

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA)

Júlio César Gomes Graça

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE ACETATO EM CÉLULAS DE
NEUROBLASTOMA SH-SY5Y E CÉLULAS-TRONCO HUMANAS DE
DENTE DECÍDUO ESFOLIADO CULTIVADAS NA PRESENÇA DE
GLUTAMATO**

Juiz de Fora
2017

JÚLIO CÉSAR GOMES GRAÇA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE ACETATO EM CÉLULAS DE
NEUROBLASTOMA SH-SY5Y E CÉLULAS-TRONCO HUMANAS DE
DENTE DECÍDUO ESFOLIADO CULTIVADAS NA PRESENÇA DE
GLUTAMATO**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo autor

Graça, Júlio César Gomes.

Avaliação dos efeitos de acetato em células de neuroblastoma sh-sy5y e células-tronco humanas de dente decíduo esfoliado cultivadas na presença de glutamato / Júlio César Gomes Graça. -- 2017.

67 p.

Orientador: Carlos Magno da Costa Maranduba

Coorientador: Fernando de Sá Silva

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. Acetato. 2. Glutamato. 3. Citotoxicidade. 4. Células SH-SY5Y. 5. Células SHED. 1. Maranduba, Carlos Magno da Costa, orient. li. Silva, Fernando de Sá, coorient. Ili. Título.

Júlio César Gomes Graça

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE ACETATO EM CÉLULAS DE
NEUROBLASTOMA SH-SY5Y E CÉLULAS-TRONCO HUMANAS DE
DENTE DECÍDUO ESFOLIADO CULTIVADAS NA PRESENÇA DE
GLUTAMATO**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Fernando de Sá Silva - Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Mateus Rodrigues Pereira
Faculdade Estácio de Sá Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Se você está lendo esta página é porque eu consegui. E não foi fácil chegar até aqui. Do processo seletivo, passando pela aprovação até a conclusão do Mestrado, foi um longo caminho percorrido. Nada foi fácil, tampouco tranquilo.

Quero agradecer a todos aqueles que sempre confiaram em mim.

Em primeiro lugar, a Deus, sob todas as Suas concepções, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Aos meus pais, Gilson e Maria, por me terem dado educação, valores e por me terem ensinado a andar. Aos senhores que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento. Ao meu irmão, Wallace, modelo em que procuro me espelhar sempre, pelos inúmeros conselhos, risadas e momentos de descontração. Nada se compara a chegar em casa, após um dia desgastante de trabalho e estudo, e sempre ser recebido de braços abertos, com boas conversas e um clima agradável; é como se toda energia negativa simplesmente evaporasse do corpo.

Aos “irmãos” que a vida colocou em meu caminho e escolhi para conviver: Fábio, Giroto, Gustavo e Wagner. Vivendo na mesma rotina de universitário perdido em ideologias, agradeço pela troca de ideias e visões de mundo das mais diversas; sempre que converso com vocês, sinto que estou colocando a passos lentos, porém constantes, minha mente para fora dessa caixa que a sociedade nos joga no momento em que nascemos.

À Marizia, amiga de graduação, depois de mestrado e até mesmo de orientador. Sempre nos ajudamos desde 2010, ano de ingresso na UFJF, costume esse que perseverou ao longo do Mestrado. Obrigado por todas as vezes em que me amparou devido à minha rotina corrida, pelo debate constante nas disciplinas da Pós, pelas risadas que dávamos de alegria e de desespero rrsrs. Com você, o Mestrado foi mais divertido.

Ao Prof. Dr. Carlos Maranduba, meu orientador e exemplo profissional e pessoal. Em mais de 7 anos de UFJF, nunca encontrei um professor tão preocupado com seus alunos e tão afável, mesmo fora do âmbito acadêmico. Obrigado por todo o ensinamento, por me apresentar a esse mundo incrível que é a cultura de células, por estar sempre disposto a esclarecer quaisquer dúvidas que surgissem. Aproveito a

oportunidade para me desculpar pelas inúmeras vezes em que lhe chamei em horários poucos convencionais para conversar sobre assuntos relacionados ao Mestrado, momentos estes onde o senhor, sempre que possível, socorria-me.

Ao Prof. Dr. Fernando de Sá Silva, pelo fundamental aporte teórico/prático na pesquisa desenvolvida, sem o qual nada disso seria possível. Obrigado por todos os e-mails solucionando minhas dúvidas, todos os artigos indicados e pela disposição constante em ajudar.

Ao Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (USP), por gentilmente ceder a linhagem de células SH-SY5Y, pilar de todos os trabalhos desenvolvidos. À Patrícia, mestranda da faculdade de odontologia, pelo apoio logístico envolvendo a aquisição das garrafas de células.

A todos os colegas do grupo GENETEC, em particular à Camilla e à Danielle, por me introduzirem na rotina do laboratório, etapa primordial para o desenvolvimento das atividades. Aos professores do laboratório de genética e biotecnologia, bem como à banca examinadora, obrigado por todo o conhecimento transmitido.

Com vocês, meus caros, divido a alegria desta experiência.

“Science never solves a problem without creating ten more”

George Bernard Shaw

RESUMO

O glutamato, aminoácido não-essencial, é um neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), sendo liberado durante o impulso nervoso. Em situações de patologia cerebral, o acúmulo de glutamato ocorre no espaço extracelular, causando dano neuronal e, eventualmente, apoptose. Muitos trabalhos relataram que a citotoxicidade do glutamato está associada a várias doenças neurológicas. Neste contexto, o acetato, um ácido graxo de cadeia curta, pode beneficiar o SNC de forma energética e estrutural. A acetil-coenzima A, forma metabolicamente ativa de acetato, é utilizada como substrato em vias bioquímicas envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, além de aumentar a acetilação das histonas, alterando a expressão de genes inflamatórios. A linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y é comumente usada em estudos relacionados a doenças neurodegenerativas, com uma capacidade de expansão em larga escala antes da diferenciação, enquanto que a linhagem de células-tronco de polpa de dente de leite decíduo esfoliado (SHED) é comumente utilizada em modelos de estudo do comportamento celular. O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos do acetato mediante a citotoxicidade causada pelo glutamato em células SH-SY5Y e SHED. Células SH-SY5Y e SHED foram cultivadas, respectivamente, em meio DMEM/F12 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina, e meio alfa-MEM, suplementado com 10% (v/v) de SFB, 1% (v/v), 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina, 0,01 mM de aminoácidos não essenciais e 2 mM L-glutamina. A viabilidade celular em diferentes concentrações de acetato (5 a 75 mM) e glutamato (25 a 150mM) foi medida pelo ensaio MTT. A diferenciação foi realizada em SH-SY5Y pela suplementação do meio com 10 µM de ácido retinóico (AR) e redução de SFB para 1% (v/v) durante 4, 7 e 10 dias em cultura, e em SHED pela substituição do meio de cultivo por DMEM Low-Glicose, suplementado com 10% (v/v) de SFB, 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina, 10^{-7} M de dexametasona, 50 µM de 2-fosfato ácido ascórbico e 2 mM de β-glicerolfosfato, a fim de verificar como essas células respondem à mistura de acetato/glutamato. A análise estatística foi realizada teste ANOVA de uma ou duas vias, bem como pelo teste de Kruskal-Wallis, quando apropriado, com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. Após 7 dias de incubação, as concentrações de 5 e 25 mM de acetato apresentaram menor influência sobre a viabilidade de células SH-SY5Y e SHED, enquanto que o IC50% de glutamato ficou em torno de 75mM e 50mM para estas linhagens, respectivamente. Ao submeter as células ao tratamento combinado de acetato e glutamato, observou-se que o acetato não exerceu citoproteção mediante exposição celular ao glutamato. Após análise qualitativa da diferenciação osteogênica em SHEDs, foi observado maior mineralização nas células tratadas com AR e acetato, em comparação com as células controle. Estudos subsequentes, que permitam identificar como tais células respondem ao acetato em nível molecular, considerando a expressão de ciclinas, compactação da cromatina e a presença de marcadores bioquímicos característicos durante a diferenciação de cada linhagem, por exemplo, poderão fornecer um entendimento mais completo de como esse composto atua na dinâmica metabólica e bioenergética celular.

Palavras-chave: Acetato. Glutamato. Citotoxicidade. Células SH-SY5Y. Células SHED

ABSTRACT

Glutamate, a non-essential amino acid, is an excitatory neurotransmitter of the central nervous system (CNS), being released during the nerve impulse. In situations of cerebral pathology, the accumulation of glutamate occurs in the extracellular space, causing neuronal damage and, eventually, apoptosis. Many studies have reported that glutamate cytotoxicity is associated with various neurological diseases. In this context, acetate, a short chain fatty acid, can benefit the CNS energetically and structurally. Acetyl-coenzyme A, a metabolically active form of acetate, is used as a substrate in biochemical pathways involved in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins, in addition to increasing the acetylation of histones, altering the expression of inflammatory genes. The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line is commonly used in studies related to neurodegenerative diseases, with a large scale expansion capacity prior to differentiation, whereas the stem cell line of exfoliated deciduous teeth (SHED) is commonly used in models of cellular behavior. The objective of this research was evaluate the effects of acetate by glutamate-induced cytotoxicity on SH-SY5Y and SHED cells. SH-SY5Y and SHED cells were cultured respectively in DMEM / F12 medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 1% (v/v) penicillin-streptomycin, and alpha-MEM medium, supplemented with 10% (v/v) FBS, 1% (v/v), 1% (v/v) penicillin-streptomycin, 0.01 mM non-essential amino acids and 2 mM L-glutamine. Cell viability at different concentrations of acetate (5 to 75 mM) and glutamate (25 to 150 mM) was measured by the MTT assay. Differentiation was performed on SH-SY5Y by supplementing the medium with 10 μ M retinoic acid (RA) and reducing FBS to 1% (v/v) for 4, 7 and 10 days in culture, and in SHED by replacing the culture medium with DMEM Low-Glucose, supplemented with 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) penicillin-streptomycin, 10^{-7} M dexamethasone, 50 μ M ascorbic acid 2-phosphate and 2 mM β - Glycerol phosphate in order to verify how these cells respond to the acetate/glutamate mixture. Statistical analysis was performed one-way or two-way ANOVA, as well as Kruskal-Wallis test, when appropriate, with $p < 0.05$ considered statistically significant. After 7 days of incubation, concentrations of 5 and 25 mM acetate had less influence on the viability of SH-SY5Y and SHED cells, whereas the IC₅₀% of glutamate was around 75mM and 50mM for these lines, respectively. By subjecting the cells to the combined treatment of acetate and glutamate, it was observed that acetate did not exert cytoprotection through cellular exposure to glutamate. After qualitative analysis of the osteogenic differentiation in SHEDs, greater mineralization was observed in the cells treated with RA and acetate, in comparison with the control cells. Subsequent studies to identify how these cells respond to acetate at the molecular level, considering the expression of cyclins, chromatin compaction, and the presence of characteristic biochemical markers during differentiation of each lineage, for example, may provide a more complete understanding of how this component acts on the metabolic dynamics and cellular bioenergetics.

Keywords: Acetate. Glutamate. Cytotoxicity. SH-SY5Y Cells. SHED Cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visão geral do metabolismo de glutamina e glutamato em células de mamíferos	16
Figura 2: Toxicidade ocasionada por glutamato.....	18
Figura 3: Descrição estilizada de um NMDAR ativado.....	19
Figura 4: Fontes e locais de produção de acetato no corpo humano.....	20
Figura 5: Produção de acetato pela microbiota intestinal.....	22
Figura 6: Via da síntese de ácidos graxos	22
Figura 7: Sistema de transferência energética creatina quinase/fosfocreatina	24
Figura 8: Metabolismo de corpos cetônicos	25
Figura 9: Síntese e degradação de NAA.....	27
Figura 10: Representação esquemática dos gradientes de glutamato e acetato utilizados	35
Figura 11: Representação esquemática dos tratamentos combinados de acetato e glutamato utilizados.....	35
Figura 12: Efeito do acetato na viabilidade celular em neuroblastoma humano (SH-SY5Y).....	38
Figura 13: Efeito do acetato na viabilidade celular em célula-tronco humana de polpa de dente decíduo esfoliado (SHED)	39
Figura 14: Efeito do glutamato na viabilidade celular em neuroblastoma humano (SH-SY5Y).....	40
Figura 15: Efeito do glutamato na viabilidade celular em célula-tronco humana de polpa de dente decíduo esfoliado (SHED)	41
Figura 16: Efeito do tratamento combinado de acetato e glutamato na viabilidade celular em neuroblastoma humano (SH-SY5Y).....	42
Figura 17: Efeito do tratamento combinado de acetato e glutamato na viabilidade celular em célula-tronco humana de polpa de dente decíduo esfoliado (SHED)	42
Figura 18: Parâmetro morfológico de células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico.....	43

Figura 19: Comprimento médio de neuritos	44
Figura 20: Comprimento médio de neuritos por células portadoras	44
Figura 21: Células portadoras de neuritos	45
Figura 22: Quantidade de neuritos por célula portadora	45
Figura 23: Total de células	46
Figura 24: Efeito do tratamento com ácido retinóico e acetato em células SHED submetidas ao protocolo de diferenciação osteogênica.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC α	Acetil-CoA carboxilase α
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ACSS1	Acetil-CoA sintetase 1
ACSS2	Acetil-CoA sintetase 2
ADP	Difosfato de adenosina
AR	Ácido Retinóico
ATP	Trifosfato de adenosina
BMSC	Células-tronco mesenquimais da medula óssea
Ca	Cálcio
Cl	Cloro
CoA	Coenzima A
DAT	Transportador de dopamina
EM	Esclerose Múltipla
EPM	Erro padrão médio
GSH	Glutathiona
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona deacetilase
H ₂ O	Água
HeLa	Células de carcinoma uterino humano
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolissacarídeo
MEM	Meio Mínimo Essencial de Eagle

MTT Na	brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difeniltetrazólio Sódio
NAA	N-acetilaspartato
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina hidrogenado
NeuN	Proteína nuclear específica de neurônio
NGAA	Norma Geral Codex para Aditivos Alimentares
NMDA	N-metil D-Aspartato
NMDAR	Receptor de N-metil D-Aspartato
NSE	Enolase neurônio-específica
Pcr	Fosfocreatina
RXR	Receptores retinóides X
SFB	Soro Fetal Bovino
SH-SY5Y	Linhagem de células de neuroblastoma humano
SHED	Células-tronco de polpa de dente de leite decíduo esfoliado
SNC	Sistema nervoso central
TCA	Ciclo dos ácidos tricarbóxicos
TH	Tirosina-hidroxilase
TNF- α	Fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1	CULTIVO CELULAR	13
1.2	GLUTAMINA, GLUTAMATO E NEUROTOXICIDADE	14
1.3	BIOENERGÉTICA DO ACETATO E NEUROPROTEÇÃO	20
1.4	CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y	28
1.5	CÉLULAS-TRONCO HUMANAS DE POLPA DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED)	29
1.6	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	31
2	OBJETIVOS.....	32
2.1	OBJETIVO GERAL	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	CULTIVO CELULAR	33
3.2	REAGENTES	33
3.3	VIABILIDADE CELULAR.....	34
3.4	DIFERENCIAÇÃO NEURONAL E CONTAGEM DE NEURITOS EM CÉLULAS SH-SY5Y	36
3.5	DIFERENCIAÇÃO ÓSSEA E MENSURAÇÃO DO NÍVEL DE CALCIFICAÇÃO EM CÉLULAS SHED	36
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4	RESULTADOS	38
4.1	EFEITO DO ACETATO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS SH-SY5Y E SHED.....	38
4.2	EFEITO DO GLUTAMATO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS SH-SY5Y E SHED.....	39
4.3	EFEITO COMBINADO DE ACETATO E GLUTAMATO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS SH-SY5Y E SHED	41
4.4	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL INDUZIDA POR ÁCIDO RETINÓICO EM CÉLULAS SH-SY5Y.....	43
4.5	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA EM CÉLULAS SH-SY5Y	46
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÃO.....	51
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CULTIVO CELULAR

A cultura de células é uma das principais técnicas nas ciências da vida, sendo o termo geral utilizado para a remoção de células, tecidos ou órgãos de um animal ou planta e a sua subsequente manutenção em um ambiente artificial propício para a sua sobrevivência e/ou proliferação (ARORA, 2013). Para que se possa cultivar células *in vitro*, é necessário propiciar às mesmas um ambiente que mimetize as condições encontradas *in vivo*. Os meios de cultivo devem garantir, portanto, condições adequadas de pH e osmolaridade, bem como prover as células de substâncias que as mesmas não podem produzir (MORAES et al., 2008). A cultura de células apresenta uma série de vantagens com relação ao uso de espécimes vivos e o cultivo *in vivo*, dentre elas podemos citar: 1) possibilidade de estudar fenômenos inacessíveis em tecidos intactos; 2) controle das condições ambientais (pH, temperatura, concentração de O₂ e CO₂); 3) obtenção de células com boa homogeneidade e bem caracterizadas; 4) economia de reagentes e tempo (FRESHNEY, 2010).

Os primeiros estudos datam do início do século XX (CARREL e BURROWS, 1911; CARREL e INGEBRIGTSEN, 1912; FOOT, 1913; EBELING, 1914), onde pesquisadores utilizaram fluidos biológicos como plasma, linfa e soro, para manter em cultivo pedaços de tecidos de origem animal. O cultivo de células animais só começou a se desenvolver com sucesso na década de 1950, quando H. Eagle conseguiu definir os nutrientes necessários para o crescimento celular (EAGLE, 1955; EAGLE *et al.*, 1956; OYAMA e EAGLE, 1956; PIEZ *et al.*, 1960). Eagle identificou o papel de metabólitos específicos para o crescimento de linhagens de fibroblasto murino e carcinoma uterino humano (HeLa), definindo assim um meio mínimo essencial para o crescimento celular destas linhagens, conhecido como Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM). Basicamente, um meio completo para o cultivo de células animais inclui o meio mínimo mais suplementos que são compostos por água, sais minerais, aminoácidos, vitaminas, glicose, suplementos orgânicos (proteínas, peptídeos, piruvato e lipídios), soro fetal de cavalo, bovino ou humano (onde estão

contidos fatores de crescimento) e antibióticos (para prevenir as contaminações microbianas)(VAN DER VALK *et al.*, 2010). As células devem ser isoladas e mantidas assepticamente em condições bastante estritas de temperatura (35° a 37°C), pH, concentração de CO₂ e umidade (FRESHNEY, 2010).

Baseando-se no meio de Eagle, vários pesquisadores propuseram modificações e inclusões de novos nutrientes para o cultivo de outras linhagens celulares. Por exemplo, o meio DMEM é uma modificação feita por Dulbecco que introduz no meio MEM de Eagle o dobro da concentração de aminoácidos e quatro vezes a quantidade de vitaminas, bem como nitrato férrico, piruvato de sódio, e alguns aminoácidos complementares (DULBECCO e FREEMAN, 1959). Há também o RPMI-1640, um meio de finalidade geral com uma ampla gama de aplicações para as células de mamíferos, em especial células hematopoiéticas. Ele foi desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute (RPMI) em Buffalo, Nova Iorque, sendo desenvolvido para a cultura de longo prazo de linfócitos de sangue periférico (ARORA, 2013). Outro amplamente utilizado é o DMEM/F12: uma combinação 1:1 de DMEM e Ham F-12, uma mistura de nutrientes que possui altos níveis de aminoácidos e vitaminas, sendo um meio extremamente rico e complexo. Ele suporta o crescimento de uma ampla gama de tipos de células, tanto no soro quanto nas formulações livres de soro (HAM, 1965; BARNES e SATO, 1980; JAYME, WATANABE e SHIMADA, 1997).

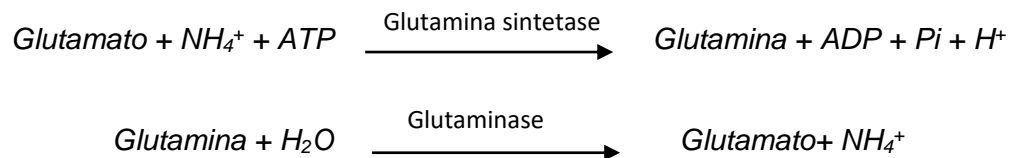
Os meios básicos para cultivo celular são constituídos por substâncias que isoladamente não conseguem proporcionar um bom crescimento celular. Portanto, torna-se necessário uma suplementação com aditivos complexos (FRESHNEY, 2010).

1.2 GLUTAMINA, GLUTAMATO E NEUROTOXICIDADE

Quando se considera a suplementação, os aminoácidos são componentes obrigatórios de todos os meios de cultura de células, haja vista serem o ponto de partida para a síntese de proteínas (FRESHNEY, 2010). Eles são necessários para a proliferação das células e a sua concentração determina a densidade celular máxima alcançável. A L-glutamina, um aminoácido não-essencial, é particularmente

importante, pois fornece nitrogênio para NAD e nucleotídeos, servindo como uma fonte de energia secundária para o metabolismo (LANE, PAX e BENNETT, 1987).

