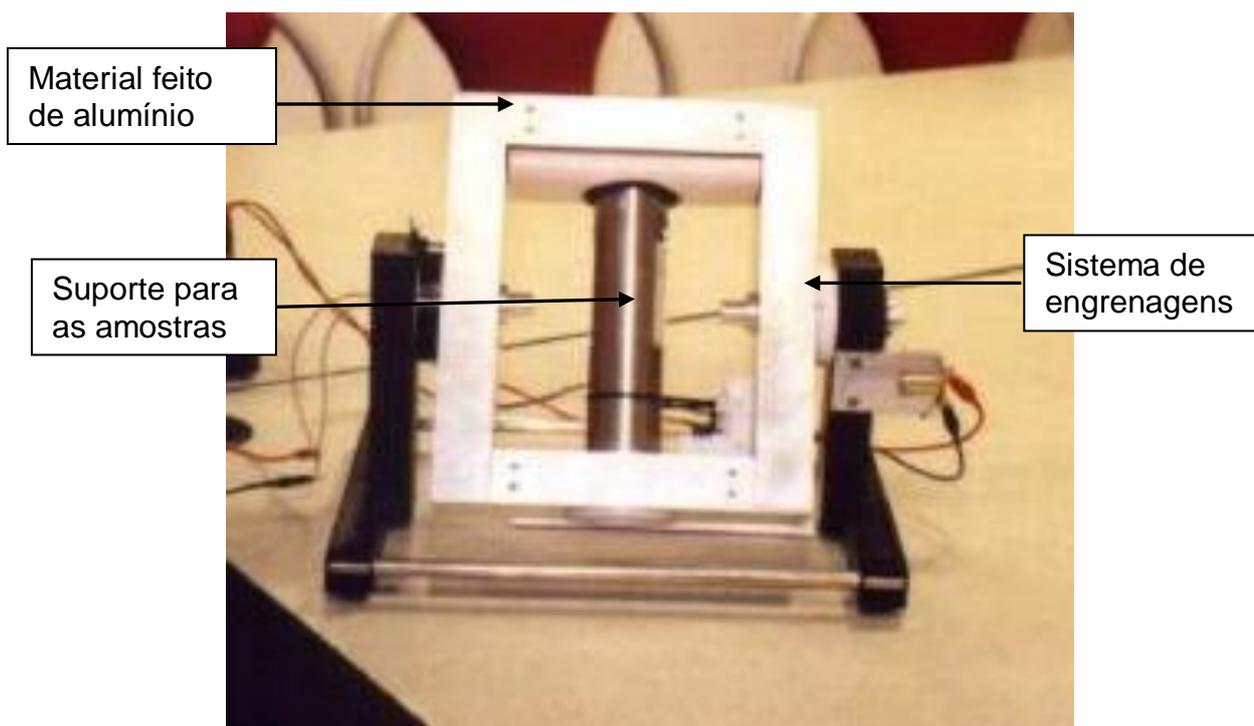


Figura 3.2: Segundo protótipo do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade
Fonte: www.pucrs.br/feng/microg



Figura 3.3: Segunda versão do clinostato em uso na Kingston University
Fonte: www.pucrs.br/feng/microg

Em um estudo realizado pelo Grupo de Terapia de Células Tronco da Universidade de Kingston, Londres, RU, utilizando-se o segundo protótipo do Clinostato 3D de baixa rotação, verificou-se o crescimento de 4 tipos de células cancerígenas e células tronco do cordão umbilical (CBSC). Após 19 horas de rotação a 37° C com uma atmosfera umidificada e com 5%CO₂, o Clinostato 3D aumentou significativamente o potencial de proliferação de todos os tipos de células testadas, quando comparadas com culturas estáticas. As células hematopoiéticas HL60 e as células hepáticas Chang mostraram um crescimento duas vezes (Figura 3.4) e 4,1 vezes superior à cultura estática, respectivamente.

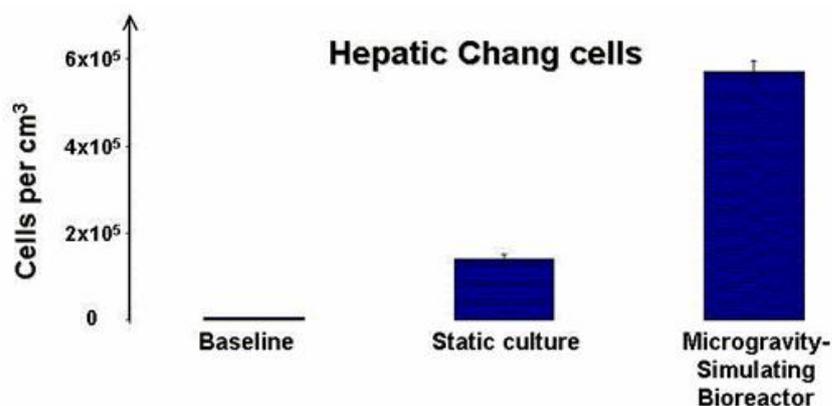


Figura 3.4: Crescimento de hepatócitos em microgravidade e controle
 Fonte: Adaptado de um poster para o 44th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2004

Ambas as células neurais (NB100 e U251) mostraram um crescimento de 3,3 (Figura 3.5) e 4,1 respectivamente, superiores à cultura estática.

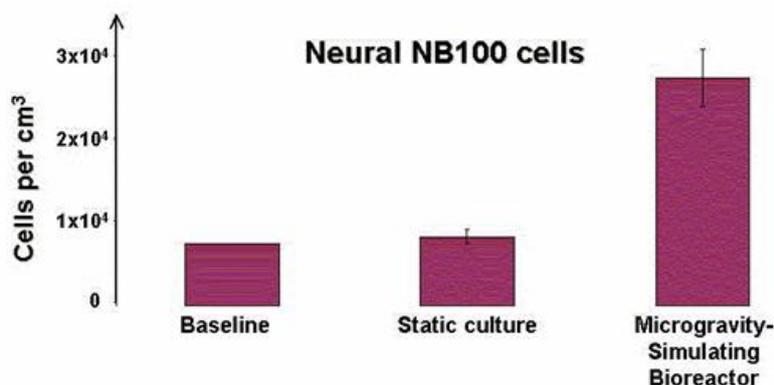


Figura 3.5: Crescimento de células neurais em microgravidade e controle
 Fonte: Adaptado de um poster para o 44th American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2004

Depois de apenas cinco dias, a análise microscópica de alta definição revelou que todas as CBSC cresceram e sobre estimulação apropriada diferenciaram-se em hepatócitos (Russomano, 2005).

3.1.3-Terceiro Protótipo do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade

O terceiro protótipo do Clinostato 3D foi primeiramente concebido fazendo-se a sua modelagem no software de CAD SolidWorks. Isto foi realizado para tentar minimizar a complexidade do projeto mecânico, reduzindo-se assim o número de peças e realizando um estudo prévio de cada uma delas. A Figura 3.6 representa todas as peças modeladas após a montagem virtual do clinostato tridimensional.

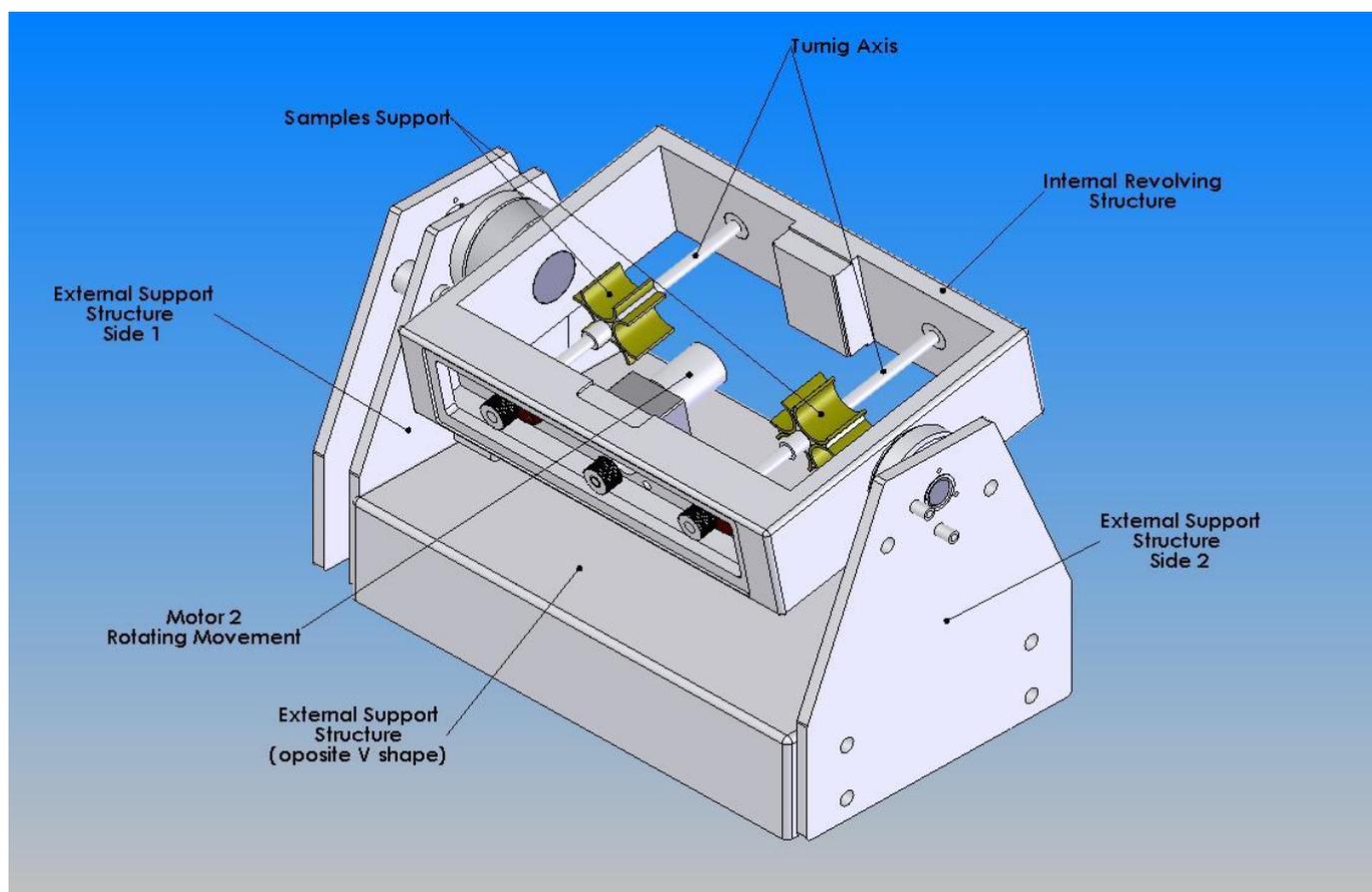


Figura 3.6: Modelagem em CAD do Clinostato Tridimensional
Fonte: www.pucrs/feng/microg

A estrutura externa tem 385mm de largura com 324,5mm de altura e 220mm de profundidade, com dois eixos rotatórios. Ela é construída numa estrutura sólida, com três partes principais. Todas as partes foram feitas com PVC expandido de 8mm de espessura, conferindo uma boa estabilidade e resistência à corrosão.

A estrutura interna, onde estão os frascos de amostras, é de formato retangular de 288mmx209mm. Os suportes para as amostras são feitos de um tubo de PVC de 32mm de diâmetro no qual parte dele foi cortado para criar uma presilha do tipo clipe. Eles estão dispostos em quatro cliques presos no eixo rotatório, estando o centro de cada tubo a 19,9mm deste eixo. A estrutura externa do suporte é uma estrutura em forma de V oposto de 383,5mx220mm. A velocidade de rotação de ambos os eixos foi fixada em 1,6 rpm ou 0,168rad/s como velocidade angular. A distância entre os centros dos tubos Falcon utilizados nos experimentos ao centro do eixo de rotação é de 2,55cm. Com o conhecimento desses valores, pode-se calcular a aceleração centrípeta através da equação abaixo.

$$A_c = \omega^2 \cdot R$$

A_c = aceleração centrípeta; ω = velocidade angular; R = raio

Portanto a A_c calculada no movimento rotacional possui uma aceleração centrípeta variando de zero a 10^{-4} g, de acordo com a posição dos tubos Falcon. Estes valores são muito menores do que a gravidade real, 9.81 m/s^2 .

