

Análise proliferativa da célula *Crandell-Rees Feline Kidney* (CRFK) cultivada com meio de cultura Dulbecco (DMEM) suplementado com coenzimas do complexo B

Proliferative analysis of the Crandell-Rees Rim Feland cell (CRFK) grown with Dulbecco culture medium (DMEM) supplemented with B complex coenzymes

Análisis proliferativo de la célula *Crandell-Rees Rim Feland* (CRFK) cultivada con medio de cultivo Dulbecco (DMEM) suplementado con coenzimas del complejo B

Recebido: 12/06/2020 | Revisado: 18/06/2020 | Aceito: 30/06/2020 | Publicado: 04/07/2020

Fabiane da Silva Reis-Góes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1283-5211>

Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana, Brasil

E-mail: fabiane.sreisgoesbiomed@gmail.com

Henrique Manoel Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5773-1101>

Labovet Produtos Veterinários, Brasil

E-mail: Henrique2@labovet.com.br

Ana Carolina Santana de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8335-2359>

Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana, Brasil

E-mail: anasantanoli@yahoo.com

Resumo

A técnica de cultura celular é utilizada por todas as áreas das ciências, principalmente na área da Biotecnologia por trazer resultados precisos e conhecimentos sobre novas patologias, estudos sobre mecanismos de infecções por microrganismo. O objetivo deste estudo foi analisar o potencial proliferativo da célula *Crandell-Rees Feline Kidney* (CRFK) em cultura estática com meio de cultura Dulbecco (DMEM) suplementado com coenzimas do complexo B. Tratou-se de um estudo experimental quantitativo, dividido em três grupos: Controle, Diversas e Diversas com B12, onde o grupo Controle não recebeu concentração extra de coenzimas, o grupo Diversas recebeu tratamento com coenzimas do complexo B, sendo elas:

tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantatênico, piridoxina, biotina e ácido fólico em quatro concentrações distintas, sempre dobrando a concentração existente na bula do meio de cultura DMEM, o terceiro grupo recebeu todas as sete coenzimas do complexo B mais a cianocobalamina (B12) que não está presente na bula do DMEM. A partir deste estudo concluiu-se que, o tratamento com coenzimas do complexo B otimizou o processo de mitose e tempo das subculturas: no grupo Diversas com B12 o tempo de cultura foi de 19,05 horas para atingir o ponto ótimo da confluência quando comparada ao grupo Controle. Portanto, o estudo apontou que a coenzima B12 é essencial para o metabolismo de células, otimizando o tempo de cultura aumentando o potencial de mitose celular.

Palavras-chave: Técnicas de cultivo de células; Ciclo do ácido cítrico; Cianocobalamina; Trifosfato de Adenosina; Mitose.

Abstract

The cell culture technique is used by all areas of science, mainly in Biotechnology, as it brings precise results and knowledge on new pathologies, studies on mechanisms of infections by microorganisms. The aim of this study was to analyze the proliferative potential of the Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK) cell in static culture with Dulbecco culture medium (DMEM) supplemented with complex B coenzymes. This is a quantitative experimental study, divided into three groups: Control, Diverse and Diverse with B12, where the Control group did not receive extra concentration of coenzymes, the Diversas group received treatment with complex B coenzymes, which are: thiamine, riboflavin, niacin, pantathenic acid, pyridoxine, biotin and acid folic acid in four different concentrations, always doubling the concentration in the package insert of the DMEM culture medium, the third group received all seven coenzymes of the B complex plus cyanocobalamin (B12) that is not present in the package insert of DMEM. From this study it was concluded that the treatment with complex B coenzymes optimized the process of mitosis and subcultures time: in the Diverse group with B12 the culture time was 19.05 hours to reach the optimum point of confluence when compared Control group. Therefore, the study pointed out that coenzyme B12 is essential for cell metabolism, optimizing culture time by increasing the potential for cell mitosis.

Keywords: Cell culture techniques; Citric acid cycle; Cyanocobalamin; Adenosine Triphosphate; Mitosis.

Resumen

La técnica de cultivo celular es utilizada por todas las áreas de la ciencia, principalmente en el área de la biotecnología, ya que aporta resultados precisos y conocimiento sobre nuevas patologías, estudios sobre mecanismos de infecciones por microorganismos. El objetivo de este estudio fue analizar el potencial proliferativo de la célula del riñón felino de Crandell-Rees (CRFK) en cultivo estático con medio de cultivo Dulbecco (DMEM) suplementado con coenzimas complejas B. Este es un estudio experimental cuantitativo, dividido en tres grupos: Control, Diverse y Diverse con B12, donde el grupo Control no recibió concentración adicional de coenzimas, el grupo Diversas recibió tratamiento con coenzimas B complejas, que son: tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, piridoxina, biotina y ácido fólico en cuatro concentraciones diferentes, siempre duplicando la concentración en el inserto del paquete del medio de cultivo DMEM, el tercer grupo recibió las siete coenzimas del complejo B más cianocobalamina (B12) que no está presente en el inserto del paquete de DMEM. A partir de este estudio, se concluyó que el tratamiento con coenzimas B complejas optimizó el proceso de mitosis y tiempo de subcultivos: en el grupo Diverso con B12, el tiempo de cultivo fue de 19.05 horas para alcanzar el punto óptimo de confluencia en comparación Grupo de control. Por lo tanto, el estudio señaló que la coenzima B12 es esencial para el metabolismo celular, optimizando el tiempo de cultivo al aumentar el potencial de mitosis celular.

Palabras clave: Técnicas de cultivo celular; Ciclo del ácido cítrico; Cianocobalamina; Trifosfato de Adenosina; Mitosis.

1. Introdução

A técnica de cultura de células consiste em isolar uma determinada célula proveniente de órgãos de animais ou de seres humanos e cultivá-las sob condições controladas e assépticas. A cultura de células surgiu em meados do século XX em experimentos realizados por Roux e Herrison (Bretas, 2011; Migita, 2012). O objeto dos experimentos desses cientistas era desvendar o funcionamento dos tecidos e das células *in vitro*. A partir de seu experimento, Harrison conseguiu provar que os prolongamentos nervosos eram parte das células nervosas. Porém, esse não foi o único resultado de sua pesquisa. Ele conseguiu melhorar a técnica de cultivo realizada por Roux e manteve células vivas *in vitro* sob condições assépticas por mais de três semanas. Seu experimento se tornou um marco para a

cultura de células (Do Amaral & Machado-Santelli, 2011; Rebello, 2014; Barbosa *et al.*, 2015).

Atualmente o cultivo de células é utilizado por todas as áreas das Ciências, principalmente na área da Biotecnologia por trazer resultados precisos e novos conhecimentos sobre patologias e proporcionar estudos sobre mecanismos de infecção por microrganismos. Está técnica também está presente na produção de imunobiológicos tanto para humanos, quanto para animais, pois antígenos virais são sintetizados a partir da aplicação de cultivo de células, sendo de suma importância para a saúde pública. (De Carvalho *et al.*, 2010; Barreto-Vieira, 2016; Bousada & Pereira, 2017; De Souza *et al.*, 2018).

