

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do Programa de Pós-Graduação

AVALIAÇÃO DE ALTERNATIVAS AO USO DO SORO FETAL
BOVINO NA ADAPTAÇÃO DE CULTIVOS CELULARES E
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE
CÓRNEA BOVINA (CORBOV)

AGDA DE MORAES LEITE TOFFALINI

BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
2015

Agda de Moraes Leite Toffalini

AVALIAÇÃO DE ALTERNATIVAS AO USO DO SORO FETAL BOVINO NA ADAPTAÇÃO DE CULTIVOS CELULARES E OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE Córnea BOVINA (CORBOV)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Professor Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis.

BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
2015

T644a Toffalini, Agda de Moraes Leite, 1978-
Avaliação de alternativas ao uso do soro fetal bovino na adaptação de cultivos celulares e
obtenção e caracterização das células de córnea bovina (CORBOV) / Agda de Moraes Leite
Toffalini. – 2016.
59 p. : il.

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Teses. 2. Sorologia veterinária – Teses. 3. Imunocitoquímica – Teses.
I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. III. Título.

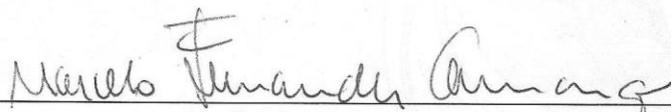
CDD – 636.208 96

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

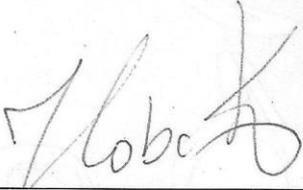
Aprovada em 02 de Junho de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Presidente - Orientador



Prof. Marcelo Fernandes Camargos
Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais - LANAGRO-MG



Prof. Zélia Inês Portela Lobato
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades e bênçãos que sempre proporciona. Embora não facilite a caminhada.

A minha família que compreendeu e me apoiou durante todo o período de ausência para que eu pudesse realizar este trabalho.

Aos meus pais que me incentivam e me inspiram na vida e nos estudos.

Ao meu esposo por tentar compreender esta etapa e me apoiar neste desafio.

Em especial a minha filha que não entendeu, mas presenciou que tudo na vida exige dedicação e empenho.

Aos meus sogros pelo apoio e incentivo.

Aos meus irmãos agradeço a compreensão e apoio incondicional que me dedicam em todos os âmbitos de nossas vidas.

Aos meus cunhados(as) pelo apoio e compreensão.

Aos amigos que acompanharam, incentivaram e reclamaram do meu afastamento. Mas, entenderam a necessidade.

Ao meu orientador, Professor Jenner Karlisson P. dos Reis pelos ensinamentos, paciência e presteza.

A minha Co-Orientadora, Dra. Graciela Kunrath Lima pela amizade, pelo apoio e por todo conhecimento que me ajudou a alcançar.

Ao Professor Rômulo Cerqueira Leite por todo o incentivo para a realização deste trabalho e por acreditar na minha capacidade.

A Grazielle pela amizade, incentivo e exemplo de vida.

Ao Eduardo pela amizade, apoio e toda ajuda.

Aos funcionários do DMVP pelo apoio e pelos momentos de descontração.

A Lúcia por cuidar com tanto zelo de todos da virologia do DMVP.

A Doraci e a Annita que com carinho me receberam e ensinaram a arte do cultivo de células.

A Escola de Veterinária e ao Laboratório de Retrovírus (RetroLab) na pessoa do Professor Rômulo e Professor Jenner pelo suporte.

Aos membros da banca examinadora, Professora Zélia Inês Portela Lobato e Dr. Marcelo Camargos pela disponibilidade e aceite.

Ao INCT, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Aos amigos do RetroLab: Fernanda, Camila, Maria Clara, Cairo, Juliana, João Helder, Daniel, Stefanne, Telissa, André, Paula, Raquel, Isabella, Ana Paula, Cláudia, Luciana e Bruna por toda a ajuda e todo o carinho com o qual me acolheram. Maria Clara Nunes, muito obrigada!

Ao Professor Ronaldo Manoel Pimenta Ribeiro pelo apoio.

Ao João Batista Amorim e Antônio Jorge pelo apoio e fornecimento de material para pesquisa.

Ao Laboratório Nacional Aropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG) na pessoa do Antônio Augusto Fonseca Júnior, Marcelo Fernandes Camargos, Anapolino Macedo de Oliveira e Ana Paula Rodrigues pela colaboração e parceria com a Escola de Veterinária.

Ao Laboratório de Histopatologia e Imunohistoquímica na pessoa da Professora Rogéria Serakides pela colaboração e ao Juneo, Lorena, Cintia, Natália e Leimar pela cooperação e apoio nos experimentos.

A Sandhra que acrescentou conhecimento e trouxe mais alternativas para nossa pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	14
2.1 Biotecnologia e Cultivo Celular	14
2.2 Cultivo Celular: Breve Histórico.....	14
2.3 Soro de Origem Animal	15
2.4 Adaptação ao Meio Livre de Soro de Origem Animal	16
2.5 Células MDBK e VERO	16
2.6 Obtenção Células para Cultivo <i>in vitro</i>	17
2.7 Cultivo Primário	17
2.8 Linhagens Finitas e Contínuas	18
2.9 Subcultivo, repique ou passagem	18
2.10 Ciclo Celular	19
2.11 Estrutura da Córnea.....	19
2.12 Técnicas Utilizadas para Caracterização de Células (<i>in vitro</i>)	20
2.12.1 Caracterização Molecular.....	20
2.12.2 Morfologia Celular	21
2.12.3 Imunocitoquímica e Imunofluorescência	21
2.12.4 Capacidade Proliferativa e Curva de Crescimento	21
2.12.5 Eficiência de Plaqueamento	22
2.13 Contaminantes Biológicos.....	22
2.14 Proliferação viral em Cultivos Celulares.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Adaptação ao Meio de Cultivo Livre de Soro de Origem Animal	24
3.1.1 Linhagens Celulares	24
3.1.2 Meios de cultivo	24
3.1.3 Adaptação das células ao meio livre de soro.....	24
3.1.4 Análises Estatísticas	25
3.2 Obtenção e Caracterização das Células da Córnea Bovina	26
3.2.1 Obtenção das Amostras	26
3.2.2 Congelamento e Descongelamento	27
3.2.3 Avaliação da Morfologia e Proliferação Celular	27
3.2.4 Métodos Utilizados para Quantificar a Proliferação Celular.....	27
3.2.4.1 Contagem Manual - Azul de Tripán.....	27
3.2.4.2 MTT	27
3.2.5 Caracterização Imunocitoquímica	28

3.2.6	Eficiência de Plaqueamento	28
3.2.7	Detecção Contaminantes pela reação PCR.....	29
3.2.8	Teste de Infectividade por BVDV e BoHV1	29
3.2.9	Avaliação da Replicação do BoHV1 em células CorBov.....	30
3.2.9.1	Titulação viral	30
3.2.10	Análises Estatísticas	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Adaptação ao Meio de Cultivo Livre de Soro de Origem Animal	31
4.1.1	Adaptação das células MDBK.....	31
4.1.2	Adaptação das células VERO.....	32
4.2	Obtenção e Caracterização das Células da Córnea Bovina	34
4.2.1	Congelamento e Descongelamento	36
4.2.2	Curva de Proliferação Celular	36
4.2.3	MTT	41
4.2.4	Caracterização Imunocitoquímica	43
4.2.5	Eficiência de Plaqueamento	43
4.2.6	Análise de Microrganismos Contaminantes por PCR	44
4.2.7	Infecção pelo BVDV e pelo BoHV-1	46
4.2.8	Avaliação da Replicação do BoHV1 em células CorBov.....	47
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	53
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação de Corte Histológico de Córnea Normal (200X) 20
- Figura 2 - Diagrama representando os tratamentos utilizados no cultivo primário para obtenção de células de córnea bovina (CorBov) 26
- Figura 3 - Quantidade de células obtidas ao longo da adaptação das células MDBK aos SMT nas diferentes fases descritas na Tabela 2. Valores obtidos através da média da contagem das triplicatas após cinco dias de incubação entre cada fase. 31
- Figura 4 - Imagens da fase 2 da adaptação das células MDBK. A) Controle. Células MDBK suplementadas com 5% de SFB em MEM. Aumento de 200X. B) Células MDBK com 25% de meio VP-SFM (STM 3) e 2,5% de SFB em MEM. Aumento de 200X. C) Células MDBK com 50% MEM e SFB e 50% STM 1 (2,5% de Hidrolisado de Soja e 2,5% de SFB em MEM). Aumento de 100X. D) Células MDBK com 50% MEM e SFB e 50% do SMT 2 (5% de Hidrolisado de Soja e 2,5% de SFB em MEM). Aumento 100X. 32
- Figura 5 - Quantidade de células obtidas ao longo da adaptação das células VERO aos SMT 1,2 e 3 nas diferentes fases descritas na Tabela 2. Valores obtidos através da média da contagem das triplicatas após cinco dias de incubação entre cada fase. 33
- Figura 6 - Imagens da fase 4 da adaptação das células VERO. Aumento 100X. A) Controle. Células VERO suplementadas com 5% de SFB. B) Células VERO com 100% de meio SMT 3 (VP-SFM). C) Células VERO com 100% do meio SMT 1 (MEM suplementado com 5% de Hidrolisado de Soja). D) Células VERO com 100% do meio SMT 2 (MEM suplementado com 10% de Hidrolisado de Soja). 34
- Figura 7 - Imagens obtidas após o cultivo primário de células da córnea bovina. Aumento 100X. A) Imagem dos primeiros dias após a raspagem da córnea e incubação. A seta indica fragmentos de tecido. (B e C) Presença de poucas células aderidas após três semanas. D) Células da córnea bovina após 60 dias apresentando monocamada com 100% de confluência. 35
- Figura 8 - Diagrama com os resultados dos tratamentos utilizados para obtenção das células de córnea bovina (CorBov) no cultivo primário. A marcação em vermelho indica as cavidades que na ausência de SFB não apresentaram células aderidas. 36
- Figura 9 - Avaliação do efeito da presença de 5% e 10% de SFB na multiplicação de células da córnea e MDBK por cinco dias através da contagem manual - método de exclusão pelo Azul de Tripán. Valores obtidos através da média da contagem das triplicatas. 37
- Figura 10 - Avaliação do efeito da presença de 5% e 10% de SFB na quantidade de células CorBov e MDBK avaliado por 38 dias - contagem manual - método de exclusão pelo Azul de Tripán. Valores da média obtida através da contagem das triplicatas. A seta indica o dia em que ocorreu a troca de meio. 38

Figura 11- Perfil de proliferação das células CorBov e MDBK avaliadas durante 33 dias na ausência de SFB (0%) e na presença de 0,2% de SFB. Valores obtidos através da média da contagem manual das triplicatas utilizando o método de exclusão pelo Azul de Tripán.	39
Figura 12 - Avaliação do efeito da presença de 1%, 2% e 5% de SFB no número de células CorBov e MDBK em placa de 96 cavidades. Valores obtidos através da média da contagem manual das triplicatas utilizando o método de exclusão pelo Azul de Tripán durante 33 dias.	40
Figura 13 - Efeito das concentrações 1%, 2% e 5% de SFB sobre o número de células CorBov e MDBK no quinto dia de cultivo caracterizando a dose dependência da concentração do SFB na quantidade de células/mL das células CorBov (A) e MDBK (B) pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán. Todas as medidas foram obtidas através do cálculo da média da contagem das triplicatas.	41
Figura 14 - Avaliação da viabilidade celular com diferentes concentrações de SFB no cultivo das células CorBov - Método MTT. Todas as medidas foram obtidas através da média da leitura das triplicatas.	42
Figura 15 – Avaliação da viabilidade celular com diferentes concentrações SFB no cultivo das células MDBK - Método MTT. Todas as medidas foram obtidas através da média da leitura das triplicatas.	42
Figura 16 - Marcação Imunocitoquímica das células CorBov. Reação com Estreptavidina-Biotina-Peroxidase (DAKO, USA) e anticorpos primários para Vimentina (Monoclonal Mouse Anti-Vimentin Clone V9). (A) Célula CorBov marcadas positivamente. Aumento 200X. (B) Controle Positivo – pele. Aumento 100X. (C) Controle Negativo – CorBov. Aumento 200X.	43
Figura 17 - Imagens das colônias de células formadas após 11 dias no teste de Eficiência de Plaqueamento das Células CorBov e MDBK em baixas densidades na presença de 4% e 10% de SFB. Todas as medidas foram obtidas de triplicatas.	44
Figura 18 - Eficiência de Plaqueamento das células CorBov e MDBK em baixas densidades na presença de 4% e 10% SFB após 11 dias. Todas as medidas foram obtidas através do cálculo baseado na contagem das triplicatas.	44
Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose da cPCR para detecção do gene GAPDH (230 pb). Canaleta 1: Marcador Molecular. Canaleta 2: Amostra CorBov1 em MEM. Canaleta 3: Amostra CorBov 2 em MEM e SFB. Canaleta 4: Amostra CorBov 3 em MEM e SFB. Canaleta 5: Amostra CorBov 4 em MEM. Amostras descritas na Tabela 2.	45
Figura 20 - Efeito citopático (ECP) após infecção das Células CorBov pelo BVDV; 72 horas após infecção. Aumento 100X. Controle negativo com monocamada das células CorBov (A) e ECP provocado pelo BVDV na monocamada das células CorBov (B).	46
Figura 21 - Efeito citopático (ECP) após infecção das Células CorBov pelo BoHV-1; 72 horas após infecção. Aumento 100X. Coloração por Cristal Violeta. Controle negativo com monocamada das células CorBov (A) e ECP provocado pelo BoHV-1 na monocamada das células CorBov (B).	47
Figura 22 - Comparação do padrão de replicação do BoHV1 em células MDBK e CorBov.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns dos principais componentes encontrados no SFB, concentrações e variações (Adaptado de Price and Gregory, 1982; Freshney, 2005)	15
Tabela 2 - Fases para a adaptação das células MDBK e VERO ao suplemento hidrolisado de soja e meio livre de insumos de origem animal.	25
Tabela 3 - Relação das Amostras CorBov Testadas para diversos Contaminantes.....	29
Tabela 4 - Resultados dos Testes PCR para os Contaminantes Pesquisados nas Amostras de Células da Córnea Bovina	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHK-21	Linhagem celular originada de células renais de hamster, <i>Mesocricetus auratus</i> (Baby hamster kidney)
BLV	Vírus da Leucose Bovina
BoHV-1	Herpesvírus bovino tipo-1
BSE	Encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca)
BTV	Vírus da Língua Azul
BVDV	Vírus da diarreia bovina a vírus
CHO	Linhagem celular originada de células do ovário de hamster, <i>Cricetulus griseus</i> (Chinese hamster ovary)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Gás Carbônico
CorBov	Células da córnea bovina
COS-7	Linhagem celular originada de células renais do macaco verde africano, <i>Cercopithecus aethiops</i> , transformadas pelo vírus SV40
cPCR	PCR convencional
Da	Daltons (unidade de medida)
DAB	3'3 diaminobenzidine tetrahydrochloride
DMSO	Dimethylsulfoxido
DMVP	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
ECP	Efeito citopático
EGF	Fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>

fug	Fungizon
g	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Hep-2	Linhagem celular humana originada de carcinoma
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
INCT	Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia
LANAGRO	Laboratórios Nacionais Agropecuários
MDBK	Mandin Darby Bovine Kidney. Linhagem celular originada de células renais bovina, <i>Bos taurus</i> .
MEM	Meio Essencial Mínimo
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidades de infecção
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
OIE	World Organisation for Animal Health
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A.	Para Análise
p/s	Penicilina e estreptomicina
PBS	Tampão fosfato-salino, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PCV-1	Circovirus Suíno tipo 1
pH	Potencial hidrogênio iônico
PI	Pós-infecção
PPV	Parvovirus Suíno
qPCR	PCR tempo real/quantitativa
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida da PCR convencional
RT-qPCR	Transcrição Reversa seguida da PCR tempo real
SA	Soro de origem animal
SFB	Soro Fetal Bovino
SMT	Suplemento ou meio teste
STV	Solução Tripsina e Versene
TCID ₅₀	Doses infectantes para 50% das culturas de tecido
U	Unidade
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VERO	Linhagem celular renal do macaco verde africano, <i>Cercopithecus aethiops</i> .
VP-SFM	<i>Virus production-serum free media</i>

Resumo

Meios para cultivo celular, com diferentes aportes nutritivos, foram criados e aperfeiçoados ao longo dos anos buscando fornecer as condições para a proliferação celular *in vitro*. O soro de origem animal (SA) é o suplemento comumente adicionado ao meio, como principal fonte de hormônios, como por exemplo, os fatores de crescimento. Foram testados como substitutos ao soro fetal bovino (SFB) na adaptação das células VERO e MDBK, o hidrolisado de soja e o meio *Virus Production Serum Free Medium* (VP-SFM), produtos que não utilizam qualquer insumo de origem animal ou humana para sua obtenção. Em ambos os meios, as células apresentaram o mesmo padrão de proliferação celular que o meio suplementado com SFB.