O movimento de rotação é obtido através do uso de dois motores de 3,8rpm a 24V de corrente contínua (CC). Para transmissão dos movimentos, os motores foram acoplados em sistemas de engrenagens. Para o movimento de revolução da estrutura interna, uma correia sincronizadora é usada para

transferir o movimento rotacional do motor que está embaixo do suporte externo. Para o movimento rotacional do suporte das amostras, são usadas duas outras correias sincronizadoras, onde ambos os eixos de rotação são acoplados à mesma polia acionadora que está fixa no eixo do motor.

A Divisão de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas do King`s College de Londres, utilizando o terceiro protótipo do Clinostato 3D, o qual serviu de base para esta dissertação, testou células humanas do epitélio brônquico para modelar o epitélio da via nasal.

A terceira versão do clinostato tridimensional também foi utilizada na tese de doutorado da Profa Marlise Araújo dos Santos, intitulada “*The Development and Evaluation of an Intranasal Scopolamine Formulation for Space Motion Sickness*”, defendida e aprovada em dezembro de 2006, no King`s College, Londres, Inglaterra.

A resistência elétrica transepitelial (TER) foi usada para monitorar o desenvolvimento da permeabilidade da camada celular. Através da medida da TER a camada celular foi avaliada para verificar o fluxo de manitol (como medida da permeabilidade do soluto).

O crescimento celular na gravidade terrestre (controle) e sob microgravidade simulada formaram camadas com valores de TER acima de $350\Omega\text{cm}^2$ após 12 e 20 dias, respectivamente. As células em confluência transferidas para câmara de difusão do clinostato mantiveram uma alta TER após 24h ou 48h no Clinostato 3D.

As câmaras de difusão do clinostato, neste sentido, mostraram-se apropriadas para o crescimento de células epiteliais confluentes e desta forma

possibilitar a investigação de sua permeabilidade *in vitro* durante simulação de microgravidade no Clinostato 3D (Santos, 2006).

3.2-Materiais e Métodos

3.2.1-Descrição do Clinostato 3D

O Clinostato 3D é composto por vários sistemas separados. A parte de construção mecânica está relacionada a todos os componentes que dão as características mecânicas ao equipamento. Os sistemas eletro-eletrônicos são responsáveis por funções como comunicação, leitura de sensores e modulação de sinais de controle de velocidade. Esse projeto baseou-se no terceiro protótipo do Clinostato 3D e sua descrição detalhada encontra-se no item 3.1.3. A seguir estão descritos os componentes que foram implementados no Clinostato 3D.

3.2.2-Microcontrolador

Como controlador das funções digitais deste projeto, utilizou-se o microcontrolador da Texas Instruments modelo MSP430f149 (MSP430 Datasheet). Entre as funções que este desempenha, tem-se: configuração e escrita do display de caracteres; comunicação serial RS232 e com o transceiver; modulação do sinal de PWM; configuração e leitura do sensor de temperatura e umidade.

Utilizou-se este microcontrolador por apresentar muitas características e periféricos interessantes ao desenvolvimento deste projeto. Com o intuito de se manter um baixo custo para a realização do projeto, fez-se uso de um compilador em linguagem C de licença GPL, com disponibilidade de amostras

provenientes do fabricante, e uma prévia experiência na utilização deste. Quanto aos periféricos, ele incorpora um Timer com capacidade de configuração para uso como modulador de PWM em seis canais de até 16bits de resolução, máquina de estado para comunicação serial, sistema de interrupção externa com 16 entradas, entre outras. Na Figura 3.7, tem-se o diagrama de blocos fornecido pelo fabricante

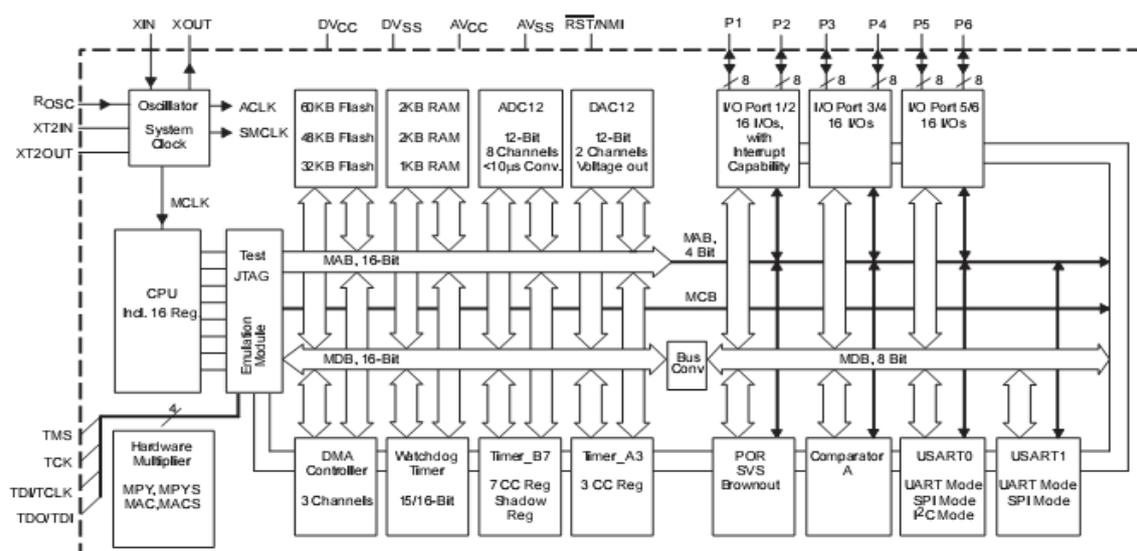


Figura 3.7: Diagrama de blocos do MSP430f149

Durante a fase de testes, utilizou-se a placa de desenvolvimento projetada e confeccionada pelo Centro de Microgravidade (Figura 3.8). Ela possibilita o acesso a todas as funções do microcontrolador, além de apresentar um driver para comunicação serial RS232, saída para display de LCD e circuitos de gravação (JTAG e BSL) do micro-controlador.

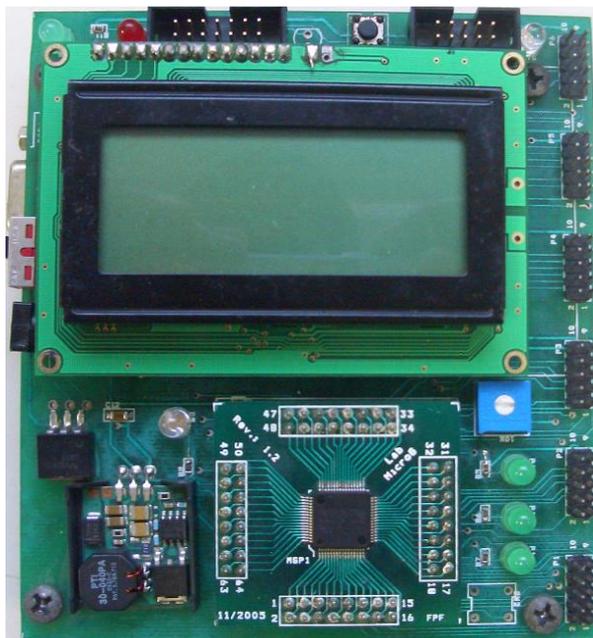


Figura 3.8: Montagem da placa de desenvolvimento
Fonte: www.pucrs.br/feng/microg

3.2.3-Sensor de Umidade e Temperatura

Para a monitoração do ambiente ao qual o Clinostato 3D está sujeito, alguns sensores foram adicionados. O clinostato operou principalmente dentro de uma estufa climatizada, onde a condição de temperatura era de 37°C e a de umidade ficou próxima de 95%. Para se manter registros destes parâmetros de ambiente, que são essenciais para a realização de testes com células, escolheu-se o sensor de temperatura e umidade da Sensirion modelo SHT71 (SHT71 Datasheet) (Figura 3.9).

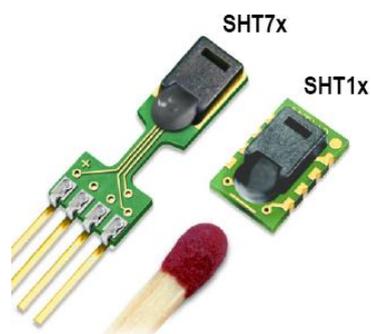


Figura 3.9: Sensor de temperatura e umidade SHT71
Fonte: http://www.sensirion.com/en/pdf/product_information

O SHT71 possui comunicação digital, evitando assim que seu sinal sofra interferência das variáveis de ambiente durante o envio das leituras. Ele também apresenta resoluções de 14bits para temperatura e 12bits para umidade, caracterizando-se num sensor de boa resolução, e apropriado para experimentos biomédicos. A comunicação é feita através de um protocolo próprio composto por sete fases, são elas: início de transmissão, envio do endereço e comando, recebimento do sinal de acknowledge, espera da conversão, recebimento dos 4 bits mais significativos, envio de um sinal de acknowledge, recebimento dos 8 bits menos significativos sem enviar outro sinal de acknowledge.

3.2.4-Transceiver de Rádio Freqüência

O sistema de comunicação remota foi idealizado fazendo-se uso do transceiver de rádio freqüência da Wenshing modelo TRW24G(TRW24G – Datasheet) (Figura 3.10). Este produto apresenta baixo custo, operação simplificada e bom alcance, justificando-se seu uso neste projeto.

O TRW24G baseia-se no circuito integrado da Nordic nRF2401 que disponibiliza apenas as entradas e saídas para operação. A Wenshing optou por um cristal de 16MHz, sendo a única variável não configurável do transceiver. Outras características do transceiver são: taxas de transmissão de até 1Mbps, operação Multicanal (125 canais), endereços de até 40bits, possibilidade da presença de Cyclic Redundancy Check, CRC, recepção simultânea em dois canais, operação a partir de 2,4GHz, alcance de até 280m.

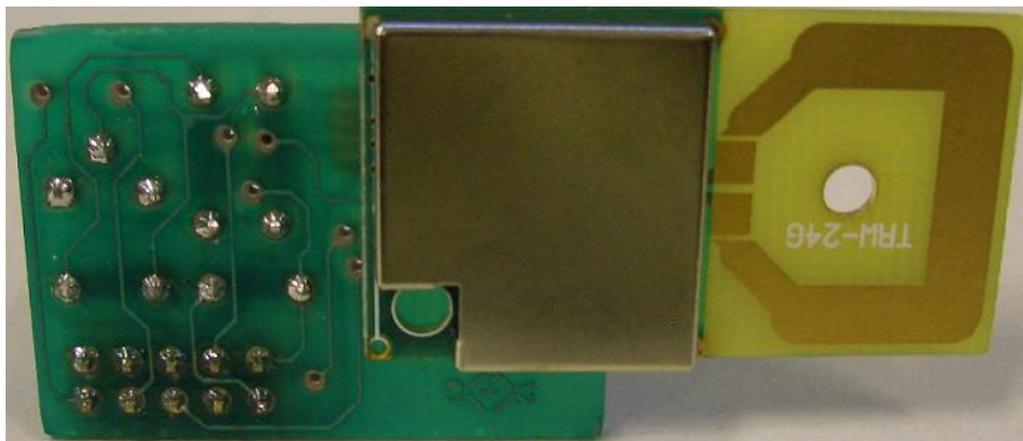


Figura 3.10: Montagem final do adaptador transceiver Rádio Freqüência
Fonte: www.pucrs.br/feng/microg

Segue na Figura 3.11 o diagrama de blocos do nRF2401, fornecido pelo fabricante.