Na área da Farmacologia o cultivo de celular é indispensável sendo um modelo *in vitro* para estudos de novos fármacos e análises de seus efeitos nas células dos seres vivos. Pesquisas com células tronco e terapia gênica em Biologia Molecular são possíveis pelo cultivo dos tecidos para análises primárias (Issac, 2012; Torres & Pessoa, 2018).

Para se obter uma cultura de células saudável e fiel ao modelo original (ou seja, o mais parecido possível com o órgão da qual as células foram extraídas) o meio nutritivo no qual serão cultivadas é extremamente importante e indispensável (Leme, 2016). No meio de cultura deve haver condições favoráveis para que as células se desenvolvam sem alterações no seu genoma. Uma dessas condições resume-se aos fatores de crescimento. Estes são ofertados pela adição de soluções como soro fetal bovino, aminoácidos, sais inorgânicos, glicose e micronutrientes. Tais elementos são componentes imprescindíveis para a homeostasia celular. Os micronutrientes realizam a função de coenzimas das enzimas necessárias para reações como geração de energia ou replicação do genoma, ou seja, para a sobrevivência da célula (Albert *et al.*, 2017).

Nesta perspectiva, as coenzimas do complexo B são micronutrientes indispensáveis para a produção de energia e para a replicação do DNA, transcrição do RNA e síntese proteica. As vitaminas B1, B2, B3 e B5 estão diretamente envolvidas na produção de energia no ciclo do ácido cítrico e transporte dos elétrons para a cadeia respiratória com objetivo de gerar energia livre na forma de ATP nas reações catabólicas imprescindíveis para a células (Kennedy, 2016). As vitaminas B2, B3, B6, B7, B9 e B12 estão envolvidas na metilação e síntese de DNA, RNA, síntese de aminoácidos e de precursores do ciclo de Krebs por meio do ciclo da metionina/homocisteína e ciclo do folato (Lara *et al.*, 2014; Valdespino-Gómez *et al.*, 2015; Kennedy, 2016; Martínez-Reyes *et al.*, 2016; Mccullough *et al.*, 2016). Nas reações anapleróticas, as coenzimas derivadas do complexo B são capazes de, quando associadas a enzimas, converter moléculas em precursores do ciclo de Krebs que podem ser

utilizadas para gerar energia ou serem convertidos em aminoácidos e glicose para outras vias metabólicas da célula (Paniz, 2015 e Kennedy, 2016).

Baseados nesses princípios, a linhagem celular escolhida para o presente estudo foi a CRFK (*Crandell-Rees Feline Kidney*) (*Felis catus*, *cat*) oriunda de rim de felino fêmea e isolada pela primeira vez em 1964 no laboratório de Epidemiologia da Força Área Americana (Crandell *et al.*, 1973). É classificada morfológicamente como fibroblastos, sendo cultivada como células aderentes (fibroblástica), ou seja, células que dependem de ancoragem para realizar o processo proliferativo (Freshney, 2015). Essa linhagem possui 37 cromossomos (2n -1) sendo aneuploide em relação a células somáticas dos felinos *in vivo* que possuem 38 pares de cromossomos.

O objetivo do presente trabalho foi submeter a célula CRKF ao cultivo com meio de cultura DMEM normal e suplementado com concentrações extras de coenzimas do complexo B. Para isso, o experimento avaliou a influência da suplementação com coenzimas do complexo B na cultura de células CRFK em meio de cultura Dulbecco, sua influência na taxa de mitose celular e no tempo de cultivo para obter-se uma confluência acima de 90% sem alterações nas características da célula.

2. Metodologia

Tratou-se de pesquisa experimental, quantitativa, que permitiu fazer comparações e manipulações entre as variáveis distintas capazes de influenciar no objeto do estudo (Pereira, Shitsuka, Pereira & Shitsuka, 2018). Os experimentos foram realizados no laboratório de vacinas virais – cultivo celular no Labovet Produtos Veterinários, ente março 2019 a dezembro de 2019. O estudo comparou as variáveis distintas como o tempo de incubação das culturas, diluição das células, concentrações extra das 7 coenzimas do complexo B isoladamente, em outro grupo comparou-se as 7 coenzimas do complexo B com adição da coenzima B12.

Linhagem celular

A célula utilizada no experimento foi a CRFK oriunda de rim de felino registrada com passagem 194 pelo Instituto Adolfo Lutz banco referência e pela ATCC[®] como CCL-94. Essa célula é cultivada para estudos de patologias e produção de imunobiológicos na maioria dos

laboratórios que as utilizam, sendo proveniente de cultura secundária com linhagem estabelecida, devido a esse motivo é dispensável a aprovação do Comitê de Ética (Crandell *et al.*, 1973). Segundo a ATCC[®] a linhagem CRFK deve ser cultivada com meio de cultura Earle[®] ou DMEM em estufa a 37° C com 5% de tensão de CO₂.

Análise dos dados

Os dados obtidos nos experimentos foram inseridos no programa R na versão 3.1.0 para analisar, quantificar e comparar as variáveis. O programa R versão 3.1.0 foi utilizado também para síntese dos gráficos de superfície de resposta. A metodologia de Superfície de Resposta é um conjunto de técnicas matemáticas/estatísticas que são usadas para alinhar e realizar análise de problemas com diversas variáveis, onde as mesmas influenciaram os resultados. Logo, essa metodologia permite eleger um valor ótimo das variáveis analisadas (Montgomery, 2013).

Definição das concentrações das coenzimas do complexo B

Para definição das concentrações das coenzimas utilizadas no presente trabalho fundamentou-se na bula do meio de cultura DMEM fabricado pela Vitrocell[®]. Para formular o meio de cultura a ser testado para o crescimento das células, definiu-se as concentrações das coenzimas avaliadas. Dessa maneira, analisou-se a bula do meio de cultura DMEM e optou-se por suplementar a concentração dessas coenzimas a partir da concentração já presente no meio (a maioria apresentam-se no meio padrão na concentração de 4mg/L). Essa complementação foi feita preparando-se soluções de concentrações crescentes das coenzimas, todas as coenzimas utilizadas nos testes eram da Synth[®]. Para tiamina (B1), nicotinamida (B3), ácido pantatênico (B5), piridoxina (B6), ácido fólico (B9) e cianocobalamina (B12) utilizou-se individualmente as concentrações de 8 mg/L, 16 mg/L, 32 mg/L e 64 mg/L como concentração adicional. A riboflavina (B2) era encontrada na fórmula original do meio na concentração de 0,4mg/L. Logo, foi adicionada na concentração de 0,8 mg/L, 1,6 mg/L, 3,2 mg/L e 6,4mg/L a biotina (B7), inicialmente com 7,2mg/L, com as concentrações de 14,4 mg/L, 28,8 mg/L, 57,6 mg/L e 115,2 mg/L. A riboflavina (B2) e a biotina (B7) foram as coenzimas que tiveram concentrações diferentes iniciais no meio de cultura quando comparado às outras coenzimas.