Células da córnea bovina (CorBov) foram obtidas através do cultivo primário e mantidas por vinte e quatro passagens. As células mantiveram sua morfologia e capacidade de proliferação após a recuperação da alíquota mantida a -196°C em nitrogênio líquido. A célula CorBov apresentou morfologia alongada e núcleos elípticos, características presentes nos fibroblastos. Na avaliação do padrão de proliferação celular observou-se um aumento gradual no número de células ao longo de 30 dias mesmo quando o meio de cultivo não foi substituído. Foi possível manter as células CorBov ao longo deste período em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com apenas um, dois, cinco ou dez por cento de SFB, dentre as concentrações testadas. Na caracterização imunocitoquímica a população celular foi marcada positivamente pela vimentina, demonstrando sua origem mesenquimal. As células de córnea foram permissíveis a replicação dos vírus da Diarreia viral Bovina (BVDV) e o Herpesvirus tipo I (BoHV-1) evidenciado pela presença de efeito citopático com áreas de lise celular e prolongamentos citoplasmáticos; e grumos de células esféricas formando estruturas em ‘cacho de uva’, respectivamente para cada vírus. O vírus BoHV-1 apresentou o mesmo padrão de replicação em células CorBov do quando comparado ao padrão de replicação em células MDBK.

Palavras chaves: Adaptação; Hidrolisado de Soja; Meios livres de Soro Animal; Cultivo Primário; Córnea Bovina.

Abstract

Media for cell culture, with different nutritional intakes were created and improved over the years seeking to provide the conditions for in vitro cell proliferation. The serum of animal origin (SA) is commonly added to the medium as the main source of hormones, such as growth factors. The soy hydrolyzate and the medium Virus Production Serum Free Medium (VP-SFM), that do not use any input of animal or human origin were tested as substitutes to fetal bovine serum (FBS) in adaptation of VERO and MDBK cells. In both media, the cells showed the same pattern of cell proliferation compared to the medium supplemented with SA.

Bovine corneal cells (CorBov) were obtained from primary culture and maintained for twenty-four passages. The cells retained their morphology and proliferation capacity after recovery from liquid nitrogen (-196°C) storage. The CorBov cells presented elongated and elliptical core morphology, features present in fibroblasts. In the standard cell proliferation assessment there was a gradual increase in the cell number over 30 days even when the culture medium was not replaced. It was possible to maintain CorBov cells throughout this period with Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with one, two, five or ten percent of SA. The CorBov cell population was positively marked by vimentin in Immunocytochemistry assay, demonstrating its mesenchymal origin. Corneal cells were permissibile to Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and Herpesvirus Type I (BoHV-1) evidenced by the presence of cytopathic effect such as cell lysis and cytoplasmic extensions; and spherical cell structures forming lumps 'bunch of grapes', respectively for each virus. The BoHV-1 showed the same pattern of virus replication in CorBov when compared to the standard (control) MDBK cells.

1. Introdução

O cultivo das células *in vitro* demanda que estas sobrevivam e se multipliquem fora do seu sistema natural. Para tanto, as células são obtidas através do cultivo primário e mantidas com os meios próprios para cultura celular.

Meios de cultivo com diferentes aportes nutricionais foram criados e aperfeiçoados ao longo dos anos para permitir o cultivo de células. Os meios básicos utilizados para o cultivo celular são formulados para fornecer nutrientes essenciais como sais minerais, aminoácidos, carboidratos e vitaminas. Entretanto, as células ainda necessitam de outras biomoléculas como os lipídeos e as proteínas. O soro de origem animal (SA) é então, o suplemento comumente adicionado ao meio, como principal fonte destas moléculas, além de possuir elementos capazes de promover a aderência das células aos substratos e favorecer a proliferação celular. Contudo, apresenta relevantes desvantagens como, por exemplo, a grande variabilidade na concentração dos elementos presentes em cada lote, a possibilidade de introdução de contaminantes, níveis elevados de endotoxinas e discussões éticas relativas à forma de obtenção do mesmo.

O cultivo celular além de substituir os animais de laboratório nos testes de toxicidade, é empregado na obtenção de vários produtos biotecnológicos, como as vacinas e interferons, que precisam ser seguros e confiáveis para a utilização em animais e humanos. Ele também é largamente utilizado em diagnósticos e caracterização de patógenos intracelulares como os vírus.

No cultivo, a substituição do SA garante condições próximas às ideais, livres de interferências biológicas oriundas dos insumos de origem animal, e as células precisam estar adaptadas a estes substitutos, os suplementos e os meios livres do SA.

As células utilizadas nos cultivos celulares são obtidas através do cultivo primário ou células imortalizadas, de linhagem contínua. As células de cultivo primário são consideradas as mais representativas, pois contêm os diversos tipos celulares presentes nos tecidos de origem e assim, mantem características como a morfologia, a fisiologia e a susceptibilidade a agentes biológicos. As células imortalizadas passaram por transformações e podem não apresentar as mesmas propriedades do tecido original. Então, o cultivo primário das células de córnea bovina é proposto como uma alternativa às células imortalizadas utilizadas em pesquisas e na rotina diagnóstica.

Não existe um tipo celular que seja susceptível a todos os vírus e apesar da disponibilidade comercial de uma variedade de tipos celulares, alguns vírus de interesse não replicam eficientemente nas células disponíveis. Assim, o cultivo primário apresenta a vantagem de possuir vários tipos celulares aumentando a possibilidade de susceptibilidade a vários vírus.

Após a obtenção das células pelo cultivo primário, as células da córnea bovina (CorBov) sobreviventes precisaram ser identificadas e caracterizadas. O conhecimento de suas particularidades e identificação das principais necessidades *in vitro* garantem a sua manutenção, proliferação e otimização do seu uso.

A avaliação das células CorBov em cultivo quanto à susceptibilidade a agentes biológicos é importante por viabilizar a produção de antígenos para uso em diagnóstico e a produção de vacinas. As características uma vez determinadas garantem o uso da célula de forma correta e assegura a reprodutibilidade, o potencial comercial e prático dos processos. Caracterizar uma linhagem inclui: determinar sua origem, seu padrão de proliferação, função, estágio de diferenciação, características genéticas, susceptibilidade a microrganismos, tumorigenicidade, presença de contaminantes, exigências nutricionais entre outras.

A obtenção de linhagens celulares através do cultivo primário, potencialmente capazes de mimetizar características das células presentes no tecido de origem e cultivadas *in vitro* por diversas passagens, como as células de córnea, representam uma alternativa para as pesquisas principalmente na área da virologia, pois, alguns vírus não replicam eficientemente em células de linhagem contínua ou não apresentam efeito citopático.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação com hidrolisado de soja e o uso do meio livre de insumos de origem animal na adaptação de cultivos celulares em substituição ao soro fetal bovino (SFB); e obter células da córnea bovina a partir de cultivo primário e caracterizá-las quanto à sua capacidade proliferativa, viabilidade após criopreservação, origem embrionária através de marcação imunocitoquímica, padrão de crescimento quando cultivadas em baixas densidades e susceptibilidade a alguns vírus.

2. Bibliografia Consultada

2.1 Biotecnologia e Cultivo Celular

O mercado global ligado a biotecnologia movimentou bilhões de dólares ao ano (Butler e Meneses-Acosta, 2012). Este sucesso econômico é sustentado pela produção de biofármacos, principalmente anticorpos monoclonais, produzidos através de bioprocessos baseados no cultivo de células de mamíferos (Butler e Meneses-Acosta, 2012).

A humanidade experimenta desde o início do século XXI um rápido aumento na procura por biofármacos (Butler, 2005). Biofármacos são produtos obtidos através da biotecnologia - processos biológicos e bioquímicos dos sistemas ou organismos visando a produção em pequena ou larga escala de bio-compostos aplicados ao diagnóstico, em processos terapêuticos ou em pesquisa (Butler, 2005; Ferreira, 2010).

O cultivo celular consiste em manipular e manter células *in vitro*, sob condições definidas e controladas, preservando ao máximo suas características fisiológicas, bioquímicas e genéticas (Candeias, 1996; Freshney, 2005; WHO, 2010). A cultura de células permite pesquisas no campo da biotecnologia, produção de proteínas e antígenos, testes de toxicidade, replicação de vírus, etc. (Butler e Meneses-Acosta, 2012).

A utilização de animais para experimentação, em pesquisa biomédica, ensaios de toxicidade e na produção de biofármacos vem sendo discutida desde o século XX. Russell e Burch em 1959 introduziram e promoveram a iniciativa dos três Rs (*Replacement, Reduction, and Refinement*) destinada a substituir, reduzir e/ou redefinir a utilização de animais de laboratório (Liebsch et al., 2011). Entretanto, ainda em 2011, apenas na União Europeia, 12,1 milhões de animais foram utilizados em experimentação animal para avaliação de produtos ou substâncias utilizadas como ração animal, ensaios para introdução de novos alimentos, avaliação de cosméticos, produtos químicos e pesticidas, entre outras finalidades (Liebsch et al., 2011). Obter bioprodutos a partir de cultivos de células, capazes de suscitar respostas que se aproximem ao máximo das obtidas em condições naturais, é a principal ferramenta para a substituição destas práticas utilizando animais de laboratório, e principal instrumento *in vitro* para propor tratamentos, novas teorias e avanços biotecnológicos, como o desenvolvimento de vacinas.

2.2 Cultivo Celular: Breve Histórico

Segundo Freshney (2005) a cultura de células começou a ser utilizada no início do século XX através de estudos com tecidos animais livres de variações sistêmicas observadas *in vivo*. As células utilizadas para cultivo são retiradas de tecidos animais através de técnicas específicas para cultivo primário e propagadas *in vitro*.

Em 1913 pela primeira vez culturas celulares foram utilizadas para propagar o vírus vaccínia (Candeias, 1996). Em 1930 os vírus da febre amarela e varíola foram propagados com sucesso em células. A partir de 1933 com o desenvolvimento dos métodos de cultivo celular foi possível pesquisar alguns vírus através da multiplicação *in vitro*. O cultivo celular passou a substituir os animais de laboratório e os ovos embrionados devido à sua maior especificidade, praticidade e menor custo (Candeias, 1996; Freitas, 2006).

Earle e colaboradores desenvolveram em 1947 a técnica de cultivo celular em monocamada, uniestratificada, utilizando meio de cultura líquido (Freitas, 2006). Em 1952, Dulbecco introduziu a utilização de uma enzima proteolítica de origem pancreática, a Tripsina, nos métodos de virologia para desagregar, individualizar e soltar as células das superfícies de aderência. Esta enzima é capaz de degradar diferencialmente a matriz proteica da membrana celular que une os tecidos celulares através da catálise da hidrólise de ligações peptídicas entre o grupo carboxila da arginina ou lisina e o grupo amina de outro aminoácido (Freitas, 2006).

Os meios utilizados para o cultivo celular devem fornecer os nutrientes necessários para a manutenção das células *in vitro*. A demanda das células é variada e complexa exigindo disponibilidade de uma ampla variedade de nutrientes como sais inorgânicos, glicose, hormônios e outros (Merten et al.,1999; Butler, 2005; Li e Wen, 2013). Porém, apenas o meio de cultivo básico, como o Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM), não apresenta, em sua composição, todos os nutrientes necessários. O SA é então, adicionado ao sistema de cultivo como principal fonte de hormônios e lipídios (Van der Valk et al., 2004).

O Meio basal de Eagle foi descrito por Eagle em 1955 e aprimorado pelo mesmo, tornando-se o MEM em 1959. Atualmente o MEM é amplamente utilizado com suplementação de SA em cultivos celulares em todo o mundo (Freshney, 2005).

2.3 Soro de Origem Animal

O SA é um suplemento utilizado para fornecer compostos não disponibilizados pelos meios de cultivos tradicionais. O soro é a principal fonte de lipídios e hormônios, como os fatores de crescimento (Tab.1). Estes compostos promovem a multiplicação celular, além de possuir alta concentração de albumina que garante proteção contra condições potencialmente adversas, como flutuações de pH ou forças de cisalhamento, tangenciais à monocamada de células (Merten et al.,1999; Butler, 2005; Li e Wen, 2013).

Fatores éticos quanto à forma de obtenção, a alta variabilidade na composição dos nutrientes presentes entre os lotes coletados, o custo deste insumo e potencial introdução de diversos contaminantes como fungos, bactérias, vírus e prions quando um bom controle de qualidade não é realizado antes da utilização deste suplemento, são algumas das desvantagens apontadas na literatura (Stoll et al.,1996; Merten et al., 1997; Merten *et al.*,1999; Van der Valk et al., 2004; Li e Wen, 2013).

Tabela 1 - Alguns dos principais componentes encontrados no SFB, concentrações e variações (Adaptado de Price and Gregory, 1982; Freshney, 2005)

SORO FETAL BOVINO		
Componentes	Concentração	Varição
Proteínas Totais	38 mg/mL	32-80
Albumina	23 mg/mL	20-50
Endotoxinas	0.36 ng/mL	0.01 -10.0
Hemoglobina	0.11 mg/mL	0.24 -1.81
Colesterol	0.31 mg/mL	0.12- 0.63
Glicose	1.25 mg/mL	0.85 - 2.47
Fibronectina	2 µU/mL	1-10
Inibidores de Proteases	1 mg/mL	0.5-2.5
Insulina	10 µU/mL	6.0-14
Cortisona	0.5 µg/100 mL	<0.1 - 2.3
T3 (Triiodotironina)	119 ng/100 mL	56-223
T4 (Tiroxina)	12.1 ng/100 mL	7.8-15.6
Fatores de crescimento EGF, PDGF, IGF-I, etc.	1-100 ng/mL	

Segundo Makoschey e colaboradores (2002) uma das principais desvantagens do SA é a introdução de contaminantes no cultivo, como por exemplo, o vírus da diarreia bovina (BVDV). Mais recentemente, a descoberta dos prions (agente causador da Encefalopatia Espongiforme Bovina – Doença da “Vaca Louca”) levaram os pesquisadores a obter hidrolisados de proteínas das plantas a fim de minimizar fontes

de contaminação provenientes de insumos de origem animal (Schlaeger, 1996; Donaldson e Shuler, 1998; Franek et al., 2000; Heidemann et al., 2000; Pham et al., 2003; Sung et al., 2004; Chun et al., 2007; Shen et al., 2007).