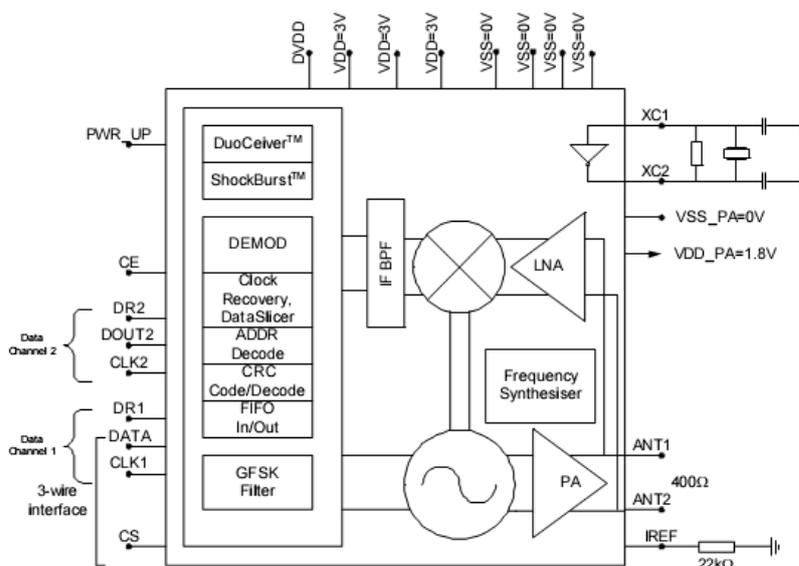


Figura 3.11. Diagrama de Blocos do nRF2401

3.2.5- Sensor de Velocidade Rotacional

Para medir a velocidade rotacional, escolheu-se o sensor da Philips Semicondutores modelo KMI15/4 (KMI15/4 – Datasheet). Este sensor utiliza o princípio de um elemento magnético resistivo acoplado a um imã permanente e

um condicionador de sinais. Utilizou-se este sensor por poder medir velocidades tão baixas quanto as que estão envolvidas neste projeto.

Na figura 3.12 tem-se o sensor KMI15/4 em detalhes, mostrando o ímã permanente no topo, o sensor acoplado a ele e a localização do circuito condicionador de sinais.

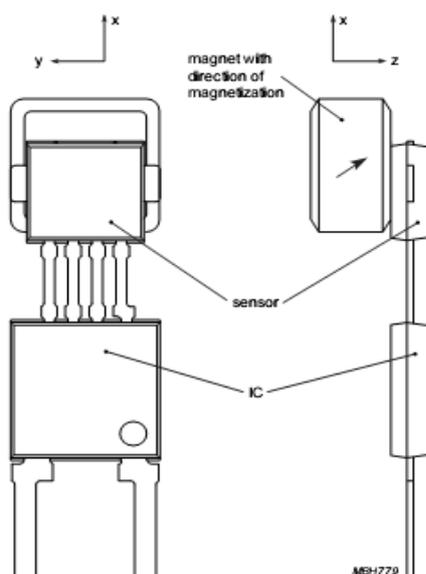


Figura 3.12: Detalhes do sensor de velocidade rotacional
Fonte: www.pucrs.br/feng/microg

No clinostato tridimensional usou-se o circuito de aplicação sugerido pelo fabricante, Figura 3.13. O sinal é coletado medindo-se a tensão em cima do RL.

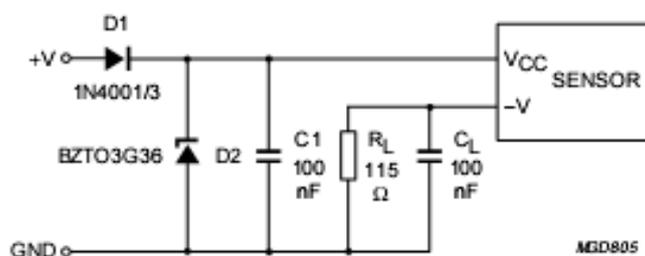


Figura 3.13. Esquemático elétrico da ligação do sensor

3.2.6-Tubo Modificado

Para o uso experimental do clinostato, é necessário que este permita troca gasosa sem que o meio de cultura seja derramado durante a rotação (Figura 3.14). Devido ao fato de não haver um tubo com essas características disponível no mercado, foi necessário desenvolver-se um a partir de um tubo Falcon de 50ml. Na tampa do tubo, três pequenos orifícios (um de 8,5mm e dois de 6,5mm) foram feitos para permitir a troca de gases entre o meio interno e o meio ambiente. Entre a tampa do tubo e o tubo em si, uma membrana foi colocada para evitar que o meio de cultura derramasse. Essa membrana, chamada Microtex, foi feita a base de poliéster pela Mont Blanc. O conjunto final possui 118 mm de comprimento por 28 mm de diâmetro interno e, após o fechamento, é posto numa autoclave para esterilização (Figura 3.15a e 3.15b).



Figura 3.14: Tubos modificados posicionados no Clinostato 3D
Fonte: www.pucrs.br/feng/microg



Figura 3.15a: Tubo Falcon modificado para estudo com Clinostato 3D
Fonte: www.pucrs.br/feng/microg

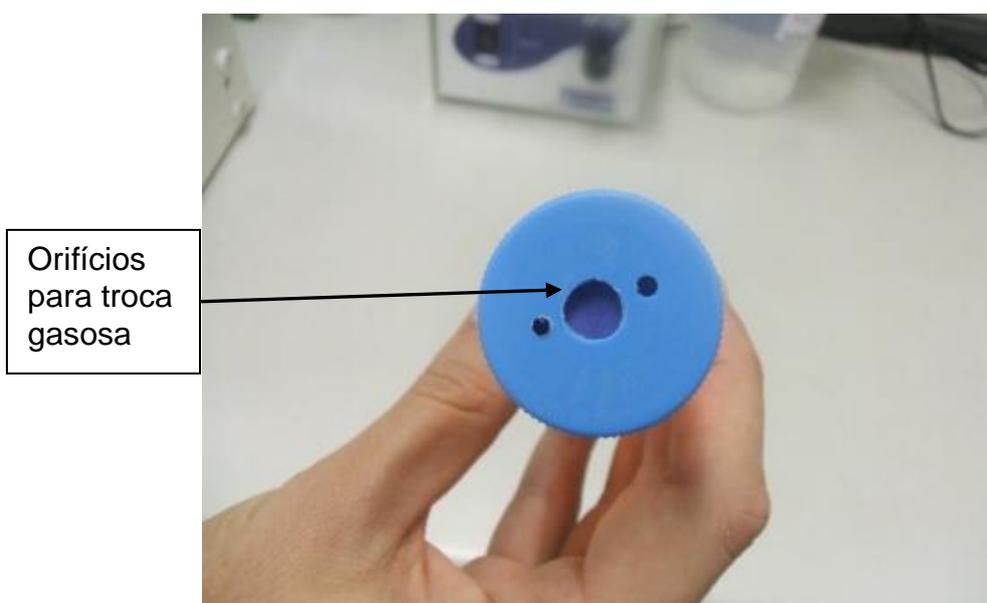


Figura 3.15b: Vista superior, com os orifícios que possibilitam a troca gasosa
Fonte: www.pucrs.br/feng/microg

3.2.7-Estufa NuAire US Autoflow

A estufa NuAire foi projetada para fornecer um ambiente controlado confiável para crescimento otimizado de cultura celulares. O exterior da estufa é feito de aço inoxidável, o que minimiza a perda de calor e fornece

estabilidade ao crescimento de células sensíveis a vibrações (Figura 3.16). O controle eletrônico da estufa NuAire é baseado num microcomputador projetado especificamente para os requerimentos precisos do ambiente para o crescimento celular ideal. O controle do fluxo de dióxido de carbônico (CO_2) utiliza um analisador de gases únicos para medir os níveis de CO_2 e esta medida independe das variações de umidade e temperatura.



Figura 3.16: Estufa NuAire do Laboratório de Imunologia/PUCRS
Fonte: www.pucrs.br/uni/inst/ipb

3.3-Ensaio sobre proliferação e viabilidade celular em microgravidade simulada – validação do Clinostato 3D

O estudo dos efeitos da microgravidade simulada em células do sistema imune e em células tumorais foi realizado tanto para validar o Clinostato 3D do Centro de Microgravidade da PUCRS como para estudar esses efeitos em processos importantes da defesa humana como a proliferação de linfócitos, bem como o crescimento de células K562. Aqui estão descritos os métodos

utilizados nesses dois experimentos, bem como as ferramentas para a análise dos dados.

3.3.1-Ética

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital São Lucas. Todos os voluntários estavam de acordo com o protocolo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto.

3.3.2-Sujeitos

Foram selecionados 10 voluntários saudáveis livres de estresses. Os critérios de exclusão incluíram: infecções, doenças do coração, anemia, leucopenia, neoplasias, depressão, contaminação pelo vírus HIV, doenças da tireóide e diabetes.

3.3.3-Coleta de sangue periférico e isolamento das células mononucleares do sangue periférico

Vinte mililitros de sangue periférico foram coletados por venopunção no período da manhã (entre 9h e 10h) e as amostras, armazenadas em tubos heparinizados contendo lítio antes das análises. As amostras foram coletadas no mesmo período do dia para evitar variações circadianas. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas por centrifugação num gradiente (900g, 30min) na Ficoll-Hypaque (Sigma). As células foram contadas por microscopia (100x) com viabilidade acima de 95%.

Após a coleta, a amostra de células foi dividida em dois tubos, um tubo ficou em rotação para avaliar o efeito da simulação de microgravidade nas

células mononucleares, enquanto o segundo tubo serviu de controle para o teste. Ambos os tubos permaneceram na estufa durante o teste. A figura 3.17 sumariza de forma esquemática os passos referentes ao teste de proliferação celular das PBMCs em simulação de microgravidade.

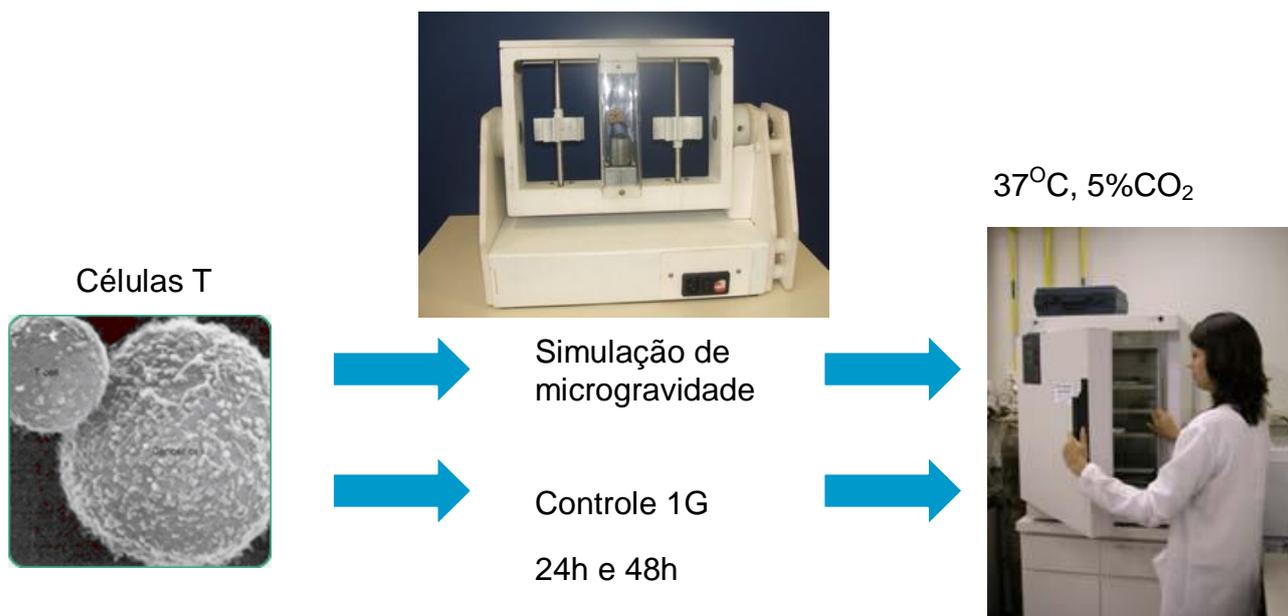


Figura 3.17: Roteiro do teste de proliferação celular em microgravidade
 Fonte: www.pucrs.br/feng/microg

3.3.4-Culturas celulares em microgravidade simulada

Depois de separadas, as células ficaram expostas à microgravidade simulada por um período de 24h e outro de 48h. Logo após, as PBMCs foram cultivadas em microplacas de 96 tubos de fundo achatado numa concentração final de 1.5×10^5 células/poço num meio de cultura completo (suplementado com gentamicina 0.5%, glutamina 1%, fungizona 0.1%, HEPES 1% e soro fetal bovino inativado pelo calor 10%, todos da Sigma) por 96h a 37°C numa atmosfera de 5% CO₂. A estimulação pelo mitógeno fitohemaglutinina seletiva da célula T (PHA 2, 1 e 0.5%; Gibco, USA) foi realizada em triplicatas (100

μL /tubo). Esse mitógeno estimula a proliferação das células clones dos linfócitos T através do receptor CD3. Nas culturas não estimuladas, o mitógeno foi substituído pelo meio de cultura.