O experimento foi dividido em três grupos: o primeiro foi denominado como Controle e não recebeu nenhuma concentração extra de coenzimas do complexo B, sendo cultivado apenas com o meio DMEM. O segundo grupo de cultivo foi denominado como Diversas e recebeu as sete coenzimas (B1; B2; B3; B5; B6; B7 e B9) nas quatro concentrações anteriormente descritas (8 mg/L, 16 mg/L, 32 mg/L e 64 mg/L, coenzima B2 nas concentrações de 0,8 mg/L, 0,16 mg/L, 0,32 mg/L e 0,64mg/L e por fim coenzima B7 em 14,4 mg/L, 28,8 mg/L, 57,6 mg/L e 115,2 mg/L). O terceiro grupo foi denominado de Diversas com B12 e recebeu as coenzimas nas quatro concentrações: 8 mg/L, 16 mg/L, 32 mg/L e 64 mg/L. Além delas, este grupo recebeu a adição de cobalamina. Logo, a diferença entre os grupos Diversas *versus* Diversas com B12 é a adição de cobalamina em comparação com outras coenzimas pré-existentes no DMEM.

Preparação das coenzimas

As coenzimas foram pesadas e posteriormente adicionou-se água deionizada sob agitação com barra magnética até completar o volume final. No caso das coenzimas hidrofóbicas como o ácido fólico (B9) e a riboflavina (B2) utilizou-se hidróxido de sódio (Synht®) 1 N para iniciar a diluição das mesmas e em seguida completou-se com água deionizada até o volume final. Posteriormente à formulação das coenzimas, as mesmas foram esterilizadas por filtração em filtro 0,22 µm, acondicionadas e armazenadas em freezer -20° C até o momento do uso.

Formulação do meio de cultura

Na formulação do meio de cultura utilizou-se água deionizada, meio de cultura DMEM e bicarbonato de sódio (Synht®) na concentração de 2,2g/L. Em seguida o meio de cultura foi clarificado na capela de fluxo laminar com filtro prensa com membrana da Millipore® de 0,45 µm (retirando partículas maiores) e filtração com membrana de 0,22 µm (para impedir a passagem de microrganismos, esterilizando o meio de cultura). Depois o meio de cultura foi incubado por 72 horas em estufa a 37° C com atmosfera suplementada com CO₂, para ser realizado o teste de esterilidade (controle microbiológico) até o momento do uso. Assim sendo, na Tabela 1 é possível visualizar o resumo do desenho experimental com as concentrações das coenzimas, as diluições realizadas e os grupos estudados.

Tabela 1: Concentrações de coenzimas do complexo B e diluições das culturas celulares.

Grupo Controle*		
Coenzimas	Concentração das Coenzimas	Diluição das células
B1; B3; B4; B5; B6 e B9	4 mg/L	1:2/1:4/1:6
B2	0,4 mg/L	
B7	7,2 mg/L	
Grupo Diversas		
Coenzimas	Concentração das Coenzimas	Diluição das células
B1; B3; B4; B5; B6 e B9	8; 16; 32 e 64 mg/L	1:2/1:4/1:6
B2	0,8; 0,16; 0,32 e 0,64 mg/L	
B7	14,4; 28,8; 57,6 e 115,2 mg/L	
Grupo Diversas com B12		
Coenzimas	Concentração das Coenzimas	Diluição das células
B1; B3; B4; B5; B6 e B9	8; 16; 32, 64 mg/L	1:2/1:4/1:6
B2	0,8; 0,16; 0,32 e 0,64 mg/L	
B7	14,4; 28,8; 57,6 e 115,2 mg/L	
B12	8; 16; 32 e 64 mg/L	

Obs: * as concentrações mencionadas nos grupos controles são aquelas que já se apresentavam na formulação original do meio DMEM. Fonte: Elaborado pelos autores baseado na bula do meio de cultura DMEM.

Na Tabela 1 pode-se observar a descrição de todas as coenzimas e sua concentração para cada grupo do experimento. Todas as concentrações baseiam-se na formula original do meio de cultura DMEM, onde as concentrações são dobradas em cada grupo de diluição realizado. A B12 por não existir na formula original do meio foi adicionada de acordo com a quantidade da maioria das coenzimas presente no meio.

Preparação do meio de cultura e das células CRFK

Para o descongelamento da célula utilizou-se uma solução de meio de cultura DMEM, soro fetal bovino (SFB) Vitrocell® e antibióticos. Na preparação, adicionou penicilina G potássica Pentabiótico® (bactericida) na concentração de 0,2%, anfotericina B Cristália® (antifúngico) a 0,2% e SFB na concentração de 10%. Assim, a célula que estava em criopreservação em nitrogênio líquido a 196° C negativos foi descongelada em banho maria a 37° C e colocada em frasco de cultura T25 contendo 11,4 ml de meio de cultura base.

Seguiu-se o protocolo de descongelamento de célula recomendado por Alves & Guimarães, (2012) da seguinte forma: a ampola subcultivada (cultura secundária)

descongelada lentamente no banho maria a 37°C, posteriormente em condições assépticas procedeu-se ao descongelamento lento colocando em frasco de cultura T25 com meio Dulbecco preparado com SFB, antifúngicos e bactericida. Após o processo de descongelamento realizou-se a incubação da célula em estufa a 37° C com tensão de 5% de CO₂ (Cruz *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2010). Foi mantido o critério de avaliação da presença da monocamada a cada 24, 48 e 72 horas, e quando esta atingiu 90% a 100% de confluência, as células foram repicadas. Realizou-se repiques da célula nas mesmas condições de descongelamento.

Subcultivo das células CRFK

Inicialmente foram realizados os repiques: a célula em estufa foi retirada para a capela de fluxo laminar, onde se desprezou o meio saturado em recipiente estéril pelo lado oposto da monocamada para evitar desprendimento celular. O tapete celular foi lavado com salina tamponada com pH 7,0 PBS para a retirada de proteínas e imunocomplexos do SFB, pois existem proteínas que inibem a enzima tripsina que foi utilizada para quebras proteolíticas das moléculas de adesão da matriz extracelular da célula com o frasco de cultura.

Sendo assim, o método enzimático foi escolhido por ser o menos agressivo quando utilizado no tempo correto (60 segundos). O mecanismo de ação do mesmo consistiu em individualizar as células sem lisá-las obtendo-se uma cultura homogênea. Para tanto, a protease clivou a matriz extracelular e desestabilizou o citoesqueleto da célula. Essa enzima promoveu a clivagem nos polipeptídios entre os radicais lisil-arginil e assim, a célula foi individualizada, ficando em cultura tridimensional por poucas horas até que reorganizou sua matriz extracelular e se ligou à superfície do frasco de cultura através dos seus receptores (Alves & Guimarães *et al.*, 2010).