A importância de cultura de células de mamífero em meio sem suplementação por SA é amplamente reconhecida (Bjare, 1992; McKeehan et al., 1990). Após a identificação dos principais nutrientes e fatores de crescimento essenciais para proliferação de diferentes tipos de células (Barnes et al., 1987) uma ampla variedade de meios quimicamente definidos, isentos de insumos de origem animal, foram concebidos ao longo dos anos por diversos pesquisadores e vários estão disponíveis comercialmente (Hutchings e Sato, 1978; Barnes e Sato, 1980a e 1980b; Bottenstein et al., 1979; Taub, 1990; Kim et al., 1998; Froud, 1999; Merten et al., 1999; Butler et al., 2000; Makoschey et al., 2002; Hartshorn et al., 2007; Pohlscheidt et al., 2008).

2.4 Adaptação ao Meio Livre de Soro de Origem Animal

Vários produtos livres de insumos de origem animal têm sido testados para promover a adaptação dos cultivos celulares. Inicialmente, os mais utilizados foram os hidrolisados como a bacto-peptona, testada em 1972 por Taylor (Ikonomou et al., 2003; Butler, 2005).

Hidrolisados são misturas complexas de oligopeptídeos, polipeptídeos e aminoácidos produzidos por digestão química de proteínas como a caseína ou albumina de tecido animal, vegetal ou células de levedura, utilizados como fonte de nitrogênio para o cultivo celular (Ikonomou et al., 2003).

Vários estudos demonstraram a eficácia dos hidrolisados no cultivo celular e na produção de proteínas (Farges-Haddani et al., 2006; Batista, 2007; Chun et al., 2007; Kim e Lee, 2009; Kim et al., 2011; Li e Wen, 2013). Farges-Haddani e colaboradores, por exemplo, testaram em 2006 o hidrolisado de canola e algumas misturas contendo peptídeos maiores (500-5000 Da) e menores (<500 Da) obtendo aumento significativo na taxa de crescimento celular, redução na taxa de morte celular e aumento na produção de interferon (Farges-Haddani et al., 2006). Kim e Lee (2009) obtiveram bons resultados na produção de anticorpos para uso terapêutico produzidos em cultivos suplementados por hidrolisado de soja.

Entretanto, algumas células não apresentam a mesma velocidade de proliferação e eficiência na produção de proteínas e replicação de vírus quando cultivadas em meio livre de SA (Stoll et al., 1996; Chun et al., 2007; Kim et al., 2011).

O meio livre de soro e proteína animal capaz de promover a proliferação de uma ampla variedade de células, segundo Chen e Chen (2009), é o meio VP-SFM desenvolvido pela Gibco™ (Thermo Fisher Scientific Inc, USA). O meio VP-SFM foi produzido sem qualquer componente de origem animal ou humano visando minimizar o potencial de contaminação por agentes patogênicos de mamíferos e eliminar vários problemas associados à utilização de SA. Este meio proporciona o crescimento celular e produção de vírus equivalente ou superior aos sistemas com suplemento de soro e outras aplicações como a produção de proteínas recombinantes e anticorpos monoclonais (GIBCO, 2002; Cardoso et al., 2007; Chen e Chen, 2009).

2.5 Células MDBK e VERO

As células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) e Vero são amplamente utilizadas na pesquisa em virologia e na rotina diagnóstica. A célula MDBK é uma linhagem contínua das células obtidas de tecido renal, de um bovino adulto, *Bos taurus*, em 18 de fevereiro de 1957 (Madin e Darby, 1958). Esta linhagem é susceptível ao herpesvírus bovino tipo I, ao parvovírus bovino, ao adenovírus bovino 2 e 3, ao vírus da diarreia viral bovina 1, ao parainfluenza 3, dentre outros (Hay et al., 1994).

As células VERO foram obtidas do tecido do rim de macaco verde Africano adulto e livre de patógenos, por Yasumura da Universidade de Chiba, no Japão, em 1962. Esta linhagem é susceptível a diversos vírus, entre eles o Poliovírus humano 1, 2 e 3; Simian Virus, SV40; e Parainfluenza tipo 2 (Hay et al., 1994).

Estes dois tipos celulares são excelentes substratos para a produção de vacinas virais (Chen e Chen, 2009), apresentam altas taxas de proliferação celular e apresentam susceptibilidade a vários vírus. A Organização Mundial de Saúde (OMS) autoriza a utilização destas células para produção de biofármacos para uso humano, inclusive por ser isenta de propriedades oncogênicas e não representar risco a saúde humana (Chen e Chen, 2009).

2.6 Obtenção Células para Cultivo *in vitro*

O cultivo de células *in vitro* requer primeiramente a obtenção das células alvo. No sistema *in vivo* as células estão organizadas formando os tecidos ou órgãos e se apresentam extremamente conectadas umas às outras. Assim, processos de desagregação celular são fundamentais para obtê-las. Entretanto, algumas células presentes nos sistemas naturais não são passíveis de remoção devido à sua fragilidade ou incapacidade de se replicar em sistemas artificiais. Assim, a obtenção de células se torna um processo crítico e primordial na execução de pesquisas ou produções comerciais baseadas no cultivo celular (Freshney, 2005).

Uma vez em cultivo, as células sobreviventes precisam ser identificadas e caracterizadas. Após o conhecimento de suas características e identificação das principais necessidades *in vitro* pode-se garantir que o cultivo celular mantenha as características morfológicas, fisiológicas e a mesma susceptibilidade aos agentes infecciosos do tecido original.

Uma vez removidas dos órgãos de origem, estas células podem ser transferidas para diferentes substratos e então cultivadas *in vitro*, em suspensão ou aderidas às superfícies dos frascos de cultivo. Esta primeira cultura é denominada cultivo primário (T'Joel e Cornelissen, 2012). A capacidade de replicação, o número de gerações e o tempo de manutenção em cultivo determinam se as células obtidas se tornarão linhagens finitas ou linhagens contínuas (células imortalizadas).

2.7 Cultivo Primário

Segundo Freshney (2005) é denominado cultivo primário a obtenção e isolamento de células de tecidos *in vivo* através de desagregação mecânica, enzimática ou explante. Estas primeiras células obtidas, aderidas a um determinado substrato ou em suspensão, antes de serem subcultivadas constituem-se o cultivo primário.

A desagregação mecânica ocorre quando o tecido é raspado, cortado em finas camadas ou quando o tecido é forçado a passar por uma seringa ou pipeta. Este método acarreta danos mecânicos, como a lise de inúmeras células.

Através da técnica de explante pequenos fragmentos de tecido são obtidos e cultivados. Este é o método de escolha quando as células são lisadas facilmente e há o risco de se perder muitas delas durante o processo de desagregação mecânica ou enzimática. Esta técnica apresenta como desvantagens um tecido fracamente aderido ao substrato e representa uma técnica altamente seletiva por favorecer apenas células em crescimento.

A desagregação enzimática utiliza tripsina, collagenase, dispase ou outras enzimas como método de obtenção das células. Apesar de mais trabalhosa e mais cara (Freshney, 2005) é uma técnica que favorece a conservação das características morfológicas, fisiológicas e a susceptibilidade aos agentes infecciosos do tecido original (Flores, 2007).

O cultivo primário se constitui como o cultivo mais representativo do tecido original, pois, é capaz de obter uma maior gama de tipos celulares, os mais diversos clones disponíveis no tecido de origem (Freshney, 2005).

2.8 Linhagens Finitas e Contínuas

A maioria das células típicas possui uma vida útil finita em cultivo, girando em torno de 20 a 100 gerações (Freshney, 2005). Estas células são denominadas linhagens finitas.

As linhagens celulares finitas apresentam baixo rendimento e baixa taxa de proliferação uma vez que apresentam inibição por contato; necessidade de aderir a uma superfície para iniciar o ciclo de multiplicação; apresentam pouca eficiência na formação de colônias quando plaqueadas em baixa densidade; alta dependência de suplementação de soro animal e fatores de crescimento; e mantém algumas funções especiais relacionadas aos tecidos de origem, como susceptibilidade a determinados vírus (Freshney, 2005).

Outros tipos celulares, principalmente as células de roedores e as tumorais são capazes de produzir infinitas gerações, são denominadas imortalizadas e constituem as linhagens celulares contínuas (Erwall et al., 1990).

Genes virais como os do SV40 e radiação podem ser utilizados para imortalizar células típicas, originalmente finitas. Geralmente estas células são transfectadas ou infectadas por retrovírus com o gene responsável pela imortalização antes que entrem em senescência. A imortalização estende a vida útil das células *in vitro* por 20 a 30 gerações até que cessem a proliferação e entrem em crise. Após um período variável em crise, que pode durar meses, um grupo de células retoma sua capacidade proliferativa e apresenta perfis de proliferação acima da média (Punchard et al, 1996; Freshney, 2005).

Células tumorais ou imortalizadas não exibem uma regulação da replicação geralmente presente nas células típicas. Freshney (2005) sugere que a causa seja a alta expressão dos oncogenes ou devido à deleção de genes supressores de crescimento. Nestas células a regulação de inibição por contato está ausente (Dulbecco e Elkington, 1973) formando uma monocamada com células posicionadas perpendicularmente e sobrepostas; apresentam alta clonogenicidade em agar (Freedman e Shin, 1974); baixa dependência de altas concentrações de soro ou fatores de crescimento devido a presença de uma maioria de clones de alta eficiência; redução da necessidade da interação entre células e de adesão para proliferação (Freshney, 2005; Flores, 2007).

As células de linhagens contínuas apresentam altas taxas de mutações acarretando alterações morfológicas e fisiológicas; geralmente perdem algumas funções especiais como susceptibilidade a vírus e sua capacidade de diferenciação (Erwall et al., 1990; Freshney, 2005; Flores, 2007). Estas mutações ocorrem devido às altas taxas de propagação e à grande demanda por estas células em laboratório, estendendo seu uso por diversas gerações e inúmeros subcultivos.

2.9 Subcultivo, repique ou passagem

Quando as células aderidas a um substrato proliferam até que não haja mais espaço disponível para novas gerações aderirem diz-se que a monocamada de células atingiu 100% de confluência. Neste ponto há a necessidade de transferir estas células para novos substratos disponibilizando maior área para aderência e maior aporte nutricional (Freshney, 2005). Esta transferência é denominada subcultivo ou passagem (Freshney, 2005; WHO, 2010). No caso de células cultivadas em suspensão o subcultivo é necessário quando o aporte nutricional disponibilizado pelo meio é exaurido.

A aderência de uma célula a outra, nas monocamadas, e a aderência destas ao substrato são devidas à interação das glicoproteínas e dos íons Ca^{2+} presentes na membrana celular com outras proteínas presentes no soro animal (SA) e de outras origens. A passagem, então, requer que estas interações sejam quebradas e proporcione a desagregação da matriz extracelular (Freshney, 2005).

Após o primeiro subcultivo vários tipos celulares obtidos no cultivo primário não resistem e desaparecem. As células com maior potencial proliferativo começam a se sobressair e o cultivo passa a apresentar um caráter mais homogêneo. Estas células, então, podem ser expandidas, caracterizadas e congeladas.

2.10 Ciclo Celular

A proliferação é um processo extremamente regulado capaz de gerar células que conservam as mesmas características da progênie e assim, expandir ou substituir uma população celular. O ciclo celular é composto por uma série de eventos moleculares controlados por sinais positivos, capazes de iniciar nova etapa, e negativos que cessam determinados processos (Joyce, 2003). A expansão do cultivo celular requer que as células repliquem passando por constantes processos mitóticos.

Em uma monocamada várias células encontram-se em fases diferentes do ciclo celular. Quando são subcultivadas entram em um período de repouso e após o subcultivo as células retomam o ciclo de replicação.

A replicação de várias células presentes em um cultivo celular representa um aumento na densidade celular quando acompanhado ao longo do tempo. Este aumento segue um padrão de crescimento descrito pelas fases: Lag constituída por uma maioria de células na fase de repouso G1; seguida por uma fase de crescimento exponencial, denominada fase *Log*; e a fase estacionária (platô) quando a densidade celular atinge o limite do substrato ou o aporte nutricional do meio é atingido, de forma que a taxa de replicação cessa ou é reduzida de forma drástica (Freshney, 2005).

Medidas das taxas de proliferação celular são utilizadas para determinar a resposta das células a determinados estímulos ou toxinas (Erkwall et al., 1990; Freshney, 2005). Esta e outras formas de caracterizar a linhagem em cultivo são importantes para o estabelecimento da rotina de manutenção dessas células em laboratório, monitorar o perfil de proliferação, determinar qual o melhor momento para o subcultivo, a melhor taxa de diluição ("split") e o melhor período para ensaios de infecção viral, dentre outras finalidades.

2.11 Estrutura da Córnea

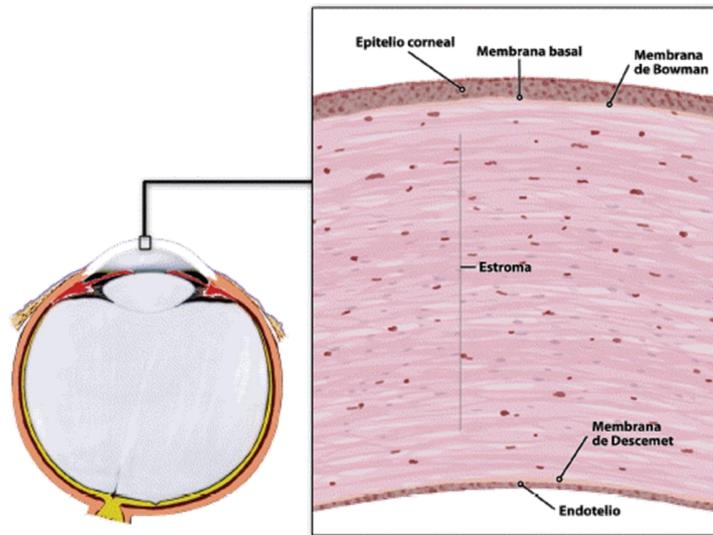
A córnea representa uma grande porção na região anterior a partir da região limbal. É uma estrutura transparente, avascularizada, innervada pelo ramo oftálmico do trigêmeo, com a presença de nervos desmielinizados para manter a transparência. Um filme lacrimal e o sistema de bomba do endotélio mantêm os níveis de umidade da córnea (Gelatt, 2007; Viana, 2002). Os nutrientes são obtidos através da lágrima, humor aquoso e vasos perilimbais. A espessura da córnea em bovinos pode atingir dois milímetros (Gelatt, 2007; Viana, 2002) sendo mais espessa no centro e mais fina na região perilimbal, variando conforme o sexo do animal e a idade (Viana, 2002).

A córnea possui cinco estruturas (Fig. 1): epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio (Joyce, 2003; Gelatt, 2007). O epitélio é a camada mais externa e possui a espessura de sete a doze camadas de células ao centro, afinando na região perilimbal. As células mais internas desta camada são células basais, epiteliais, cubóides e estão em constante proliferação. À medida que amadurecem migram para a superfície ocular e alteram sua morfologia se tornando maiores, mais planas, poligonais e com microvilos (Stades et al., 1999; Gelatt, 2007).

A camada mais interna deste epitélio está separada do estroma por uma fina membrana basal, acelular, denominada membrana de Bowman. Porém, não é detectada na maioria dos animais (Gelatt, 2007). A membrana de Bowman nos bovinos é detectada, mas se apresenta mais fina que em outras espécies (Gelatt, 2007).

O estroma representa 90% do volume da córnea (Gelatt, 2007). Composto por fibras colágenas, queratócitos e glicosaminoglicanos. Logo abaixo, separando o estroma do endotélio situa-se uma membrana acelular, constituída por finas fibras colágenas, denominada membrana de Descemet (Gelatt, 2007).

O endotélio é composto por uma única camada celular. Esta barreira é responsável por manter a transparência da córnea e regular a hidratação do estroma. As células do endotélio apresentam uma grande quantidade de mitocôndrias, retículos endoplasmáticos liso e rugoso, indicando alta atividade metabólica e síntese proteica (Joyce, 2003; Gelatt, 2007).