3.3.5-Ensaio da proliferação/viabilidade celular

As respostas proliferativas foram determinadas por um ensaio colorimétrico modificado (Collaziol, 2002, Mosmann, 1983). Nas últimas 4h de cultura, 100 μL do sobrenadante foi gentilmente descartado e foram adicionados 40 μL do preparado MTT (3-(4,5-diametil 2-tiazolil) 2,5 difenil-2H-tetrazolium, Sigma) solução (5 mg/mL em RPMI-1640) em cada um dos poços. As enzimas desidrogenases nas células metabolicamente ativas convertem esse substrato em formazam, produzindo um precipitado azul escuro. As culturas celulares foram incubadas por 4h a 37°C numa atmosfera de 5% CO_2 . Após completada a remoção do sobrenadante, 100 μL de dimetil sulfoxido (Sigma) foi adicionado em cada tubo. A densidade óptica (OD) foi determinada usando-se um leitor de placa Biorad ELISA com comprimento de onda de 570nm e 630nm. A proliferação/viabilidade é expressa em ΔOD (OD da cultura estimulada – OD da cultura não estimulada).

3.3.6-Estudo com células tumorais K562 em simulação de microgravidade

Também foram estudados os efeitos da microgravidade simulada no crescimento de células tumorais K562. Esse estudo consistiu em expor quatro amostras de células K562 à microgravidade simulada pelo clinostato por períodos de tempos (24h, 48h, 72h e 96h) junto com o respectivo controle. Ao

término do tempo de microgravidade o crescimento celular foi determinado pelo mesmo ensaio colorimétrico modificado utilizado no teste com células mononucleares. Nas últimas 4h de cultura, foram adicionados 40 μ L do preparado MTT (3-(4,5-diametil 2-tiazolil) 2,5 difenil-2H-tetrazolium, Sigma) solução (5 mg/mL em RPMI-1640) em cada um dos poços. As amostras foram incubadas por 4h a 37°C numa atmosfera de 5% CO₂. Após completada a remoção do sobrenadante, 100 μ L de dimetil sulfoxido (Sigma) foi adicionado em cada tubo. A densidade óptica (OD) foi determinada usando-se um leitor de placa Biorad ELISA com comprimento de onda de 570nm e 630nm. O crescimento celular é expresso em Δ OD (OD da cultura estimulada – OD da cultura não estimulada).

3.3.7-Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada através das médias e desvio padrão dos resultados e de testes t-pareados. O nível de significância empregado foi de $p \leq 0,05$.

Nesse capítulo, foi descrita uma breve revisão sobre a evolução dos clinostatos projetados e construídos no Centro de Microgravidade da PUCRS, mostrando seus aperfeiçoamentos e estudos de validação ao longo das versões. Foram ainda descritos os materiais e métodos utilizados para o melhoramento da última versão do Clinostato 3D e sua validação, através da realização de testes com células humanas em microgravidade simulada.

O próximo capítulo abordará os resultados encontrados sobre o aperfeiçoamento do clinostato e os obtidos nos testes com células humanas.

CAPÍTULO 4

Resultados

4.1-Aperfeiçoamento do Clinostato 3D

Após vários testes feitos, através de ensaios reais e outros apenas de bancada, pode-se dizer que o Clinostato 3D concebido e desenvolvido pelo Centro de Microgravidade é um equipamento plenamente funcional e resistente às condições de uso.

Esta última versão do Clinostato 3D foi implementada com transceiver Rádio Freqüência, sensor de velocidade rotacional, sensor de umidade e temperatura, um software de controle, além do microcontrolador, responsável pela modulação do sinal PWM, comunicação serial RS232 e leitura dos sensores de umidade e temperatura (Figura 4.1).

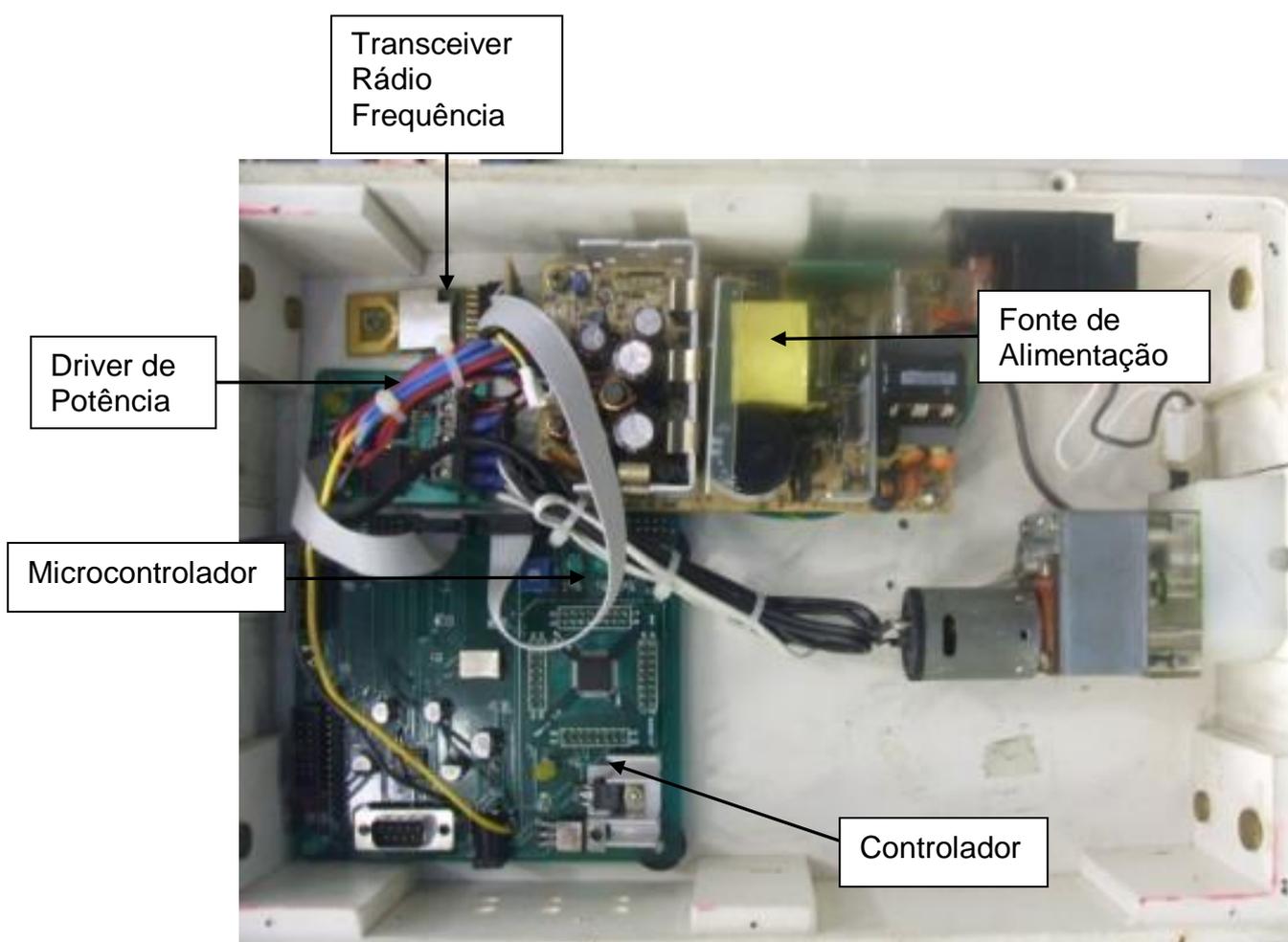


Figura 4.1: Microcontrolador, transceiver rádio freqüência implementados no clinostato 3D
Fonte: www.pucrs.br/feng/microg

4.1.1- Transceiver Rádio Freqüência

Durante os testes com o Clinostato 3D dentro da estufa do Laboratório de Imunologia, o transceiver Rádio Freqüência funcionou de acordo com o esperado, enviando os dados obtidos pelos sensores implementados ao computador do operador.

4.1.2-Sensor de velocidade rotacional

O parâmetro velocidade rotacional é um dos mais importantes aspectos deste projeto. Como cada tipo de célula ou organismo requer uma combinação de velocidades diferentes, a mensuração desta variável é muito importante.

Através do sensor de velocidade rotacional implementado no Clinostato 3D, pode-se monitorar e controlar sua velocidade de rotação. Esse sensor foi capaz de medir a velocidade rotacional ao longo dos experimentos com o Clinostato 3D sem que houvesse falha no envio das medidas.

4.1.3-Sensor de umidade e temperatura

Os sensores de umidade e temperatura mostram as condições que o Clinostato 3D está submetido, a fim de monitorar essas variáveis para que as mesmas não influenciem nos resultados dos testes com células. A tabela II mostra as temperaturas medidas tanto pelo sensor da estufa quanto pelo sensor do clinostato a fim de comparar a eficácia do mesmo ao longo de uma hora. Quando essas variáveis obtidas pelos sensores foram analisadas, não foi observada nenhuma variação significativa entre as medidas ($p=0,338$).

Tabela II- Medidas das temperaturas com o sensor do clinostato e da estufa ao longo de uma hora

Tempo	Temperatura (°C)	
	Estufa	Clinostato
1min	37,1	34,86
10min	37,0	36,88
20min	36,9	37,04
30min	37,0	36,94
40min	37,0	37,06
50min	37,0	37,00
60min	37,1	37,08
Média	37,01	36,69
DP	0,004	0,66
p	0,338	

4.1.4-Software de controle

A Figura 4.2 apresenta o ambiente visual desenvolvido em linguagem Delphi para interação remota do usuário com o Clinostato 3D. Nesse ambiente gráfico, tem-se a visualização dos registros de temperatura e umidade, bem como o sentido e velocidade de rotação nos dois eixos.



Figura 4.2: Ambiente visual de monitoração e controle
Fonte: www.pucrs.br/feng/microg

O Clinostato 3D, durante os testes, permaneceu em rotação por até quatro dias ininterruptos na estufa sem que houvesse falha de seus componentes ou deterioração por causa da umidade.

Aqui acabam os resultados sobre o aperfeiçoamento do Clinostato 3D, e a discussão sobre esses resultados se encontra capítulo 5 da dissertação. Os próximos resultados são referentes ao estudo da microgravidade simulada e seus efeitos na proliferação e viabilidade das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), experimentos utilizados para validar o clinostato 3D.

4.2- Validação do tubo Falcon modificado

Foi realizado um teste para avaliar a capacidade de troca gasosa do tubo a ser utilizado nos experimentos com as células mononucleares. Nesse experimento, foram cultivadas PBMCs em microgravidade simulada no tubo modificado, no controle a 1G também no tubo modificado e numa placa de fundo achatado que serviria de controle para verificar a troca gasosa dos tubos. A Figura 4.3 a seguir mostra os resultados obtidos neste teste.