A glutamina é um aminoácido instável que, com o tempo, converte-se em uma forma que não pode ser utilizada pelas células (PASIEKA e MORGAN, 1959). Sua degradação resulta no acúmulo de amônia, a qual pode ter efeito deletério sobre algumas linhagens celulares. Duas enzimas são responsáveis pela síntese de glutamina a partir do glutamato ou, inversamente, sua degradação em glutamato: a glutamina sintetase e a glutaminase, respectivamente (ROWBOTTOM, KEAST e MORTON, 1996; NEWSHOLME, PROCOPIO, *et al.*, 2003), conforme esquema abaixo:



Mediante a conversão de glutamato em glutamina e da utilização da amônia como fonte de nitrogênio, havendo consumo de trifosfato de adenosina (ATP), a glutamina sintetase é a enzima-chave para a síntese da glutamina e para a regulação do metabolismo celular do nitrogênio (NEWSHOLME, LIMA, *et al.*, 2003). Trata-se de uma aminotransferase amplamente distribuída entre os organismos vivos, sendo sua atividade fundamental para a manutenção da vida de microrganismos e de animais (HISCOCK e PEDERSEN, 2002). Os fatores que regulam a atividade da glutamina sintetase são diversos, tais como glicocorticoides (SANTOS, CAPERUTO e COSTA ROSA, 2007), hormônios tireoidianos (HISCOCK e PEDERSEN, 2002), hormônio do crescimento e insulina (ARDAWI, 1990), resultando em inúmeras funções no organismo (LABOW, SOUBA e ABCOUWER, 2001). No cérebro, é utilizada como um importante agente na redução da concentração de amônia, com consequente desintoxicação e síntese de glutamina para nova síntese de glutamato (ROWBOTTOM, KEAST e MORTON, 1996). No pulmão e no músculo esquelético, é responsável pela manutenção da concentração de glutamina plasmática, sendo essencial em situações patológicas ou de estresse (PINEL *et al.*, 2006). Nos rins, a glutamina sintetase é imprescindível para o controle do metabolismo do nitrogênio e manutenção do pH no organismo (LABOW, SOUBA e ABCOUWER, 2001).

A glutaminase é a enzima que catalisa a hidrólise de glutamina em glutamato e íon amônio. Ela está envolvida em diversos processos metabólicos e pode ser encontrada em bactérias, plantas e animais (Figura 1) (RENNIE *et al.*, 2001). Em mamíferos, tal enzima pode ser encontrada sob duas isoformas, uma (menos abundante) no fígado e outra nos demais tecidos, tais como rins, cérebro, leucócitos e trato gastrointestinal. Contudo, a sua forma mais ativa apresenta-se principalmente nas mitocôndrias (LABOW, SOUBA e ABCOUWER, 2001). Por meio do glutamato, pode ocorrer a síntese de outros aminoácidos e de antioxidantes como a glutatona (GSH), principal antioxidante celular não-enzimático (LU, 2013).

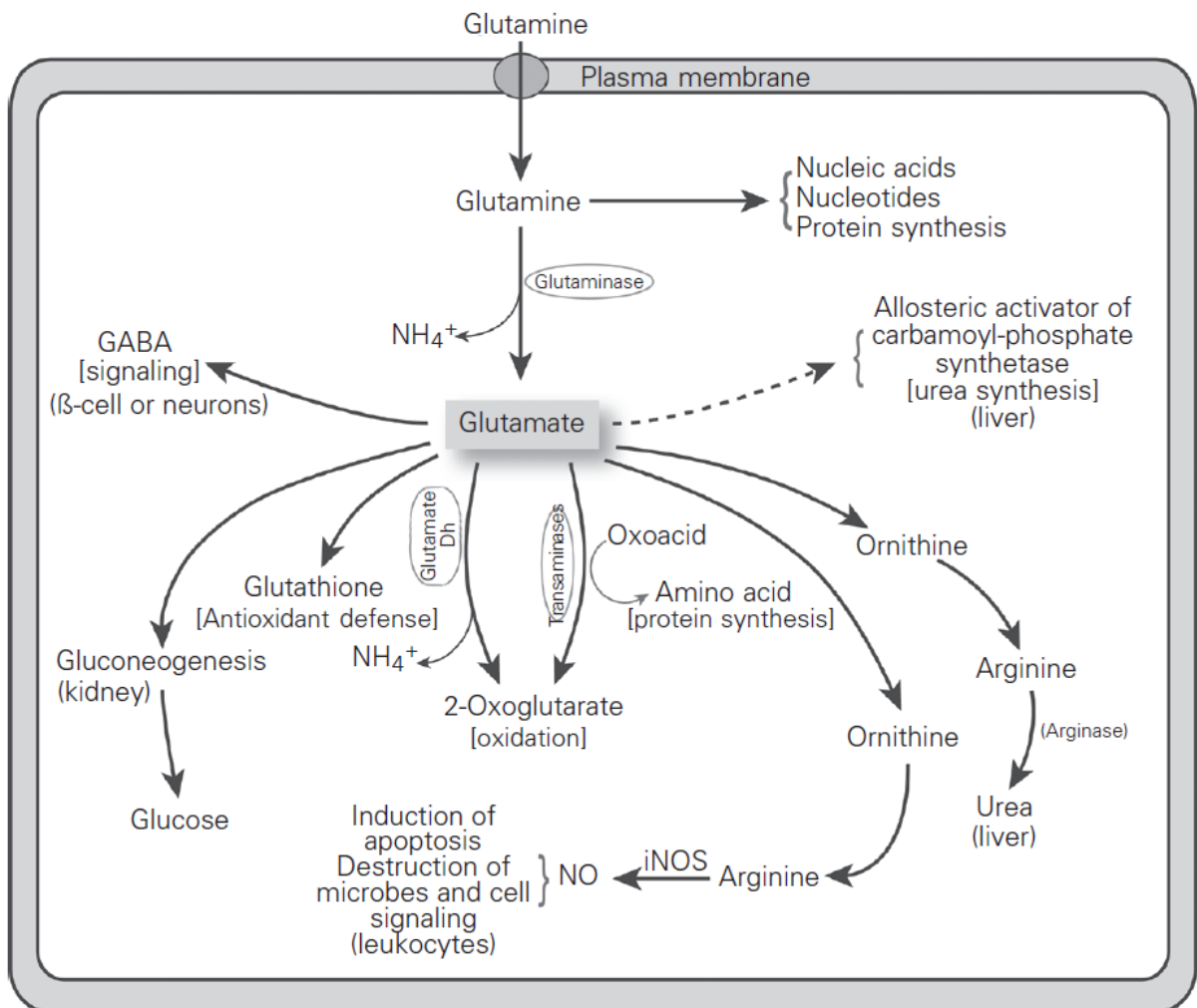


Figura 1: Visão geral do metabolismo de glutamina e glutamato em células de mamíferos. O glutamato é produzido a partir da glutamina através da actividade da glutaminase. Ele pode então ser convertido em ácido gama-amino-butírico (GABA), ornitina, 2-oxoglutarato, glicose ou glutatona. Fonte: (NEWSHOLME, LIMA, *et al.*, 2003)

O glutamato é um neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC), o mais comum em mamíferos (MELDRUM, 2000), sendo armazenado em

vesículas nas sinapses. O impulso nervoso causa a liberação de glutamato pelo neurônio pré-sináptico, o qual, por sua vez, causa a ativação de receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) em terminais pós-sinápticos, ocasionando o influxo de cálcio nestas células. As membranas de astrócitos, bem como de neurônios, possuem transportadores de glutamato que retiram rapidamente este aminoácido do espaço extracelular (DANYSZ e PARSONS, 2012; HOLMSETH *et al.*, 2012).

O cálcio é um íon fundamental para as funções fisiológicas dos neurônios, porém em grandes quantidades causa lesão e morte celular (SZYDLOWSKA e TYMIANSKI, 2010). Em situações de patologia cerebral (danos ou doenças), os transportadores podem funcionar de forma reversa e causar a acumulação e concentrações excessivas de glutamato no espaço extracelular. Esta reversão provoca a entrada e acúmulo de íons cálcio (Ca^{2+}) nas células, através de receptores NMDA, levando a danos neuronais e eventualmente morte celular (apoptose) (SATTLER e TYMIANSKI, 2001). Este processo é citotóxico e pode ser letal para os neurônios (Figura 2). Tal toxicidade pode ser causada por: 1) alterações mitocondriais decorrentes de um influxo excessivo e descontrolado de Ca^{2+} na célula, ultrapassando a sua capacidade de estocagem, com a subsequente apoptose; 2) amplificação ou superexpressão de fatores de transcrição de genes pró-apoptóticos ou 3) repressão de fatores de transcrição de genes anti-apoptóticos mediada pelo glutamato e pelo Ca^{2+} (SATTLER e TYMIANSKI, 2001; ARUNDINE e TYMIANSKI, 2003; CHEN, GUO e KONG, 2012).

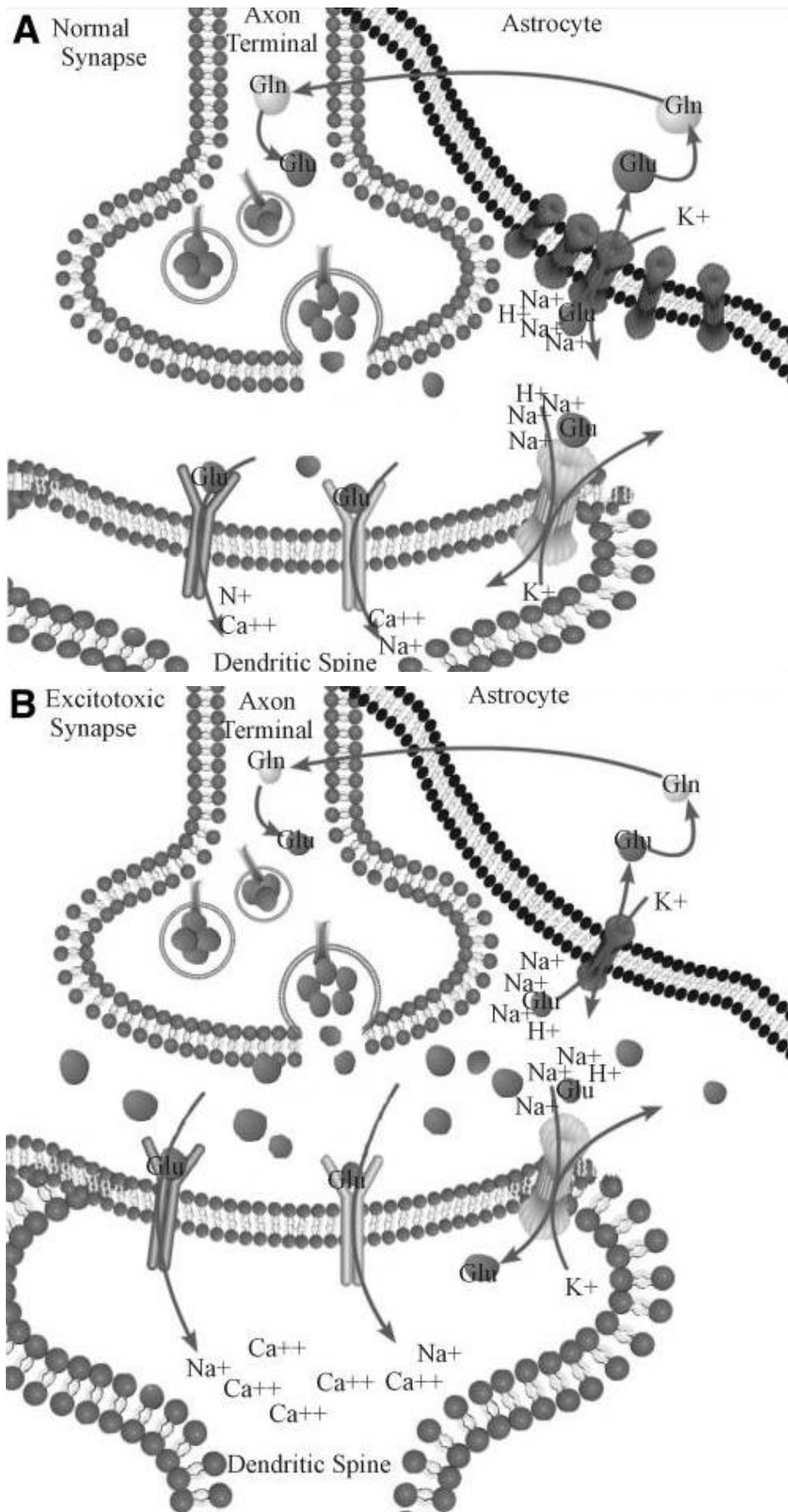


Figura 2: Toxicidade ocasionada por glutamato. (A) Em uma sinapse de funcionamento normal, o glutamato liberado dos terminais pré-sinápticos ativa os receptores NMDA e AMPA, resultando em um influxo de íons Na e Ca no elemento pós-sináptico, despolarização do neurônio e, finalmente, um potencial de ação. (B) A toxicidade pode ser induzida por uma elevação da concentração sináptica de glutamato. Isso pode ser causado por um aumento do glutamato liberado e/ou uma diminuição de sua captação. A estimulação excessiva dos receptores de glutamato resultante deste aumento na concentração resulta em maior concentração intracelular de íons Ca^{2+} , causando morte neuronal. Fonte: (FORAN e TROTTI, 2009).

A citotoxicidade devida à acumulação de glutamato está associada a doenças neurológicas e neurodegenerativas, tais como a doença de Huntington, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson e derrame cerebral ou lesão cerebral traumática (HYND, SCOTT e DODD, 2004; KOSTIC, ZIVKOVIC e STOJANOVIC, 2013), tendo em vista que induz a danos tais como disfunção de memória, produção de radicais livres, disfunção mitocondrial e morte celular. Os principais receptores envolvidos neste processo são os do tipo NMDA, porém os receptores AMPA/Cainato também são ativados, causando o influxo de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- e H_2O através do gradiente osmótico, causando edema, lise celular e, conseqüentemente, maior liberação de glutamato (STOCCA e VICINI, 1998; CHEN, MUHLHAUSER e YANG, 2003; PAPOUIN *et al.*, 2012). A ativação de receptores de NMDA é dependente da ligação de um agonista (glutamato ou aspartato) e também da ligação de um coagonista (glicina ou D-serina) (Figura 3). A liberação exacerbada de glutamato, por sua vez, gera a morte por citotoxicidade de outras células dando seqüência a um ciclo de degeneração no tecido (LAUBE *et al.*, 1997; SZYDLOWSKA e TYMIANSKI, 2010).

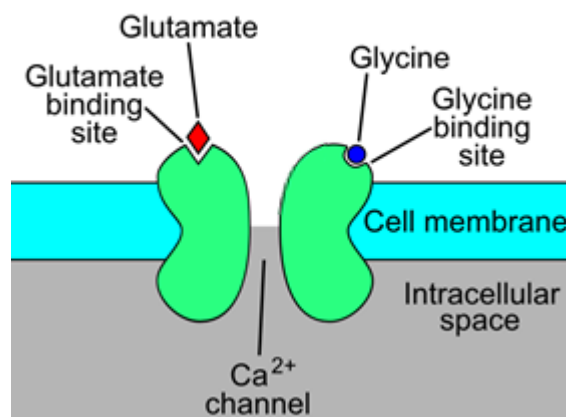


Figura 3: Descrição estilizada de um NMDAR ativado. O glutamato e a glicina estão em seus respectivos locais de ligação. Os NMDAR requerem a ligação de duas moléculas de glutamato ou aspartato e duas de glicina. Adaptado de: (LAUBE *et al.*, 1997 - modificado pelo autor).

1.3 BIOENERGÉTICA DO ACETATO E NEUROPROTEÇÃO

Neste contexto, o acetato, ácido graxo de cadeia curta, pode beneficiar o SNC energeticamente e estruturalmente. Basicamente, devido à participação de acetil-coenzima A (Acetil-CoA), forma metabolicamente ativa do acetato, em vias bioquímicas envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas.

De acordo com a Norma Geral Codex para Aditivos Alimentares (NGAA), as principais fontes nutricionais de acetato são alimentos como queijos e outros produtos lácteos, carnes processadas, pão, etanol e carboidratos indigeríveis. Além disso, o acetato pode ser liberado a partir de compostos acetilados no organismo (Figura 4) (SCHUG, VANDE VOORDE e GOTTLIEB, 2016).

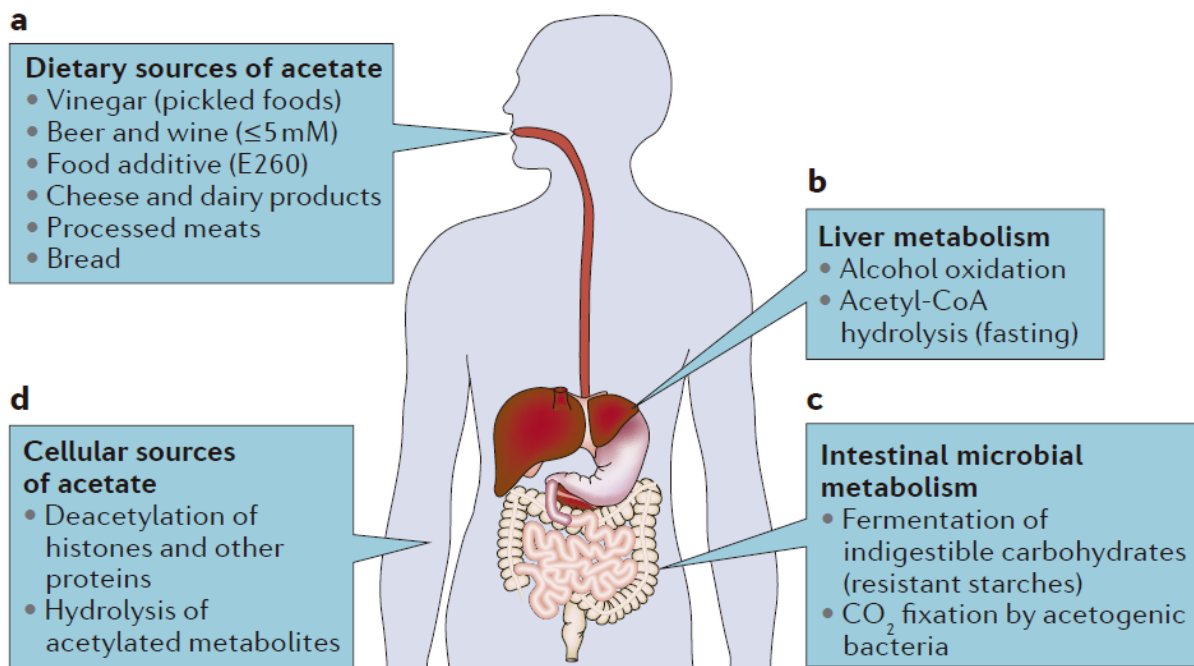


Figura 4: Fontes e locais de produção de acetato no corpo humano. Fonte: (SCHUG, VANDE VOORDE e GOTTLIEB, 2016).

O acetato é produzido pela maioria das espécies de bactérias intestinais através da fermentação do piruvato via acetil-CoA. Além disso, as bactérias acetogênicas podem produzir acetato a partir de CO_2 e H_2 através da via redutora de Wood-Ljungdahl (Figura 5) (SCHUCHMANN e MULLER, 2014; SCHUG, VANDE VOORDE e GOTTLIEB, 2016). Tais microrganismos podem produzir três moléculas de acetato a partir de uma molécula de glicose ou frutose (REY *et al.*, 2010;

SCHUCHMANN e MULLER, 2014). O acetato é utilizado localmente no intestino, e o restante entra no fígado através do sistema venoso porta-hepático. De lá, O acetato remanescente é liberado na corrente sanguínea, onde é consumido e oxidado pelos tecidos periféricos.

Após a captação celular, existem duas enzimas capazes de utilizar o acetato como substrato: a acetil-CoA sintetase 1, localizada na mitocôndria (ACSS1), e a ACSS2, localizadas na matriz mitocondrial (LUONG *et al.*, 2000; FUJINO *et al.*, 2001). As acetil-CoA-sintetases, por definição, catalisam a ligação dependente de ATP do acetato à CoA para a produção de acetil-CoA, que é um metabolito central entre a glicólise e o ciclo de Krebs, além de um substrato importante para várias outras reações bioquímicas e vias, tais como a da síntese de esteróis, hexosaminas e cetonas (Figura 5) (SCHUG, VANDE VOORDE e GOTTLIEB, 2016).