Fonte: <http://scielo.isciii.es/img/revistas/asisna/v31n1/wpe1c.gif>

Figura 1 - Representação de Corte Histológico de Córnea Normal (200X)

As células da córnea de diversas espécies animais são utilizadas como modelos na busca do entendimento sobre os mecanismos da perda da função desta estrutura em humanos. Vários são os estudos que caracterizam as células obtidas a partir deste tecido. Exemplos: caracterização de células de córnea bovina (Tseng et al., 1981; Joyce 2003; D'hondt et al., 2009; Huang et al., 2010; Singh et al., 2013); caracterização de células equinas (Mathes et al., 2009; Buss et al., 2010); outros caracterizam padrões de reparação celular e alterações provocadas por diferentes tratamentos (Gospodrowicz et al., 1977; Johnstone et al., 1996; Motegi et al., 2003; Bueno et al., 2009; Chou et al., 2014); dentre outros. Entretanto, poucas pesquisas caracterizam quanto à susceptibilidade a diferentes vírus e sua capacidade de produção viral (Wilcox, 1969).

2.12 Técnicas Utilizadas para Caracterização de Células (*in vitro*)

Segundo Erkwil e colaboradores (1990) e Freshney (2005) amostras de tecidos obtidos no cultivo primário são heterogêneas com relação aos tipos celulares que as compõem. Replicatas de uma mesma região do tecido apresentam vários tipos celulares. Após uma ou duas passagens os tipos celulares são selecionados pelas condições de cultivo. Apenas as células com maior potencial proliferativo são capazes de sobressair e permanecer em cultura. Esta população tende a ser homogênea e a manter as características do tecido de origem ao longo de vários subcultivos.

Inúmeras variáveis podem influenciar a obtenção de células, a seleção do tipo celular predominante, a manutenção *in vitro* e os resultados obtidos. Assim, no cultivo celular a caracterização das células em cultivo é imprescindível para: comprovar a sua origem; descartar contaminação cruzada com outras linhagens celulares; identificar o nível de diferenciação celular (diferenciadas ou não); determinar o tipo de linhagem (continua ou finita); a capacidade proliferativa; as características de replicação *in vitro*; eficiência de plaqueamento; dentre outras caracterizações. Impetrar, caracterizar e selecionar uma linhagem celular de alto desempenho é a chave para o desenvolvimento dos bioprocessos (Butler, 2007).

2.12.1 Caracterização Molecular

Caracterização da linhagem celular é vital não apenas para determinar a funcionalidade, mas para determinar a sua autenticidade. Cabe escolher a melhor técnica para a identificação. A tecnologia

molecular permite mapear o material genético ou sua expressão através de técnicas conhecidas como ‘DNA fingerprinting’; ‘DNA profiling’; e da análise de expressão gênica. A citologia disponibiliza a análise de cromossomos (cariótipo) e FISH ou ‘chromosome painting’. Análise das isoenzimas utiliza eletroforese em gel para diferenciá-las (Freshney, 2005).

2.12.2 Morfologia Celular

A observação direta ao microscópio óptico proporciona a observação da morfologia celular capaz de prover indícios para classificar a célula como de aparência fibroblástica ou epitelial, por exemplo. Segundo Freshney (2005) os termos fibroblasto e epitelial são utilizados para referir ao aspecto da célula *in vitro* e não aludir a sua origem. Assim, uma célula bipolar ou multipolar que apresenta um comprimento duas vezes maior que sua largura é denominada fibroblástica. Células com morfologia poligonal e com dimensões mais regulares são classificadas como epiteliais.

Colorações das monocamadas proporcionam um maior contraste, facilitam a visualização e a identificação da morfologia celular. Podem ser utilizados o Giemsa ou Cristal Violeta, por exemplo.

2.12.3 Imunocitoquímica e Imunofluorescência

A imunologia utiliza marcadores específicos capazes de reconhecer moléculas características a cada linhagem celular (Freshney, 2005). As técnicas de imuno marcação são utilizadas para complementar a identificação das células provendo importantes informações acerca do fenótipo, diagnóstico ou prognóstico (DAKO, 2009), como por exemplo, pesquisar a expressão de vimentina para verificar a origem embrionária das células. A vimentina é um componente proteico intermediário capaz de formar microfilamentos citoplasmáticos característicos de células mesenquimais (Mathes et al., 2009; Pang et al., 2010).

2.12.4 Capacidade Proliferativa e Curva de Crescimento

A quantificação das células em cultivo é essencial para a caracterização das capacidades proliferativas de diferentes tipos celulares e para estabelecer condições de reprodutibilidade, uniformidade do cultivo primário e manutenção adequada das linhagens (Freshney, 2005; Huang et al., 2010).

A capacidade proliferativa pode ser avaliada de várias formas. Embora a proliferação de uma monocamada possa ser estimada quando visualizada diariamente sob o microscópio, procedimentos de quantificação garantem maior precisão e confiabilidade.

A quantificação é realizada através de contagem manual por investigador treinado ou por equipamentos automáticos, como o Beckman Counter ou o CASY-1- Scharfe System. A contagem manual de células utiliza o hemocítmetro ou Câmara de Neubauer. Através desta contagem é determinado o número de células em suspensão. O corante Azul de Tripán pode ser utilizado na contagem para diferenciar células viáveis e danificadas, e aprimorar as informações obtidas (Freshney, 2005).

Uma curva de proliferação completa é necessária para a caracterização da linhagem e melhor planejamento do experimento nos estágios iniciais. Uma vez conhecida a curva de crescimento da célula, uma nova caracterização pode ser desenvolvida após alguns dias de cultivo para determinar o efeito de diferentes insumos e compostos na proliferação celular.

A quantificação pode ser obtida também através da mensuração dos produtos celulares como a redução do MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (Mosmann, 1983; Assanga et al., 2013).

2.12.5 Eficiência de Plaqueamento

A eficiência de plaqueamento é um ensaio de longa duração e apropriado para avaliar a taxa de sobrevivência e potencial proliferativo de uma célula obtida em cultivo primário ou estimar outros tipos de respostas em células de linhagem (Freshney, 2005; Huang et al., 2010).

Na determinação da eficiência de plaqueamento ou formação de colônias as células são plaqueadas em baixas densidades e a leitura realizada após uma a três semanas. Assim, a capacidade de proliferação celular é determinada através da avaliação do tamanho da colônia que será maior quanto mais células estiverem presentes; e a taxa de sobrevivência, número de clones sobreviventes, quando avaliado o número de colônias ainda presentes após exposição a diferentes insumos, tratamentos, drogas ou radiação, por exemplo (Pomp et al., 1996).

2.13 Contaminantes Biológicos

A cultura *in vitro* fornece as condições ideais também para o crescimento de diversos microorganismos contaminantes, como por exemplo, vírus, fungos e bactérias. O uso de antibiótico e antifúngico não elimina alguns destes, apenas inibem ou reduzem sua proliferação. A contaminação biológica do cultivo celular ocorre devido à presença destes agentes (Cobo et al., 2005; Freshney, 2005).

A contaminação bacteriana é geralmente evidente devido à turvação e à mudança de cor do meio de cultura como resultado da alteração do pH (Cobo et al., 2005). A contaminação por micoplasma, as menores bactérias conhecidas atualmente (Timenetsky et al., 2006), e por vírus podem não apresentar qualquer alteração na morfologia das células ou no meio de cultura, mas são capazes de interferir na fisiologia, como no metabolismo de aminoácidos e de ácidos nucleicos, reduzindo a taxa de proliferação e a produção de proteínas (Stanbridge e Reff, 1979; McGarrity et al., 1992; Cobo et al., 2005; Timenetsky et al., 2006).

As contaminações virais são comuns em algumas linhagens de células que podem conter um vírus endógeno ou ser contaminada por estirpes exógenas. Podem ainda secretar partículas virais ou expressar antígenos virais em sua superfície.

As fontes primárias de contaminação viral são os reagentes biológicos preparados a partir de tecido animal infectado, cultivos primários e a manipulação laboratorial inadequada (Langdon, 2004; Cobo et al., 2005; Freshney, 2005; WHO, 2010). Segundo Brízneu e colaboradores (2008) 20 a 63% dos cultivos primários de pele estão contaminados por bactérias ou fungos.

A presença de contaminantes em cultivos celulares colocam em dúvida os resultados de pesquisas, pode extinguir linhagens celulares, inviabilizar produção de vacinas virais podendo levar à soroconversão ou provocar doenças em animais vacinados (Wessman e Levings, 1998; Freshney, 2005; Camargos et al., 2008).

Diferentes técnicas são utilizadas para a detecção de contaminantes biológicos, como por exemplo, o isolamento do agente, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polimerase Chain Reaction*) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (Chen, 1977; Freshney, 2005; Schiff, 2005).

As técnicas baseadas na detecção de contaminantes por PCR demonstram altas sensibilidades e especificidades, simplicidade na execução e rapidez na obtenção dos resultados (Rawadi e Dussurget, 1995; Camargos et al., 2008).

2.14 Proliferação viral em Cultivos Celulares

O controle das diversas enfermidades infecciosas e a manutenção da saúde dos animais constituem grandes desafios para a humanidade (Freitas, 2006; Fenner et al., 2011). Algumas doenças animais, inclusive as viroses, necessitam de constante monitoramento e pesquisa, pois podem causar grandes prejuízos à saúde e à economia.

O diagnóstico laboratorial em virologia é determinante para um tratamento correto e controle efetivo da doença (Flores, 2007), e se tornou possível após o desenvolvimento de tecnologias que permitiram a identificação dos vírus, sua replicação, caracterização e pesquisas para delinear formas de tratamento.

Vírus são organismos que necessitam do aparato celular para se replicar. Assim, os cultivos celulares se tornaram um método largamente utilizado para propagação viral (Candeias, 1996).

Vários tipos celulares originados de diversas espécies estão disponíveis comercialmente. Mas, não existe uma célula susceptível a todos os tipos de vírus já identificados (Flores, 2007). Da mesma forma, um mesmo vírus também não é capaz de se propagar em uma ampla variedade de tipos celulares. Geralmente, utilizam-se as células da mesma espécie animal da qual o vírus foi obtido.

Alguns vírus não replicam eficientemente em células de linhagem contínua. Então, ainda hoje, apesar dos avanços tecnológicos, são utilizadas células obtidas por cultivo primário, ovos embrionados e cobaias para replicação, identificação, pesquisa e produção de biofármacos com esses vírus.

A propagação viral em cultivos celulares pode ser monitorada através da detecção da progênie viral, detecção bioquímica de macromoléculas específicas ou visualização de efeitos citopáticos (ECP).

ECP são alterações morfológicas observadas ao longo da monocamada, provocadas pelo processo replicativo dos vírus. Determinado agente viral produz um tipo de ECP característico em determinada linhagem celular como, por exemplo, formação de sincícios (células gigantes multinucleadas), aglomeração celular, células arredondadas próximas a regiões de lise, vacuolizações, entre outros (Flores, 2007). Entretanto alguns vírus são denominados não citopatogênicos, pois não causam ECP nas células infectadas.

O vírus causador da diarreia bovina e o herpesvírus bovino tipo I são vírus descritos pela OIE (World Organisation for Animal Health), capazes de produzir ECP em células MDBK, células de origem bovina utilizadas no diagnóstico das respectivas patologias causadas por esses vírus.

2.14.1 Vírus da Diarreia Bovina (BVDV)

O Vírus da Diarreia Bovina (BVDV) provoca uma enfermidade infectocontagiosa com distribuição mundial e os sinais clínicos variam desde quadros subclínicos à condição fatal decorrente da doença das mucosas (OIE, 2008).

BVDV é um perigo particularmente importante para a transferência de embriões e a produção de biofármacos devido à elevada frequência de contaminação de lotes de soro fetal bovino utilizado em cultivos celulares (OIE, 2008).

2.14.2 Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1)

O Herpesvírus bovino tipo-1 (BoHV-1) possui distribuição mundial e provoca doenças de grande importância econômica (OIE, 2010). É, portanto, objeto de programas de controle e erradicação em todo o mundo (OIE, 2010), embora já tenha sido erradicado em alguns países europeus (Flores, 2007; OIE, 2010).

A movimentação e comercialização internacional de animais requerem que estejam livres de infecções pelos BoHV-1, vírus da Leucose Bovina (BLV), vírus da Língua Azul (BTV), entre outras (Flores, 2007).

3 Materiais e Métodos

3.1 Adaptação ao Meio de Cultivo Livre de Soro de Origem Animal

3.1.1 Linhagens Celulares

Células utilizadas: MDBK (CCL-22 ATCC) oriunda do LANAGRO e VERO (CCL-81 ATCC) oriunda do Laboratório Lema Biologic do Brasil. Ambas as células pertencentes ao banco de células do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

3.1.2 Meios de cultivo

As células foram cultivadas nos seguintes meios:

- MEM e SFB: Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM - GIBCO™) suplementado com 5% de SFB, penicilina potássica (200 U/mL) e estreptomicina (2 mg/mL).
- SMT 1 – Suplemento ou Meio Teste 1: meio MEM suplementado com 5% de hidrolisado de soja comercial, 12,5 mg/mL (Sigma, cat. n. 58903C), penicilina potássica (200 U/mL) e estreptomicina (2 mg/mL).
- SMT 2 – Suplemento ou Meio Teste 2: meio MEM suplementado com 10% hidrolisado de soja comercial, 25 mg/mL (Sigma, cat. n. 58903C), penicilina potássica (200 U/mL) e estreptomicina (2 mg/mL).
- SMT 3 – Suplemento ou Meio Teste 3: meio VP-SFM, *virus production-serum free media*, (GIBCO™, BRL cat n. 12559-027) com ultra-baixo teor de proteína (5 µg/ml), isento de soro e de outros componentes de origem animal ou humana, concebido para o crescimento de células VERO e para a produção de vírus (Frazzati-Gallina et al., 2001). Segundo o fornecedor este meio é adequado também para o crescimento de células COS-7, MDCK, células BHK-21 (cultura de suspensão) e células HEp2, e para a produção de proteína recombinante. Acrescido de glutamina 4mM, penicilina potássica (100 U/mL) e estreptomicina (1 mg/mL).

Os cultivos foram incubados à 37° C, em atmosfera com 5% de CO₂.

3.1.3 Adaptação das células ao meio livre de soro

O hidrolisado de soja obtido comercialmente na concentração 250 g/L foi diluído em água ultrapura e previamente autoclavada para atingir uma concentração da solução estoque de 250 mg/mL. O meio SMT 1 foi preparado utilizando-se meio MEM acrescido de 5% da solução estoque de hidrolisado de soja mantendo uma concentração final de 12,5 mg/mL. O meio SMT 2 foi preparado utilizando-se meio MEM acrescido de 10% da solução estoque de hidrolisado de soja mantendo uma concentração final de 25 mg/mL.

O meio VP-SFM (SMT 3) foi preparado conforme instruções do fabricante, GIBCO™ e filtrado utilizando-se membrana 0,22 µm.

O MEM suplementado com 5% de SFB, foi gradualmente sendo retirado do cultivo a cada repique e os meios livres de produtos de origem animal (suplemento ou meio teste - SMT), foram acrescentados. Conforme apresentado na tabela 2.

Este experimento para adaptação das células foi realizado uma vez em placas de cultivo celular com seis cavidades e cada SMT foi testado em triplicata, conforme protocolo para adaptação em meio livre de soro de origem animal (GIBCO, 2003). Brevemente, no primeiro repique as células foram desagregadas utilizando tripsina (Sigma cat.T-4799) e determinado o número de células através da contagem manual pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán.