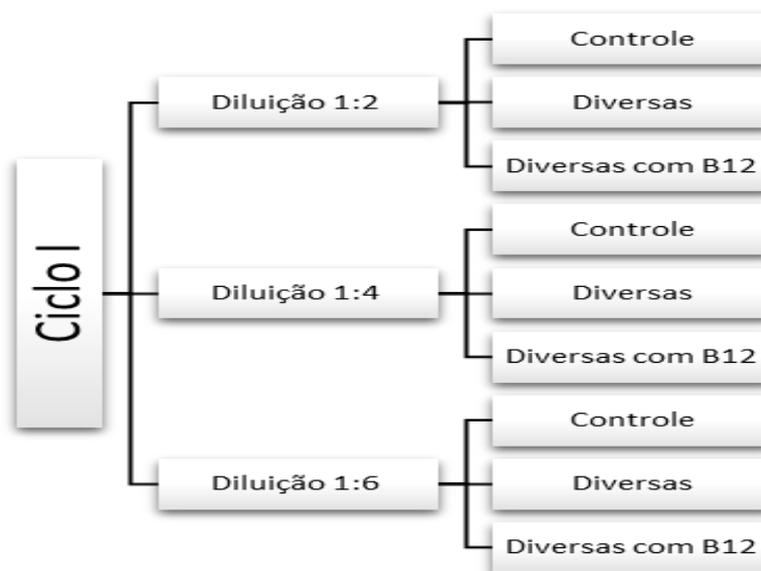
A cada etapa as células eram quantificadas. O método mais utilizado para quantificá-las é através da contagem em Câmara de Neubauer. O método de quantificação serviu para expressar o resultado do crescimento da célula em cultivo obtendo o número de células por mililitro. A avaliação de vitalidade foi realizada pela adição do corante azul de tripan. As células foram diluídas com o corante (1:4 – 3 mL de corante mais 1 mL de célula) e posteriormente foram multiplicados pelo fator de correção da câmara de Neubauer para definir o número de células por mililitro (Toffalini, 2015). Todas as células submetidas ao experimento foram cultivadas sob as mesmas condições, tais como: temperatura 37° C com controle de temperatura pelo termo higrômetro (aparelho capaz de medir a temperatura

máxima e mínima), com temperatura verificada três vezes ao dia. O pH do meio de cultura que foi mantido entre 6,4 a 6,6.

Diluições realizadas no experimento

As células foram cultivadas em diferentes diluições para se observar a influência das concentrações das coenzimas no tempo de confluência. Assim, optou-se por usar diluições celulares de 1:2, 1:4 e 1:6, sendo a diluição basal 1:2. Todas essas diluições foram submetidas às mesmas condições de concentração das coenzimas (Figura 1).

Figura 1: Representação esquemática dos Grupos *Controle*, *Diversas* e *Diversas com B12* nas diferentes diluições utilizadas.



Fonte: Autores.

O fluxograma traz o procedimento realizado em cada ciclo de forma resumida diluições feitas em cada grupo das células cultivadas. Todos os grupos foram tratados e subcultivados nas mesmas condições.

3 Resultados e Discussões

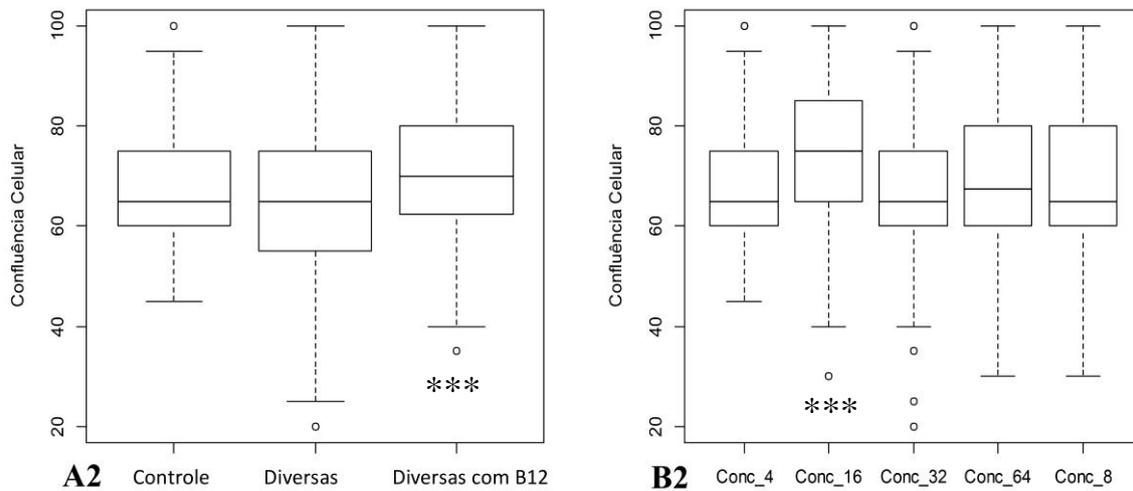
O estudo testou as diferentes concentrações das coenzimas e as diluições das células em cultura para observar sua influência no tempo de confluência da CRFK. Desta forma, nas culturas celulares, foram testadas maiores concentrações de coenzimas do complexo B em

relação ao grupo Controle. No terceiro grupo foi testado ainda o acréscimo de B12. As culturas foram comparadas quanto à confluência das células na ausência de tratamento, na presença de coenzimas do complexo B e na presença destas com B12. Esses tratamentos foram realizados em diferentes diluições das células CRFK (1:2; 1:4 e 1:6).

Verifica-se que na Figura 2 (gráfico **A2**) foram avaliados os três grupos estudados nesse experimento, onde o grupo Controle recebeu, apenas meio de cultura DMEM em comparação com o grupo Diversas que recebeu tratamento extra de coenzimas do complexo B teve um desenvolvimento similar ao grupo Controle. Logo, o grupo *Diversas* não demonstrou diferença em sua taxa de mitose. Todavia, no terceiro grupo (*Diversas* com B12) houve um desempenho superior em relação aos outros grupos, onde observou-se um aumento significativo na confluência da monocamada da cultura ($p = <0,00001$) em relação aos grupos Controle e *Diversas*.

Partindo dessa observação, notou-se que as culturas do grupo *Diversas* (a adição extra de coenzimas do complexo B) e *Diversas* com B12 (coenzimas do complexo B com adição de cobalamina) otimizaram o tempo de mitose, ou seja, esse tempo foi reduzido sendo em média de 48 horas para atingir a confluência adequada em comparação com o Controle que levou em média 72 horas. O gráfico **B2** (Figura 2) mostra a concentração mínima necessária de coenzimas para o desenvolvimento das culturas. Os resultados mostraram que a melhor concentração testada foi a de 16mg/L ($p = <0,1612$). Sendo estatisticamente relevante em relação ao grupo Controle e aos demais grupos com diferentes concentrações. As concentrações de 32mg/L e 8mg/L tiveram os piores resultados, já que seus desempenhos foram similares aos do grupo Controle que não recebeu nenhum tratamento. Desta forma, a concentração mínima necessária indicada é a de 16mg/L para experimentos em cultura celular.