A incorporação de acetato em ácidos graxos envolve três passos enzimáticos: ligação de acetato com CoA para produzir acetil-CoA por ACSS2, carboxilação de acetil-CoA por acetil-CoA carboxilase α (ACCA, também conhecida como ACC1) e a condensação de acetil-CoA e/ou malonil-CoA pela sintase de ácidos graxos (FAS) (Figura 6) (KIMURA, FUKUDA e IRITANI, 2005). Por outro lado, A oxidação de acetato no ciclo de Krebs proporciona equivalentes redutores para a produção de energia por fosforilação oxidativa.

Ao todo, esses destinos metabólicos de acetato indicam que quando a oxidação mitocondrial da glicose é comprometida (sob condições de hipoxia ou baixa glicose) ou a disponibilidade de lipídios exógenos é limitada, o acetato pode ser utilizado para gerar acetil-CoA, produzindo energia através do ciclo Krebs e/ou gerando biomassa.

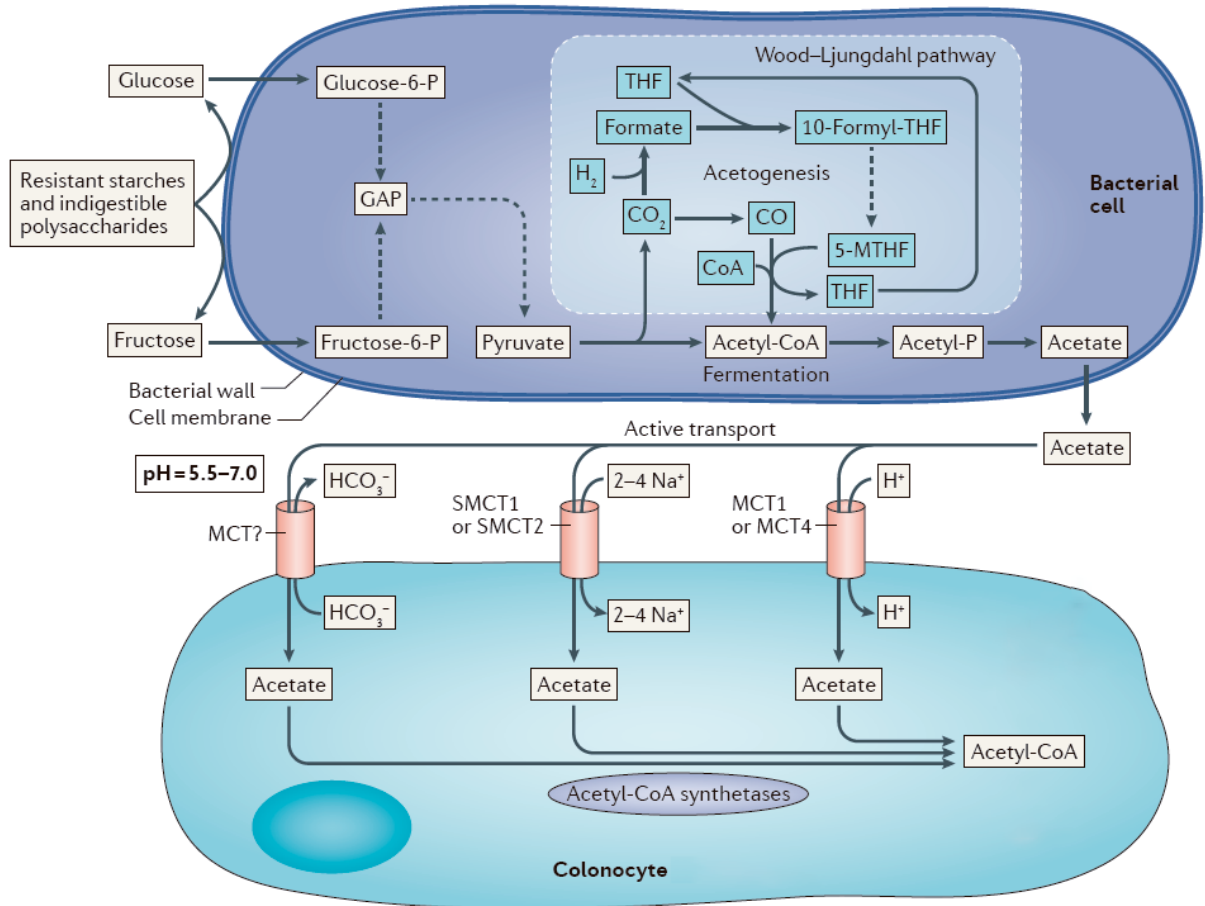


Figura 5: Produção de acetato pelas bactérias intestinais. Adaptado de: (SCHUG, VANDE VOORDE e GOTTLIEB, 2016 - modificado pelo autor).

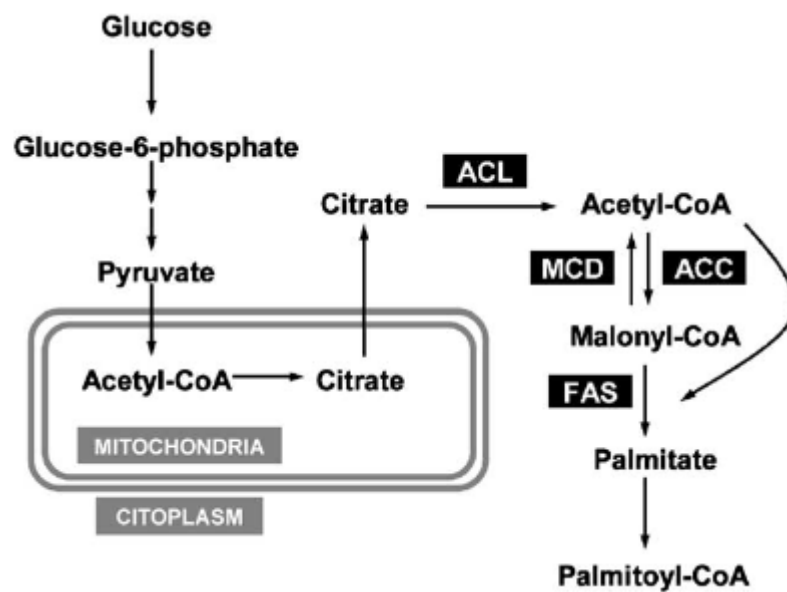


Figura 6: Via da síntese de ácidos graxos. ACC: acetil-CoA carboxilase; ACL: ATP citrato liase; FAS: síntese de ácidos graxos; MCD: malonil-CoA descarboxilase. Fonte: (LOPEZ *et al.*, 2005).

A versatilidade da acetil-CoA derivada de acetato estende-se para além de ser um substrato bioenergético e um precursor lipogênico, incluindo também a acetilação de proteínas e metabolitos. Estudos mostraram que o tratamento com acetato, em modelos murinos de neuroinflamação induzida por Lipopolissacarídeo (LPS), foi capaz de inibir a atividade de histonas deacetilases (HDACs), enzimas que catalisam a remoção de grupos acetil de histonas, influenciando diretamente na expressão gênica (SOLIMAN e ROSENBERGER, 2011; BRISSETTE *et al.*, 2012; SOLIMAN, PUIG, *et al.*, 2012; SOLIMAN, SMITH, *et al.*, 2012). Nestes, o tratamento ocasionou aumento da acetilação de histonas, com aumento da atividade de histonas acetiltransferases (HATs). Ocorreu ainda redução da expressão de IL-1 β , citocina pró-inflamatória, sugerindo que o tratamento resultou em redução da neuroinflamação (SOLIMAN, SMITH, *et al.*, 2012). Pesquisas que avaliaram o efeito do acetato em modelo de neuroborreliose em ratos encontraram efeitos semelhantes, com redução da ativação de microglia e da expressão cerebral de IL-1 β (BRISSETTE *et al.*, 2012). O acetato foi também testado em culturas de microglia estimuladas com LPS. O tratamento reverteu a hipoacetilação de histona (H3K9) induzida pelo LPS e reduziu a expressão proteica de IL-6, IL-1 β e TNF- α (SOLIMAN, PUIG, *et al.*, 2012).

Contudo, a extensão até a qual a disponibilidade de acetato pode influenciar marcas epigenéticas específicas e níveis globais de acetilação precisa ser determinada. O acetato pode se tornar uma fonte substancial de acetil-CoA celular quando outras fontes de carbono (por exemplo, glicose e glutamina) são limitadas, e a utilização de acetato dependerá da sua disponibilidade, eficiência de absorção e expressão de enzimas captadoras de acetato (Exemplo, ACSS1 e ACSS2) (SCHUG, VANDE VOORDE e GOTTLIEB, 2016).

Foi demonstrado que a suplementação alimentar com acetato aumenta sua concentração em 17 vezes e de acetil-CoA em 2,2 vezes no cérebro de camundongos (MATHEW *et al.*, 2005). O acetato atravessa a barreira hemato-encefálica (DEELCHAND *et al.*, 2009) e é assimilado preferencialmente por astrócitos, antes da ativação de acetil-CoA pela acetil-CoA sintetase (WANIEWSKI e MARTIN, 1998; HALLOWS, LEE e DENU, 2006).

O acetato pode aumentar os níveis de acetil-CoA e abastecer duas reservas energéticas no SNC. Especula-se que a energia gerada como resultado do metabolismo mitocondrial de acetil-CoA seja armazenada na forma de fosfocreatinina (PCr) (BHATT *et al.*, 2013) e, quando requerida, é rapidamente convertida em ATP

(Figura 7) (MEYER *et al.*, 1984). A PCr se mostrou neuroprotetora em modelos animais (ARUN *et al.*, 2010) e o aumento de seu estoque neuronal protege os neurônios contra danos por hipóxia, toxicidade induzida por glutamato e por β -amiloide (BREWER e WALLIMANN, 2000; BALESTRINO *et al.*, 2002).

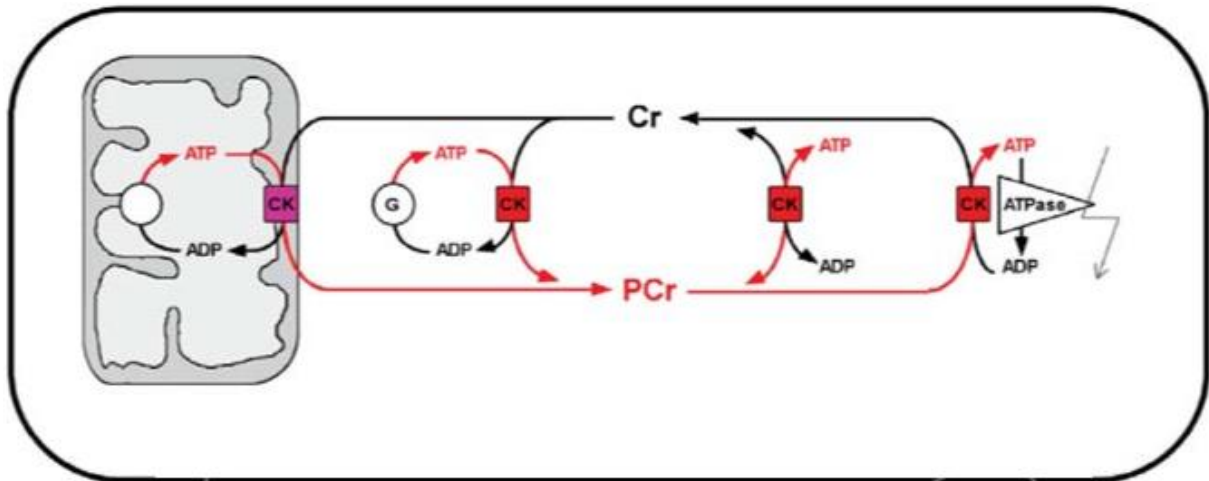


Figura 7: Sistema de transferência energética creatina quinase/fosfocreatina. As enzimas creatina cinase (CK) mitocondrial e citosólica são específicas para cada compartimento celular. Elas estão associadas com o ATP sintetizado vindo de processos metabólicos, bem como ao consumo de ATP em funções celulares. Devido ao alto poder de difusão da fosfocreatina em comparação com o ATP, este sistema apresenta um perfil de tampão energético espacial e temporal. Fonte: (SAKS *et al.*, 2006).

Outra hipótese é apoiada na ação de corpos cetônicos (acetoacetato e beta-hidroxibutirato), que são sintetizados no fígado a partir da acetil-CoA gerada pela beta-oxidação de ácidos graxos, quando os níveis de acetil-CoA excedem a capacidade de utilização no ciclo TCA (Figura 8) (JAWORSKI, NAMBOODIRI e MOFFETT, 2016). A dieta cetogênica, uma dieta rica em lipídios, moderada em proteínas e baixa em carboidratos, imita o jejum e aumenta significativamente as concentrações séricas de beta-hidroxibutirato e acetoacetato (HARTMAN e VINING, 2007). Recentes estudos mostram que os corpos cetônicos e seus componentes tem efeito neuroprotetor para doenças neurológicas agudas e crônicas, particularmente no tratamento de epilepsia em crianças, patologias relacionadas com a deficiência das enzimas GLUT-1, piruvato desidrogenase e defeitos da glicólise cerebral (HARTMAN e VINING, 2007; KIM e RHO, 2008; NEI *et al.*, 2014). A dieta cetogênica é considerada segura porque os níveis de cetona são auto-limitantes, uma vez que os corpos cetônicos em excesso são excretados na urina (JAWORSKI, NAMBOODIRI e MOFFETT, 2016).

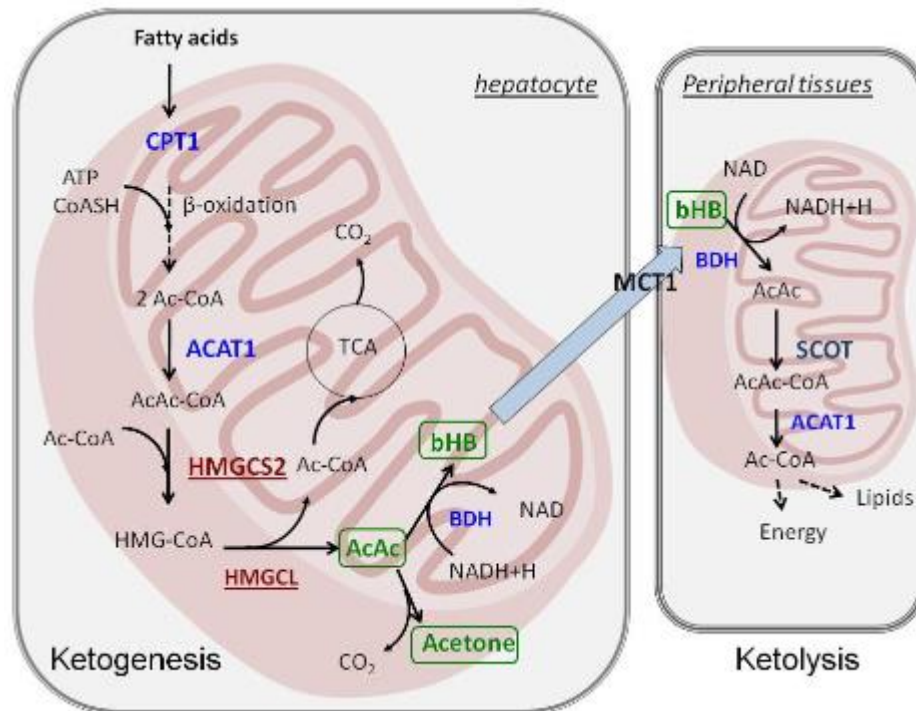


Figura 8: Metabolismo de corpos cetônicos. A cetogênese ocorre em mitocôndrias de hepatócitos, enquanto que a cetólise envolve a utilização de corpos cetônicos nas mitocôndrias dos tecidos periféricos. ACAT1: acetoacetil-CoA tiolase, Ac-CoA: acetil-CoA, AcAc-CoA: acetoacetil-CoA, BDH: β-hidroxiacetil-CoA desidrogenase, bHB: β-hidroxiacetil-CoA, CPT1: carnitina palmitoiltransferase 1, HMGCL: HMG-CoA liase, HMGCS2: HMG-CoA sintetase, MCT1: transportador de monocarboxilato 1, SCOT: succinil-CoA transferase, TCA: ciclo dos ácidos tricarbóxicos. Fonte: (GRABACKA *et al.*, 2016).

O mecanismo pelo qual a dieta cetogênica leva à redução das crises epiléticas ainda não está esclarecido; sugere-se que a oferta excessiva de gorduras é capaz de manter o mecanismo metabólico de inanição, pois nesta situação, este macronutriente é utilizado como fonte energética no lugar da gordura estocada, criando e mantendo um estado de cetose (PRASAD, STAFSTROM e HOLMES, 1996). O efeito sedativo dos corpos cetônicos (acetoacetato e β-hidroxiacetil-CoA), a concentração destes no plasma, o grau de acidose, a desidratação parcial, a mudança na concentração lipídica e a adaptação metabólica energética do cérebro decorrentes desta cetose seriam os principais fatores envolvidos e responsáveis pelo controle das crises (SWINK, VINING e FREEMAN, 1997; KATYAL *et al.*, 2000).

A demonstração de que o sistema nervoso central é capaz de metabolizar corpos cetônicos sugere que estes possam estar relacionados com o efeito desta dieta (OWEN *et al.*, 1967). Os corpos cetônicos contribuem não só como fonte de energia para o cérebro, mas também para constituintes cerebrais dependentes de glicose (GABA e glutamato). Como a oxidação de ácidos graxos produz uma grande

quantidade de ATP, sugere-se que o aumento das reservas energéticas cerebrais seja um fator protetor contra as crises (WHELESS, BAUMGARTNER e GHANBARI, 2001).

Outra molécula relacionada ao estoque de energia é o N-acetilaspártato (NAA). Estudos recentes, muitos deles voltados para a Esclerose Múltipla (EM), têm mostrado a importância energética e estrutural do NAA na neuroproteção. Isto é interessante, uma vez que o excesso de glutamato na EM causa citotoxicidade em neurônios, conforme já mencionado, e a via para a formação de NAA se utiliza desse glutamato disponível. A acetilação do aspártato pela enzima neuronal aspártato N-acetiltransferase resulta na formação de NAA, que é exportado pela mitocôndria. A formação de NAA favorece a conversão do glutamato em α -cetoglutarato, que é um mecanismo em neurônios para contornar a lenta reação da citrato sintase no ciclo do ácido tricarbóxico. Os níveis de NAA são considerados como um marcador da função mitocondrial e integridade axonal (YUDKOFF et al., 1994; CAMBRON *et al.*, 2012). O NAA produzido nas mitocôndrias axonais é liberado no espaço extracelular e captado pelos oligodendrócitos para a manutenção da mielina (Figura 9) (ANDO *et al.*, 2003). Nos oligodendrócitos, a aspártatoacilase cliva a porção acetato do NAA para utilização na síntese de ácido graxos e esteroides que são utilizados como blocos de construção para a síntese de lipídios de mielina (MOFFETT *et al.*, 2007). Os axônios que perdem sua bainha de mielina são propensos à degeneração, como ocorre na EM (IRVINE e BLAKEMORE, 2008). Cria-se então um ciclo de eficiência energética e produção da mielina, tendo o acetato como principal componente neuroprotetor.

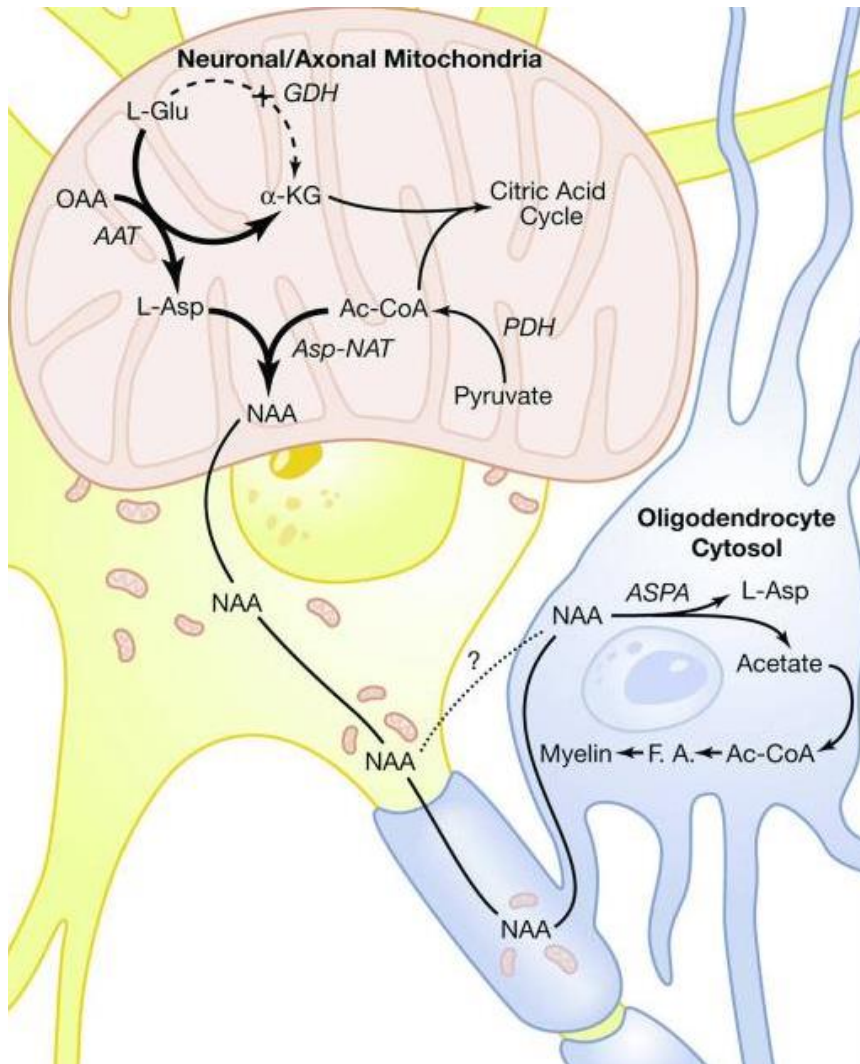


Figura 9: Síntese e degradação de NAA. OAA, ácido oxaloacético; A-KG, α -cetoglutarato; AAT, aspartato aminotransferase; GDH, glutamato desidrogenase; PDH, piruvato desidrogenase; F.A., ácidos graxos; Ac-CoA, acetil CoA. Fonte: (MADHAVARAO *et al.*, 2005).