A contagem manual foi realizada diluindo-se uma alíquota da suspensão de células obtidas após a tripsinização, em corante Azul de Tripán 0,4% (Vetec – Brasil), através do emprego de um fator de diluição conhecido. O número de células presentes nesta diluição foi calculado após a contagem dos quatro quadrantes periféricos do hemocitômetro, a Câmara de Neubauer. Utilizou-se para o cálculo a média dos quatro quadrantes, observados em microscópio invertido (CK Olympus Tokyo), multiplicado pelo fator de diluição utilizado e pelo fator de correção da câmara (10^4).

Uma alíquota desta suspensão celular foi obtida e mantida a relação de $0,5 \times 10^5$ cel/cm² e, acrescentado ao final, 75% do meio suplementado com SFB e 25% do SMT 1, 2 ou 3 (Fase 1 – Tab. 2). Na segunda passagem o número inicial de células foi mantido ($0,5 \times 10^5$ cel/cm²) e o meio de cultivo foi constituído por 50% de cada suplemento (50% SFB e 50% do SMT 1, 2 ou 3, Fase 2 – Tab. 2). Na terceira passagem (Fase 3 – Tab. 2), a mesma quantidade inicial de células foi mantida com 25% do MEM e SFB e 75% de SMT. Apenas na fase 4 (Tab. 2) o meio MEM suplementado com SFB foi completamente removido e utilizado apenas o meio constituído por 100% do SMT 1, 2 ou 3. Nesta última fase o SFB não foi utilizado para inativar a tripsina durante a passagem de células ou para suplementar os meios testados (SMT).

Após cada passagem as células foram incubadas a 37° C, em atmosfera com 5% de CO₂ e mantidas por cinco dias até a próxima passagem, contagem e gradual fase de adaptação. O controle do experimento foi realizado com triplicatas da mesma linhagem celular em estudo, mantida nas mesmas condições de temperatura e atmosfera de CO₂, submetidas às mesmas condições de contagem manual, porém cultivadas apenas com meio MEM suplementado com 5% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina.

Tabela 2 - Fases para a adaptação das células MDBK e VERO ao suplemento hidrolisado de soja e meio livre de insumos de origem animal.

	Fase 1 (%)	Fase 2 (%)	Fase 3 (%)	Fase 4 (%)
MEM e SFB^a	75	50	25	0
SMT 1	25	50	75	100
SMT 2	25	50	75	100
SMT 3	25	50	75	100

* SMT: Suplemento ou meio teste.

^a MEM e SFB: Foram retirados gradualmente ao longo das fases.

3.1.4 Análises Estatísticas

O número de células obtido a cada subcultivo foram plotados em tabelas do programa Graphpad Prisma 5 (Instat, Graphpad Software, San Diego, CA, USA) utilizando para análise estatística o Teste t não paramétrico e desenho experimental para não pareados, Mann-Whitney. Foi considerando para nível de significância valores de $p < 0,05$.

3.2 Obtenção e Caracterização das Células da Córnea Bovina

3.2.1 Obtenção das Amostras

Os globos oculares para a retirada da córnea foram obtidos em abatedouro. Foram aproveitados três olhos de animais adultos e de ambos os gêneros. O material foi transportado até o Laboratório de Retrovírus (RetroLab) da Escola de Veterinária (EV-UFMG) em Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM – GIBCO/USA cat. 41500-083) tratado com 2% p/s (Penicilina G sódica 100 U/mL; Sulfato de Estreptomicina 100 µg/mL) e 1% Anfotericina B (0,25 µg/mL).

Na cabine de segurança biológica os globos oculares foram lavados em novo meio com a mesma concentração de suplementos. A córnea foi retirada e lavada cinco vezes permanecendo cinco minutos em cada solução de lavagem (MEM, 2%p/s, 1% fug.). Após lavagem, a córnea em forma de botão foi raspada com bisturi número 20 (Embramac, China). As camadas (epitélio, estroma e endotélio) foram raspadas indiscriminadamente até que não restassem grandes fragmentos. Algumas alíquotas obtidas com a raspagem foram mantidas em STV1X (Solução 0,2% Tripsina e 0,02% Versene) por três minutos em estufa 37°C e posteriormente em metade da placa foi adicionado apenas MEM e p/s nos poços e na outra metade MEM com SFB e p/s. Outras alíquotas foram distribuídas diretamente em placas de cultivo celular de seis cavidades, sem passar pela desagregação química (Fig. 2). As placas foram incubadas a 37°C com atmosfera de 5% CO₂.

As células capazes de aderir à superfície e que atingiram a confluência mínima de 70%, formando uma monocamada, foram tripsinizadas e transferidas para uma garrafa de cultivo celular de 25cm² conforme protocolo para subcultivo celular do Manual de Cultivo Celular da EV-UFMG (não publicado) e Rovozzo e Burke (1973) brevemente descrito abaixo.

O meio de cultivo foi descartado e a monocamada lavada com PBS1X (NaCl; KCl; H₂KO₄P; Na₂HPO₄; H₂O MiliQ q.s.p.). O STV1X foi utilizado para desagregação celular. Após o desprendimento da monocamada e individualização das células a ação da STV1X foi interrompida com MEM suplementado com 10% de SFB (Invitrogen Cat.12657-029).

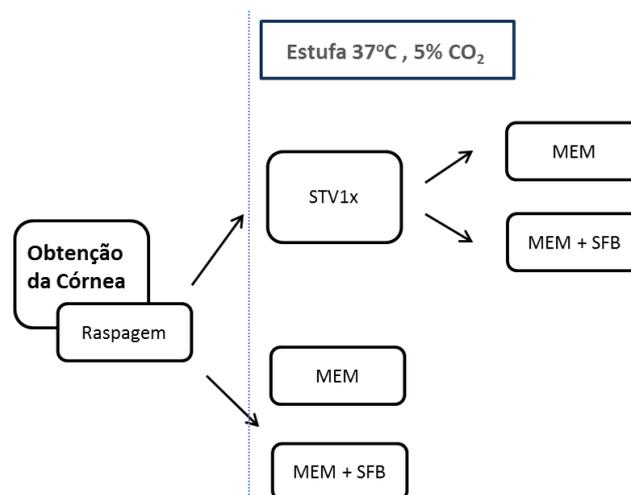


Figura 2 - Diagrama representando os tratamentos utilizados no cultivo primário para obtenção de células de córnea bovina (CorBov)

O meio contendo as células em suspensão foi transferido para novas garrafas de poliestireno para cultivo celular. Conforme os novos cultivos se estabeleciam e atingiam confluência de no mínimo 70% (aproximadamente 5×10^5 cel/cm²) eram novamente subcultivados (proporção 1:2), eventualmente

congelados em nitrogênio líquido (-196°C) e testados quanto a capacidade de aderência em superfícies de vidro e de plástico em garrafas utilizadas para cultivo de células.

3.2.2 Congelamento e Descongelamento

Uma vez estabelecida a cultura procedeu-se o congelamento conforme protocolo do Manual de Cultivo Celular da EV-UFMG (não publicado). Resumidamente, o frasco de cultivo contendo a monocamada confluyente e com no máximo 48 horas após o último subcultivo, foi tripsinizado e a suspensão de células obtida para contagem em Câmara de Neubauer. A suspensão de células foi diluída a razão de 2 a 4 x 10⁶ células/mL, 40% de SFB e 10% do criopreservante Dimethylsulfoxido (DMSO, Sigma D-5879). Esta suspensão contendo as células foi distribuída em criotubos e estes congelados a -80°C, envoltos por algodão hidrofóbico e dentro de caixas de isopor. Após 72 horas foram transferidos para botijões de nitrogênio líquido (-196°C).

Vinte dias após o congelamento uma alíquota (criotubo) foi descongelada e as células transferidas para uma garrafa de cultivo celular de 25cm² de área para cultivo. A viabilidade, percentual de células viáveis, foi calculada pelo método de exclusão utilizando o corante Azul de Tripán 0,4% (Vetec – Brasil) em câmara de Neubauer imediatamente após o descongelamento. Utilizou-se para o cálculo a média dos quatro quadrantes da câmara (conforme descrito anteriormente). Células não coradas pelo Azul de Tripán foram contabilizadas como viáveis, e células coradas, indicando a presença de alterações na integridade da membrana plasmática, foram contadas como inviáveis. Os dados foram expressos como percentagem de células viáveis comparada à contagem total de células (Rovozzo e Burke, 1973; Hassell e Engelhardt, 1977).

3.2.3 Observação da Morfologia Celular e da confluência da monocamada

A observação da morfologia das células e a avaliação da proliferação através da avaliação da densidade celular em relação ao substrato ou através das quantificações foram realizadas em microscópio invertido (CK Olympus Tokyo) e fotografadas em microscópio (Leica DMIL) equipado com um sistema de imagens (Leica DFC310). Foram utilizadas, quando necessário, colorações de Muiy-Grunwald-Giemsa e Cristal Violeta 1% para melhor visualização das células.

Os experimentos foram realizados em triplicatas para cada tratamento testado. Todos os meios utilizados continham 1% p/s para contenção de eventual proliferação bacteriana.

3.2.4 Métodos Utilizados para Quantificar a Proliferação Celular

3.2.4.1 Contagem Manual - Azul de Tripán

Garrafas de cultivo com monocamadas confluentes das células CorBov e MDBK foram tripsinizadas e as células obtidas foram contadas e distribuídas nas respectivas placas com 96, 24 e 12 poços, separadamente, na razão de 1x10⁴ cel/cm² para quantificação da proliferação celular. Diferentes concentrações de SFB (entre 0 e 10%) foram aplicadas às triplicatas de cada linhagem para posterior comparação da proliferação das células ao longo do tempo.

A quantificação das triplicatas foi obtida através da recuperação das células em um mesmo volume de suspensão celular, padronizado para cada placa e posterior contagem manual em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Tripán, para favorecer a visualização das células e diferenciar células viáveis e não viáveis.

3.2.4.2 MTT

O MTT (Sigma Cat.M2128) foi utilizado para avaliar a capacidade e o perfil de replicação das células quando expostas a diferentes concentrações de SFB.

As células CorBov e MDBK foram obtidas e o número de células contados. Distribuídas em placa na razão de 1×10^4 células/cm² e suplementadas com 0%, 0,2%, 1%, 2% e 5% de SFB. Foram utilizadas oito placas de 96 poços, incubadas em estufa 37°C e 5% CO₂, para leituras das triplicatas de cada concentração de SFB, realizadas após 24, 48, 72, 96, 120 horas e 12, 19 e 26 dias.

Triplicatas do teste “branco” sem células, cavidades contendo apenas o meio com as concentrações de SFB testadas, e triplicatas controle, contendo células com meio livre de SFB (0% SFB), foram utilizadas para permitir a correção das leituras e posterior comparação dos níveis de proliferação celular.

Nos tempos determinados para cada leitura, 20 µL da solução filtrada de MTT (5mg MTT/mL em PBS1X) foi adicionado a cada cavidade da placa e esta incubada por 4 horas, protegida da luz, em estufa 37°C e 5% CO₂. Após a incubação o sobrenadante foi retirado, adicionado 150µL de Isopropanol (0,04M Isopropanol, HCl 2N) e o conteúdo homogeneizado para dissolver os cristais de Formazan que se formaram. Após a solubilização destes cristais a intensidade da coloração azulada foi mensurada em espectrofotômetro a 540nm, Thermoplate- TP Read -Leitor Microelisa (Supino, 1995; Giocondo, 2007).

O resultado foi obtido através do calculo abaixo:

$\frac{\text{Leitura do poço} - \text{Média da leitura brancos respectivos}}{\text{Leitura do controle (0\% SFB)}}$

3.2.5 Caracterização Imunocitoquímica

O ensaio imunocitoquímico foi realizado no laboratório de Histopatologia do Hospital Veterinário da UFMG.

As células CorBov foram semeadas sobre lamínula na proporção de 1×10^4 células/cm² e incubadas em estufa 37°C e 5% de CO₂. Após 24-48 horas foram fixadas com Acetona P.A. e mantidas em álcool 70° a -4° C em câmara úmida até a realização da reação Estreptavidina-Biotina-Peroxidase (DAKO – USA Cat.0690) e anticorpos primários para Vimentina (Monoclonal Mouse Anti-Vimentin Clone V9 – DAKO-USA Cat.M0725). Os controles negativos da reação foram constituídos de células CorBov sem a utilização de anticorpos primários na reação. Cortes histológicos de pele foram utilizados como controle positivo.

As lâminas contendo os controles positivos foram desparafinadas e hidratadas. O peróxido de hidrogênio foi utilizado para remover as peroxidases endógenas presentes nos tecidos, e o soro bloqueio (Protein Block Serum Free, DAKO – USA Cat.X0909), utilizado para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos primários.

Os anticorpos primários para Vimentina foram incubados *overnight* em câmara úmida. Após esta incubação foram aplicados os anticorpos secundários por 45 minutos. Em seguida a estreptavidina por 30 minutos. O cromógeno utilizado para a revelação foi a diaminobenzidina (sistema de substrato DAB- 3'3 diaminobenzidine tetrahydrochloride, Vision Lab Corp.) e contra coloração realizada com hematoxilina de Harris.

3.2.6 Eficiência de Plaqueamento

A eficiência de plaqueamento das células CorBov em baixas densidades foi avaliada através do protocolo adaptado de Freshney (2005).

As células CorBov e MDBK, foram obtidas de uma monocamada confluyente após tripsinização, diluídas 1:10 em Azul de Tripán e contadas em câmara de Neubauer. Cada tipo celular foi então diluído:

- A) 6,25 células/cm² (60 células por poço) em meio MEM suplementado com 10% de SFB e 1% p/s;
- B) 12,5 células/cm² (120 células por poço) de MEM suplementado com 4% de SFB e 1% p/s.

As suspensões diluídas foram distribuídas em placas de seis poços e então incubadas em estufa 37°C com 5% CO₂ por 11 dias. Após a incubação o sobrenadante foi descartado e células fixadas e coradas com cristal violeta 1% por 10 minutos. As colônias, constituídas de um número maior que 50 células e visualizadas macroscopicamente foram contadas.

A eficiência de plaqueamento foi calculada através da fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de colônias formadas}}{\text{N}^\circ \text{ de células plaqueadas}} \times 100 = \text{Eficiência de plaqueamento}$$

3.2.7 Detecção de Contaminantes pela reação PCR

A avaliação de contaminantes mais frequentemente encontrados em cultivos celulares, como Micoplasma, BVDV, PPV, PCV-1 e BTV (Rawadi e Dussurget, 1995; WHO, 2010; Oliveira, 2012; Pinheiro de Oliveira et al., 2013) foi realizada através da PCR. Esta avaliação foi realizada no Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, LANAGRO/MG.

Foram utilizadas diferentes PCRs para detectar o material genético, RNA ou DNA, presente em cada um dos possíveis contaminantes. A avaliação da presença ou ausência do BVDV foi realizada pelo método de RT-PCR (Transcrição Reversa seguida da PCR convencional - cPCR) e RT-PCR tempo real (RT-qPCR). Micoplasma, PCV1, PPV e BTV foram testados pela PCR convencional (cPCR) ou PCR em tempo Real (qPCR). A eficiência das extrações foi demonstrada por cPCR para o gene bovino GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), gene conservado presente nas células dos mamíferos (Oliveira, 2012).

Foram testadas 4 amostras das células CorBov nas passagens p.4, p.5 e p.8 (Tab. 3) para análise conforme condições descritas na tabela 3. Todas foram congeladas a -20°C até a realização dos testes.

Tabela 3 - Relação das Amostras CorBov Testadas para diversos Contaminantes

Número da Amostra	Número da Passagem	Substrato utilizado para diluição
1	p.5	MEM
2	p.8	MEM + SFB
3	p.4	MEM + SFB
4	p.8	MEM

3.2.8 Teste de Infectividade por BVDV e BoHV1

A susceptibilidade da célula CorBov aos vírus de origem bovina BVDV e BoHV 1 foi avaliada infectando-as com estirpes de referência do BVDV NADL (ATCC® VR-534TM) e BoHV-1 (ATCC® VR-188TM).