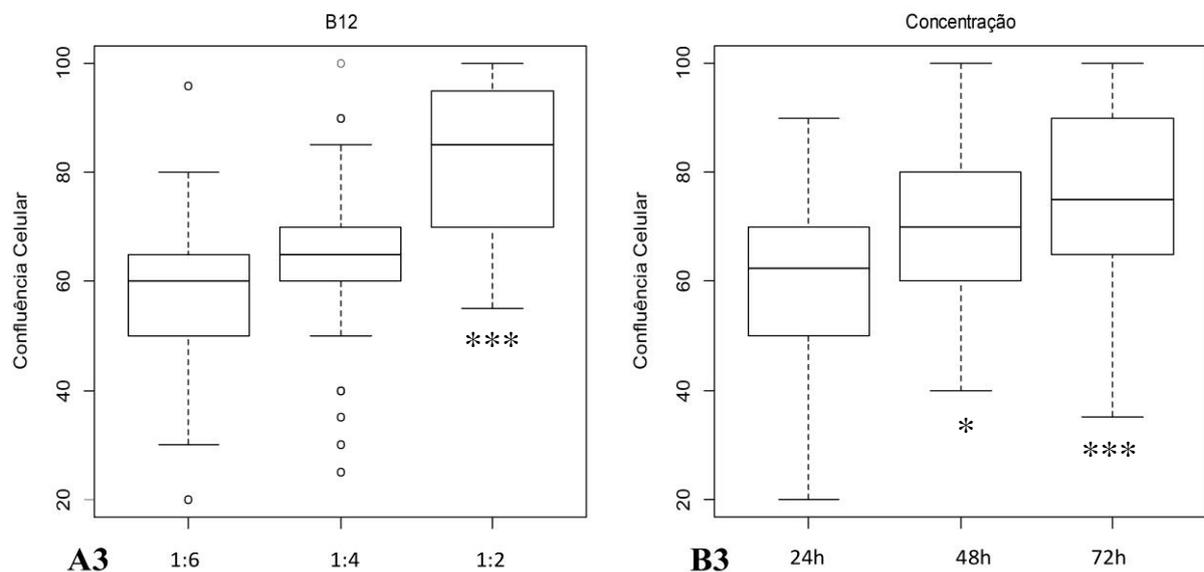
Figura 2: Confluências médias dos grupos tratados com vitaminas do Complexo B.



O gráfico A2 *** mostra a comparação das médias de confluência das subculturas de células com avaliação dos três grupos: Controle; Diversas e Diversas com B12; o gráfico B2 mostra o desempenho das concentrações das coenzimas do complexo B comparadas com o grupo Controle. *** $p = <0,00001$. Fonte: Autores.

Observa-se que na Figura 3 - gráfico **A3** os parâmetros diluição exerceram impacto significativo na resposta de confluência celular, sendo a diluição de 1:2 com resultado significativo ($p = <0,000001$). Logo, quanto menos diluída forem as células e menos concentrado for o meio (ou seja, com tratamento em 16mg/L das coenzimas), e com maior tempo de incubação, maior será a confluência até o nível ótimo determinado. Por outro lado, na Figura 3 – gráfico **B3** o experimento mostrou que o tempo com melhor resultado foi entre 48 a 72 horas de incubação para o próximo repique ($p = <0,000001$), ou seja, a célula alcança uma confluência ótima (de 85% a 95%) dentro deste tempo.

Figura 3: Análise dos parâmetros tempo, diluição e concentração na cultura das células CRFK.



O gráfico A mostra as diluições realizadas nas culturas da célula em comparação com a confluência da cultura (1:2 ***; 1:4 e 1:6) no gráfico B mostra o tempo de incubação das culturas em comparação com a confluência da cultura 37°C (24h; 48h e 72h). * e *** significam valores de $p < 0,00001$. Fonte: Autores.

Na Figura 4 – gráfico **A4**, está representado o resultado da análise de superfície de resposta para os experimentos de confluência celular de todos os ciclos experimentais testados com B12 em comparação com os ciclos controles. No entanto, não estão representados graficamente os resultados das análises para o grupo Diversas, devido à ausência de significância estatística na análise deste grupo.

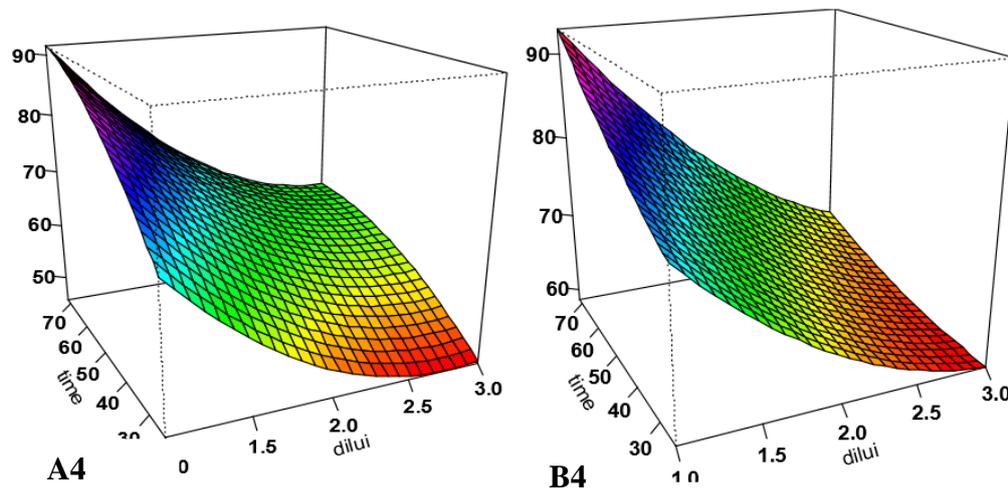
Percebe-se que o ponto de estacionariedade do modelo ajustado agora está próximo ao ponto máximo da maioria dos preditores [i.e., condições otimizadas: tempo (19,05 horas) e diluição (3,12)] sendo a concentração mínima necessária de 16mg/L apresentada em gráficos anteriores. Em suma, temos resultados significantes dos experimentos para o grupo Diversas com B12, sendo essa a peça chave para essa nova metodologia de cultivo celular, pois dessa forma foi possível otimizar o tempo de cultivo e reprodução celular para os parâmetros ideais.