Todas essas informações dos estudos sobre a manutenção da integridade neuronal são utilizadas para se entender a patologia de diversas doenças neurológicas. O conjunto de dados da literatura disponível até o momento sugere que o acetato promove a acetilação de DNA no SNC através de diferentes mecanismos que variam de acordo com a dose e o tempo de tratamento. O resultado dessa maior acetilação se manifesta na modulação parâmetros inflamatórios, como a expressão de citocinas anti-inflamatórias da imunidade inata (SOLIMAN e ROSENBERGER, 2011; BRISSETTE *et al.*, 2012; SOLIMAN, PUIG, *et al.*, 2012; SOLIMAN, SMITH, *et al.*, 2012). Pode-se especular que o efeito final dessa cadeia de eventos *in vivo* seja a preservação de neurônios e uma melhor evolução clínica em situações de neuroinflamação.

1.4 CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y

A linhagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, descrita pela primeira vez no final da década de 1970 (BIEDLER *et al.*, 1978), é um subclone derivado do neuroblastoma SK-N-SH, proveniente da medula óssea de uma fêmea de quatro anos de idade. Tais células são comumente utilizadas em estudos relacionados com o neuroblastoma e doenças neurodegenerativas. Quando em cultura, elas se assemelham com neuroblastos do sistema simpático, apresentando morfologia epitelial com citoplasma escasso (BIEDLER *et al.*, 1978). Células desta linhagem estão estacionadas nos estágios iniciais da diferenciação neuronal e são caracterizadas bioquimicamente pela escassez de marcadores neuronais (CONROY e BERG, 1995; GILANY *et al.*, 2008). Elas apresentam características dopaminérgicas, pois expressam baixos níveis de enzimas da via de síntese das catecolaminas, incluindo a tirosina-hidroxilase (TH), dopamina- β -hidroxilase e transportador de dopamina (DAT) (XIE, HU e LI, 2010).

A capacidade dos pesquisadores em diferenciar células SH-SY5Y em células que possuam um fenótipo semelhante a neurônios mais maduros, através da manipulação do meio de cultura, tem proporcionado inúmeros benefícios no campo da pesquisa em neurociência. As vantagens incluem a capacidade de expansão em larga escala antes da diferenciação, com relativa facilidade e baixo custo para a cultura em comparação com os neurônios primários (AGHOLME *et al.*, 2010). Uma vez que estas células são consideradas uma linhagem celular, as preocupações de ordem ética associadas com a cultura neuronal humana primária não estão envolvidas. Além disso, como as células SH-SY5Y são derivadas de humanos, elas expressam uma série de proteínas específicas de humanos e isoformas de proteínas que não estão presentes em culturas primárias de roedores (KOVALEVICH e LANGFORD, 2013).

Apesar da origem tumoral, muitos estudos mostraram que as células SH-SY5Y podem ser diferenciadas em neurônios dopaminérgicos através do tratamento com Ácido Retinóico (AR) (PAHLMAN *et al.*, 1984). O AR é a forma biologicamente ativa da vitamina A, necessária para o desenvolvimento normal, bem como diferenciação e morfogênese de diversos órgãos e sistemas, a exemplo do sistema nervoso (BAIN *et al.*, 1995). O papel dessa neurotrofina na diferenciação neuronal é

mediado através de Receptores ao Ácido Retinóico (RAR) e Receptores Retinóides X (RXR) (MARK, GHYSELINCK e CHAMBON, 2006). *In vitro*, o AR promove a diferenciação e inibe a divisão celular, bloqueando a fase G1/S do ciclo celular (MALIK, BLUSZTAJN e GREENWOOD, 2000). Dessa forma, o AR regula a transição das células precursora para a célula diferenciada pós-mitótica (ROSS *et al.*, 2000). A indução do processo de diferenciação ocorre pelo aumento da produção de catecolaminas, da expressão da enzima enolase e pela expressão de fatores de crescimento. Isso leva à formação de projeções citoplasmáticas (neuritos), induzindo as células a modificarem sua morfologia epitelial para uma forma estrelada (EDSJO, HOLMQUIST e PAHLMAN, 2007). Células SH-SY5Y diferenciadas com AR são um modelo adequado de estudo de doenças que acometem neurônios, uma vez que elas passam a apresentar características morfológicas, como formato estrelado e crescimento de neuritos alongados, além de características bioquímicas, como a expressão dos marcadores neuronais TH enolase neurônio-específica (NSE) e proteína nuclear específica de neurônio (NeuN), ocorrendo concomitante diminuição de marcadores de células não diferenciadas (LOPES *et al.*, 2012).

1.5 CÉLULAS-TRONCO HUMANAS DE POLPA DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED)

Células-tronco (CT) são células capazes de se autorrenovar e se diferenciar para uma linhagem celular específica, tendo por isso recebido considerável atenção da sociedade. Avanços tecnológicos têm ajudado a identificar o potencial das mesmas, particularmente no que se refere à sua capacidade regenerativa em modelos transplantados, bem como atuando em modelos de estudo do comportamento celular (SILVA *et al.*, 2012; STERNECKERT, REINHARDT e SCHOLER, 2014).

Estudos demonstraram que as células-tronco, via co-cultivo ou substituição por meio condicionado, exercem efeitos neuroprotetores sobre a toxicidade mediada por glutamato em células neuronais, particularmente devido à secreção de fatores neurotróficos, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator de crescimento do nervoso (NGF) (LU *et al.*, 2011). Alternativamente, Voulgari-

Kokota e colaboradores mostraram, em 2012, que células-tronco podem atuar sobre neurônios corticais de camundongos, reduzindo os níveis de mRNA de genes relacionados à codificação de subunidades de NMDA nos mesmos, enquanto aumentam os níveis de expressão de genes associados com funções não-neuronais e de linhagens progenitoras (VOULGARI-KOKOTA *et al.*, 2012). Com isso, percebe-se que células-tronco podem mediar uma neuroproteção direta reduzindo a sensibilidade neuronal aos ligantes do receptor de glutamato e alterando a expressão gênica, sugerindo uma ligação entre os efeitos terapêuticos das MSC e a ativação da plasticidade celular no SNC danificado, em situações de neurodegeneração.

Em 2003, Miura e colaboradores relataram a detecção de células-tronco multipotentes em meio a células de polpa de dentes de leite decíduos esfoliados (SHED) (MIURA *et al.*, 2003). Tais células despertaram interesse imediato por terem características semelhantes à população de células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMSC), sendo essa última melhor caracterizada. Essa década de estudos sobre as SHED, no entanto, mostrou consistentemente que suas capacidades de proliferação e diferenciação são superiores às BMSCs (GIORDANO *et al.*, 2011). Além disso, o procedimento para coleta de medula óssea é invasivo, necessitando de anestesia e afastamento das atividades diárias, enquanto a perda do dente de leite é um processo natural que ocorre durante a infância; sua extração é normalmente indolor e minimamente invasiva (CORDEIRO *et al.*, 2008).

Quando comparadas às células-tronco provenientes da medula óssea e da polpa de dentes permanentes, notou-se que as SHED apresentam maior taxa de proliferação. Além disso, os dados desse estudo indicam que as SHED possuem habilidade de se diferenciarem em células odontoblásticas funcionais, adipócitos e células neurais, além de estimularem a osteogênese após transplantação *in vivo* (MIURA *et al.*, 2003). Em 2010, foi publicada a primeira aplicação clínica da SHED no tratamento da doença de Parkinson, e os resultados preliminares foram encorajadores (WANG *et al.*, 2010).

Estudos com as células-tronco são de grande interesse para a ciência, pois elas possuem a capacidade de estimular a regeneração tecidual e, conseqüentemente, apresentam diversas perspectivas terapêuticas. Nesse sentido, ressalta-se a importância do acetato, haja vista que estudos demonstraram o papel modulador do mesmo sobre a proliferação celular no epitélio intestinal, induzindo bloqueio do ciclo celular (MATSUKI *et al.*, 2013).

1.6 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

De posse dessas informações, observa-se como o acetato, sendo precursor de Acetil-CoA, é um componente central em inúmeras vias metabólicas, muitas delas ligadas à neuroproteção, bem como à proliferação celular. Entretanto, há poucos registros na literatura que tratem de seus efeitos sobre a viabilidade e diferenciação celular. Nesse sentido, o presente estudo teve por objetivo avaliar a possibilidade de citoproteção do acetato mediante glutamato, comumente utilizado em estudos de citotoxicidade do sistema nervoso, e seu efeito na proliferação e diferenciação celular. Para tal, foram utilizadas células SH-SY5Y, importante modelo de estudo de patologias neurológicas, bem como células SHED, por sua capacidade terapêutica e potencial efeito neuroprotetor. Assim, esperou-se verificar, a nível celular, *in vitro*, se a suplementação com acetato é benéfica no tratamento de patologias do sistema nervoso.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o possível efeito citoprotetor, atuação na proliferação e diferenciação do acetato frente à citotoxicidade mediada por glutamato em linhagem de células SH-SY5Y e SHED.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar efeitos celulares, tais como proliferação, viabilidade, inibição e citotoxicidade, do acetato de sódio e glutamato, isoladamente, em células SH-SY5Y e SHED;
- Determinar o IC50% para acetato e glutamato, que corresponde à concentração capaz de inibir 50% da proliferação celular *in vitro*.
- Determinar a provável concentração citoprotetora de acetato nas células SH-SY5Y e SHED, mediante tratamento com a IC50% de glutamato.
- Avaliar o efeito do acetato na diferenciação de células SH-SY5Y e SHED;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTIVO CELULAR

As células SH-SY5Y (ATCC, USA) foram gentilmente cedidas em colaboração com o Prof. Jean Pierre Schatzmann Peron, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (USP). Inicialmente, elas foram semeadas em frascos T25 (Corning, USA), utilizando meio DMEM/F12 suplementado com 15% (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB - LGC Biotecnologia, Brasil), 100 U/mL de penicilina (LGC Biotecnologia, Brasil), 100 µg/mL de estreptomicina (LGC Biotecnologia, Brasil), sendo em seguida armazenadas em uma incubadora umidificada, à atmosfera de 95% ar e 5% CO₂ (REVCO 3000, Thermo Scientific, USA), temperatura de 37°C. O meio foi trocado a cada 72h. As linhagens de células tronco da polpa dentária de dentes decíduos (SHED) foram obtidas de crianças saudáveis, após aprovação pelo Comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEP/UFJF Parecer nº 03/2011, em anexo) e se encontram estocadas no Biobanco Genética Humana e Terapia Celular (GENETEC; CONEP Parecer nº 22/2015, em anexo) da Universidade Federal de Juiz de Fora. O procedimento de cultivo adotado foi o mesmo das SH-SY5Y, com a diferença de que o meio basal utilizado foi alfa-MEM (LGC Biotecnologia), suplementado com 10% (v/v) de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (LGC Biotecnologia), 0,01 mM de aminoácidos não essenciais (LGC Biotecnologia, Brasil) e 2 mM de L-glutamina (LGC Biotecnologia, Brasil).

3.2 REAGENTES

A solução estoque de glutamato a 0,2 M foi preparada por diluição de glutamato monossódico (pó, Sigma-Aldrich, USA) em meio de cultivo DMEM/F12, seguido de filtração em microfiltros de 0,22 µm (Millipore, USA). Solução estoque de acetato a 0,1 M foi preparada por diluição de acetato de sódio (pó, LGC Biotecnologia,

Brasil) em solução PBS 1x (LGC Biotecnologia, Brasil); em seguida, o pH foi ajustado para 7,4, com posterior filtração. Solução estoque de ácido retinóico a 10 μ M foi preparada por diluição de acetato de retinol (pó, Sigma-Aldrich, USA) em etanol absoluto (LGC Biotecnologia, Brasil), seguido de filtração. Todas as soluções foram armazenadas a -4°C , sendo trocadas a cada quatorze dias.

3.3 VIABILIDADE CELULAR

Ao atingir 80% de confluência, as células foram desagregadas por ação enzimática de Tripsina (LGC Biotecnologia, Brasil) por 3 minutos a 37°C , contadas em Câmara de Neubauer, e uma densidade de cerca de 5×10^4 células/poço foi transferida para placas de 96 poços (Corning, USA), (Dia 0). A influência de glutamato e acetato sob a proliferação, em células SH-SY5Y e SHED, foi verificada através do ensaio de MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difeniltetrazólio). Este ensaio tem como objetivo geral avaliar a viabilidade celular, sendo utilizado para determinar a toxicidade de vários fármacos em diferentes concentrações. As células foram tratadas com diferentes concentrações de acetato e glutamato, isoladamente, 24 horas após o plaqueamento (Dia 1) (Figura 10). Após determinação do IC50% para cada composto, foi realizado um tratamento combinado de glutamato e acetato (Figura 11). O tratamento controle envolveu a adição, juntamente com o meio basal suplementado, de solução PBS a 25 mM e/ou etanol a 10 μ M, para os ensaios com acetato e/ou ácido retinóico, respectivamente, tendo em vista que ambos constituem o veículo das referidas soluções.

As leituras foram realizadas 3, 5 e 7 dias após a adição de glutamato e/ou acetato. O meio de cultivo foi removido e foram adicionados 90 μ L de meio puro mais 10 μ L de MTT (Sigma-Aldrich, USA). Em seguida, a placa foi mantida no escuro na estufa por 4 horas e, após esse período, o meio mais MTT foi removido e 100 μ L de álcool isopropílico ácido foram adicionados. A placa foi mantida no escuro na estufa por 1 hora, o sobrenadante foi transferido para uma nova placa e, como controle, 100 μ L de álcool isopropílico ácido foram adicionados. A proliferação foi avaliada em espectrofotômetro (Thermo Scientific Varioskan Flash, USA) à absorvância de 570 nm

(MOSMANN, 1983). Os experimentos foram realizados durante 3, 5 e 7 dias, em 12 repetições.

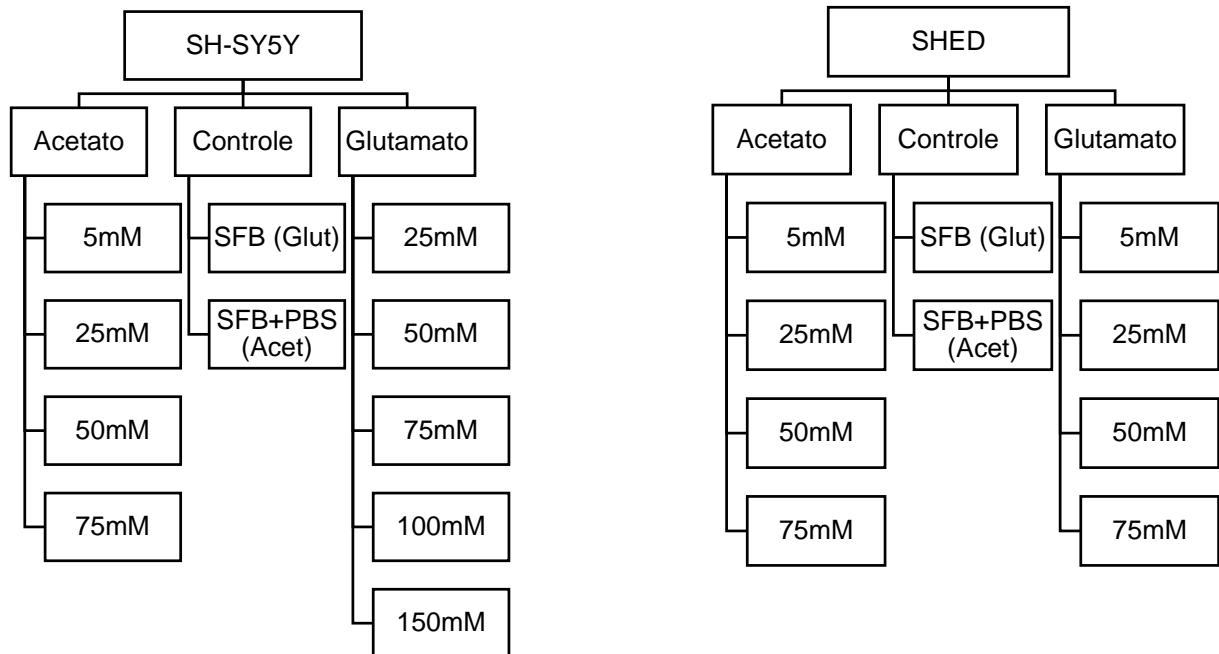


Figura 10: Representação esquemática dos gradientes de glutamato e acetato utilizados, bem como das soluções controle; n=12 para cada concentração de cada grupo.

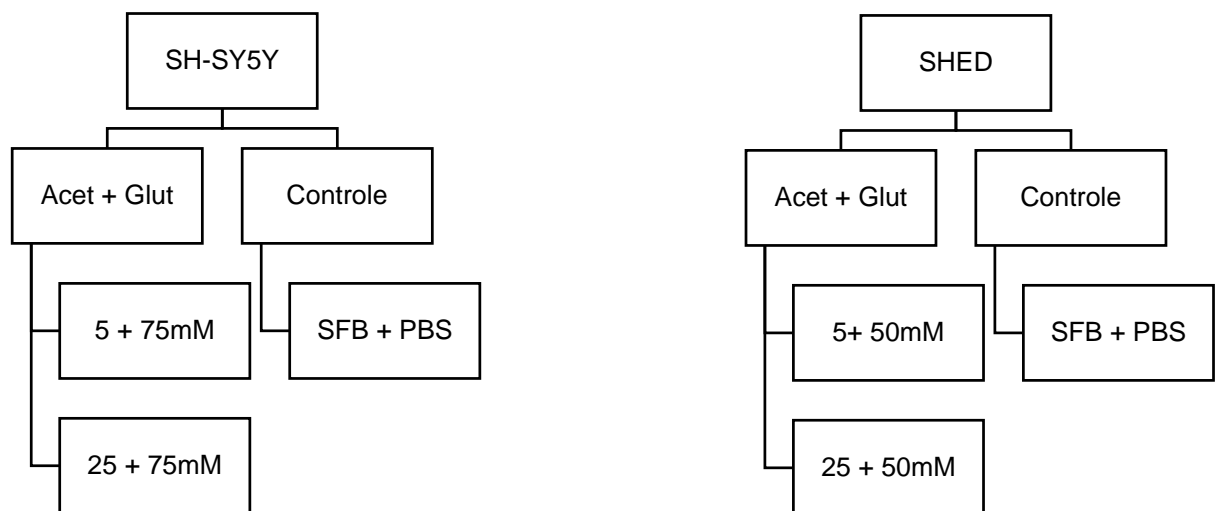


Figura 11: Representação esquemática dos tratamentos combinados de acetato e glutamato utilizados, bem como das soluções controle; n=12 para cada concentração de cada grupo.

3.4 DIFERENCIAÇÃO NEURONAL E CONTAGEM DE NEURITOS EM CÉLULAS SH-SY5Y

Após confluência, as células SH-SY5Y foram distribuídas em 10 Placas de Petri 35x10 mm (Corning, USA) a uma densidade de 1×10^5 células. A indução da diferenciação celular ocorreu após 24 horas, período que permite o estabelecimento e aderência das mesmas às placas. O meio de indução da diferenciação teve redução do SFB para 1% (v/v) no meio de cultivo e suplementação deste com $10 \mu\text{M}$ de ácido retinóico (AR). Esse tratamento foi repetido a cada três dias pela substituição por meio de cultivo contendo ácido retinóico, durante um intervalo de 10 dias (LOPES *et al.*, 2012).