As células CorBov foram semeadas em placa 96 cavidades na proporção de 3 x 10⁴ cel/cm² e infectadas com 100 TCID₅₀ em 50uL de BVDV e do 100 TCID₅₀ em 50 µL de BoHV1 . As placas foram incubadas em estufa 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após 72 horas as placas foram observadas quanto ao aparecimento de ECP.

Neste experimento, sob as mesmas condições, as células MDBK, utilizadas para o diagnóstico destes vírus (OIE, 2008), foram utilizadas como controle positivo para comparação do ECP. Nos controles

negativos foram utilizadas células CorBov e MDBK MOCK infectadas, ou seja, tratadas com o meio diluente sem vírus.

3.2.9 Avaliação da Replicação do BoHV1 em células CorBov

Para estimar a capacidade da célula CorBov em suportar a replicação do BoHV1 o cultivo celular foi infectado e os sobrenadantes coletados em diferentes tempos após a infecção (PI). Posteriormente a curva de replicação viral foi determinada a partir da titulação do vírus nos sobrenadantes obtidos.

Neste experimento, garrafas de cultivo com monocamadas confluentes das células CorBov e MDBK foram tripsinizadas, contadas e diluídas a uma razão de $7,8 \times 10^4$ células/cm², distribuídas em placas de seis poços e incubadas *overnight* em estufa 37°C em atmosfera de 5% CO₂.

As células foram infectadas com 0,05 MOI de BoHV1 (ATCC VR-188). Após uma hora de adsorção o sobrenadante foi recolhido e o meio de cultivo MEM suplementado com 2,5% de SFB e 1% p/s foi adicionado. As placas foram novamente incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os sobrenadantes das triplicatas foram coletados 12, 24, 48 e 72 horas após a infecção e congelados a -80°C até a titulação viral.

3.2.9.1 Titulação viral

Diluições seriadas na base 10 (10^{-1} a 10^{-10}) foram utilizadas para a titulação viral nos sobrenadantes celulares. Cada diluição foi distribuída em uma coluna da placa de 96 poços e as células MDBK foram semeadas em todos os poços na razão de 3×10^4 células/cm². Desta forma, cada diluição foi testada em octoplicata.

Em todas as placas, as duas últimas colunas (11 e 12) continham apenas células e meio de cultivo (controles negativos). Uma das colunas contendo apenas células foi escolhida e infectada com o vírus de referência para controle positivo em cada experimento.

As placas foram incubadas em estufa 37°C e 5% CO₂ e observadas após 72 horas em microscópio invertido para detecção da presença de ECP e cálculo do título de vírus (TCID₅₀). Para cálculo do título viral foi utilizado o método de Reed & Muench (Rovozzo e Burke, 1973). Foram considerados positivos os poços que apresentassem qualquer evidência de ECP, mesmo quando presente em uma pequena área.

3.2.10 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prisma 5 (Instat, Graphpad Software, San Diego, CA, USA) utilizando para análise o teste t não paramétrico e desenho experimental para não pareados, Mann-Whitney. Foi considerando para nível de significância valores de $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Adaptação ao Meio de Cultivo Livre de Soro de Origem Animal

4.1.1 Adaptação das células MDBK

As células MDBK cultivadas na fase 2 (Fig.3), com 50% do meio MEM com SFB e 50% do meio VP-SFM (SMT3), portanto, na presença de uma concentração de 2,5% de SFB, apresentaram o mesmo padrão de crescimento celular quando comparadas ao controle ($p=0,7$).

As células MDBK adaptadas na fase 2 ao meio com 50% de MEM e SFB e 50% de SMT 1, e outro experimento com 50% de MEM e SFB e 50% de STM 2, ou seja 2,5% ou 5% de hidrolisado de soja e 2,5% de SFB em ambas (Fig.3), também apresentaram o mesmo padrão de crescimento celular quando comparadas ao controle ($p= 0,1$)

O controle mantido com 5% SFB não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,4$) quando as duas fases da adaptação da célula MDBK foram comparadas (Fig.3).

Não foi possível continuar a adaptação das células MDBK nas fases 3 e 4 desde experimento devido a presença de contaminação por bactérias.

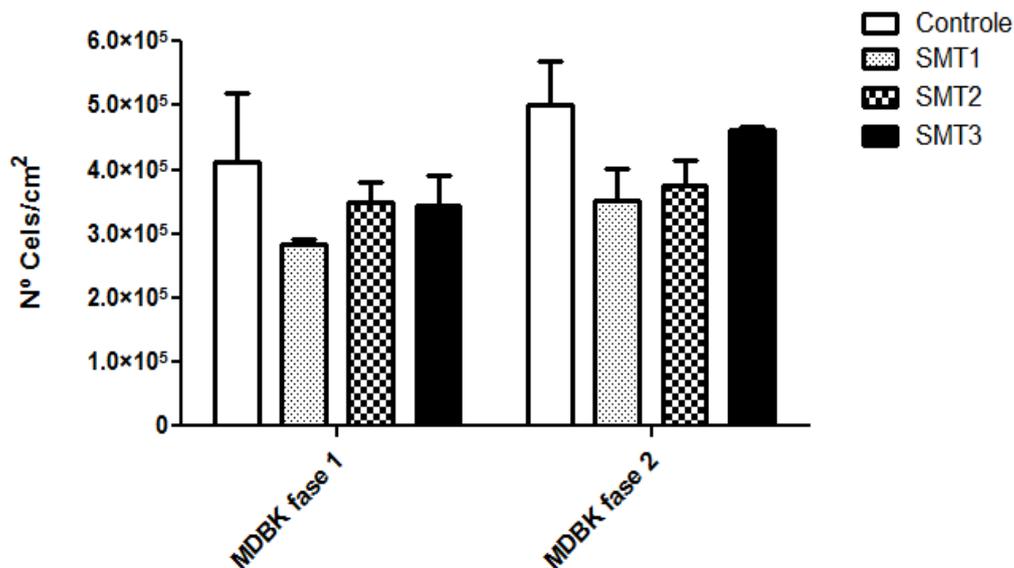


Figura 3 - Quantidade de células obtidas ao longo da adaptação das células MDBK aos SMT nas diferentes fases descritas na Tabela 2. Valores obtidos através da média da contagem das triplicatas após cinco dias de incubação entre cada fase.

As células MDBK apresentaram aderência ao substrato e mantiveram a mesma morfologia observada nas células utilizadas como controle (Fig. 4A), durante as fases de adaptação com o meio VP-SFM (Fig. 4B) e quando suplementadas com hidrolisado de soja (Fig. 4C e 4D).

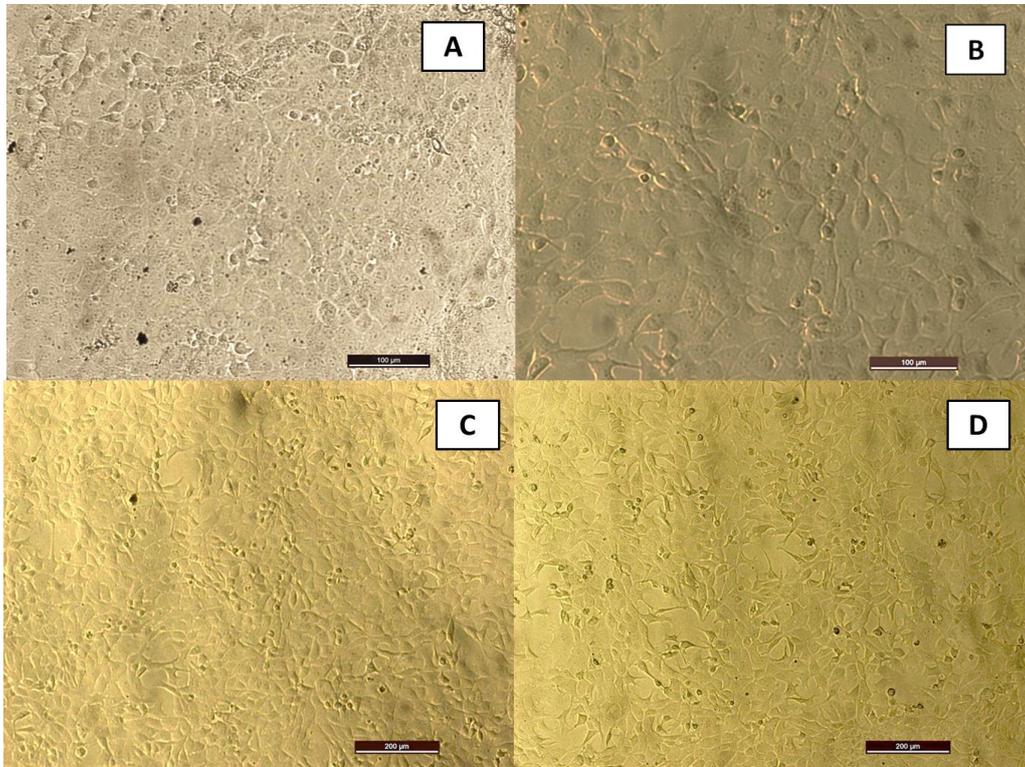


Figura 4 - Imagens da fase 2 da adaptação das células MDBK. **A)** Controle. Células MDBK suplementadas com 5% de SFB em MEM. Aumento de 200X. **B)** Células MDBK com 25% de meio VP-SFM (STM 3) e 2,5% de SFB em MEM. Aumento de 200X. **C)** Células MDBK com 50% MEM e SFB e 50% STM 1 (2,5% de Hidrolisado de Soja e 2,5% de SFB em MEM). Aumento de 100X. **D)** Células MDBK com 50% MEM e SFB e 50% do SMT 2 (5% de Hidrolisado de Soja e 2,5% de SFB em MEM). Aumento 100X.

4.1.2 Adaptação das células VERO

As células VERO cultivadas no meio VP-SFM (SMT 3), nas fases dois e quatro (Fig. 5), apresentaram um padrão de crescimento celular maior que as células utilizadas no controle, suplementadas com 5% de SFB. Entretanto esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,1$).

Na fase quatro, as células VERO em meio MEM suplementado com 5% ou 10% de hidrolisado de soja, SMT 1 e 2 (Fig. 5) apresentaram estatisticamente o mesmo padrão de crescimento celular quando comparadas ao controle ($p=0,83$ SMT 1; e $p=1,0$ SMT 2).

O controle de crescimento celular suplementado com 5% SFB manteve o mesmo padrão de crescimento (Fig. 5) ao longo das quatro fases observadas ($p=0,7$).

As células VERO visualizadas ao microscópio e analisadas qualitativamente na fase 4, quando cultivadas apenas com o meio VP-SFM, SMT 3 (Fig. 6B) apresentaram aderência ao substrato e mantiveram a mesma morfologia observada no meio suplementado com SFB (Fig. 6A). Na mesma fase, as células VERO cultivadas com SMT 1 e 2, 5% e 10% de hidrolisado de soja, não atingiram confluência de 100%, apresentaram uma distribuição irregular da monocamada e presença de maior número de células mortas no sobrenadante do meio SMT 1 (Fig. 6C e 6D).

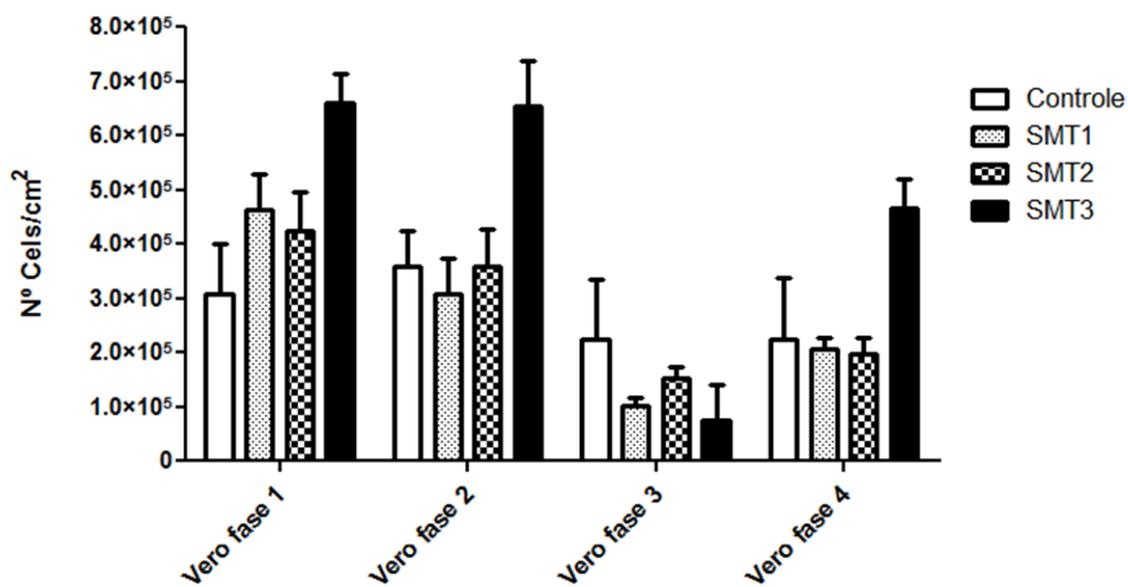


Figura 5 - Quantidade de células obtidas ao longo da adaptação das células VERO aos SMT 1,2 e 3 nas diferentes fases descritas na Tabela 2. Valores obtidos através da média da contagem das triplicatas após cinco dias de incubação entre cada fase.

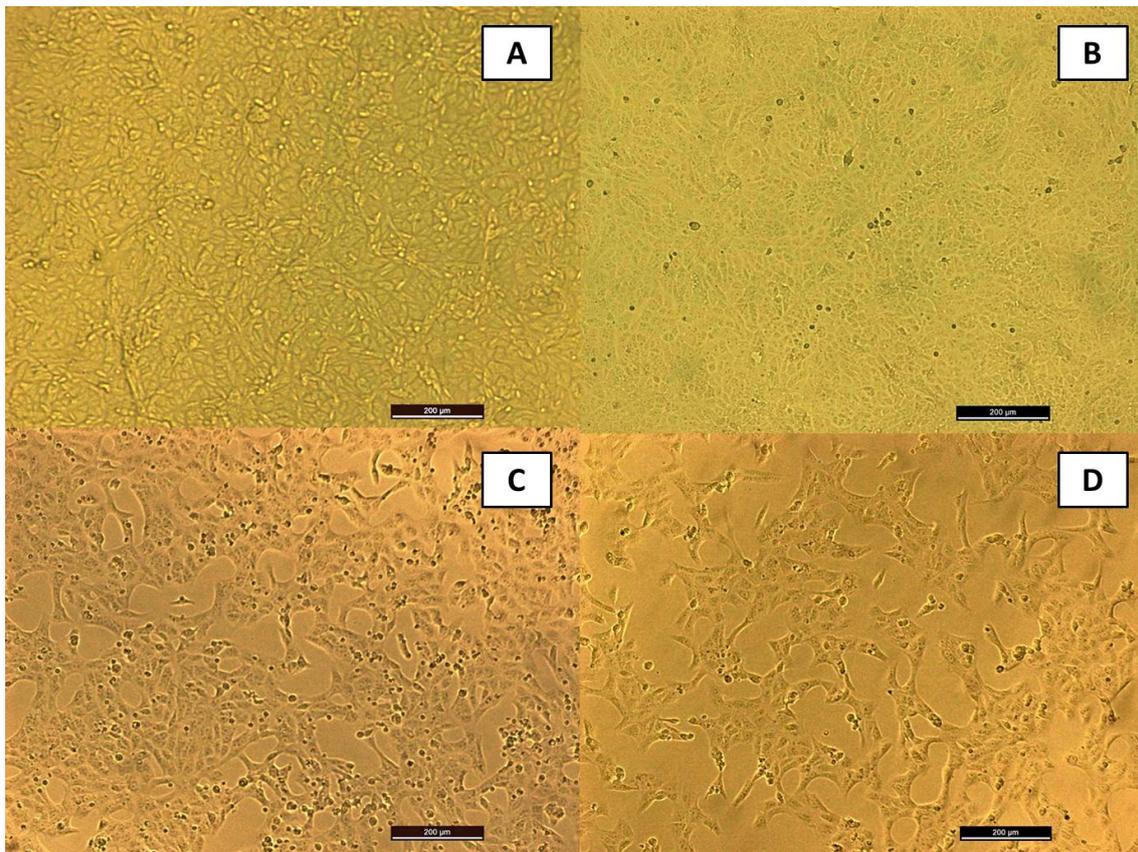


Figura 6 - Imagens da fase 4 da adaptação das células VERO. Aumento 100X. A) Controle. Células VERO suplementadas com 5% de SFB. B) Células VERO com 100% de meio SMT 3 (VP-SFM). C) Células VERO com 100% do meio SMT 1 (MEM suplementado com 5% de Hidrolisado de Soja). D) Células VERO com 100% do meio SMT 2 (MEM suplementado com 10% de Hidrolisado de Soja).