Em contrapartida, ainda na Figura 4 – gráfico **A4**, pode-se observar a superfície de resposta para a confluência celular de todos os controles em conjunto. A resposta apresentou curvatura na superfície, onde a curva tempo e diluição apresenta um perfil côncavo, favorável para localizar um ponto de máximo. Assim, o gráfico **A4** apresentou os seguintes resultados: [i.e., condições otimizadas: tempo (72,96 horas) e diluição (3,01) – em relação a concentração ótima não foi apresentada por ser invariável], sendo inferior aos resultados do gráfico **B4** no

que se refere ao tempo de incubação da cultura e diluição da célula, ou seja, para que a célula alcançasse a confluência ótima levou mais tempo do que o grupo Diversas com B12.

É notório que no gráfico **B4** o ponto de estacionariedade do modelo ajustado agora está próximo ao ponto máximo da maioria dos preditores [i.e., condições otimizadas: tempo (19,05 horas) e diluição (3,12)]. Logo, estes resultados revelam que o tratamento recebido por este grupo melhorou o processo de mitose, através da biodisponibilidade da coenzima B12 associadas as outras sete coenzimas derivadas do complexo B. Neste sentido, considera-se que o objetivo proposto pelo estudo foi alcançado, mostrando a eficiência que o tratamento adicional com cobalamina na cultura celular.

Figura 4: Resultado da análise de superfície de resposta para os experimentos de confluência celular.



O gráfico **A4** mostra a superfície de resposta para confluência celular com todos os grupos controles em conjunto em comparação com o tempo de incubamento das subculturas e diluição das subculturas no gráfico **B4** superfície de resposta para confluência celular da subcultura com todos os ciclos integrados do grupo de Diversas com B12 comparando as diluição, tempo de incubação e confluência das subculturas. Fonte: Autores.

O presente estudo trouxe em seu modelo experimental um técnicas novas de suplementação do meio de cultura DMEM. Não encontrando um trabalho semelhante disponível na literatura até o presente momento ao avaliar a adição das coenzimas do complexo B inseridas na subcultura da CRFK. Nossos resultados apresentaram significância estatística no tempo de incubação da cultura ficando em 19,05 horas, a concentração das coenzimas que apresentou relevância estatística foi 16 mg/ mL e por fim o tratamento com a coenzima B 12 obteve-se o melhor resultado diante do segundo grupo sem a presença da mesma e grupo controle.

Neste contexto, segundo Mccullough *et al.*, (2016) e Albert (2017), os micronutrientes (coenzimas) são extremamente importantes para o metabolismo celular, e sem eles as células entram em *stress* metabólico, no qual podem ocorrer mutações gerando patologias diversas e apoptose precoce. Por outro lado, o ciclo celular funciona de forma controlada por um sistema biológico altamente organizado mediado por enzimas, além das coenzimas que fornecem a porção nutricional para que a célula realize suas atividades (Lents & Baldassare, 2016).

Nelson & Cox (2018) afirmam que o ciclo de Krebs compreende uma gama de reações metabólicas e é considerado o eixo central do metabolismo celular, onde a energia é gerada na forma de ATP. Esse ciclo é composto de oito reações gerando 7 intermediários, todos importantes para a geração de energia e por serem percussores em outras vias catabólicas, sendo que esses intermediários são dependentes das coenzimas do complexo B para realizar suas reações. Assim, suplementou-se a cultura com concentrações adicionais de coenzimas do complexo B a partir das coenzimas presentes no meio de cultura Dulbecco, além de um dos grupos, chamado de *Diversas* com B12, ter recebido a adição extra de B12. Visto a importância das coenzimas do complexo B para a célula e com o objetivo de simplificar o metabolismo das coenzimas *in situ*, estruturou-se uma Tabela 2 contendo todas as reações oxidativas, anapleróticas e catabólicas cujas coenzimas do complexo B participam. As coenzimas foram elencadas associadas com suas respectivas reações e moléculas resultantes de suas reações.

Tabela 2: Coenzimas envolvidas nas reações oxidativas do Ciclo de Krebs, Reações Anapleróticas, Fosforilação Oxidativa e Ciclo da Metionina com o Ácido Fólico.

Reações Oxidativas do Ciclo de Krebs				
Autores	Ano	Reações do Ciclo de Krebs	Moléculas	Coenzimas
Nelson & Cox; Voet <i>et al.</i>	2018 2014	Conversão de Piruvato em Acetil-CoA	Piruvato em Acetil-CoA	B1; B3; B4; B5
Kennedy	2016	3 ^a	Isocitrato em α - Cetoglutarato	B3
Dalvin Martínez-Reyes <i>et al.</i>	2007 2016	4 ^a	α -Cetoglutarato em Succinil-CoA	B1; B3; B4; B5
Voet <i>et al.</i>	2014	5 ^a e 6 ^a	Succinil-CoA em Succinato	B2 e B5
Martínez-Reyes <i>et al.</i>	2016	8 ^a	Malato em Oxaloacetato	B3
Reações Anapleróticas				
Kennedy	2016	α -Cetoglutarato proveniente do ciclo da Metionina	α -Cetoglutarato em Succinil-CoA	B1; B3; B4; B5; B7 e B12
		Piruvato proveniente da glicólise.	Piruvato em Oxaloacetato	B7
Fosforilação Oxidativa				
Nelson & Cox	2018	Transporte das moléculas de Hidrogênio para Complexo e I e III	Síntese de ATP	B2 e B3
Ciclo da Metionina / Ciclo do Ácido Fólico				
Paniz Bassoli Padmanabhan <i>et al.</i> Vannucchi <i>et al.</i>	2015 2009 2013 2017	Síntese de RNA e DNA; síntese de Succinil-CoA, Valina e Cisteína	Oxidação da Metionina e Tetraidrofolato	B2; B6; B12 e B9

Fonte: Autores.

Na Tabela 2 é possível ver a presença das coenzimas do complexo em diversas reações metabólicas, tanto catabólicas como anabólicas. Uma das mais importantes reações em que as coenzimas do complexo B faz parte é a síntese de DNA e RNA fornecendo substrato para que o processo de divisão celular ocorra.

Portanto, os resultados encontrados nos testes de comparação das médias de confluência das subculturas das células para avaliação dos três grupos (Controle; Diversas e Diversas com B12) são justificados pela ação nutritiva que as coenzimas do complexo B tem no metabolismo e mitose da célula, promovendo um crescimento maior dos grupos que receberam o tratamento, devido à disponibilidade das coenzimas nas culturas em estudo. O grupo que apresentou relevância estatística foi Diversas com B12, devido a sua função no metabolismo celular.

Nos experimentos de desempenho das concentrações das coenzimas do complexo B, expressou-se como melhor resultado a concentração de 16 mg/ L. Porém, não há experimentos na literatura que utilizem coenzimas do complexo B em cultura de CRFK, todavia há um estudo realizado por Toffalini em (2015), onde o mesmo cultivou células MDBK (células derivadas de rim bovino) e as submeteu a concentrações variáveis de SFB, avaliando o platô e viabilidade celular das culturas. Assim, esse trabalho é semelhante em relação ao desenho experimental que se utilizou, no entanto, como foi utilizado outras substâncias, não há possibilidade de comparação com o estudo atual apesar do trabalho apresentar a mesma finalidade.