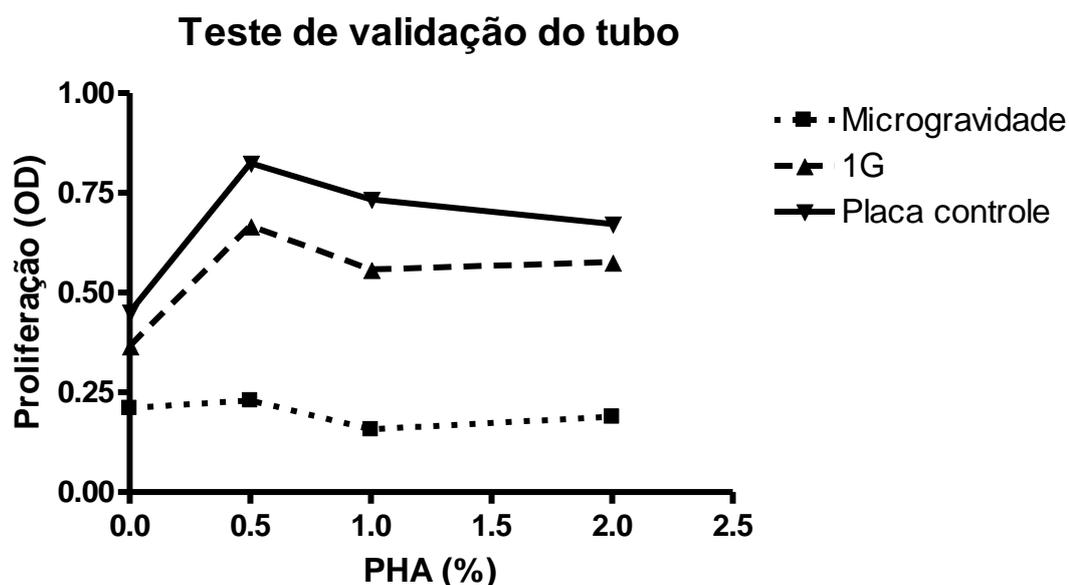


Figura 4.3 – Experimento de validação dos tubos modificados

Os resultados obtidos no teste mostraram que os tubos modificados com a membrana impermeável permitiram a troca gasosa entre o meio de cultura dentro dos tubos e o interior da estufa, indicando que esses tubos foram capazes de realizar troca gasosa e podem ser utilizados nos experimentos de proliferação celular.

4.3-Proliferação e viabilidade celular das PBMCs em simulação de microgravidade

Este estudo objetivou avaliar os efeitos da microgravidade simulada sobre a proliferação e viabilidade de linfócitos T humanos em estimulação ao mitógeno fitohemaglutina.

Os resultados foram expressos em densidade óptica, indicando a proliferação das células mononucleares em simulação de microgravidade e controle estático.

A tabela III mostra as médias e os desvios padrão da proliferação celular na estimulação por mitógeno. Essas médias pertencem às amostras em 24h e 48h de simulação de microgravidade e representam o crescimento das células mononucleares nas condições de microgravidade simulada em relação à quantidade de mitógeno a qual a amostra foi exposta. Os resultados individuais estão apresentados no Anexo 8.1.

Tabela III – Média e desvio padrão das amostras em 24h e 48h de simulação de microgravidade na estimulação por mitógeno (n=10)

	24h		48h	
PHA	média	DP	média	DP
0.0	0.138	0.071	0.076	0.027
0.5	0.182	0.091	0.134	0.034
1.0	0.208	0.138	0.171	0.061
2.0	0.204	0.196	0.144	0.059

Resultados dos testes com as PBMCs durante 24h de simulação de microgravidade e do controle estão apresentados na Figura 4.4. Esses resultados expressam a proliferação e viabilidade celular das células mononucleares em 24h de simulação de microgravidade.

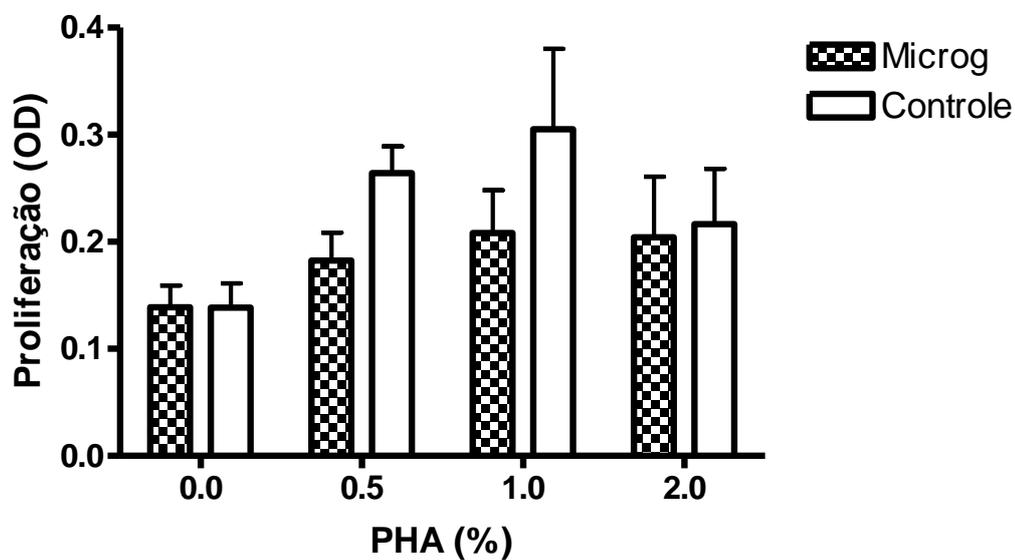


Figura 4.4: Proliferação das PBMCs após 24h de microgravidade simulada
 $p=0,146$

Figura 4.5 mostra os resultados de proliferação celular obtidos durante 48h de clinorrotação.

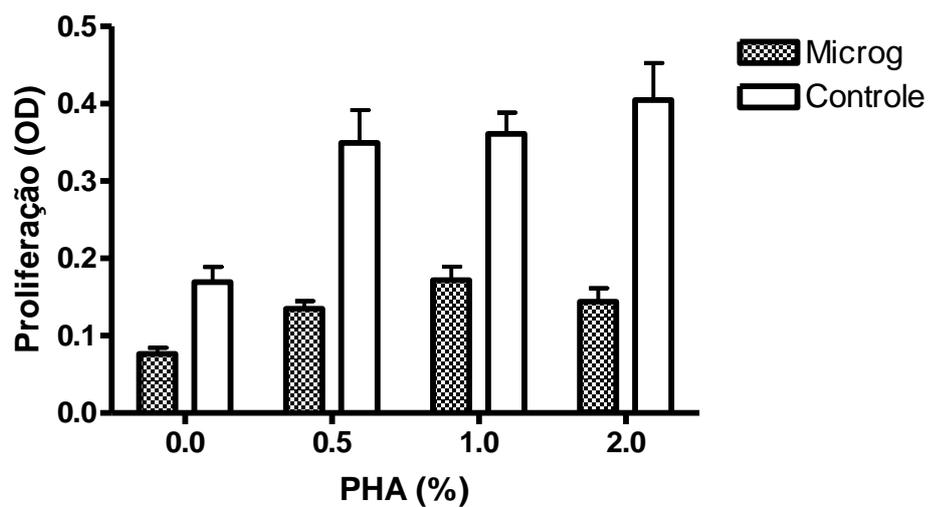


Figura 4.5: Proliferação das PBMCs após 48h de microgravidade simulada
 $p= 0,012^*$

* - Resultado significativo

Figura 4.6 mostra uma comparação entre a proliferação e a viabilidade celular em 24 h e 48h de simulação microgravidade. Essa figura ilustra a diferença dos resultados obtidos em 24h e 48h de clinorrotação e serve para mostrar que essa diferença foi causada pelo efeito da microgravidade nas células mononucleares.

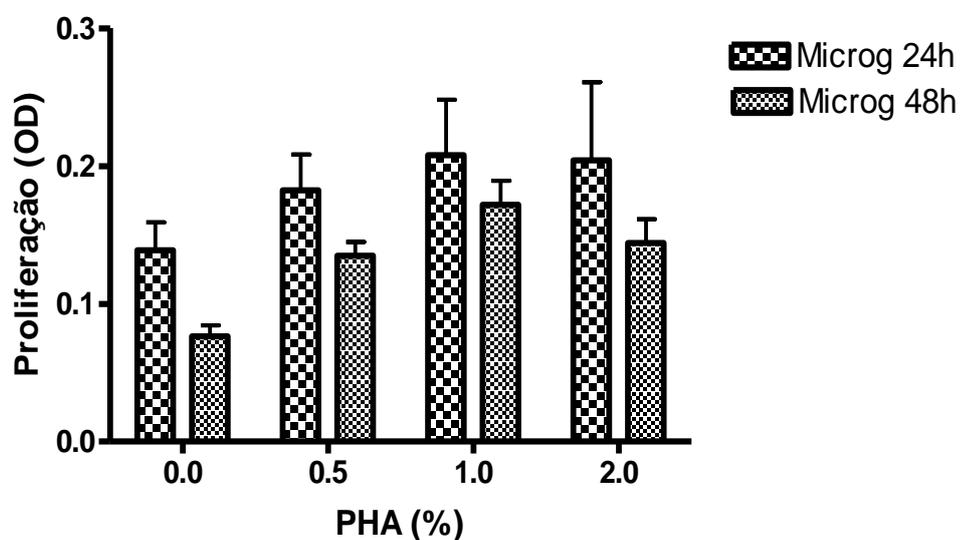


Figura 4.6: Comparação entre as culturas celulares durante 24h e 48h em microgravidade simulada $p=0,003^*$

Aqui acabam os resultados sobre o estudo da microgravidade simulada na proliferação das PBMCs, e a discussão sobre esses resultados se encontra capítulo 5 da dissertação. Os próximos resultados são referentes ao estudo dos efeitos da microgravidade simulada através do Clinostato 3D no crescimento de células tumorais K562 ao longo de quatro dias.

* - Resultado significativo

4.3-Crescimento das células tumorais K562 em simulação de microgravidade

O objetivo deste trabalho foi testar o crescimento de células tumorais K562 utilizando-se o Clinostato 3D do Centro de Microgravidade como simulador de microgravidade.

Os resultados foram expressos em densidade óptica, indicando o crescimento das células tumorais K562 em simulação de microgravidade e controle estático.

A tabela IV mostra as médias e os desvios padrão do crescimento celular em microgravidade simulada e no controle. Essas médias pertencem às amostras em 24h, 48h, 72h e 96h de simulação de microgravidade e os respectivos controles, e representam o crescimento das células K562 nas condições de microgravidade. Os dados individuais estão no Anexo 8.2.

Tabela IV - Média e desvio padrão das amostras em 24h, 48h, 72h e 96h de simulação de microgravidade e no controle (n=3).

Tempo	Microgravidade		Controle	
	média	DP	média	DP
24h	0,314	0,0038	0,110	0,0003
48h	0,249	0,0003	0,143	0,0004
72h	0,271	0,0014	0,123	0,0009
96h	0,431	0,0041	0,188	0,0032

A Figura 4.7 mostra a curva de crescimento celular das células K562 em microgravidade simulada e no controle ao longo de quatro dias.

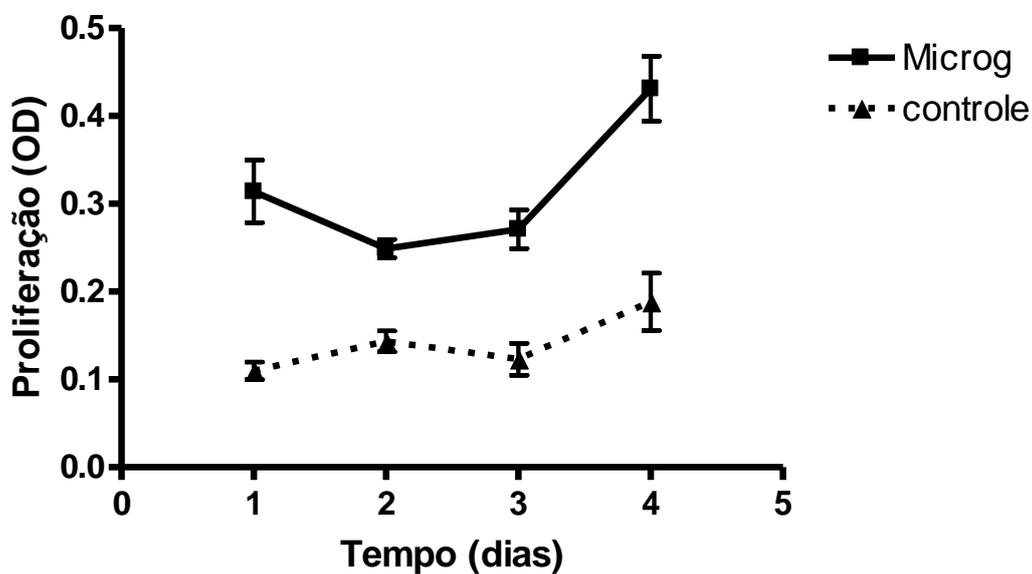


Figura 4.7: Crescimento celular das células tumorais K562 ao longo de quatro dias $p=0,007^*$

Nesse capítulo, foram apresentados os resultados do aperfeiçoamento do Clinostato 3D, bem como os resultados referentes aos dois testes realizados com o mesmo, o teste de proliferação celular com PBMCs e o teste de crescimento celular com as células K562 em simulação de microgravidade. O próximo capítulo será sobre a discussão dos resultados obtidos.