4.2 Obtenção e Caracterização das Células da Córnea Bovina

Todos os raspados da córnea, tratados ou não com STV1X, foram cultivados em placas para cultura de células, em meio MEM contendo bactericidas e fungicidas e algumas das culturas foram suplementadas com SFB.

Inicialmente alguns poços apresentavam, no sobrenadante, grumos de células com a presença de células achatadas, cúbicas e justapostas caracterizando uma morfologia de células epiteliais (Fig. 7A). Entretanto, ao final da primeira semana, estas células já não estavam presentes e apenas nos poços suplementados com SFB foram observadas poucas células aderidas (Fig. 7 B e C; Fig. 8).

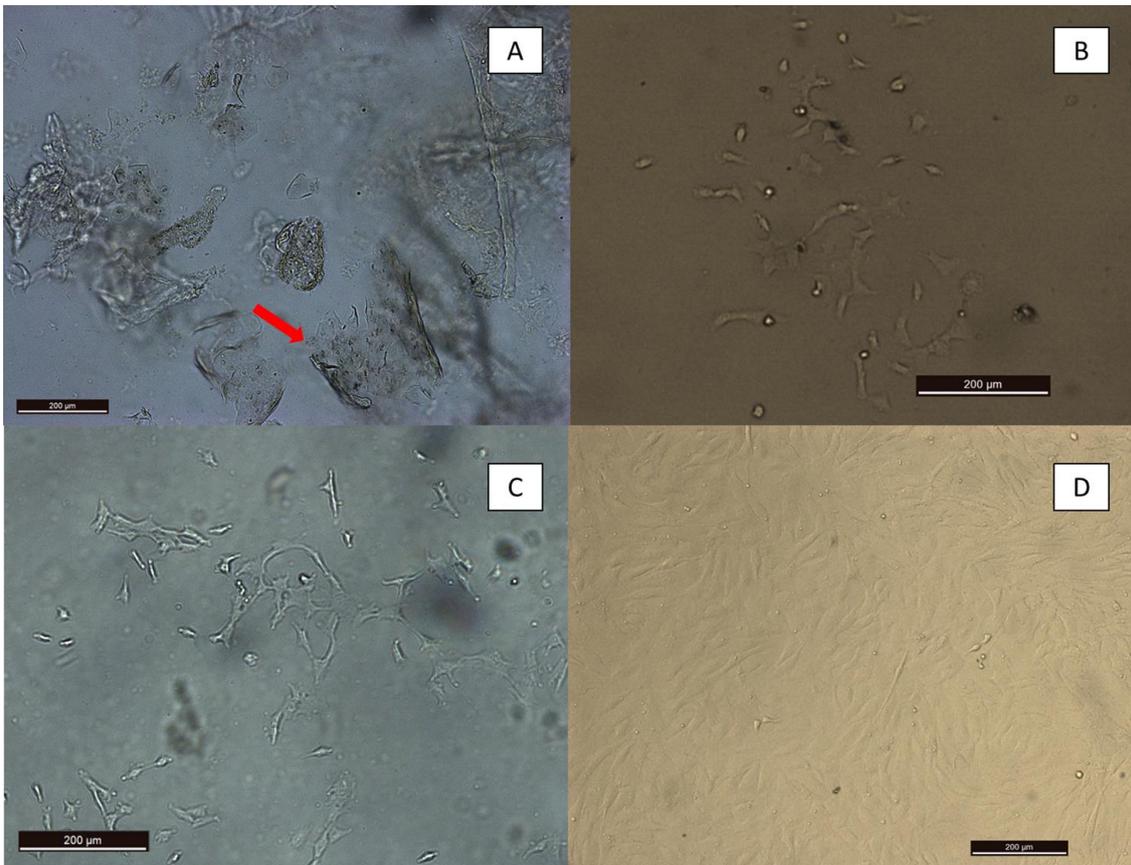


Figura 7 - Imagens obtidas após o cultivo primário de células da córnea bovina. Aumento 100X. A) Imagem dos primeiros dias após a raspagem da córnea e incubação. A seta indica fragmentos de tecido. (B e C) Presença de poucas células aderidas após três semanas. D) Células da córnea bovina após 60 dias apresentando monocamada com 100% de confluência.

Ao longo das três semanas iniciais, apenas os tecidos que foram submetidos ao STV 1X para desagregação durante o cultivo primário e suplementados com SFB, apresentaram um reduzido número de células aderido à superfície de alguns poços (Fig. 7B). Estas poucas células apresentaram morfologia irregular, formando pequenos nichos e com a presença de algumas células esféricas no sobrenadante (Fig. 7C). Estes pequenos nichos de células não apresentaram aumento na densidade celular apesar das trocas de meio de cultivo a cada cinco dias, que fornecia novo aporte nutricional. Tentativas de obtenção de células através da tripsinização de alguns poços e transferência para outros substratos não impactaram positivamente na proliferação celular.

Após as tentativas sem sucesso para aumentar a densidade celular os meios de todos as cavidades das placas do cultivo primário foram trocados por meio MEM contendo 20% de SFB e 1% p/s e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Somente após 60 dias de incubação as placas foram retiradas da estufa para nova observação e posterior descarte. Porém, alguns poços apresentavam monocamada celular com 100% de confluência, poucas células no sobrenadante e as células aderidas com aspecto de fibroblastos (figura 7D). Durante estes dois meses o meio de cultivo não foi repostado. Três globos oculares de bovinos foram utilizados para obtenção das células da córnea. Entretanto, foi possível obter células de apenas dois, e após 60 dias de incubação.

As monocamadas foram então tripsinizadas e as células transferidas para outros substratos como frascos de poliestireno tratados para cultivo e frascos de vidro. A partir de então as células CorBov foram

subcultivadas utilizando a proporção de 1:2 a 1:5, utilizando MEM suplementados com 10% SFB e 1% p/s. As passagens foram realizadas a cada três ou cinco dias, após atingirem no mínimo 70% de confluência. As células se multiplicaram durante 24 passagens quando os experimentos chegaram ao final e o trabalho foi interrompido para análises dos dados e finalização. Entretanto, não apresentavam indícios de diminuição de proliferação indicando que possivelmente seriam capazes de passar por mais passagens. Com aumento na quantidade de células CorBov durante as passagens realizadas foi possível congelar amostras, verificar presença de contaminantes e realizar experimentos para caracterização das mesmas.

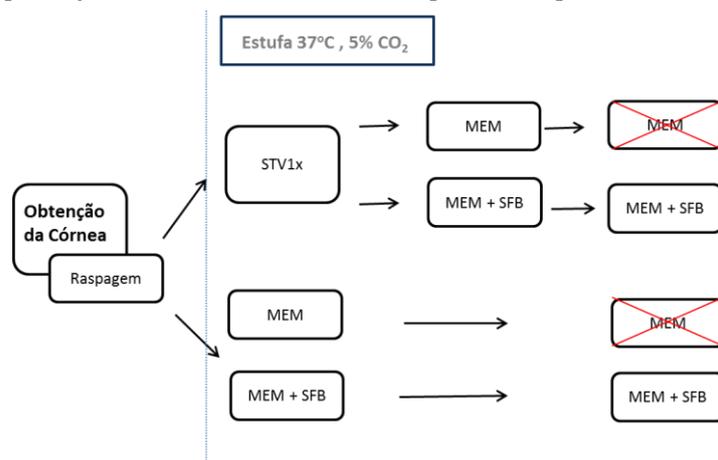


Figura 8 - Diagrama com os resultados dos tratamentos utilizados para obtenção das células de córnea bovina (CorBov) no cultivo primário. A marcação em vermelho indica as cavidades que na ausência de SFB não apresentaram células aderidas.

4.2.1 Congelamento e Descongelamento

Oito alíquotas de células CorBov nas passagens quatro e cinco foram congeladas (4×10^6 cel/mL) a -196°C em nitrogênio líquido. Após 20 dias uma alíquota de um mililitro foi descongelada e as células depositadas em garrafa de poliestireno, com área para cultivo de 25 cm^2 . Imediatamente após o descongelamento, foi verificada viabilidade de 95,3% através da contagem manual pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán.

Após, o descongelamento as células apresentavam uma morfologia similar a fibroblasto e atingiram confluência de 100% após 24 horas. Subcultivos posteriores, foram realizados quando a monocamada atingia o mínimo de 70% de confluência, foram realizados para expandir a quantidade de células. Foram realizadas 24 passagens.

4.2.2 Curva de Proliferação Celular

Inicialmente, as células CorBov e MDBK foram comparadas quanto à capacidade de proliferação frente às concentrações de 5% e 10% de SFB por 5 dias.

O perfil de multiplicação de ambas as linhagens começou a se diferenciar a partir de 48 horas. As células MDBK apresentaram uma taxa de crescimento maior a partir de 72 horas. Entretanto no quinto dia, 120 horas, ponto em que o gráfico assinala a maior diferença na relação do número de células por centímetros quadrados, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as duas linhagens celulares, $p=0,1$ (Fig. 9).

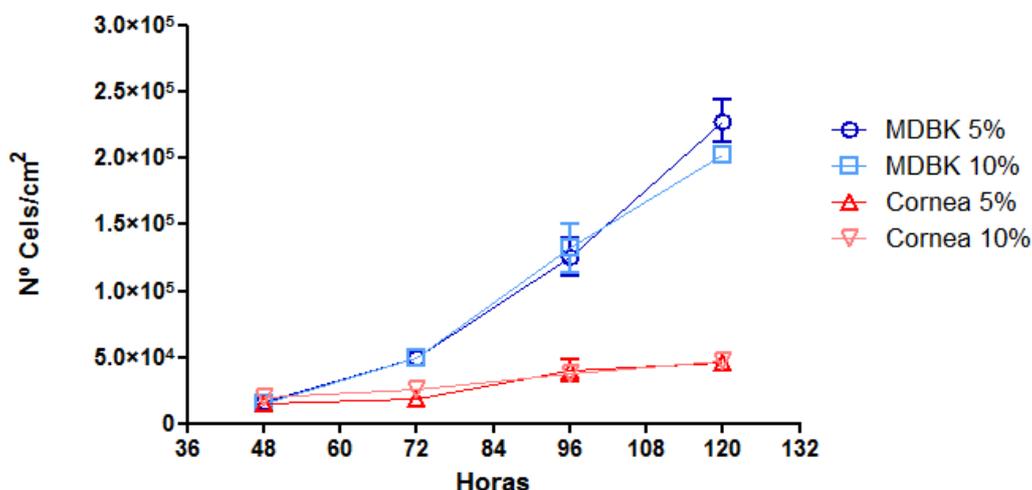


Figura 9 - Avaliação do efeito da presença de 5% e 10% de SFB na multiplicação de células da córnea e MDBK por cinco dias através da contagem manual - método de exclusão pelo Azul de Tripán. Valores obtidos através da média da contagem das triplicatas.

Paralelamente, foi observado que as células CorBov se mantiveram estáveis em cultivo por longos períodos, mesmo sem a troca de meio. Assim, foram propostos novos protocolos para acompanhamento da proliferação dessas células por mais de 30 dias com reposição do meio de cultura a cada cinco dias (Fig. 10).

Conforme observado nas figuras 9 nove e 10 a proliferação celular começou se diferenciar após 48 horas. As células CorBov com 5% e 10% de SFB (Fig. 10) atingiram o maior número de células apenas no dia 31 ($\sim 2 \times 10^5$ cel/cm²). Após alcançar as quantidades máximas as células CorBov suplementadas com 5% de SFB reduziram a quantidade de células presente no substrato. As células CorBov suplementadas com 10% de SFB mantiveram seu número de células por cm² (Fig. 10).

A linhagem MDBK atingiu o platô a partir do quinto dia em ambas as concentrações de SFB. Neste dia houve a troca de meio de cultivo e dois dias após os cultivos voltaram a apresentar aumento no número de células/cm². No oitavo dia as células MDBK (Fig. 10) com 10% de SFB atingiram a maior quantidade de células ($5,2 \times 10^5$ cel/cm²). A MDBK com 5% de SFB apresentou a maior quantidade de células no décimo dia ($6,3 \times 10^5$ cel/cm²). Após atingirem as quantidades máximas os valores começaram a reduzir e as quantidades das células CorBov e MDBK coincidiram apenas após 24 dias em cultivo, quando as células CorBov ainda estavam aumentando em número por cm² e as células MDBK indicavam sua senescência representada pela redução no número de células (Fig. 10).

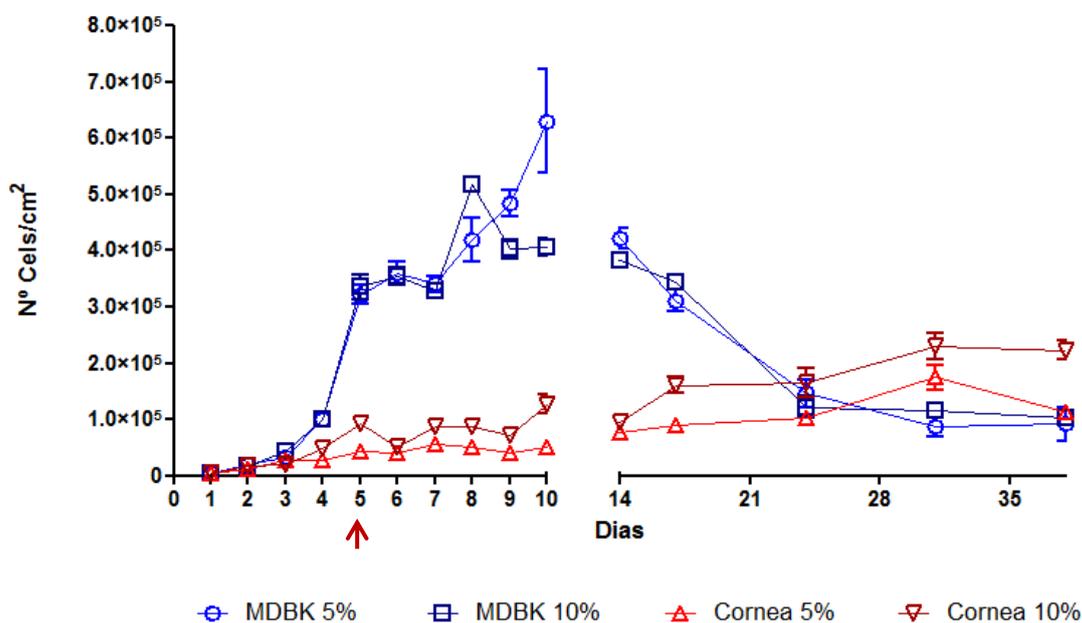


Figura 10 - Avaliação do efeito da presença de 5% e 10% de SFB na quantidade de células CorBov e MDBK avaliado por 38 dias - contagem manual - método de exclusão pelo Azul de Tripán. Valores da média obtida através da contagem das triplicatas. A seta indica o dia em que ocorreu a troca de meio.