Verifica-se que nos testes de diluição das subculturas observou-se que houve resultados significativo para a diluição 1:2, assim, essa diluição prova ser a melhor opção para estabelecer um protocolo a partir deste experimento. Todavia, Monteiro *et al.*, (2011), ressaltam que o fator diluição interfere no desempenho das subculturas; assim pode se observar que nas diluições 1:4 e 1:6 ocorreu uma resposta não significativa das subculturas em todos os ciclos realizados, independente do tratamento recebido.

Nos experimentos de incubação das subculturas o crescimento da célula foi mensurado pela capacidade da CRFK em fazer uma monocamada, para tanto, observou-se a formação da monocamada para estipular a confluência celular nos tempos de 24; 48 e 72 horas após cada repique. Na análise geral de todos os experimentos independente do tratamento recebido, obteve-se confluência ótima entre 48 e 72 horas; todavia, no grupo que recebeu o tratamento com B12 esse tempo ótimo foi de 19,05 horas, tendo relevância estatística. Esse método de análise da monocamada celular foi utilizado por Yamamoto-Silva *et al.*, (2017), onde encontrou-se resultados semelhantes com a progressão das células em cultivo.

É notório que nos resultados da resposta de superfície é possível observar a confluência celular da subcultura com todos os ciclos integrados do grupo Diversas com B12, apresentando relevância estatística quando comparados aos grupos Controle e Diversas. É

necessário salientar que os grupos Controle e Diversas não receberam essa substância. Em justificativa a estes resultados a partir do metabolismo, Ulak, *et al.* (2014), afirmam que B12 e B9 estão ligados diretamente na síntese de DNA e RNA, ou seja, na divisão celular. Ainda, Vannucchi *et al.* (2017); Paniz (2015) e Schieferdecker *et al.* (2015), corroboram que a coenzima B12 está envolvida diretamente no ciclo da metionina sendo um aminoácido muito importante para a síntese proteica celular. Assim a B12 converte homocisteína em metionina que pode fazer tanto em reações anapleróticas com a enzima adenosil transferase reagindo com ATP sintetizando a S-adenosil metionina, posteriormente esta molécula é utilizada na metilação de DNA, RNA.

Nesta perspectiva, a B12 também é utilizada na síntese proteica para a mitose sendo convertida pela metionina síntese em 5-metil THF que em seguida é catalisada pela enzima metileno-tetrahidrofolato redutase em dois passos transformando em uma molécula chamada 10-formil THF. Posteriormente 10-formil THF sofre catalização conjunta pelas enzimas glicinamida ribonucleotídeo transformilase (GART) e 5-amino-imidazol-4-carboxamina ribonucleotídeo transformilase (AICARFT) para síntese de purinas, tanto DNA como o RNA da célula. A síntese de pirimidina ocorre através da molécula 5,10-metileno THF (B12 oxidada) é catalisada pela enzima timidilato sintase (TS) em seguida sofre ação catalítica pelas enzimas deoxiuridina monofosfato (dUMP) e deoxitimidina monofosfato (dTMP), sendo essas coenzimas essenciais para o crescimento celular e a replicação (Paniz, 2015).

Bassoli (2009), Gomes (2013); Kennedy (2016), relatam que a cobalamina está envolvida em distintas vias catabólicas e metabólicas do metabolismo celular. Contudo, a B12 é sintetizada exclusivamente por microrganismos como as bactérias (adquirida por via exógena), sendo posteriormente convertida em coenzimas ativas: a metil-cobalamina e a desoxiadenosil-cobalamina, essenciais para o crescimento e replicação celular. Diante disso, o metabolismo da B12 sofre ação das redutases dentro da célula, após a redução, pode seguir duas vias metabólicas, sendo elas: na mitocôndria, onde origina a desoxiadenosil-cobalamina, coenzima na qual se une à metilmalonil-CoA mutase, enzima que converte metilmalonil-CoA em succinil-CoA, um precursor do ciclo de Krebs (reação anaplerótica) (Vannucchi *et al.*, 2017).

Portanto, diante dos resultados expressos no aumento da confluência das células em subcultura, fica claro a influência que a B12 promoveu potencializando a proliferação. Devido, a sua ação em diversas reações metabólicas, indispensáveis para o crescimento celular e agilidade nas técnicas de cultivo de células. Conclui-se que esta coenzima influenciou no processo mitótico alterando o perfil de proliferação da célula estudada.

4 Considerações Finais

Evidentemente, sendo o cultivo de células tão importante para a ciência contemporânea é extremamente necessário o aprimoramento desta técnica. Esse trabalho buscou o melhoramento dos protocolos existentes, através da suplementação com micronutrientes (coenzimas do complexo B) com objetivo de otimizar o tempo de cultivo celular em busca de resultados mais rápidos e precisos. Assim, com adição da cianocobalamina à fórmula original do meio de cultura DMEM obteve-se resultados com significância estatística, devido a ação nutritiva da coenzima B12, por estar envolvida na maioria das reações metabólicas da célula em cultivo, participando do ciclo de Krebs, síntese de DNA, RNA através do ciclo da metionina, ácido fólico e cadeia respiratória. Logo, o estudo apresentou resultados promissores que podem ser aplicados em laboratórios de pesquisa a fim de se otimizar o processo de cultura de CRFK, obtendo-se culturas mais rápidas ao trazer para os pesquisadores resultados fidedignos em um prazo mais curto. Prontamente, novas propostas de protocolos para cultura celular podem ser estabelecidas a partir deste estudo, servindo como base científica para a realização de novas pesquisas de patologias a serem estudadas e estudos novas terapias.

Referências

Alberts, B, Johnson, A, Lewis, J, Morgan, D, Raff, M, Roberts, K & Hunt, T. (2017). *Biologia molecular da célula*. Artmed Editora.

Alves, E. A & Guimarães, A C R. (2010). *Cultivo celular*. EPSJV.

Barbosa de Sousa, B., dos Santos, F. A., Pimentel, M. M. L., Fernandes, D. P., Prexedes, E. A., & Bezerra, M. B. (2015). Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 9(2), 334-347.

Barreto-Vieira, D F, Barth, O M, Silva, M A N D, Santos, C C, Santos, A D S & Filippis, A M B D (2016). Ultraestrutura das partículas do vírus Zika em culturas celulares. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111 (8), 532-4.

Bassoli, B. K. (2009). *Ácido Fólico: efeitos paradoxais na promoção da hepatocarcinogênese em ratos*. (Dissertação de mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo.

Bousada, G. M & Pereira, E. L. (2017). Produção de vacinas virais parte I: engenharia de bioprocessos. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, 15(1), 309-332.