* - Resultado significativo

CAPÍTULO 5

5- Discussão

5.1-Aperfeiçoamento do Clinostato 3D

Os resultados obtidos nos ensaios reais e de bancada mostram que o Clinostato 3D apresentou melhorias significativas no seu controle e funcionamento, graças à presença do microcontrolador (Figura 4.1) que é responsável pela leitura dos sensores de umidade e temperatura, pela modulação do sinal PWM e pela comunicação serial com o computador do operador. A presença desse microcontrolador justificou-se pelo fato dele desempenhar diversas funções e possuir um baixo custo ao projeto.

A implementação do Transceiver Rádio Freqüência possibilitou a monitoração remota do funcionamento do clinostato, uma vez que através desse sistema o operador pode controlar suas funções como, por exemplo, a velocidade e o sentido de rotação com o auxílio da interface gráfica (Figura 4.2).

Em relação às versões anteriores, o clinostato mostrou uma evolução no quesito de resistência dos materiais aos efeitos da temperatura e umidade dentro da estufa. O Clinostato 3D, após permanecer quatro dias ininterruptos dentro da estufa do Laboratório de Imunologia do IPB-PUCRS, não sofreu nenhuma deterioração dos seus componentes, indicando que com esses aperfeiçoamentos, o Clinostato 3D pode ser utilizado em testes que necessitem de um tempo maior de microgravidade simulada sem que haja uma perda de eficácia do aparelho em si.

As modificações feitas nos materiais do Clinostato 3D permitiram que ele ficasse em operação pelo tempo necessário para o estudo em questão, simulando o ambiente de microgravidade indefinidamente, ao contrário de outros aparelhos utilizados para simular microgravidade em Terra, onde o tempo é um fator limitante, como, por exemplo, a Free Fall Machine ou a Centrifuge Free Fall Machine (Manti, 2006).

O Clinostato 3D, após esses aperfeiçoamentos, também pode operar como uma Random Positioning Machine, uma vez que agora se podem variar no clinostato os parâmetros de velocidade e sentido rotação durante a execução do protocolo de pesquisa, através do microcontrolador implementado. Essa possibilidade faz com que o clinostato desenvolvido no Centro de Microgravidade da PUCRS possua características que outros clinostatos disponíveis no mercado não possuem (Klaus, 2001).

5.2-Ensaio de proliferação e viabilidade das células mononucleares do sangue periférico

Os resultados indicam um resultado não significativo na proliferação e viabilidade celular na estimulação ao mitógeno fitohemaglutinina em 24h de microgravidade simulada ($p=0,146$). Estes dados sugerem que para as células mononucleares do sangue periférico, 24h de clinorrotação não são suficientes, talvez pelo fato que a proliferação das PBMCs ocorre após 24h.

No estudo realizado por Walther *et al* em 1998, testou-se a expressão gênica da IL-2 e de seu receptor com a tecnologia da RT-PCR (reação em

cadeia da polimerase com transcriptase reversa). As condições de microgravidade foram simuladas com um clinostato de alta rotação. Esse estudo mostrou que a expressão de interleucina-2, uma citocina envolvida na resposta proliferativa, é reduzida em 85% após 46h de clinorotação. Os dados indicam que a falha na expressão do receptor de interleucina-2 é responsável pela perda da atividade e que a microgravidade pode ser usada como um inibidor não invasivo da ativação celular. Foi então, no presente estudo, necessário cultivar as células mononucleares em 48h de simulação de microgravidade (Figura 5.1) e os resultados confirmam a diminuição da proliferação e viabilidade celular ($p=0,012$).



Figura 5.1: 48h de clinorotação no Lab de Imunologia/IPB

A Figura 4.7 representa uma comparação entre as culturas em 24h e 48h de simulação de microgravidade, a qual sugere que 48h é o tempo apropriado

para promover os efeitos esperados da microgravidade nas células mononucleares. Vinte e quatro horas de clinorrotação não devem ser suficientes para este objetivo. Acredita-se, portanto, que a proliferação das PBMCs diminui enquanto o tempo de exposição à microgravidade aumenta. O próximo passo será determinar se este decréscimo da proliferação continua à medida que o tempo de microgravidade simulada aumenta.

O decréscimo da proliferação das PBMCs pode ocorrer por diversos motivos. Hashemi et al (1999) descobriram que a estimulação das PBMCs ao mitógeno PHA em clinorrotação mostrou uma inibição da expressão de CD25 (o receptor da IL-2), CD69 e CD71 e que a ausência da expressão de CD25 em microgravidade certamente prejudica a resposta das células T para a citocina IL-2, um evento necessário para a resposta proliferativa. A clinorrotação bloqueia a transcrição do fator de ativação das células T (Figura 5.2) e também inibe a ligação da transcrição dos fatores necessários para produção de IL-2 (Morrow, 2006).

Outros estudos indicam que a diminuição *in vitro* está relacionada somente aos efeitos gravitacionais a nível celular, enquanto os *in vivo* seriam também causados pelo estresse físico e psicológico de um vôo espacial, o qual afetaria o sistema imune através do sistema neuroendócrino.

A interação homeostática entre o hipotálamo, a glândula hipófise e a glândula supradrenal constitui o eixo HPA (Figura 5.2), a principal parte do sistema neuroendócrino que controla as reações ao estresse e regula diversos processos do corpo humano, incluindo a digestão, o sistema imune, o humor e a sexualidade (Taylor, 1993).

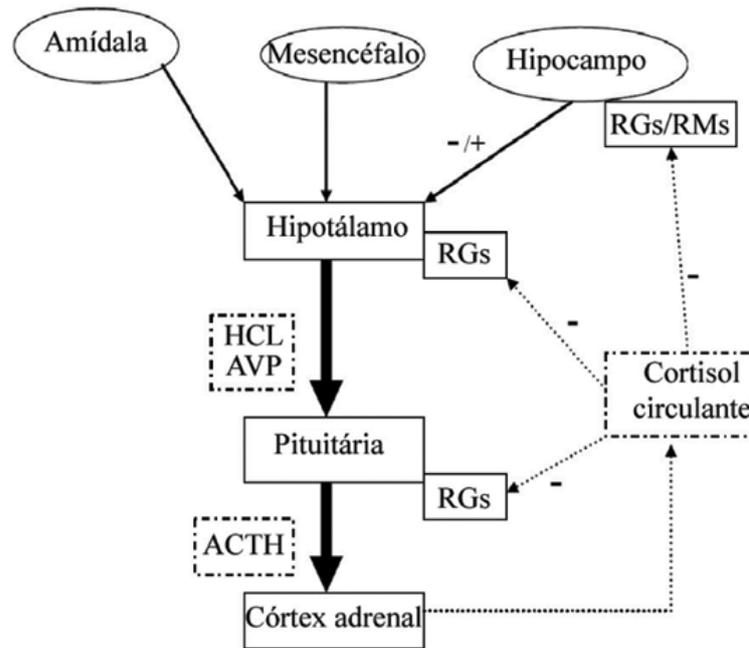


Figura 5.2: Diagrama esquemático do eixo HPA, descrevendo a regulação e o feedback negativo (-), do cortisol por via dos receptores de Glicocorticóides (RG) (AVP- vasopressina, ACTH- hormônio adrenocorticotrópico)

Fonte: www.scielo.br/img/revistas

O volume plasmático diminui consideravelmente nos vôos espaciais, e, por conseguinte, os constituintes endócrinos e imunológicos do sangue estão modificados pela influência da força gravitacional (Tipton, 1996). Por outro lado, os níveis dos hormônios adrenocorticotrópico, aldosterona e anti-diurético mantêm-se elevados e as concentrações de angiotensina e cortisol aumentam em relação ao controle em Terra (Tipton, 1996).

O cortisol é um hormônio corticosteróide produzido pelo córtex da glândula adrenal, muitas vezes referido como hormônio do estresse. Ele aumenta a pressão sanguínea, os níveis de açúcar no sangue e possui ação imunossupressora. Em níveis normais, o cortisol (como outros glicocorticóides)

possui uma gama de ações, como ajudar a restaurar a homeostase após o estresse e diminuir a atividade do sistema imune. O cortisol inibe a proliferação das células T pela diminuição da produção de interleucina-2 e pela ineficácia de produzir o fator de crescimento de células T. Esse fato reflete na redistribuição de leucócitos para os linfonodos, medula espinhal e pele (Palácios, 1982).

Walther (1999) mostrou que a função dos linfócitos T é alterada, tendo sua atividade diminuída em mais de 50% dos membros dos vôos espaciais, indicando que tal efeito é devido ao estresse do vôo do que a falta de peso em si. Entretanto, quando os linfócitos T do sangue periférico foram testados em condições similares a microgravidade real com a Random Positioning Machine, os resultados mostraram os efeitos deletérios da microgravidade simulada na expressão gênica da IL-2 e de seu receptor. Por outro lado, pouco se sabe sobre os efeitos da microgravidade nos linfócitos B, no seu crescimento e na produção de anticorpos (Figura 5.3) (Suganuma, 2001). Acredita-se, porém, que os vôos espaciais estão associados com a redução dos níveis de linfócitos T, eosinófilos e células do tipo natural killers (NK) e com o aumento do número de neutrófilos no sangue periférico (Mehta, 2001).

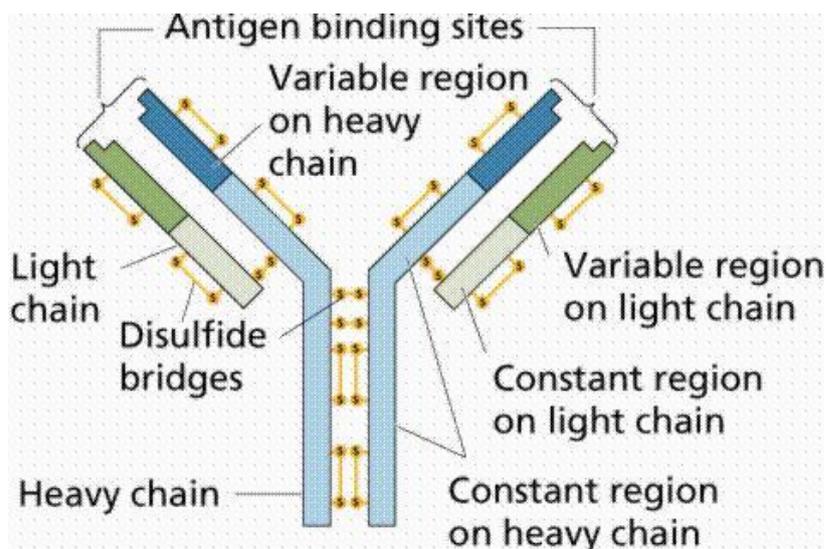


Figura 5.3: Representação ilustrativa da estrutura básica de um anticorpo, mostrando as quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas leves e duas pesadas
Fonte: www.rbi.fmrp.usp.br

Kulkarni (2005) relatou que uma suplementação nutricional de nucleotídeos possui o potencial para servir como uma contramedida para as disfunções imunológicas observadas em viagens espaciais. Esse estudo demonstrou que a proliferação celular estimulada por PHA, a diminuição dos níveis de IL-2 e interferon- γ e outras funções imunológicas podem ser restauradas através de uma dieta de nucleotídeos (Figura 5.4). Uma diminuição dos níveis de corticosteróides, através de uma suplementação por nucleotídeos, pode ser um dos possíveis mecanismos responsáveis pela restauração do sistema imunológico.