A morfologia e a densidade de neuritos em células SH-SY5Y foram avaliadas após 10 dias de diferenciação. Oito campos foram selecionados aleatoriamente e fotografados utilizando o microscópio invertido Nikon TS100F, e os dados foram analisados com o software Motic Images Plus 2.0. As células foram contadas após 10 dias de tratamento e o número de células diferenciadas foi expresso como uma média do total \pm EPM, $n = 3$. Considerou-se uma célula como diferenciada quando ela apresentou pelo menos um neurito de comprimento maior do que o corpo da célula (DWANE, DURACK e KIELY, 2013). O comprimento dos neuritos que se estendem a partir das células SH-SY5Y após a diferenciação de 10 dias foi medido e o comprimento médio para cada matriz foi expresso em um gráfico \pm EPM, $n = 3$. Diferenças significativas foram medidas por teste *t* de Student.

Vale ressaltar que, após alguns meses de experimentação, os vials de células SH-SY5Y disponíveis, quando descongelados, apresentaram contaminação, razão pela qual não foi possível realizar testes de viabilidade nesta linhagem após diferenciação. Não tendo mais tempo viável de se obter outras linhagens dessas células e realizar os experimentos para fechamento da presente dissertação, decidimos, nesse ponto do trabalho, encerrar os experimentos com essas células.

3.5 DIFERENCIAÇÃO ÓSSEA E MENSURAÇÃO DO NÍVEL DE CALCIFICAÇÃO EM CÉLULAS SHED

Para as células SHED, também plaqueadas em 10 placas de 35x10 mm, houve substituição do meio de cultivo por DMEM Low-Glicose (LGC Biotecnologia, Brasil) suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10^{-7} M de dexametasona (Sigma, USA), 50 µM de 2-fosfato ácido ascórbico (Sigma, USA), 2 mM de β-glicerolfosfato (Sigma, USA). Além destes, houve o acréscimo de solução de acetato a 25 mM ou AR a 10 µM, conforme o tratamento. A cultura foi mantida por 21 dias, substituindo o meio de cultivo a cada 3 dias. Para a mensuração dos níveis de cálcio, foram adicionados 250 µL da solução de extração feita com ácido acético a 1% e metanol (4:1, respectivamente) em cada placa previamente corada com Vermelho de Alizarina e, em seguida, as placas foram levadas ao agitador (Forma Orbital Shaker, Thermo, USA) por 30 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo das mesmas foi transferido para uma placa de 96 poços e 200 µL da solução de extração foram utilizados em 3 poços como branco para calibragem do espectrofotômetro (Thermo Scientific Varioskan Flash, USA). A quantificação do cálcio foi monitorada pela absorbância à 570 nm.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados pelo teste estatístico ANOVA de uma ou duas vias, bem como pelo teste de Kruskal-Wallis, quando apropriado, de acordo com a normalidade pelo teste de D'Agostino & Pearson. A análise estatística foi feita no programa GraphPadPrism 6.0 (USA). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO ACETATO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS SH-SY5Y E SHED

Primeiramente, foi investigado a influência do acetato sobre a viabilidade de células de neuroblastoma humano. A Figura 12 mostra que, após sete dias de incubação, a concentração de 5 mM de acetato apresentou menor influência sobre a viabilidade celular das culturas de neuroblastoma humano. As concentrações de 25 a 75 mM resultaram em significativa ($p < 0,001$) redução na viabilidade das células.

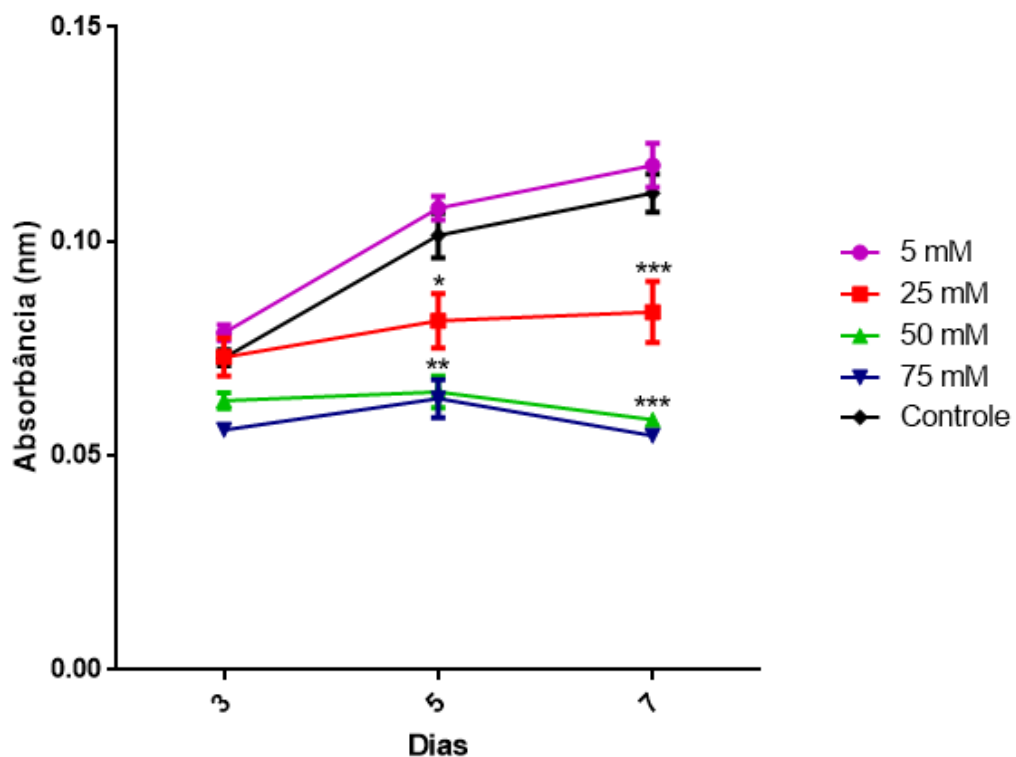


Figura 12: Efeito do acetato na viabilidade celular em neuroblastoma humano (SH-SY5Y). As células foram incubadas com acetato em diferentes concentrações durante 3, 5 e 7 dias. Resultados expressos como Média \pm EPM (n=12). Controle vs Todos. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Para as células-tronco de polpa de dente decíduo esfoliado, submetidas ao mesmo tratamento, a Figura 13 também mostra que a concentração de 5 mM de acetato exerceu menor influência sobre a viabilidade celular de SHED, enquanto que

as concentrações de 25 a 75 mM comprometem a mesma significativamente após sete dias de incubação. Por esse motivo, foram escolhidas as concentrações de acetato de 5 mM, que não influenciou na proliferação celular, e 25 mM, uma vez que a literatura mostra que o efeito citoprotetor do acetato acompanha redução da proliferação celular (MATSUKI *et al.*, 2013), para utilização no tratamento combinado com glutamato, haja vista que o propósito deste experimento é verificar o possível efeito citoprotetor de acetato.

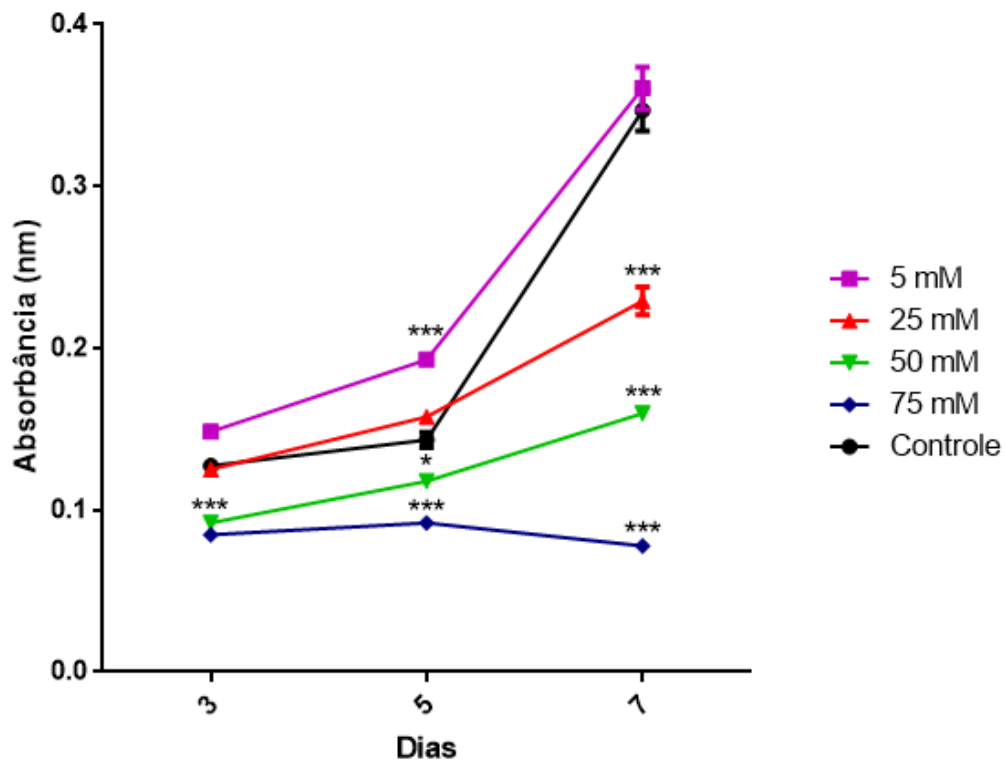


Figura 13: Efeito do acetato na viabilidade celular em célula-tronco humana de polpa de dente decíduo esfoliado (SHED). As células foram incubadas com acetato em diferentes concentrações durante 3, 5 e 7 dias. Resultados expressos como Média \pm EPM (n=12). Controle vs Todos. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

4.2 EFEITO DO GLUTAMATO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS SH-SY5Y E SHED

Em seguida, foi investigado a citotoxicidade de glutamato sobre as células SH-SY5Y. A Figura 14 mostra que o glutamato apresentou IC50% próximo ao

tratamento de 75 mM, com absorvância de 0,0592 nm, quando comparado ao controle, com 0,0940 nm.

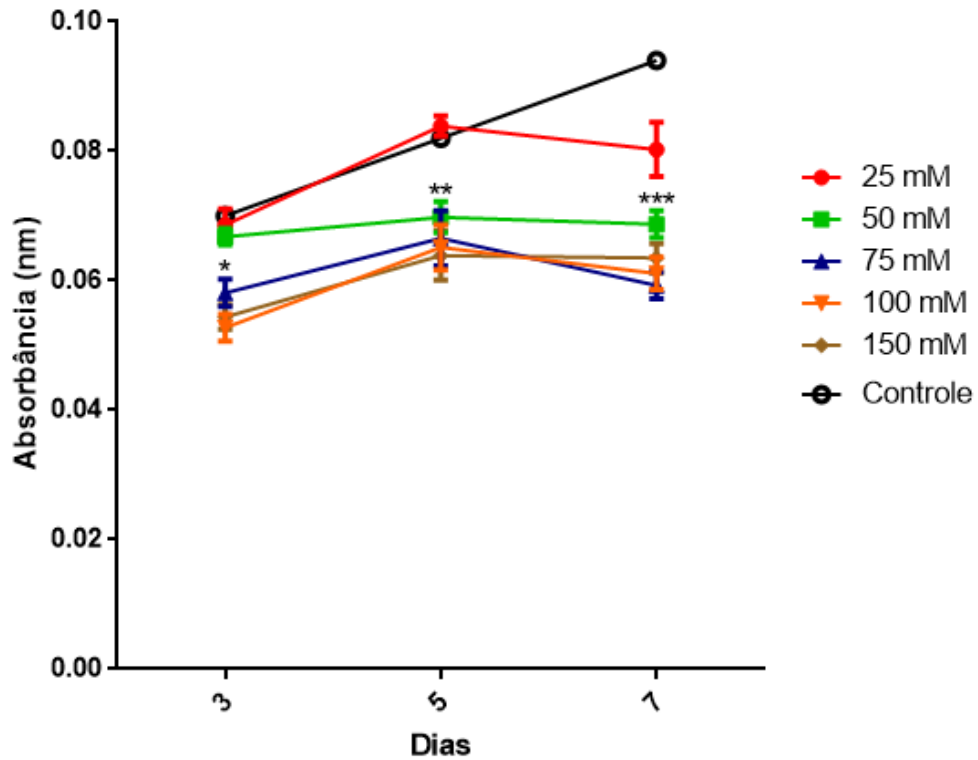


Figura 14: Efeito do glutamato na viabilidade celular em neuroblastoma humano (SH-SY5Y). As células foram incubadas com glutamato em diferentes concentrações durante 3, 5 e 7 dias. Resultados expressos como média \pm e.p.m (n=12). Resultados expressos como Média \pm EPM (n=12). Controle vs Todos. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Para as células SHED, as concentrações de glutamato utilizadas foram 5, 25, 50 e 75 mM. É possível observar que o glutamato apresenta IC50% próximo ao tratamento de 50 mM, com absorvância de 0,1509 nm, quando comparado ao controle, com 0,3520 (Figura 15).

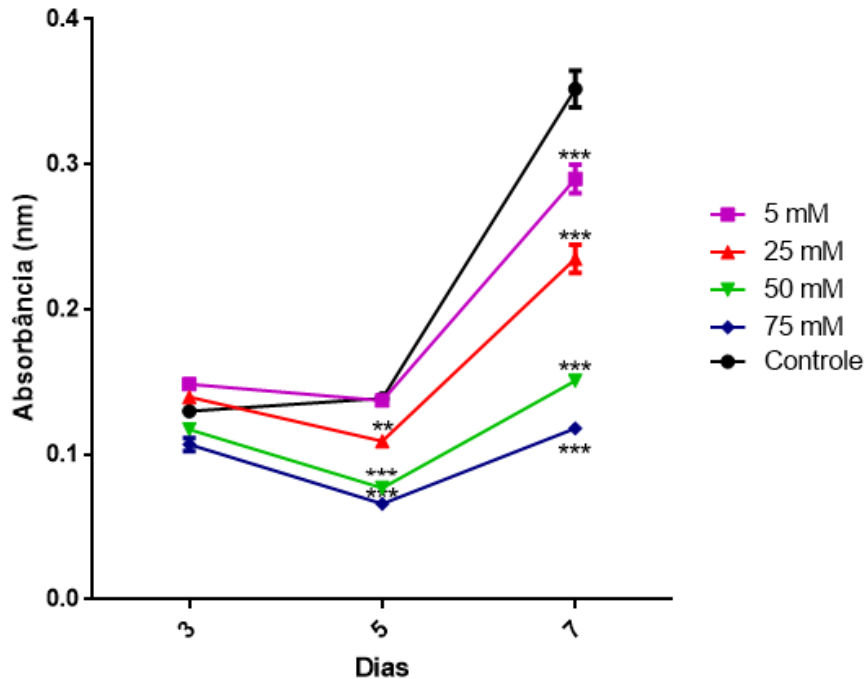


Figura 15: Efeito do glutamato na viabilidade celular em célula-tronco humana de polpa de dente decíduo esfoliado (SHED). As células foram incubadas com glutamato em diferentes concentrações durante 3, 5 e 7 dias e a viabilidade determinada pelo ensaio de MTT. Resultados expressos como média \pm e.p.m (n=12). Resultados expressos como Média \pm EPM (n=12). Controle vs Todos. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

4.3 EFEITO COMBINADO DE ACETATO E GLUTAMATO SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS SH-SY5Y E SHED

Para verificar se o tratamento com acetato exerce algum efeito citoprotetor mediante o glutamato, as células foram submetidas a tratamentos contendo concentrações de glutamato referente ao IC50% observados nos experimentos de viabilidade. A linhagem SH-SY5Y foi tratada, simultaneamente, com glutamato 75 mM e acetato 5 ou 25 mM, durante 3, 5 e 7 dias. Para a SHED, utilizou-se glutamato 50 mM. O meio de cultivo foi substituído a cada 48 horas para restabelecer os níveis de glutamato e acetato. Conforme as figuras 16 e 17, notou-se que o acetato não influenciou na citotoxicidade provocada por glutamato.

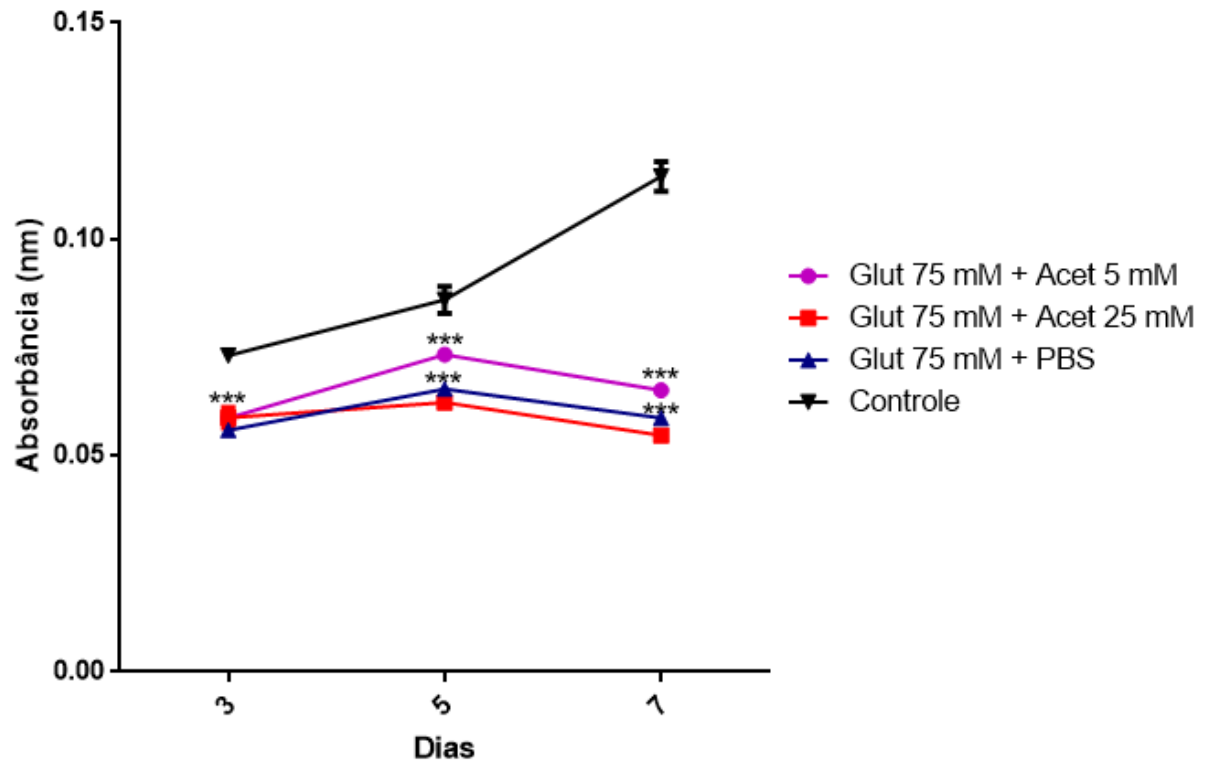


Figura 16: Efeito do tratamento combinado de acetato e glutamato na viabilidade celular em neuroblastoma humano (SH-SY5Y). As células foram incubadas com acetato 5 e 25 mM, bem como glutamato 75 mM, durante 3, 5 e 7 dias e a viabilidade determinada pelo ensaio de MTT. Resultados expressos como Média \pm EPM (n=12). Controle vs Todos. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

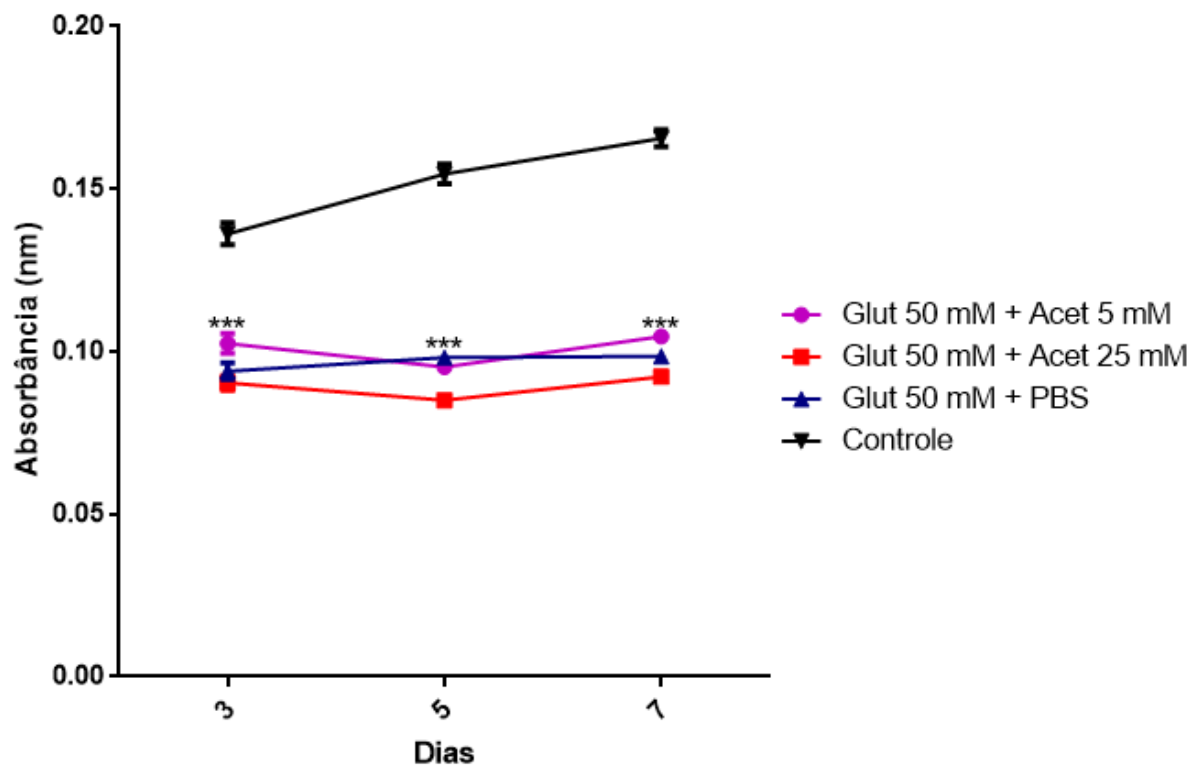


Figura 17: Efeito do tratamento combinado de acetato e glutamato na viabilidade celular em célula-tronco humana de polpa de dente decíduo esfoliado (SHED). As células foram incubadas com acetato 5 e 25 mM, bem como glutamato 50 mM, durante 3, 5 e 7 dias e a viabilidade determinada pelo ensaio

de MTT. Resultados expressos como Média \pm EPM (n=12). Controle vs Todos. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

4.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL INDUZIDA POR ÁCIDO RETINÓICO EM CÉLULAS SH-SY5Y

Para demonstrar que as células SH-SY5Y podem ser diferenciadas para um fenótipo tipo neuronal com o tratamento com ácido retinóico, foram analisadas as alterações na morfologia celular. Observou-se uma diminuição significativa da taxa de proliferação celular e a indução de crescimento prolongado de neuritos pelo protocolo de diferenciação das células SH-SY5Y (Figura 18). As células que cresceram exponencialmente mantiveram uma morfologia indiferenciada típica (Figura 18A), enquanto que as diferenciadas apresentaram morfologia estrelada, com neuritos mais proeminentes (Figura 18B).