Bretas, R. M. (2011). *Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais*. (Dissertação de mestrado), Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, programa de pós-graduação em Tecnologia em Imunobiológicos, Rio de Janeiro.

Coleção Americana de Culturas e Tecidos – ATCC. Credible Leads to Incredible. 2017 disponível em: <https://www.atcc.org/en.aspx>

Crandell, R. A, Fabricant, C. G & Nelson-Rees, W. A. (1973). Desenvolvimento, caracterização e suscetibilidade viral de uma linha celular renal felina (*Felis catus*) (CRFK). *In vitro*, 9 (3), 176-85.

Cruz, M, Enes, M, Pereira, M, Dourado, M & Ribeiro, A. B. S. (2009). Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. *Revista portuguesa de pneumologia*, 15(4), 669-82.

De Carvalho, A. C. A, Pereira, E. D. S. C, Costa, C, Barreto, I. C, Madureira, L. C & Paim, F. R. (2010). Estratégias regenerativas da bioengenharia tecidual e aspectos éticos. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 9(1), 20-27.

De Sousa Barbosa, B, Dos Santos, F. A, Pimentel, M. M. L, Fernandes, D. P, Prexedes, E. A & Bezerra, M. B. (2015). Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 9(2), 334-47.

De Souza, F G, Fernandes, B L, Rebelatto, C L K., De Aguiar, A M, Fracaro, L & Brofman, P R S. (2018). Proliferação e diferenciação de células-tronco em contato com eluato de membrana de fibrina. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 53(1), 45-52.

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

Do Amaral, J B, & Machado-Santelli, G M. (2011). A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. *Naturalia*, 34.

Freshney, R I. (2015). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons.

Gomes, T D U H. (2013). *Efeito da concentração de metionina na dieta durante o período pré e pós-natal sobre o estresse oxidativo, a instabilidade genômica e expressão de RNAm de Mat1a, Bhmt e Cbs em camundongos* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Isaac, C. (2012). Construção de substituto da pele composto por matriz de colágeno porcino povoada por fibroblastos dérmicos e queratinócitos humanos: avaliação histológica. *Rev. Bras. Cir. Plást*, 503-508.

Kennedy, D O. (2016). B vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy—a review. *Nutrients*, 8(2), 68.

Lara, M T, Aguiar, M J B, Giannetti, J G & Januário, J N. (2014). Deficiência de biotinidase: aspectos clínicos, diagnósticos e triagem neonatal. *Rev Med Minas Gerais*, 24(3), 388-396.

Leme, J. (2016). *Cultivo de célula BHK-21 C13 em meio de cultura livre de soro fetal bovino adaptada para crescimento em suspensão* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Lents, N H & Baldassare, J. J (2016). Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases. *Encyclopedia of Cell Biology*, volume 3, 423-432. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.30057-8>

Martínez-Reyes, I, Diebold, L P, Kong, H, Schieber, M, Huang, H, Hensley, C T & Dufour, E. (2016). TCA cycle and mitochondrial membrane potential are necessary for diverse biological functions. *Molecular cell*, 61(2), 199-209.

Mccullough, L E, Miller, E E, Mendez, M A, Murtha, A P, Murphy, S K & Hoyo, C. (2016) Vitaminas B maternas: efeitos no peso da prole e na metilação do DNA em domínios geneticamente impressos. *Epigenética clínica*, 8 (1), 8.

Migita, N A. (2012). Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares. (Monografia) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu.

Monteiro, T R, Luis, Z G, Freitas, E D O, Matsumoto, K & Scherwinski-Pereira, J. E. (2011). Diluição celular, características do meio de cultura e biorreatores de imersão temporária na diferenciação e regeneração de células em suspensão de bananeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(SPE1), 213-221.

Montgomery, D C. Design and analysis of experiments (2013). (8th ed.). New York: John Wiley & Sons.

Nelson, D L & Cox, M M. (2018). *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. (7a ed.). Editora Artmed.

Padmanabhan, N, Jia, D, Geary-Joo, C, Wu, X, Ferguson-Smith, A C, Fung, E, Bieda, M C, Snyder, F F, Gravel, R A, Cross, J C & Watson, E D (2013). A mutation in folate metabolism causes epigenetic instability and transgenerational effects on development. *Cell*, 155 (1), 81-93.

Paniz, C. (2015). *Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm dos genes de DHFR, MTHFR, interferon- \hat{I}^3 , TNF- \hat{I}^{\pm} e interleucina-8, e na citotoxicidade das células NK* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Pereira, A S; Shitsuka, D M; Parreira, F J; Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1.

- Rebello, M A. (2014). *Fundamentos da Cultura de Tecidos e Células animais*. Rio de Janeiro. Editora Rubio.
- Schieferdecker, M E M, Thieme, R D & Hauschild, D B. (2015). *Vitaminas, minerais e eletrólitos: aspectos fisiológicos, nutricionais e dietéticos*. Rio de Janeiro. Editora Rubio.
- Toffalini, A D M L. (2015). Avaliação de alternativas ao uso do soro fetal bovino na adaptação de cultivos celulares e obtenção e caracterização das células de córnea bovina (corbov).
- Torres, C B B & Pessoa, W S. (2018). Células-tronco pluripotentes induzidas e edição de genes: avanços tecnológicos da pesquisa em medicina regenerativa e terapia gênica. *Jornal Interdisciplinar de Biociências*, 3(1), 56.
- Ulak, M, Chandyo, R K., Adhikari, R K., Sharma, P R., Sommerfelt, H, Refsum, H & Strand, T A. (2014). Cobalamin and folate status in 6 to 35 months old children presenting with acute diarrhea in Bhaktapur, Nepal. *PLoS One*, 9(3).
- Valdespino-Gómez, V M, Valdespino-Castillo, P M & Valdespino-Castillo, V E. (2015). Interacción de las vías de señalización intracelulares participantes en la proliferación celular: potencial blanco de intervencionismo terapéutico. *Cirugía y Cirujanos*, 83(2), 165-174.
- Vannucchi, H, Monteiro, T M & Takeuchi, P L. (2017). Cobalamina (vitamina B₁₂). Brasil: *ILSI – International Life Science Institute*, (2nd ed.) São Paulo.
- Voet, D, Voet, J G & Pratt, C W. (2014). *Fundamentos de Bioquímica-: A Vida em Nível Molecular*. Artmed Editora.
- Yamamoto-Silva, F P, Todescan, F F, Duarte, R C, De Araújo, N S, Rosa, L, De Lima, K L & de Freitas Silva, B S. (2017). Estudo in vitro do padrão de crescimento e proliferação celular de pré-osteoblastos humanos com Bio-Oss® e GenO®. *Revista Odontológica do Brasil Central*, 26(76), 11-14.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Fabiane da Silva Reis Góes – 50%

Henrique Manoel Silva – 20 %

Ana Carolina Santana de Oliveira – 30 %