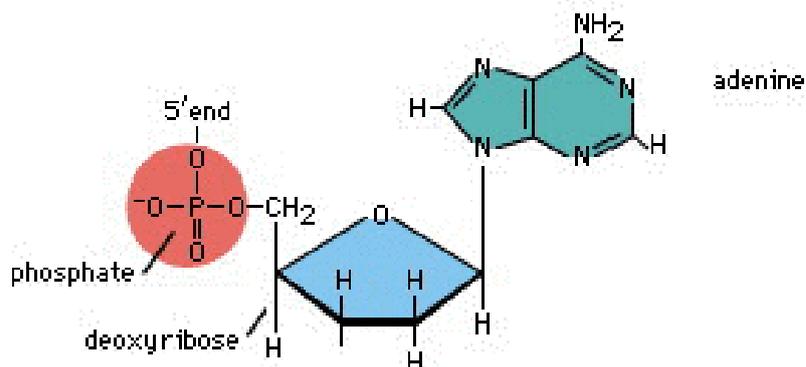


Figura 5.4: Fórmula estrutural de um nucleotídeo, sendo uma pentose (representada em azul), uma base nitrogenada (verde) e pelo menos um grupamento fosfato (vermelho)

Fonte: www.virtual.epm.br

A microgravidade também afeta outras funções imunológicas, como a locomoção dos linfócitos, que é um aspecto importante da resposta imune. Durante o crescimento, maturação, diferenciação linfocitária, é essencial que os linfócitos atravessem a matriz extracelular. Condições que afetem a locomoção podem ter consequências adversas para a defesa do organismo. Sundaresan (2002) mostrou que a locomoção dos linfócitos foi inibida em 73% durante 21h de cultura em microgravidade, quando comparada com as células em cultura a 1G. Uma diminuição na produção e funcionamento de certos tipos de citocinas, como interferon- γ , IL-1 e IL-2, também é observado em simulação de microgravidade (Sonnenfeld & Miller, 1993).

O presente estudo confirma que o efeito da microgravidade no sistema imune não é devido somente ao estresse físico e psicológico do vôo espacial, mas é causado pela microgravidade em si, afetando a proliferação e viabilidade celular, indicando que o efeito da falta de peso deve ocorrer a nível celular.

5.3-Ensaio do crescimento de células K562 em simulação de microgravidade

Os resultados dos testes realizados com as células K562 mostraram um aumento significativo do crescimento celular quando comparado ao controle estático ao longo de quatro dias de cultivo ($p= 0,007$) (Figura 4.9).

Os efeitos de um ambiente de microgravidade no crescimento de células tumorais e em sua carcinogênese ainda não estão totalmente esclarecidos. Wang (2003) investigou os efeitos da falta de peso simulada através de um clinostato na diferenciação da expressão gênica de células de osteosarcoma em ratos e observou que a diferenciação dessas células é reduzida após 72h de simulação de microgravidade.

Russomano et al (2005) testaram o crescimento de quatro tipos de células cancerígenas e células tronco do cordão umbilical (CBSC). As células tumorais testadas foram células hematopoiéticas HL60, células neurais NB100 e U251 e células hepáticas Chang. Os resultados indicaram que a microgravidade simulada aumentou significamente o potencial de proliferação de todos os tipos de células testadas, quando comparadas com culturas estáticas. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos com as células K562, onde também houve um crescimento superior das células testadas em simulação de microgravidade do que no controle estático.

Vôos espaciais envolvem inúmeros estressores biológicos que podem afetar a incidência de câncer a longo prazo e o comportamento tumoral. Taga et al (2006) estudaram o crescimento de melanomas, a produção de melanina

e a apoptose dessas células em microgravidade simulada, utilizando o Rotating Wall Vessel, e constataram que, após 48h de exposição, houve uma diminuição de 50% no tamanho do tumor. Entretanto, a produção de melanina aumentou em 24h e 48h de simulação de microgravidade e a tumorigenicidade das células, quando comparada ao controle estático. Os resultados desse estudo indicam que a microgravidade altera o crescimento das células tumorais e aumenta a sua invasividade, talvez pelo fato de que a cultura em microgravidade selecione as células com maior tumorigenicidade, apesar de diminuir o crescimento celular.

Diversos estudos, tanto em roedores quanto em humanos, mostram uma diminuição da resistência às infecções bacterianas e virais em condições de microgravidade (Hashemi, 1999 e Morrow, 2006). Entretanto, o efeito das condições dos vôos espaciais na imunidade a tumores ainda não foi totalmente esclarecido. A fim de se testar o crescimento e a imunidade às células tumorais SI509a, foi utilizado uma técnica de suspensão corporal pelos membros posteriores de roedores como simulação de microgravidade. Os resultados mostraram um aumento significativo do crescimento do tumor e uma diminuição da resposta imune aos antígenos dos tumores, quando comparados aos controles, indicando que a imunidade antitumoral é inibida em suspensões antiortostática (Lee 2005).

Nesse capítulo foram discutidos os resultados obtidos no aperfeiçoamento do Clinostato 3D, no teste de proliferação celular com células mononucleares e no teste com células K562, ambos os experimentos realizados em microgravidade simulada. O próximo capítulo abordará as conclusões obtidas referentes a cada um dos itens discutidos nesse capítulo.

CAPÍTULO 6

Conclusão

Esta dissertação concentrou-se em três focos de trabalho: 1) O aperfeiçoamento do Clinostato 3D, com a implementação de componentes para melhorar o desempenho do clinostato; 2) A validação do Clinostato 3D em solo nacional com a utilização de células do sistema imunológico; 3) O estudo do efeito da microgravidade simulada no crescimento de células tumorais K562.

6.1- Aperfeiçoamento do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade

O aperfeiçoamento do Clinostato 3D foi realizado com base na implementação de componentes eletrônicos que permitiram que o Clinostato 3D tenha um desempenho superior em relação às suas outras versões. O microcontrolador MSP430 implementado é responsável pelas funções digitais do clinostato.

O sensor de velocidade rotacional mede com exatidão a velocidade, uma vez que esse parâmetro é um dos mais importantes aspectos deste projeto e a mensuração desta variável é muito importante para o estudo com células humanas.

Uma vez que o clinostato operou principalmente dentro de uma estufa climatizada, onde a condição de temperatura era de 37°C e a de umidade ficou próxima de 95%, sensores de temperatura e umidade foram implementados no Clinostato 3D. Esses sensores medem com confiabilidade essas variáveis para se manter os registros destes parâmetros de ambiente, que são essenciais para a realização de testes com células.

O sistema de comunicação remota foi possível através do uso do Transceiver Rádio Freqüência. Esse sistema de comunicação é responsável pelo envio de das leituras obtidas pelo sensor de velocidade e do sensor de temperatura e umidade. A comunicação entre os sensores e o computador do operador, onde encontrava-se o software de controle e monitoração remota, apresentou resultados mais que satisfatórios.

Com base nos dados obtidos a partir da implementação dos componentes mencionados, pode-se afirmar que o Clinostato 3D do Centro de Microgravidade possui agora um desempenho superior, uma confiabilidade maior e a sua operação tornou-se mais simplificada.

6.2- Validação do Clinostato 3D do Centro de Microgravidade

O Clinostato 3D foi capaz de “desorientar” as células do sistema imunológico e simular, assim, os efeitos encontrados quando expostas ao ambiente de microgravidade.

Os resultados obtidos nos testes de proliferação e viabilidade celular em 24h e 48h de microgravidade simulada validam o Clinostato 3D do Centro de Microgravidade como uma ferramenta capaz de simular microgravidade na Terra.

O presente estudo mostrou que a diminuição da atividade imunológica em relação aos vôos espaciais não esta somente associada ao estresse físico e psicológico que o astronauta está submetido, já que essa diminuição parece ser causada pela microgravidade per se, a qual afeta proliferação e viabilidade celular.

Os resultados encontrados mostram que a resposta proliferativa à estimulação por mitógeno diminui em 48h de clinorrotação, o que pode prejudicar o sistema imune de um indivíduo exposto ao ambiente de microgravidade.

6.3- O efeito da microgravidade simulada no crescimento de células tumorais K562

Os resultados obtidos no teste com células tumorais K562 em microgravidade simulada mostraram um crescimento superior das amostras em relação ao controle. Esse crescimento foi constante ao longo dos quatro dias de testes e demonstra uma preocupação para as missões espaciais, uma vez elas envolvem inúmeros estressores biológicos que podem afetar a incidência de câncer a longo prazo e o comportamento tumoral.

Sabe-se que os efeitos de um ambiente de microgravidade no crescimento de células tumorais e em sua carcinogênese ainda não estão totalmente esclarecidos, necessitando-se de um maior aprofundamento dos estudos nos efeitos das condições dos vôos espaciais na imunidade a tumores.

7- Referências

- 1- AGÊNCIA ESPACIAL BRASILEIRA. Microgravidade. Disponível em:
<<http://www.aeb.gov.br>> Acesso em: 15 nov. 2004.
- 2- AUDUS LJ. The mechanism of the perception of gravity by plants.
Biological receptor mechanism, Cambridge v 16, p 197-228,
1962.
- 3- BARCELOS NETO J. **Mecânica newtoniana, lagrangiana e hamiltoniana**. São Paulo, Livr da Física Editora, 431 p, 2004.
- 4- BURAVKOVA I, ROMANOV Y, RYKOVA M, GRIGORIEVA O, MERZLIKINA N. Cell-to-cell interactions in changed gravity: Ground –based and flights experiments. **Acta Astronautica**, EUA, v 57, p 67-74, 2005.
- 5- CHARLES JB, LATHERS CM. Cardiovascular adaptation to spaceflight. **J. Clin.Pharmacol**, EUA v. 31, p. 1010 -1023, 1991.
- 6- CHOPRA V, FADL AA, SHA J, CHOPRA S, GALINDO CL, CHOPRA AK. Alterations in the virulence potential of enteric pathogens and bacterial-host cell interactions under simulated microgravity conditions. **J Toxicol Environ Health**, EUA, v 69(14), p1345-1370, 2006.
- 7- COGOLI, M The fast rotating clinostat: a history of its use in gravitational biology and a comparison of ground-based and flight experiment result. **ASGSB Bull**, Londres, v 5(2), p 59-67, 1992.
- 8- COLLA G, ROUPHAEL Y, CARDARELLI M, MAZZUCATO A, OLIMPIERI I. Growth, yield and reproduction of dwarf tomato grown

- under simulated microgravity conditions. **Plant biosystems**, Itália, v 141(1), p 75-81, 2007.
- 9- COLLAZIOL D, PREISSLER T, BAUER ME. Avaliação da proliferação linfocitária e sensibilidade a glicocorticóides por ensaios colorimétricos. **Revista de medicina da Pucrs**, Porto Alegre, v 12, p 226-231, 2002.
- 10- DEDOLFPH RR, DIPERT MH. The physical basis of gravity stimulus nullification by clinostat rotation. **Plant physiol**, EUA, v 47, p 756-764, 1971.
- 11- DE MICCO V, SCALA M, ARONNE G. Evaluation of the effect of clinostat rotation on pollen germination and tube development as a tool for selection of plants in Space. **Acta Astronautica**, EUA, v 58(9), p 464-470, 2006.
- 12- FORRAZ N, RUSSOMANO T, FALCÃO FP, SANTOS LGF, MOTTA JD, MCGCKIN CP. A novel microgravity-simulating bioreactor for tissue engineering. Paper presented at the **44th AMERICAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY ANNUAL MEETING**, Washington, DC, EUA, p 4-8, 2004.
- 13- HALLIDAY D, RESNICK R, WALKER, J. **Fundamentals of Physics**. 4^a ed. New York, EUA, v.1, p118, 1993.
- 14- HASHEMI BB, PENKALA JE, VENS C, HULS H, CUBBAGE M, SAMS CF. T cell activation responses are differentially regulated during clinorotation and in spaceflight. **FASEB J.**, v 13, p 2071-2082, 1999.