Em relação às alterações morfológicas, nota-se que células tratadas com AR apresentam um aumento no comprimento médio de neuritos (Figura 19) e por células portadoras de neuritos (Figura 20), na proporção de células portadoras de neuritos (Figura 21), na quantidade de neuritos por célula portadora (Figura 22). A figura 23 mostra que o AR ocasionou uma leve diminuição no número de células em relação ao controle.

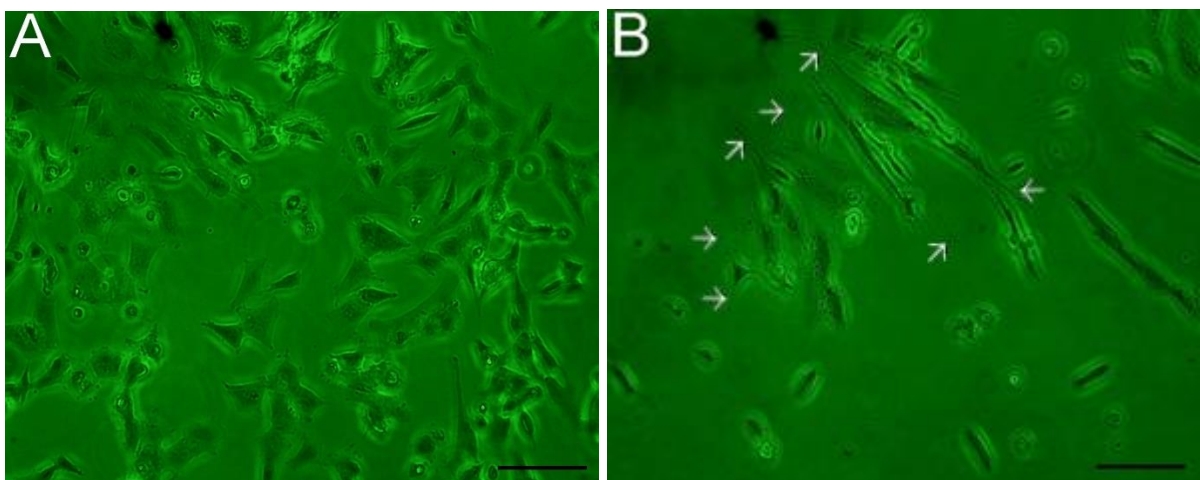


Figura 18: Parâmetro morfológico de células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico. Imagens de contraste de fase representativas de células SH-SY5Y proliferativas em meio de cultura com 15% (v/v)

de SFB (A). Imagens de contraste de fase representativas da linhagem SH-SY5Y diferenciada com ácido retinóico $10\mu\text{M}$ durante 10 dias em meio de cultura com 1%(v/v) de FBS; neuritos indicados por setas brancas (B). Barra de escala: $100\mu\text{m}$.

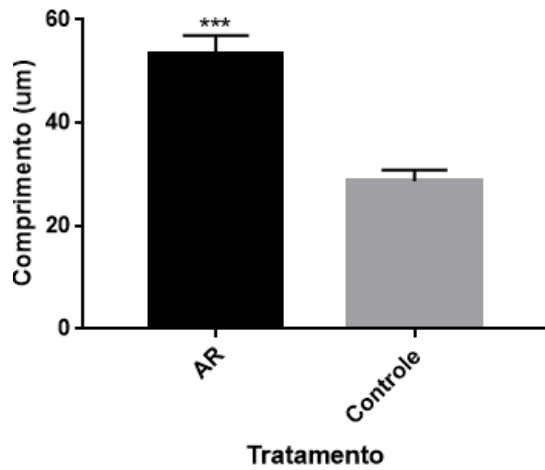


Figura 19: Comprimento médio de neuritos. Resultados expressos como Média \pm EPM (n=8). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

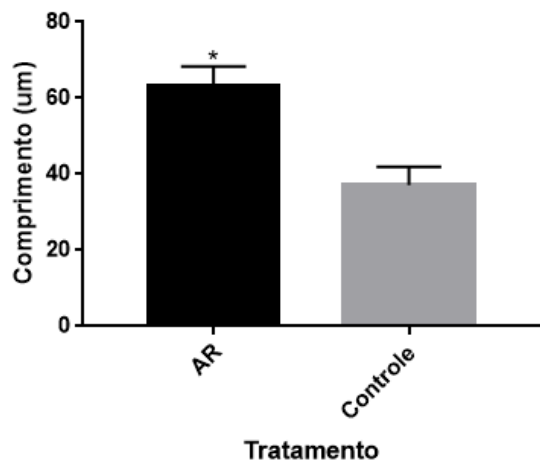


Figura 20: Comprimento médio de neuritos por células portadoras. Resultados expressos como Média \pm EPM (n=8). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

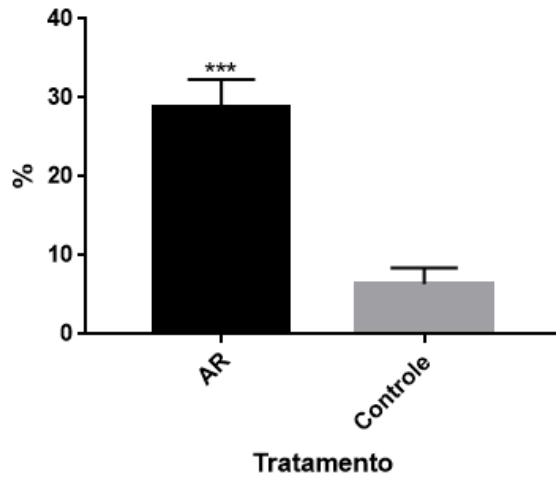


Figura 21: Células portadoras de neuritos (porcentagem em relação ao total). Resultados expressos como Média \pm EPM (n=8). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

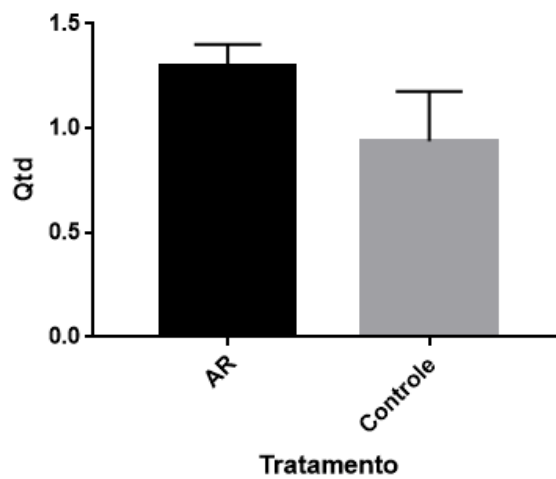


Figura 22: Quantidade de neuritos por célula portadora. Resultados expressos como Média \pm EPM (n=8). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

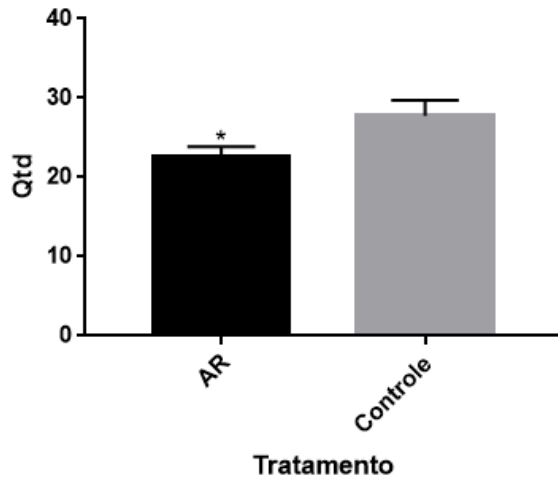


Figura 23: Total de células. Resultados expressos como Média \pm EPM (n=8). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

4.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA EM CÉLULAS SHED

Após 21 dias de diferenciação osteogênica, foi quantificado em espectrofotômetro os depósitos de cálcio, sendo observado maior mineralização nas células tratadas, em comparação com as células controle (Figura 24).

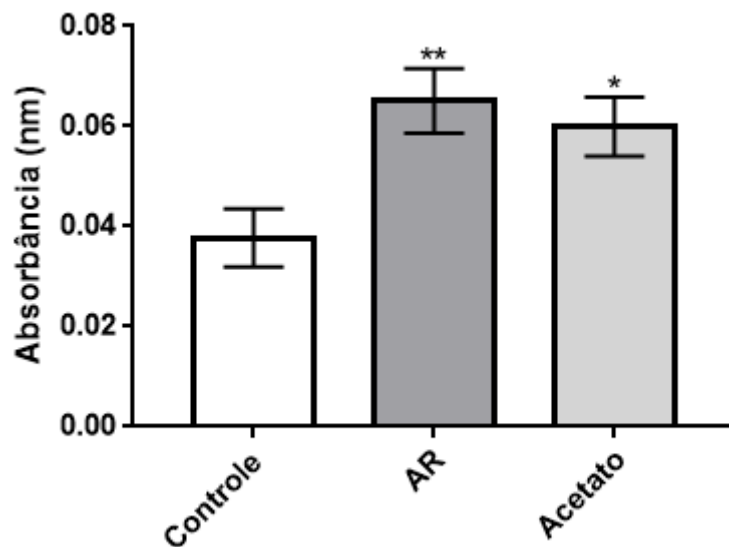


Figura 24: Efeito do tratamento com ácido retinóico (10uM) e acetato (25mM), sob a densidade óptica da coloração com vermelho de Alizarina em célula-tronco humana de polpa de dente decíduo esfoliado (SHED), submetidas ao protocolo de diferenciação osteogênica. Resultados expressos como Média \pm EPM (n=12). Controle vs Todos. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos os possíveis efeitos de acetato na proliferação, citoproteção frente a toxicidade induzida por glutamato e na diferenciação celular. Ao longo dos últimos anos, houve avanços nos estudos do potencial de suplementação dietética de acetato como uma intervenção anti-inflamatória e neuroprotetiva em diferentes modelos de doenças neuroinflamatórias *in vivo* e *in vitro* (MATHEW *et al.*, 2005; ARUN *et al.*, 2010; SOLIMAN e ROSENBERGER, 2011; SOLIMAN *et al.*, 2012; BHATT *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2016). Um ponto crucial em relação a essa suplementação é a sua segurança e tolerabilidade. A este respeito, a administração parenteral e oral em animais não foi associada a toxicidades ou alterações comportamentais analisadas em cães (BAILEY, HEATH e MILES, 1989; BAILEY, HAYMOND e MILES, 1991), camundongos (BAILEY, MILES e HAYMOND, 1993) ou ratos (SOLIMAN e ROSENBERGER, 2011; SOLIMAN, SMITH, *et al.*, 2012).

Fontes endógenas de acetato encontradas no SNC, que podem influenciar os níveis de acetato celular, incluem os compostos de aminoácido acetilados (N-acetilaspartato, N-acetilcarnitina, N-acetilcarnosina e N-acetilcisteína), bem como proteínas acetiladas capazes de modular os níveis de acetato celular em resposta à desacetilação proteica regulatória e/ou à degradação proteica (SOLIMAN, PUIG, *et al.*, 2012). Já o acetato de derivação periférica entra em circulação sanguínea e atravessa a barreira hematoencefálica por simples difusão (OLDENDORF, 1973).

A acetil-CoA metabolicamente ativa é um precursor importante em numerosos processos biológicos que são fundamentais para o fornecimento de energia mitocondrial, síntese de ácidos graxos e metabolismo lipídico (SCHUG, VANDE VOORDE e GOTTLIEB, 2016). Por exemplo, no citossol de oligodendrocitos, a acetil-CoA é a fonte das unidades de dois átomos de carbono utilizados para o alongamento dos ácidos graxos, que é paralelo à deposição de mielina (BOURRE *et al.*, 1977). Ela também é utilizada para oxidação no ciclo de Krebs e produção de energia após a condensação com oxaloacetato para formar citrato, bem como na biossíntese de corpos cetônicos, ácidos graxos e colesterol (FUKAO, LOPASCHUK e MITCHELL, 2004; AKRAM, 2014). Além disso, as acetiltransferases empregam acetil-CoA como doador de acetil para reações de acetilação pós-tradução em resíduos de lisina e arginina que podem levar a consequências estruturais e funcionais em

proteínas (GLOZAK *et al.*, 2005). A acetilação de proteínas nucleares, como as histonas, pode levar a mudanças arquitetônicas da cromatina e, portanto, alterações na expressão gênica (BANNISTER e KOUZARIDES, 2011).

Ao submeter as células SH-SY5Y e SHED ao tratamento combinado de acetato e glutamato, observou-se que o acetato não exerceu citoproteção mediante exposição celular ao glutamato. Matsuki e colaboradores (2013) mostraram que o acetato é um dos principais responsáveis pela repressão transcricional dos genes de ciclina D1 e ciclina E1 em células do epitélio intestinal. Tais ciclinas são essenciais para a progressão do ponto de checagem G1/S no ciclo celular, de modo que sua repressão ocasiona o bloqueio da proliferação celular. Desse modo, a redução da viabilidade celular como um todo pode ter sido causada por uma redução na proliferação celular propriamente dita, e não por morte celular.

Com relação à diferenciação das células SH-SY5Y, os resultados obtidos corroboram com dados da literatura. A validação de um protocolo de diferenciação de células de neuroblastoma é uma importante ferramenta para estudos de doenças neurológicas, uma vez que permite a obtenção de células com características de neurônios dopaminérgicos (EDSJO, HOLMQUIST e PAHLMAN, 2007). Tal linhagem tem sido utilizada no estudo de vias moleculares e bioquímicas desenvolvidas na fisiopatologia de várias doenças que acometem o SNC. Entretanto, possuem características oncogênicas e proliferativas, com um estágio de diferenciação precoce caracterizado pela baixa presença de marcadores neuronais (LOPES *et al.*, 2010).

Desse modo, a diferenciação com AR é fundamental para se alcançar um modelo experimental adequado para o estudo de mecanismos celulares e moleculares relacionados a neuropatologias, bem como avaliar o efeito de novas moléculas com potencial terapêutico para essas doenças. A análise morfológica mostrou que as células diferenciadas são capazes de adquirir um fenótipo neuronal, com crescimento de neuritos e um formato estrelado. A diferenciação com ácido retinóico por 7 a 10 dias é recorrente em outros experimentos na literatura (AGHOLME *et al.*, 2010; LOPES *et al.*, 2012; KOVALEVICH e LANGFORD, 2013; GERVOIS *et al.*, 2017). Devido à contaminação dos lotes de células SH-SY5Y disponíveis, não foi possível realizar subsequentes testes. Pretende-se, tão logo novos vials estejam disponíveis, dar continuidade a estes experimentos, a fim de se averiguar em maiores detalhes como células SH-SY5Y respondem ao acetato no processo de diferenciação

na presença ou ausência de glutamato. Dessa forma, demos continuidade aos estudos utilizando as SHED.

Já para a diferenciação das células SHED, os dados encontrados para o tratamento com AR também são recorrentes na literatura, uma vez que estudos comprovaram que o AR influencia a diferenciação e proliferação de osteoblastos (CHOONG, MARTIN e NG, 1993; SKILLINGTON, CHOY e DERYNCK, 2002), além de induzir a diferenciação osteogênica de células-tronco derivadas de tecidos adiposos (MALLADI *et al.*, 2006). Chadipiralla e colaboradores (2010) demonstraram que o tratamento de SHED's com AR altera significativamente a expressão de genes relacionados à osteogênese (p.ex., ALP, RUNX2, OPN), após 7 dias de tratamento, enquanto que a mineralização da matriz pode ser facilmente detectada após 21 dias de tratamento (CHADIPIRALLA *et al.*, 2010). Tais achados indicam que o AR é um indutor efetivo da diferenciação osteogênica de SHED. No tratamento com acetato, a maior mineralização pode estar relacionada a mudanças nos padrões de acetilação em histonas, influenciando diretamente na expressão gênica e, por conseguinte, no fenótipo proliferativo/diferenciado das células (MARKS, RICHON e RIFKIND, 2000; MARIN-HUSSTEGE *et al.*, 2002; LONG *et al.*, 2015).

Não foi possível obter resultados que indicassem o efeito citoprotetor do acetato frente à citotoxicidade do glutamato em SH-SY5Y, uma vez que os experimentos com essas células foram interrompidos. Apenas com a análise de MTT não é possível discernir se o acetato é capaz de promover algum efeito citoprotetor, uma vez que o ensaio mensura a atividade mitocondrial e não morte celular (MOSMANN, 1983). De acordo com a literatura, o acetato promove diminuição do ciclo-celular e consequentemente a proliferação (MATSUKI *et al.*, 2013; LONG *et al.*, 2015), o que pode indicar no ensaio de MTT falsa inviabilidade celular. Em paralelo, o acetato, por meio da expressão de reguladores do ciclo celular, também se relaciona com a diferenciação celular, o que compete com a proliferação celular (MATSUKI *et al.*, 2013). É necessária maior investigação para se apurar se a citoproteção indicada pela literatura está ligada ou não à diferenciação celular, protegendo as células de morte celular. Adicionalmente, há a necessidade de avaliação de apoptose celular em paralelo ao MTT e à diferenciação celular.

Estudos *in vitro* são fundamentais para se realizar uma triagem inicial de compostos com potencial terapêutico, com possível utilização posterior em modelos animais e estudos clínicos. Considerando o cultivo celular, pode-se submeter

linhagens celulares a tratamentos com drogas em diversas concentrações, e a partir destes dados selecionar os mais promissores para ensaios com modelos animais. Após a obtenção de resultados em modelo *in vivo*, é possível validar os mesmos em ensaios clínicos (RADIO e MUNDY, 2008). Tal abordagem possibilita a aplicação de resultados da pesquisa básica em um contexto clínico, enfatizando o desenvolvimento de novos tratamentos. Contudo, a detecção da neurotoxicidade/neuroproteção de compostos representa um desafio para estudos em neurociências, haja vista que os modelos *in vitro* não mimetizam a complexidade fisiológica e bioquímica do sistema nervoso central (BAL-PRICE *et al.*, 2008).

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que o acetato afetou a proliferação das células SH-SY5Y e SHED. Em relação à sua capacidade citoprotetora frente à citotoxicidade promovida pelo glutamato, os resultados ainda são inconclusivos, uma vez que os experimentos com as SH-SY5Y foram interrompidos. Entretanto, promoveu maior diferenciação em células SHED, demonstrando como tal composto atua influenciando a expressão gênica. Estudos subsequentes são necessários para verificar se a atuação positiva na diferenciação celular promovida pelo acetato é uma forma de citoproteção. Além disso, outros estudos são necessários para identificar como tais células respondem ao acetato em nível molecular, considerando apoptose, expressão de ciclinas, compactação da cromatina e a presença de marcadores bioquímicos característicos durante a diferenciação de cada linhagem, por exemplo, que poderão fornecer um entendimento mais completo de como esse composto atua na dinâmica metabólica e bioenergética celular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHOLME, L.; LINDSTROM, T.; KAGEDAL, K.; MARCUSSON, J.; HALLBECK, M. 2010. An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, **20 (4)**: 1069-1082.
- AKRAM, M. 2014. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. **Cell biochemistry and biophysics**, **68 (3)**: 475-478.
- ANDO, S.; TANAKA, Y.; TOYODA, Y.; KON, K. 2003. Turnover of myelin lipids in aging brain. **Neurochemical research**, **28 (1)**: 5-13.
- ARDAWI, M. S. 1990. Glutamine-synthesizing activity in lungs of fed, starved, acidotic, diabetic, injured and septic rats. **The Biochemical journal**, **270 (3)**: 829-832.
- ARUN, P.; ARIYANNUR, P. S.; MOFFETT, J. R.; XING, G.; HAMILTON, K.; GRUNBERG, N. E.; IVES, J. A.; NAMBOODIRI, A. M. 2010. Metabolic acetate therapy for the treatment of traumatic brain injury. **Journal of neurotrauma**, **27 (1)**: 293-298.
- ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell calcium**, **34 (4-5)**: 325-337.
- BAILEY, J. W.; HAYMOND, M. W.; MILES, J. M. 1991. Triacetin: a potential parenteral nutrient. **JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition**, **15 (1)**: 32-36.
- BAILEY, J. W.; HEATH, H., 3RD; MILES, J. M. 1989. Calcium, magnesium, and phosphorus metabolism in dogs given intravenous triacetin. **The American journal of clinical nutrition**, **49 (2)**: 385-388.
- BAILEY, J. W.; MILES, J. M.; HAYMOND, M. W. 1993. Effect of parenteral administration of short-chain triglycerides on leucine metabolism. **The American journal of clinical nutrition**, **58 (6)**: 912-916.
- BAIN, G.; KITCHENS, D.; YAO, M.; HUETTNER, J. E.; GOTTLIEB, D. I. 1995. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. **Developmental biology**, **168 (2)**: 342-357.
- BAL-PRICE, A. K.; SUNOL, C.; WEISS, D. G.; VAN VLIET, E.; WESTERINK, R. H.; COSTA, L. G. 2008. Application of in vitro neurotoxicity testing for regulatory purposes: Symposium III summary and research needs. **Neurotoxicology**, **29 (3)**: 520-531.

BALESTRINO, M.; LENSCHAN, M.; PARODI, M.; PERASSO, L.; REBAUDO, R.; MELANI, R.; POLENOV, S.; CUPELLO, A. 2002. Role of creatine and phosphocreatine in neuronal protection from anoxic and ischemic damage. **Amino acids**, **23 (1-3)**: 221-229.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell research**, **21 (3)**: 381-395.

BHATT, D. P.; HOUDEK, H. M.; WATT, J. A.; ROSENBERGER, T. A. 2013. Acetate supplementation increases brain phosphocreatine and reduces AMP levels with no effect on mitochondrial biogenesis. **Neurochemistry international**, **62 (3)**: 296-305.

BIEDLER, J. L.; ROFFLER-TARLOV, S.; SCHACHNER, M.; FREEDMAN, L. S. 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. **Cancer research**, **38 (11 Pt 1)**: 3751-3757.

BOURRE, J. M.; PATURNEAU-JOUAS, M. Y.; DAUDU, O. L.; BAUMANN, N. A. 1977. Lignoceric acid biosynthesis in the developing brain. Activities of mitochondrial acetyl-CoA-dependent synthesis and microsomal malonyl-CoA chain-elongating system in relation to myelination. Comparison between normal mouse and dysmyelinating mutants (quaking and jimpy). **European journal of biochemistry**, **72 (1)**: 41-47.

BREWER, G. J.; WALLIMANN, T. W. 2000. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. **Journal of neurochemistry**, **74 (5)**: 1968-1978.

BRISSETTE, C. A.; HOUDEK, H. M.; FLODEN, A. M.; ROSENBERGER, T. A. 2012. Acetate supplementation reduces microglia activation and brain interleukin-1beta levels in a rat model of Lyme neuroborreliosis. **Journal of neuroinflammation**, **9**: 249.

BROWN, D.; BOULEY, R.; PAUNESCU, T. G.; BRETON, S.; LU, H. A. 2012. New insights into the dynamic regulation of water and acid-base balance by renal epithelial cells. **American journal of physiology. Cell physiology**, **302 (10)**: C1421-1433.

CAMBRON, M.; D'HAESELEER, M.; LAUREYS, G.; CLINCKERS, R.; DEBRUYNE, J.; DE KEYSER, J. 2012. White-matter astrocytes, axonal energy metabolism, and axonal degeneration in multiple sclerosis. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, **32 (3)**: 413-424.

CARREL, A.; BURROWS, M. T. 1911. CULTIVATION OF TISSUES IN VITRO AND ITS TECHNIQUE. **The Journal of experimental medicine**, **13 (3)**: 387-396.

CARREL, A.; INGEBRIGTSEN, R. 1912. THE PRODUCTION OF ANTIBODIES BY TISSUES LIVING OUTSIDE OF THE ORGANISM. **The Journal of experimental medicine**, **15 (3)**: 287-291.

- CHEN, L.; MUHLHAUSER, M.; YANG, C. R. 2003. Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons in vitro and in vivo. **Journal of neurophysiology**, **89 (2)**: 691-703.
- CHEN, X.; GUO, C.; KONG, J. 2012. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Neural regeneration research**, **7 (5)**: 376-385.
- CHOONG, P. F.; MARTIN, T. J.; NG, K. W. 1993. Effects of ascorbic acid, calcitriol, and retinoic acid on the differentiation of preosteoblasts. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, **11 (5)**: 638-647.
- CONROY, W. G.; BERG, D. K. 1995. Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions. **The Journal of biological chemistry**, **270 (9)**: 4424-4431.
- CORDEIRO, M. M.; DONG, Z.; KANEKO, T.; ZHANG, Z.; MIYAZAWA, M.; SHI, S.; SMITH, A. J.; NOR, J. E. 2008. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **Journal of endodontics**, **34 (8)**: 962-969.
- DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. 2012. Alzheimer's disease, beta-amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections. **British journal of pharmacology**, **167 (2)**: 324-352.
- DE SA SILVA, F.; ALMEIDA, P. N.; RETTORE, J. V.; MARANDUBA, C. P.; DE SOUZA, C. M.; DE SOUZA, G. T.; ZANETTE RDE, S.; MIYAGI, S. P.; SANTOS MDE, O.; MARQUES, M. M.; MARANDUBA, C. M. 2012. Toward personalized cell therapies by using stem cells: seven relevant topics for safety and success in stem cell therapy. **Journal of biomedicine & biotechnology**, **2012**: 758102.
- DEELCHAND, D. K.; SHESTOV, A. A.; KOSKI, D. M.; UGURBIL, K.; HENRY, P. G. 2009. Acetate transport and utilization in the rat brain. **Journal of neurochemistry**, **109 Suppl 1**: 46-54.
- DWANE, S.; DURACK, E.; KIELY, P. A. 2013. Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration. **BMC research notes**, **6**: 366.
- EAGLE, H. 1955. The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (Stain HeLa) in tissue culture. **The Journal of experimental medicine**, **102 (1)**: 37-48.
- EAGLE, H.; OYAMA, V. I.; LEVY, M.; HORTON, C. L.; FLEISCHMAN, R. 1956. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. **The Journal of biological chemistry**, **218 (2)**: 607-616.
- EBELING, A. H. 1914. THE EFFECT OF THE VARIATION IN THE OSMOTIC TENSION AND OF THE DILUTION OF CULTURE MEDIA ON THE CELL PROLIFERATION OF CONNECTIVE TISSUE. **The Journal of experimental medicine**, **20 (2)**: 130-139.

EDSJO, A.; HOLMQUIST, L.; PAHLMAN, S. 2007. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. **Seminars in cancer biology**, **17 (3)**: 248-256.

FOOT, N. C. 1913. THE GROWTH OF CHICKEN BONE MARROW IN VITRO AND ITS BEARING ON HEMATOGENESIS IN ADULT LIFE. **The Journal of experimental medicine**, **17 (1)**: 43-60.

FORAN, E.; TROTTI, D. 2009. Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. **Antioxidants & redox signaling**, **11 (7)**: 1587-1602.

FUJINO, T.; KONDO, J.; ISHIKAWA, M.; MORIKAWA, K.; YAMAMOTO, T. T. 2001. Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. **The Journal of biological chemistry**, **276 (14)**: 11420-11426.

FUKAO, T.; LOPASCHUK, G. D.; MITCHELL, G. A. 2004. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, **70 (3)**: 243-251.

GERVOIS, P.; WOLFS, E.; DILLEN, Y.; HILKENS, P.; RATAJCZAK, J.; DRIESEN, R. B.; VANGANSEWINKEL, T.; BRONCKAERS, A.; BRONE, B.; STRUYS, T.; LAMBRICHTS, I. 2017. Paracrine Maturation and Migration of SH-SY5Y Cells by Dental Pulp Stem Cells. **Journal of dental research**, **96 (6)**: 654-662.

GILANY, K.; VAN ELZEN, R.; MOUS, K.; COEN, E.; VAN DONGEN, W.; VANDAMME, S.; GEVAERT, K.; TIMMERMAN, E.; VANDEKERCKHOVE, J.; DEWILDE, S.; VAN OSTADE, X.; MOENS, L. 2008. The proteome of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y: an enlarged proteome. **Biochimica et biophysica acta**, **1784 (7-8)**: 983-985.

GIORDANO, G.; LA MONACA, G.; ANNIBALI, S.; CICCONE, A.; OTTOLENGHI, L. 2011. Stem cells from oral niches: a review. **Annali di stomatologia**, **2 (1-2)**: 3-8.

GLOZAK, M. A.; SENGUPTA, N.; ZHANG, X.; SETO, E. 2005. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. **Gene**, **363**: 15-23.

GRABACKA, M.; PIERZCHALSKA, M.; DEAN, M.; REISS, K. 2016. Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPARalpha. **International journal of molecular sciences**, **17 (12)**.

HALLOWS, W. C.; LEE, S.; DENU, J. M. 2006. Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **103 (27)**: 10230-10235.

HARTMAN, A. L.; VINING, E. P. 2007. Clinical aspects of the ketogenic diet. **Epilepsia**, **48 (1)**: 31-42.

HISCOCK, N.; PEDERSEN, B. K. 2002. Exercise-induced immunodepression-plasma glutamine is not the link. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, **93 (3)**: 813-822.

HOLMSETH, S.; DEHNES, Y.; HUANG, Y. H.; FOLLIN-ARBELET, V. V.; GRUTLE, N. J.; MYLONAKOU, M. N.; PLACHEZ, C.; ZHOU, Y.; FURNESS, D. N.; BERGLES, D. E.; LEHRE, K. P.; DANBOLT, N. C. 2012. The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, **32 (17)**: 6000-6013.

HYND, M. R.; SCOTT, H. L.; DODD, P. R. 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neurochemistry international**, **45 (5)**: 583-595.

IRVINE, K. A.; BLAKEMORE, W. F. 2008. Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. **Brain : a journal of neurology**, **131 (Pt 6)**: 1464-1477.

JAWORSKI, D. M.; NAMBOODIRI, A. M.; MOFFETT, J. R. 2016. Acetate as a Metabolic and Epigenetic Modifier of Cancer Therapy. **Journal of cellular biochemistry**, **117 (3)**: 574-588.

KATYAL, N. G.; KOEHLER, A. N.; MCGHEE, B.; FOLEY, C. M.; CRUMRINE, P. K. 2000. The ketogenic diet in refractory epilepsy: the experience of Children's Hospital of Pittsburgh. **Clinical pediatrics**, **39 (3)**: 153-159.

KIM, D. Y.; RHO, J. M. 2008. The ketogenic diet and epilepsy. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, **11 (2)**: 113-120.

KIMURA, T.; FUKUDA, H.; IRITANI, N. 2005. Labeled acetate incorporation into lipids and lipid elimination after oral administration in rat liver and adipose tissue. **Journal of nutritional science and vitaminology**, **51 (2)**: 104-109.

KOSTIC, M.; ZIVKOVIC, N.; STOJANOVIC, I. 2013. Multiple sclerosis and glutamate excitotoxicity. **Reviews in the neurosciences**, **24 (1)**: 71-88.

KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. 2013. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, **1078**: 9-21.

KRITIS, A. A.; STAMOULA, E. G.; PANISKAKI, K. A.; VAVILIS, T. D. 2015. Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. **Frontiers in cellular neuroscience**, **9**: 91.

LABOW, B. I.; SOUBA, W. W.; ABCOUWER, S. F. 2001. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism--glutaminase and glutamine synthetase. **The Journal of nutrition**, **131 (9 Suppl)**: 2467S-2474S; discussion 2486S-2467S.

LANE, C. A.; PAX, R. A.; BENNETT, J. L. 1987. L-glutamine: an amino acid required for maintenance of the tegumental membrane potential of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, **94** (Pt 2): 233-242.

LAUBE, B.; HIRAI, H.; STURGESS, M.; BETZ, H.; KUHSE, J. 1997. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. **Neuron**, **18** (3): 493-503.

LONG, P. M.; TIGHE, S. W.; DRISCOLL, H. E.; FORTNER, K. A.; VIAPIANO, M. S.; JAWORSKI, D. M. 2015. Acetate supplementation as a means of inducing glioblastoma stem-like cell growth arrest. **Journal of cellular physiology**, **230** (8): 1929-1943.

LOPES, F. M.; LONDERO, G. F.; DE MEDEIROS, L. M.; DA MOTTA, L. L.; BEHR, G. A.; DE OLIVEIRA, V. A.; IBRAHIM, M.; MOREIRA, J. C.; PORCIUNCULA, L. O.; DA ROCHA, J. B.; KLAMT, F. 2012. Evaluation of the neurotoxic/neuroprotective role of organoselenides using differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line challenged with 6-hydroxydopamine. **Neurotoxicity research**, **22** (2): 138-149.

LOPES, F. M.; SCHRODER, R.; DA FROTA, M. L., JR.; ZANOTTO-FILHO, A.; MULLER, C. B.; PIRES, A. S.; MEURER, R. T.; COLPO, G. D.; GELAIN, D. P.; KAPCZINSKI, F.; MOREIRA, J. C.; FERNANDES MDA, C.; KLAMT, F. 2010. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. **Brain research**, **1337**: 85-94.

LOPEZ, M.; TOVAR, S.; VAZQUEZ, M. J.; NOGUEIRAS, R.; SENARIS, R.; DIEGUEZ, C. 2005. Sensing the fat: fatty acid metabolism in the hypothalamus and the melanocortin system. **Peptides**, **26** (10): 1753-1758.

LU, S.; LU, C.; HAN, Q.; LI, J.; DU, Z.; LIAO, L.; ZHAO, R. C. 2011. Adipose-derived mesenchymal stem cells protect PC12 cells from glutamate excitotoxicity-induced apoptosis by upregulation of XIAP through PI3-K/Akt activation. **Toxicology**, **279** (1-3): 189-195.

LU, S. C. 2013. Glutathione synthesis. **Biochimica et biophysica acta**, **1830** (5): 3143-3153.

LUONG, A.; HANNAH, V. C.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. 2000. Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins. **The Journal of biological chemistry**, **275** (34): 26458-26466.

LUPTON, J. R.; KURTZ, P. P. 1993. Relationship of colonic luminal short-chain fatty acids and pH to in vivo cell proliferation in rats. **The Journal of nutrition**, **123** (9): 1522-1530.

MADHAVARAO, C. N.; ARUN, P.; MOFFETT, J. R.; SZUCS, S.; SURENDRAN, S.; MATALON, R.; GARBERN, J.; HRISTOVA, D.; JOHNSON, A.; JIANG, W.; NAMBOODIRI, M. A. 2005. Defective N-acetylaspartate catabolism reduces brain acetate levels and myelin lipid synthesis in Canavan's disease. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, 102 (14): 5221-5226.

MALIK, M. A.; BLUSZTAJN, J. K.; GREENWOOD, C. E. 2000. Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: role of retinoic acid. **The Journal of nutritional biochemistry, 11 (1): 2-13.**

MALLADI, P.; XU, Y.; YANG, G. P.; LONGAKER, M. T. 2006. Functions of vitamin D, retinoic acid, and dexamethasone in mouse adipose-derived mesenchymal cells. **Tissue engineering, 12 (7): 2031-2040.**

MARIN-HUSSTEGE, M.; MUGGIRONI, M.; LIU, A.; CASACCIA-BONNEFIL, P. 2002. Histone deacetylase activity is necessary for oligodendrocyte lineage progression. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 22 (23): 10333-10345.**

MARK, M.; GHYSELINCK, N. B.; CHAMBON, P. 2006. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. **Annual review of pharmacology and toxicology, 46: 451-480.**

MARKS, P. A.; RICHON, V. M.; RIFKIND, R. A. 2000. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. **Journal of the National Cancer Institute, 92 (15): 1210-1216.**

MATHEW, R.; ARUN, P.; MADHAVARAO, C. N.; MOFFETT, J. R.; NAMBOODIRI, M. A. 2005. Progress toward acetate supplementation therapy for Canavan disease: glyceryl triacetate administration increases acetate, but not N-acetylaspartate, levels in brain. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 315 (1): 297-303.**

MATSUKI, T.; PEDRON, T.; REGNAULT, B.; MULET, C.; HARA, T.; SANSONETTI, P. J. 2013. Epithelial cell proliferation arrest induced by lactate and acetate from *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve*. **PloS one, 8 (4): e63053.**

MELDRUM, B. S. 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal of nutrition, 130 (4S Suppl): 1007s-1015s.**

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100 (10): 5807-5812.**

MOFFETT, J. R.; ROSS, B.; ARUN, P.; MADHAVARAO, C. N.; NAMBOODIRI, A. M. 2007. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. **Progress in neurobiology, 81 (2): 89-131.**

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods, 65 (1-2): 55-63.**

NEI, M.; NGO, L.; SIRVEN, J. I.; SPERLING, M. R. 2014. Ketogenic diet in adolescents and adults with epilepsy. **Seizure**, **23 (6)**: 439-442.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M. M.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T. C.; DOI, S. Q.; BAZOTTE, R. B.; CURI, R. 2003. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, **36 (2)**: 153-163.

NEWSHOLME, P.; PROCOPIO, J.; LIMA, M. M.; PITHON-CURI, T. C.; CURI, R. 2003. Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. **Cell biochemistry and function**, **21 (1)**: 1-9.

OLDENDORF, W. H. 1973. Carrier-mediated blood-brain barrier transport of short-chain monocarboxylic organic acids. **The American journal of physiology**, **224 (6)**: 1450-1453.

OWEN, O. E.; MORGAN, A. P.; KEMP, H. G.; SULLIVAN, J. M.; HERRERA, M. G.; CAHILL, G. F., JR. 1967. Brain metabolism during fasting. **The Journal of clinical investigation**, **46 (10)**: 1589-1595.

OYAMA, V. I.; EAGLE, H. 1956. Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (folin-ciocalteau). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, **91 (2)**: 305-307.

PAHLMAN, S.; RUUSALA, A. I.; ABRAHAMSSON, L.; MATTSSON, M. E.; ESSCHER, T. 1984. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. **Cell differentiation**, **14 (2)**: 135-144.

PAPOUIN, T.; LADEPECHE, L.; RUEL, J.; SACCHI, S.; LABASQUE, M.; HANINI, M.; GROU, L.; POLLEGIONI, L.; MOTHET, J. P.; OLIET, S. H. 2012. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. **Cell**, **150 (3)**: 633-646.

PASIEKA, A. E.; MORGAN, J. F. 1959. Glutamine metabolism of normal and malignant cells cultivated in synthetic media. **Nature**, **183 (4669)**: 1201-1202.

PIEZ, K. A.; OYAMA, V. I.; LEVINTOW, L.; EAGLE, H. 1960. Proteolysis in stored serum and its possible significance in cell culture. **Nature**, **188**: 59-60.