- 15- JANEWAY CA. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**.5ed, Porto Alegre, Artmed Editora, 767 p, 2002.
- 16- KAUR I, SIMONS ER, CASTRO VA, OTT CM, PIERSON DL. Changes in monocyte functions of astronauts. **Brain Behavior and Immunity** Houston, EUA v 19, p 547-554, 2005.
- 17- KLAUS DM. Clinostat and Bioreactors. **Gravitational and space biology bulletin**, Londres, v 14(2), p 55-64, 2001.
- 18- KLEIN E, BEN-BASSAT H, NEUMANN H et al. Proprieties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. **Int J Cancer**, EUA, v 18(4), p 421-431, 1976.
- 19- KMI15/4 – Datasheet
http://www.nxp.com/acrobat/datasheets/KMI15_4_4.pdf
- 20- KNIGHT SC, STAGG AJ. Atigen-presenting cell types. **Curr opin immunol**, Nova Iorque, v 5, p 374-382, 1993.
- 21- KULKARNI AD, YAMAUCHI K, SUNDARESAN A, RAMESH GT, PELLIS NR. Countermeasures for space flight effects on immune system: nutritional nucleotides. **Gravitational and Space Biology**, Londres, v 18(2), p 12-14, 2005.
- 22- LEE EH, DING WH, KULKARNI AD, GRANSTEIN RD. Tumor growth and immune function in mice during hindlimb unloading. **Aviat space environ med**, Alexandria, EUA, v 76(6), p 536-540, 2005.
- 23- LU SK, BAI S, JAVERI K, BRUNNER LJ. Altered cytochrome P450 and P-Glycoprotein levels in rats during simulate weightlessness. **Aviat, space environ med**, Alexandria, EUA, v 73, p 112-118, 2002.

- 24- MANTI L. Does reduced gravity alter cellular response to ionizing radiation? **Radiat environ biophys**, Berlim, v 45, p 1-8, 2006.
- 25- MEHTA SK, KAUR I, GRIMM EA, SMID C, FEEBACK DL, PIERSON DL. Decreased non-MHC- restricted (CD56(+)) killer cell cytotoxicity after spaceflight. **J Appl. Physiol**, EUA, v 91, p 1814-1818, 2001.
- 26- MORROW MA. Clinorotation differentially inhibits T-lymphocyte transcription factor activation. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim**, Londres, v 42, p 153-158, 2006.
- 27- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J immunol methods**, EUA v 65, p 55-63, 1983.
- 28- MSP430f149 – Datasheet -<http://www.ti.com/lit/gpn/msp430f149>
- 29- PALACIOS R, SUGAWARA I. Hydrocortisone abrogates proliferation of T cells in autologous mixed lymphocyte reaction by rendering the interleukin-2 Producer T cells unresponsive to interleukin-1 and unable to synthesize the T-cell growth factor". **Scand J Immunol**, Suécia, v 15 (1), p 25-31, 1982.
- 30- PAUL WE. **Fundamental Immunology**, 3a ed. Nova Iorque, Raven Press, 1993.
- 31- PIEPMEIER EH, KALNS JE, MCINTYRE KM, LEWIS ML. Prolonged weightlessness affects promyelocytic multidrug resistance. **Experim cell research**, Londres, v 237, p 410-418, 1997.
- 32- RUSSOMANO T. CARDOSO RB, FALCÃO FP, DALMARCO G, SANTOS CRV, SANTOS LGF et al. Development and Validation of a 3D Clinostat for the Study of Cells during Microgravity Simulation. **IEEE**, CD 1-4, 2005.

- 33-SANTOS MA, BOSQUILLON C, RUSSOMANO T, FALCÃO F, MARTINELLI L, MARRIOTT C, FORBES B. Development of a Diffusion Chamber to Evaluate *In Vitro* Respiratory Epithelial Cell Layer Permeability in Microgravity. **ICASM**, CD 1-4, 2006.
- 34- SERWAY RA. **Princípios de Física**. São Paulo, Thomson Editora, 520 p, 2004.
- 35-SHT71 Datasheet:
http://www.sensirion.com/en/pdf/product_information/Data_Sheet_humidity_sensor_SHT1x_SHT7x_E.pdf
- 36- SONNENFELD G. Space flight, microgravity, stress, and immune responses. **Adv Space Res**, Gra-Bretanha, v 23(12), p 1945-1953, 1999.
- 37- SONNENFELD G, MILLER ES. The role of cytokines in immune changes induced by spaceflight. **J. Leukoc. Biol**, EUA, v 54, p 253-258, 1993.
- 38- SUGANUMA T, O'OKA H, FUKUDA T. Study of the effects of microgravity on cell growth of human antibody producing cells and their secretions. **Biol Sci Space**, EUA, v 15, p 64-66, 2001.
- 39- SUNDARESAN A, RISIN D, PELLIS NR. Loss of signal transduction and inhibition of lymphocyte locomotion in a ground based model microgravity. **In vitro Cell Biol-Anim**, v 38, p 118-122, 2002.

- 40- TAGA M, YAMAUCHI K, ODLE J, FURIAN L, SUNDARESAN A, RAMESH GT et al. Melanoma growth and tumorigenicity in models of microgravity. **Aviat space environ med**, Alexandria, EUA, v 77(11), p 1113-1116, 2006.
- 41- TAYLOR GR. Overview of spaceflight immunology studies. **J Leukoc Biol**, EUA v 54, p179-188, 1993.
- 42- TIPTON CM, GREENFEAL JE, JACKSON CG. Neuroendocrine and immune system response with spaceflights. **Med Sci Sports Exerc**, EUA, v 28(8), p 988-998, 1996.
- 43- TRW24G – Datasheet
<http://www.wenshing.com.tw/data/rf-module/TRW-24G.pdf>
- 44- WALTHER I, COGOLI A , PIPPIA P, MELONI MA, COSSU G, COGOLI M, et al. Human immune cells as space travellers. **Eur J Med Res**, v 4, p 361-363, 1999.
- 45- WALTHER I, PIPPIA P, MELONI MA, TURRINI F, MANNU F, COGOLI A. Simulated microgravity inhibits the genetic expression of interleukin-2 and its receptor in mitogen-activated T lymphocytes. **FEBS Letters**, v 436, p 115-118, 1998.
- 46- WANG B, ZHANG S, WU, WY. Effects of rotating clinostat simulated weightlessness on the differentiation-related gene expression of ROS 17/2.8 cells. **Space Med Eng**, Pequim, China, v 16(2), p 120-122, 2003.
- 47- WEIR D. **The Handbook of Experimental Immunology**, vol.1, 5a ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1996.

48- ZHANG X, LI XB, YANG S, LI G, JIANG PD, LIN ZH. The effects of simulated microgravity on cultured chicken embryonic chondrocytes. **Adv Space Research**, Alemanha, v 32(8), p 1577-1583, 2003.

Anexo 8

Anexo 8.1

Dados individuais do teste de proliferação celular com células mononucleares em simulação de microgravidade

Tabela 1.A - Dados completos dos voluntários 1 e 2 no teste de proliferação celular.

Voluntário	1			2		
Idade	25			21		
Sexo	Masc			Fem		
Duração do teste	24h			24h		
OD microg						
PHA 0%	0,046	0,078	0,059	0,161	0,118	0,153
PHA 0,5%	0,071	0,123	0,088	0,085	0,132	0,15
PHA 1%	0,057	0,087	0,086	0,095	0,116	0,135
PHA 2%	0,06	0,063	0,067	0,091	0,048	0,053
OD controle						
PHA 0%	0,105	0,143	0,185	0,097	0,098	0,098
PHA 0,5%	0,434	0,322	0,207	0,135	0,139	0,147
PHA 1%	0,173	0,293	0,357	0,098	0,123	0,119
PHA 2%	0,224	0,186	0,146	0,103	0,095	0,095

Tabela 1.B - Dados completos dos voluntários 3 e 4 no teste de proliferação celular.

Voluntário	3			4		
Idade	23			26		
Sexo	Masc			Fem		
Duração do teste	24h			24h		
OD microg						
PHA 0%	0,041	0,044	0,046	0,216	0,237	0,238
PHA 0,5%	0,113	0,113	0,083	0,35	0,153	0,316
PHA 1%	0,057	0,094	0,06	0,453	0,355	0,224
PHA 2%	0,047	0,047	0,112	0,255	0,476	0,68
OD controle						
PHA 0%	0,039	0,055	0,045	0,233	0,262	0,223
PHA 0,5%	0,11	0,1	0,088	0,228	0,298	0,316
PHA 1%	0,065	0,126	0,078	0,78	0,739	0,558
PHA 2%	0,051	0,048	0,051	0,448	0,395	0,59

Tabela 1.C - Dados completos dos voluntários 5 e 6 no teste de proliferação celular.

Voluntário	5			6		
Idade	20			27		
Sexo	Fem			Masc		
Duração do teste	24h			48h		
OD microg						
PHA 0%	0,126	0,127	0,16	0,055	0,057	0,048
PHA 0,5%	0,251	0,259	0,183	0,145	0,118	0,188
PHA 1%	0,414	0,245	0,248	0,172	0,201	0,196
PHA 2%	0,266	0,173	0,202	0,205	0,202	0,218
OD controle						
PHA 0%	0,141	0,167	0,204	0,094	0,092	0,115
PHA 0,5%	0,255	0,209	0,249	0,613	0,398	0,413
PHA 1%	0,428	0,259	0,288	0,415	0,392	0,42
PHA 2%	0,252	0,225	0,245	0,354	0,45	0,42

Tabela 1.D - Dados completos dos voluntários 7 e 8 no teste de proliferação celular.

Voluntário	7			8		
Idade	25			28		
Sexo	Fem			Masc		
Duração do teste	48h			48h		
OD microg						
PHA 0%	0,062	0,113	0,083	0,077	0,106	0,133
PHA 0,5%	0,152	0,118	0,138	0,154	0,138	0,185
PHA 1%	0,23	0,215	0,223	0,169	0,2	0,225
PHA 2%	0,143	0,098	0,183	0,208	0,156	0,12
OD controle						
PHA 0%	0,152	0,185	0,201	0,279	0,18	0,301
PHA 0,5%	0,264	0,279	0,291	0,415	0,597	0,366
PHA 1%	0,32	0,338	0,341	0,574	0,293	0,414
PHA 2%	0,288	0,226	0,274	0,447	0,86	0,494

Tabela 1.E - Dados completos dos voluntários 9 e 10 no teste de proliferação celular.

Voluntário	9			10		
Idade	28			24		
Sexo	Masc			Fem		
Duração do teste	48h			48h		
OD microg						
PHA 0%	0,046	0,078	0,059	0,078	0,107	0,047
PHA 0,5%	0,071	0,123	0,088	0,155	0,137	0,069
PHA 1%	0,057	0,087	0,086	0,168	0,201	0,058
PHA 2%	0,066	0,063	0,067	0,208	0,154	0,066
OD controle						
PHA 0%	0,105	0,143	0,185	0,281	0,106	0,299
PHA 0,5%	0,224	0,186	0,146	0,411	0,223	0,368
PHA 1%	0,173	0,293	0,357	0,577	0,172	0,416
PHA 2%	0,434	0,322	0,287	0,443	0,435	0,498

Anexo 8.2

Dados individuais do teste de crescimento de células K562 em simulação de microgravidade.

Tabela 2.A - Resultados completos do crescimento celular ao longo de 4 dias em simulação de microgravidade.

Amostra	K562					
	Microgravidade			Controle		
24h	0,354	0,345	0,243	0,12	0,12	0,09
48h	0,24	0,237	0,27	0,15	0,16	0,12
72h	0,246	0,315	0,252	0,09	0,153	0,126
96h	0,357	0,471	0,465	0,123	0,227	0,215