PINEL, C.; COXAM, V.; MIGNON, M.; TAILLANDIER, D.; CUBIZOLLES, C.; LEBECQUE, P.; DARMAUN, D.; MEYNIAL-DENIS, D. 2006. Alterations in glutamine synthetase activity in rat skeletal muscle are associated with advanced age. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, **22 (7-8)**: 778-785.

PRASAD, A. N.; STAFSTROM, C. F.; HOLMES, G. L. 1996. Alternative epilepsy therapies: the ketogenic diet, immunoglobulins, and steroids. **Epilepsia**, **37 Suppl 1**: S81-95.

- RADIO, N. M.; MUNDY, W. R. 2008. Developmental neurotoxicity testing in vitro: models for assessing chemical effects on neurite outgrowth. **Neurotoxicology**, **29 (3)**: 361-376.
- RENNIE, M. J.; BOWTELL, J. L.; BRUCE, M.; KHOGALI, S. E. 2001. Interaction between glutamine availability and metabolism of glycogen, tricarboxylic acid cycle intermediates and glutathione. **The Journal of nutrition**, **131 (9 Suppl)**: 2488S-2490S; discussion 2496S-2487S.
- REY, F. E.; FAITH, J. J.; BAIN, J.; MUEHLBAUER, M. J.; STEVENS, R. D.; NEWGARD, C. B.; GORDON, J. I. 2010. Dissecting the in vivo metabolic potential of two human gut acetogens. **The Journal of biological chemistry**, **285 (29)**: 22082-22090.
- ROSS, S. A.; MCCAFFERY, P. J.; DRAGER, U. C.; DE LUCA, L. M. 2000. Retinoids in embryonal development. **Physiological reviews**, **80 (3)**: 1021-1054.
- ROWBOTTOM, D. G.; KEAST, D.; MORTON, A. R. 1996. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, **21 (2)**: 80-97.
- SAKS, V.; DZEJA, P.; SCHLATTNER, U.; VENDELIN, M.; TERZIC, A.; WALLIMANN, T. 2006. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. **The Journal of physiology**, **571 (Pt 2)**: 253-273.
- SANTOS, R. V.; CAPERUTO, E. C.; COSTA ROSA, L. F. 2007. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. **Life sciences**, **80 (6)**: 573-578.
- SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. 2001. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. **Molecular neurobiology**, **24 (1-3)**: 107-129.
- SCHUCHMANN, K.; MULLER, V. 2014. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. **Nature reviews. Microbiology**, **12 (12)**: 809-821.
- SCHUG, Z. T.; VANDE VOORDE, J.; GOTTLIEB, E. 2016. The metabolic fate of acetate in cancer. **Nature reviews. Cancer**, **16 (11)**: 708-717.
- SKILLINGTON, J.; CHOY, L.; DERYNCK, R. 2002. Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes. **The Journal of cell biology**, **159 (1)**: 135-146.
- SMITH, M. D.; BHATT, D. P.; GEIGER, J. D.; ROSENBERGER, T. A. 2014. Acetate supplementation modulates brain adenosine metabolizing enzymes and adenosine A(2)A receptor levels in rats subjected to neuroinflammation. **Journal of neuroinflammation**, **11**: 99.

- SOLIMAN, M. L.; PUIG, K. L.; COMBS, C. K.; ROSENBERGER, T. A. 2012. Acetate reduces microglia inflammatory signaling in vitro. **Journal of neurochemistry**, **123** (4): 555-567.
- SOLIMAN, M. L.; ROSENBERGER, T. A. 2011. Acetate supplementation increases brain histone acetylation and inhibits histone deacetylase activity and expression. **Molecular and cellular biochemistry**, **352** (1-2): 173-180.
- SOLIMAN, M. L.; SMITH, M. D.; HOUDEK, H. M.; ROSENBERGER, T. A. 2012. Acetate supplementation modulates brain histone acetylation and decreases interleukin-1beta expression in a rat model of neuroinflammation. **Journal of neuroinflammation**, **9**: 51.
- STERNECKERT, J. L.; REINHARDT, P.; SCHOLER, H. R. 2014. Investigating human disease using stem cell models. **Nature reviews. Genetics**, **15** (9): 625-639.
- STOCCA, G.; VICINI, S. 1998. Increased contribution of NR2A subunit to synaptic NMDA receptors in developing rat cortical neurons. **The Journal of physiology**, **507** (Pt 1): 13-24.
- SWINK, T. D.; VINING, E. P.; FREEMAN, J. M. 1997. The ketogenic diet: 1997. **Advances in pediatrics**, **44**: 297-329.
- SZYDLOWSKA, K.; TYMIANSKI, M. 2010. Calcium, ischemia and excitotoxicity. **Cell calcium**, **47** (2): 122-129.
- VAN DER VALK, J.; BRUNNER, D.; DE SMET, K.; FEX SVENNINGSEN, A.; HONEGGER, P.; KNUDSEN, L. E.; LINDL, T.; NORABERG, J.; PRICE, A.; SCARINO, M. L.; GSTRAUNTHALER, G. 2010. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, **24** (4): 1053-1063.
- VOULGARI-KOKOTA, A.; FAIRLESS, R.; KARAMITA, M.; KYRARGYRI, V.; TSEVELEKI, V.; EVANGELIDOU, M.; DELORME, B.; CHARBORD, P.; DIEM, R.; PROBERT, L. 2012. Mesenchymal stem cells protect CNS neurons against glutamate excitotoxicity by inhibiting glutamate receptor expression and function. **Experimental neurology**, **236** (1): 161-170.
- WANG, J.; WANG, X.; SUN, Z.; WANG, X.; YANG, H.; SHI, S.; WANG, S. 2010. Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. **Stem cells and development**, **19** (9): 1375-1383.
- WANIEWSKI, R. A.; MARTIN, D. L. 1998. Preferential utilization of acetate by astrocytes is attributable to transport. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, **18** (14): 5225-5233.
- WHELESS, J. W.; BAUMGARTNER, J.; GHANBARI, C. 2001. Vagus nerve stimulation and the ketogenic diet. **Neurologic clinics**, **19** (2): 371-407.

XIE, H. R.; HU, L. S.; LI, G. Y. 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Chinese medical journal**, **123 (8)**: 1086-1092.

YUDKOFF, M.; NELSON, D.; DAIKHIN, Y.; ERECINSKA, M. 1994. Tricarboxylic acid cycle in rat brain synaptosomes. Fluxes and interactions with aspartate aminotransferase and malate/aspartate shuttle. **The Journal of biological chemistry**, **269 (44)**: 27414-27420.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética UFJF



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36936900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Parecer nº «003/2011»

Protocolo CEP-UFJF: «2263.003.2011» **FR:** «394410» **CAAE:** «0234.0.180.00-10»

Projeto de Pesquisa: "Isolamento, Caracterização e diferenciação de Células Tronco Adultas obtidas a partir da polpa dentária, tecido adiposo e cordão umbilical humano."

Área Temática: «Grupo III»

Pesquisador Responsável: «Carlos Magno da Costa Maranduba»

Pesquisadores Participantes: "Elídio Fábio Goulard de Lana, Paula Loures Valle Lima, Marília de Pádua Dornelas Corrêa"

Instituição: «Instituto de Ciências Biológicas

Sumário/comentários do protocolo:

Justificativa: O estudo de células-tronco tem recebido considerável atenção desde a descoberta de que células-tronco adultas têm a capacidade de formar diferentes tipos de tecidos. O avanço tecnológico tem ajudado a identificar o potencial das células-tronco e sua capacidade de regenerar os tecidos está sendo estudada em modelos transplantados. Estudos do isolamento, natureza e potencial de diferenciação das células-tronco terão um impacto positivo no nosso conhecimento do desenvolvimento humano e da medicina regenerativa.

Comentário: Os argumentos apresentados justificam a realização do estudo.

Objetivos: Pretendemos neste projeto isolar, caracterizar e diferenciar células-tronco adultas isoladas da polpa dentária humana de dentes decíduos (dente de leite), tecido adiposo obtido de lipoaspiração e do tecido do cordão umbilical humano, para estabelecer um banco dessas células para uso em pesquisas

Comentário: Os objetivos são coerentes com a justificativa.

Metodologia: Devido ao fato do fácil acesso para obtenção dos materiais biológicos: polpa dentária decídua ou "polpa de dente de leite", de tecido adiposo derivados de lipoaspiração e do tecido do cordão umbilical (gelatina de Wharton), tecidos esses que, como mencionado anteriormente, são descartados no lixo, o estudo com as células-tronco adultas é muito atraente, pois, é uma fonte de células de quantidade não limitada (podem ser usadas vários dentes para estabelecer a cultura de células, quantidade enormes de tecido adiposo ou quase todo o comprimento do cordão umbilical) para um banco de células, sua futura aplicação na terapia celular e engenharia tecidual torna-se uma promessa (Perry et al., 2008). Suas características semelhantes às células-tronco embrionárias humanas são muito importantes, além de não haver problemas éticos (Kerkis et al., 2006). Vale a pena mencionar que até pode ser interessante para uma criança na idade de "dente de leite" guardar seus dentes em um banco de células para eventuais problemas de saúde no futuro (Perry et al., 2008), além dos demais tecidos aqui mencionados.

Comentário: A metodologia é adequada para responder a pergunta do estudo.

Revisão e referências: Devidamente citadas no texto, atualizadas e adequadas

Orçamento: Claro e adequado

Fonte de custeio: Pesquisadores

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, bem elaborado, claro e preciso.

Qualificação do(a) pesquisador(a). Satisfatória

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela **aprovação** do protocolo de pesquisa proposto.

Situação: Projeto Aprovado
Juiz de Fora, 17 de março 2011

lêda maria vrgas dias
Prof. Dra. Iêda Maria Vargas Dias
Coordenadora – CEP/UFJF

RECEBI	
DATA:	11, 04 / 2011
ASS:	<i>Carlos Magno da Costa Maranduba</i>

ANEXO B – Parecer do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa



CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONEP (BIOBANCO) N.º. 022/2015

Registro CONEP B-030 (Este n.º deve ser citado nas correspondências referentes a este biobanco)

Processo n.º 25000.113045/2014-88

Instituição responsável: Universidade Federal de Juiz de Fora

Instituições participantes: -

Responsável (is) institucional: Carlos Magno da Costa Maranduba

CEP de origem: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora

Histórico da tramitação do protocolo de desenvolvimento:

Em 18/06/2014 a CONEP recebeu documentação solicitando análise deste protocolo de desenvolvimento (biobanco). A CONEP emitiu em 27/11/2014 Parecer Consubstanciado com "pendências" após apreciação (Parecer Consubstanciado n.º 029/2014).

Em 07/04/2015 a CONEP recebeu do CEP a documentação (papel e CD-ROM) com as respostas ao Parecer CONEP n.º 029/2014 (respostas analisadas neste parecer).

Sumário geral do protocolo:

Tipo de material biológico:

Serão coletados e armazenados os seguintes materiais biológicos no presente biobanco: Dentes Humanos (decíduos e permanentes), Fluidos Biológicos (urina e sangue periférico), linhagens celulares (isoladas da polpa dentária humana, tecido adiposo, tecido do cordão umbilical) e DNA/RNA.

Regimento interno:

A composição dos membros responsáveis pelo Biobanco GENÉTICA HUMANA E TERAPIA CELULAR (GENETEC) será: Dois docentes titulares e um suplente com reconhecida experiência em desenvolvimento de pesquisa pertencente à(s) área(s) de GENÉTICA e IMUNOLOGIA, sendo dois do Departamento de Biologia e um do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, ambos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Um docente titular será o Coordenador do Biobanco GENÉTICA HUMANA E TERAPIA CELULAR (GENETEC) e o outro o Coordenador Associado. O docente suplente poderá substituir os Coordenadores caso ambos estejam ausentes simultaneamente da Instituição.

O regimento interno traz a seguinte composição: "Os membros titulares e o membro suplente inicialmente serão formados pelos docentes do Departamento de Biologia: Carlos Magno da Costa Maranduba (Titular – Coordenador do Biobanco) e Marcelo de Oliveira Santos (Suplente); e do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia: Gilson da Costa Macedo (Titular - Coordenador Associado) descritos no artigo 4, parágrafo único, serão eleitos pelos docentes da área de GENÉTICA, por meio de escrutínio secreto, em eleição organizada pelas áreas descritas acima."

Os objetivos do Banco de Dentes são:

- "Coletar e armazenar material de origem humana. O DNA (ácido desoxirribonucléico – DNA) e o RNA (ácido ribonucléico) serão obtidos de punção periférica; as linhagens

Cont. Nota Técnica de resposta do Biobanco B-016

celulares serão obtidas de polpa dentária (dentes decíduos e permanentes), tecido adiposo (obtidos de lipoaspiração), tecido do cordão umbilical (por ocasião do nascimento); e fluidos biológicos, como o sangue periférico que será obtido através da punção periférica e urina, através de coleta do jato intermediário."

- "Registrar o material coletado e garantir a confidencialidade dos dados"

- "Fazer cumprir e zelar pelas demais atribuições do Biobanco GENÉTICA HUMANA E TERAPIA CELULAR (GENETEC) descritas na Resolução CNS 441/11."

Os potenciais consentidores de material biológico ao Biobanco GENÉTICA HUMANA E TERAPIA CELULAR (GENETEC) serão indivíduos maiores e menores de idade (este último após consentimento dos responsáveis), que serão selecionados em diversos lugares informados em projetos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana, através de aplicação de questionários, ou coleta de amostras, tais como sangue periférico, urina, obtenção de dentes decíduos e permanentes, lipoaspirado e amostras do Cordão Umbilical, amostras que façam parte das linhas de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. O potencial voluntário será abordado em Clínicas Odontológicas (dentes decíduos e permanentes), Clínicas Médicas e Hospitais (obtenção lipoaspirado, cordão umbilical, sangue periférico e urina).

"O acesso aos materiais biológicos será restrito a pessoas autorizadas. Não haverá dissociação dos dados dos voluntários de sua amostra, estando os dados de contato coletados e vinculados a amostra armazenada no biobanco, tendo acesso as informações doutorandos e mestrands com seus respectivos projetos de pesquisas aprovados em Comitê de Ética em Humanos, e em vigência."

Procedimentos operacionais padrão:

Os procedimentos operacionais de coleta, processamento, armazenamento, distribuição e descarte do material foram apresentados como parte do conteúdo do Regimento Interno - 09/05/2014.

Documentos encaminhados para análise:

1. BIOBANCO GENETEC.docx;
2. DECLARACAO RELATORIO.docx;
3. GERENCIAMENTO E RESPONSABILIDADE.docx;
4. Oficio Biobanco GENETEC.pdf;
5. TERMO-DE-ASSENTIMENTO.docx;
6. TERMO-DE-CONSENTIMENTO-LIVRE-ESCLARECIDO.docx.

Documentos encaminhados para a análise das Respostas ao Parecer CONEP nº 029/2014:

1. BIOBANCO GENETEC;
2. Carta de Encamohamento CEP Resposta e pendencias;
3. DECLARAÇÃO RELATORIO;
4. GERENCIAMENTO E RESPONSABILIDADE;
5. TERMO-DE-ASSENTIMENTO;
5. TERMO-DE-CENSENTIMENTO-LIVRE-ESCLARECIDO.

Conclusões e Pendências/Lista de inadequações:

1. Quanto ao sigilo e confidencialidade do participante da pesquisa e suas amostras apresentados no Regimento Interno datado de 09/05/2014, leem-se os seguintes trechos:
 - a. "O material será coletado em frascos apropriados e estéreis, sendo todos por ocasião devidamente **rotulada para identificação dos doadores e amostras.**" (destaque nosso) (página 3 de 7, item "CAPÍTULO VIII –

Cont. Nota Técnica de resposta do Biobanco B-016

COLETA E ARMAZENAMENTO DE MATERIAL DE ORIGEM HUMANA" - Artigo 11);

- b. "Coletado material com devida **rotulagem, contendo nome completo, data, tipo de material:**" (destaque nosso) (página 4 de 7, item "CAPÍTULO VIII – COLETA E ARMAZENAMENTO DE MATERIAL DE ORIGEM HUMANA" - Artigo 13 e 14, Parágrafo 1);

Para garantir a confidencialidade da origem do material armazenado, todos os frascos contendo o material biológico deverão ser rotulados com códigos de identificação e não com os nomes ou outros dados que viabilizem a identificação do participante. Diante do exposto, solicita-se adequação.

RESPOSTA: Assim como solicitado, no documento referente ao Regimento Interno, na Pág. 3 de 7, artigo 11, foi realizada a alteração solicitada, sendo o mesmo marcado em negrito. Na Pág. 4 de 7, Artigos 13 e 14, ambos Parágrafo 1, também foi realizada alteração, sendo o mesmo marcado em negrito.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

- a. O TCLE é o documento no qual o pesquisador deve prestar todas as informações pertinentes ao protocolo para os participantes de pesquisa de maneira clara e objetiva. Termos como "mecanismos genéticos e celulares", "terapia celular com células tronco", "engenharia tecidual", "medicina regenerativa", são muito técnicos e devem ser melhor explicados para compreensão do participante. Solicita-se adequação.

- b. No final da página 1 de 3, lê-se: "Suas informações pessoais serão mantidas em **sigilo e privacidade, pois suas respostas serão analisadas em conjunto com as respostas de todos os outros voluntários.**" (destaque nosso). Na verdade, o sigilo e confidencialidade devem ser garantidos como direito a privacidade dos participantes. Assim, devem ser apresentados os processos de codificação e decodificação e as políticas de segurança com níveis de permissão diferenciados e formas de evitar a identificação do participante da pesquisa por pessoal não autorizado, conforme preconizado na Portaria CNS 2201 de 2011, Capítulo IV, Seção III, Artigo 23, Parágrafo 2º. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, as terminologias técnicas foram removidas do texto, bem como foi mencionado ao final da Pág. 1 de 3 que o material biológico será codificado. Na Pág. 2 de 3 foi colocado um campo para assinatura do menor de idade, bem como um espaço para assinatura do pesquisador e campo para data. Ressalto que informamos na primeira página do documento que "Em caso de voluntários menores de idade, este TCLE destina-se aos pais/responsáveis legais". Todas as alterações foram marcadas em negrito no documento.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Quanto ao Termo de Assentimento:

- a. Na página 1 de 1, lê-se: "Se **you concorda em ceder seu material para o Biobanco, ou no caso do menor de idade o qual você é responsável**, ele ficará armazenado no Biobanco GENÉTICA HUMANA E TERAPIA CELULAR (GENETEC) do Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora para utilização em pesquisas científicas." (destaque nosso). O termo de assentimento deve

Cont. Nota Técnica de resposta do Biobanco B-016

ser dirigido ao menor de idade. Os Termos de Assentimento devem ser elaborados em linguagem acessível à compreensão dos participantes, em suas diferentes faixas etárias. Podem ser utilizados argumentos gráficos, como desenhos, personagens e histórias ilustrativas, para que o menor compreenda a importância, os procedimentos e os objetivos do Biobanco. É importante ressaltar o disposto no item II.2 da Resolução CNS nº 466 de 2012: "A eticidade da pesquisa implica em: consentimento livre e esclarecido dos indivíduos-alvo e a proteção a grupos vulneráveis e aos legalmente incapazes (autonomia)". Neste sentido, a pesquisa envolvendo seres humanos deverá sempre tratá-los em sua dignidade, respeitá-los em sua autonomia e defendê-los em sua vulnerabilidade. Solicita-se, portanto:

- a.1) A revisão do Termo de Assentimento para contemplar o exposto acima.
- a.2) Que seja apresentado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em separado para os pais/responsáveis, ou que o TCLE principal recebido para análise contenha, em seu texto, informação específica de que, em caso de voluntários menores de idade, este TCLE destina-se aos pais/responsáveis legais.
- b. Para os menores de idade alfabetizados e capazes de firmar o termo de assentimento, solicita-se a inclusão do campo destinado a sua assinatura e também o campo a ser datado pelo pesquisador e o menor. Solicita-se adequação.
- c. Cabe ressaltar a necessidade de reconsentir o menor, uma vez que ele atinja a maioridade, com o TCLE do biobanco, caso suas amostras ainda estejam armazenadas no biobanco. Essa informação deve constar no termo de assentimento ao menor e também no TCLE dirigido aos pais/responsáveis. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: No Termo de Assentimento, na Pág. 2 de 2 foi colocado um campo para assinatura do menor de idade, bem como um espaço para assinatura do pesquisador e campo para data. Todas as alterações foram marcadas em negrito no documento. Ainda, foram colocadas ilustrações para que o menor compreenda a importância, os procedimentos e os objetivos do Biobanco.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Resolução CNS nº 441 de 2011, manifesta-se pela aprovação do protocolo de desenvolvimento do biobanco.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 02 de Junho de 2015


Gabriela Maródin
 Coordenadora da CONEP/CNS/MS

ER/PT