O número de células da linhagem CorBov suplementada com 5% e 10% de SFB não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao número de células MDBK nas mesmas condições de SFB em cada dia avaliado. Mesmo nos dias onde o gráfico demonstra picos como no quinto dia, $p=0,1$; décimo dia, $p=0,07$; e trigésimo oitavo dia, $p=0,07$ (Fig. 10).

O efeito de outras concentrações de SFB na proliferação das células CorBov também foi avaliado em experimentos em longo prazo. Experimentos utilizando o método MTT e contagem manual por exclusão do Azul de Tripán foram realizados durante 26 e 33 dias, respectivamente, empregando as concentrações 0%, 0,2%, 1%, 2% e 5% de SFB nos meios de cultivo das células MDBK e da Córnea. O meio de cultivo e as suspensões celulares utilizados para estes dois experimentos foram preparados sob as mesmas condições, homogeneizados e distribuído nas respectivas placas. Além destas condições, o meio não foi substituído e nenhum suplemento foi adicionado durante o período de realização destes experimentos.

As células CorBov e MDBK com 0% e 0,2% de SFB apresentaram menor taxa de proliferação celular. Estes resultados foram estatisticamente significativos quando comparados às outras concentrações de SFB (1%, 2% e 5%), por exemplo, CorBov 0,2% e CorBov 5% $p=0,001$; MDBK 0,2% e MDBK 5% $p=0,008$. Visando avaliar as diferenças no comportamento das células MDBK e CorBov na ausência de SFB foi realizado o experimento com 0% e 0,2% de SFB. Os dados do padrão de proliferação celular na ausência ou em baixa concentração de SFB (0% e 0,2%) foram alocados em gráfico separado das demais concentrações de SFB para melhor análise (Fig. 11).

As células CorBov na ausência de SFB apresentaram discreta proliferação até 48 horas e diminuição gradativa no número/cm² até o 5º dia (Fig. 11). As células CorBov mantidas a 0,2% de SFB apresentaram a maior proliferação celular em 72 horas de cultivo atingindo 1×10^4 cel/cm² e diminuindo gradualmente até o 26º dia (Fig. 11) quando não foram visualizadas células aderidas. A linhagem MDBK não apresentou quantidade significativa de células na ausência de SFB. Na presença de 0,2% de SFB apresentou discreto

crescimento até o quarto dia. Após este período apresentou diminuição na quantidade de células/cm² (8×10^3 cel/cm²).

Quando comparadas, as células CorBov e MDBK suplementadas com 0,2% de SFB em 72 horas de cultivo não há diferença estatisticamente significativa ($p=1,0$) entre o número de células obtidas para ambas contagens.

As células CorBov mantidas com 5% de SFB (Fig. 12) apresentaram maior número de células do quinto dia ($2,6 \times 10^4$ cel/cm²), reduzindo a partir deste ponto e retornando a aumentar a quantidade apenas no 33º dia. A CorBov suplementada com 2% de SFB apresentou sua maior quantidade ($1,8 \times 10^4$ cel/cm²) no quinto dia, voltando a apresentar aumento apenas no 19º e 33º dias. As células CorBov com 1% de SFB apresentaram seu pico de crescimento com $1,6 \times 10^4$ cel/cm², no terceiro e quarto dias. Exibindo apenas no 19º dia um discreto aumento (Fig. 12).

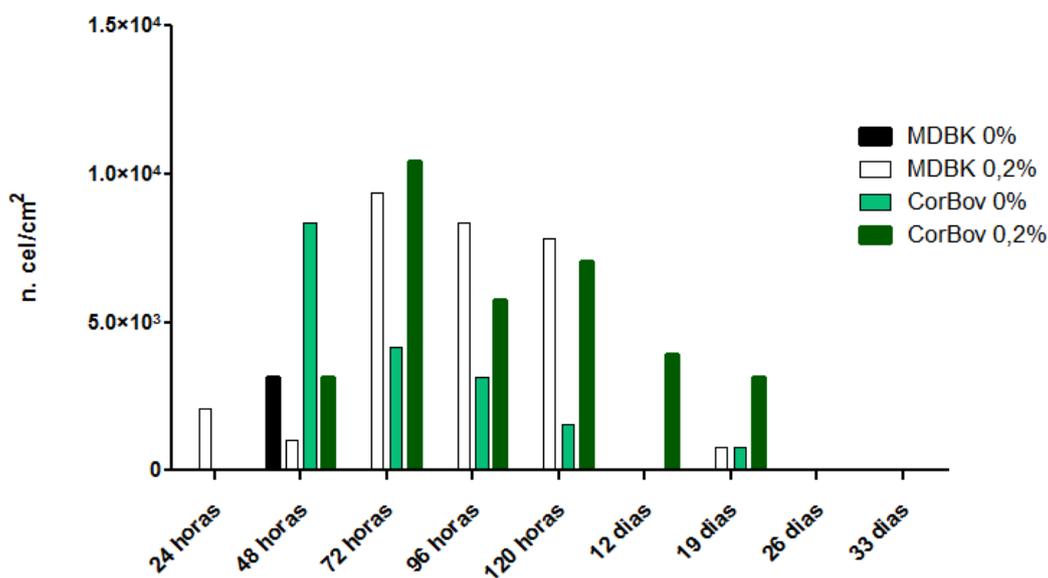


Figura 11- Perfil de proliferação das células CorBov e MDBK avaliadas durante 33 dias na ausência de SFB (0%) e na presença de 0,2% de SFB. Valores obtidos através da média da contagem manual das triplicatas utilizando o método de exclusão pelo Azul de Tripán.

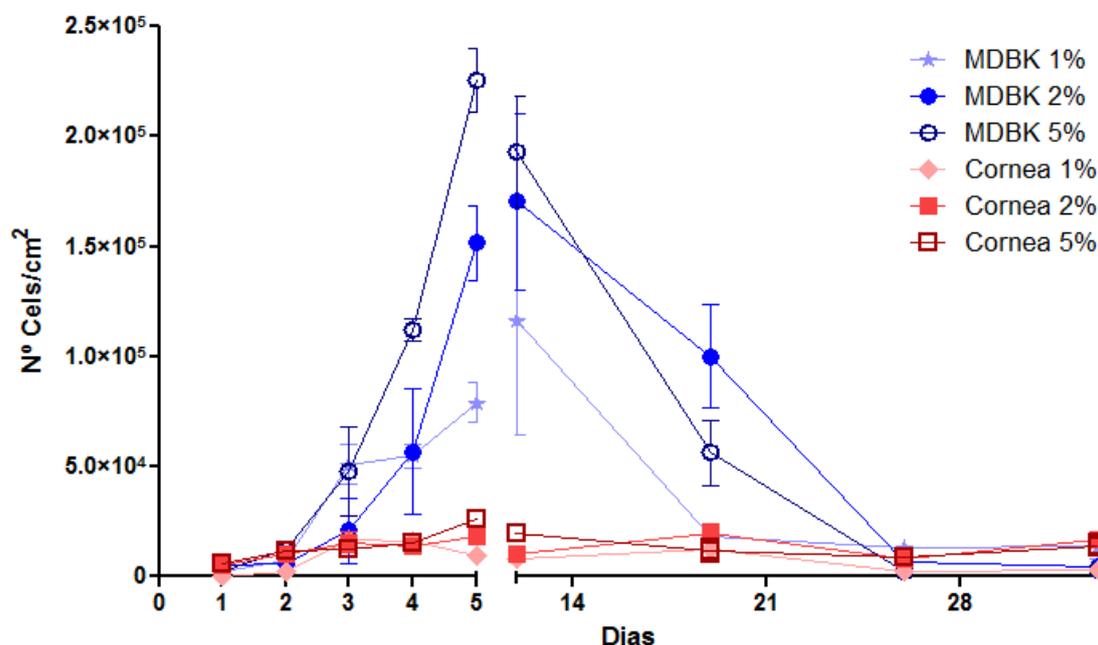


Figura 12 - Avaliação do efeito da presença de 1%, 2% e 5% de SFB no número de células CorBov e MDBK em placa de 96 cavidades. Valores obtidos através da média da contagem manual das triplicatas utilizando o método de exclusão pelo Azul de Tripán durante 33 dias.

As células da linhagem MDBK com 5% de SFB (Fig. 12) atingiram seu número máximo no quinto dia (2×10^5 cel/cm²) apresentando redução a partir do décimo segundo dia. As células MDBK com 2% demonstraram o mesmo perfil de crescimento atingindo seu maior número no quinto dia também ($1,7 \times 10^5$ cel/cm²). A MDBK com 1% de SFB (Fig. 12) apresentou o mesmo perfil de crescimento, entretanto a quantidade máxima de células foi observada no 12º dia ($1,1 \times 10^5$ cel/cm²).

O número de células de ambas as linhagens coincidiu no 26º dia do cultivo. Quando analisadas em cada ponto demonstrado no gráfico, as células CorBov e MDBK com as mesmas concentrações de SFB, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, por exemplo, quinto dia $p = 0,1$ para CorBov e MDBK com 5% de SFB.

A figura 13 apresenta de forma mais detalhada, no quinto dia, os efeitos das concentrações 1%, 2% e 5% de SFB sobre a quantidade das células CorBov e MDBK. O gráfico (Fig. 13) demonstra que o efeito sobre a quantidade celular é dose dependente da concentração de SFB utilizado.

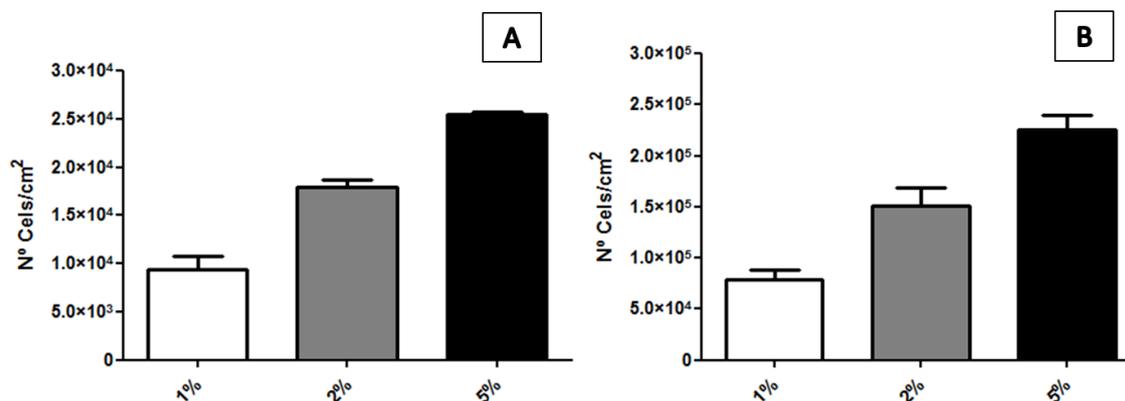


Figura 13 - Efeito das concentrações 1%, 2% e 5% de SFB sobre o número de células CorBov e MDBK no quinto dia de cultivo caracterizando a dose dependência da concentração do SFB na quantidade de células/mL das células CorBov (A) e MDBK (B) pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán. Todas as medidas foram obtidas através do cálculo da média da contagem das triplicatas.

4.2.3 MTT

O perfil de proliferação das células CorBov e MDBK foram representados separadamente nas Figuras 14 e 15 respectivamente, para melhor visualização dos dados.

As células CorBov, na ausência de SFB, se mantiveram por 72 horas em um platô de atividade celular (Fig. 14), reduzindo após este período. Assim como apresentado pelas células MDBK.

Quando suplementado com 0,2% de SFB as células CorBov apresentaram um discreto aumento até 48 horas (Fig. 14). Posteriormente uma pequena redução e voltando a aumentar no quinto dia. As células MDBK suplementadas com 0,2% de SFB apresentaram um platô de atividade até 120 horas (Fig. 15). Quando comparadas as células CorBov e MDBK, nesta concentração de SFB, não houve diferença estatisticamente significativa entre os índices das células metabolicamente ativas nas duas linhagens.

As células CorBov suplementadas com 1% de SFB (Fig. 14) atingiram no décimo segundo dia seu maior índice (valor = 1,5). O maior índice de células metabolicamente ativas das células MDBK suplementadas com 1% de SFB ocorreu no quinto dia e diminuiu após este período (Fig. 15). Houve diferença estatisticamente significativa quando as duas linhagens, com 1% de SFB, atingiram seus maiores índices de atividade metabólica, $p=0,003$.

Com a suplementação de 2% de SFB, a célula CorBov atingiu no 19º dia valores próximos a 2 (Fig. 14). Sendo que a MDBK com 2% de SFB (Fig. 15) atingiu os maiores valores (próximo a 10) no quinto e décimo segundo dia de cultivo, diminuindo após este período. Comparando as duas linhagens quando suplementadas com 2% de SFB não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,15$).

Comparou-se as células CorBov e MDBK na presença de 5% de SFB e observou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,049$). Com a CorBov atingindo valor acima de 2,5 no 26º dia e a MDBK atingindo valores acima de 15 no décimo segundo dia.

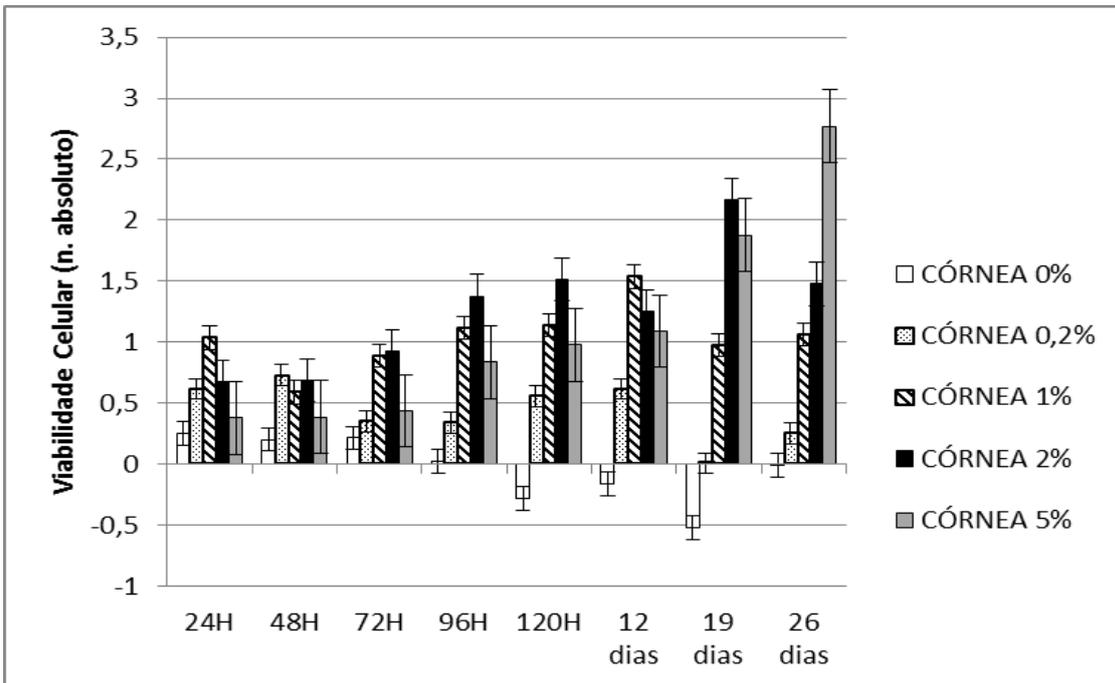


Figura 14 - Avaliação da viabilidade celular com diferentes concentrações de SFB no cultivo das células CorBoV - Método MTT. Todas as medidas foram obtidas através da média da leitura das triplicatas.

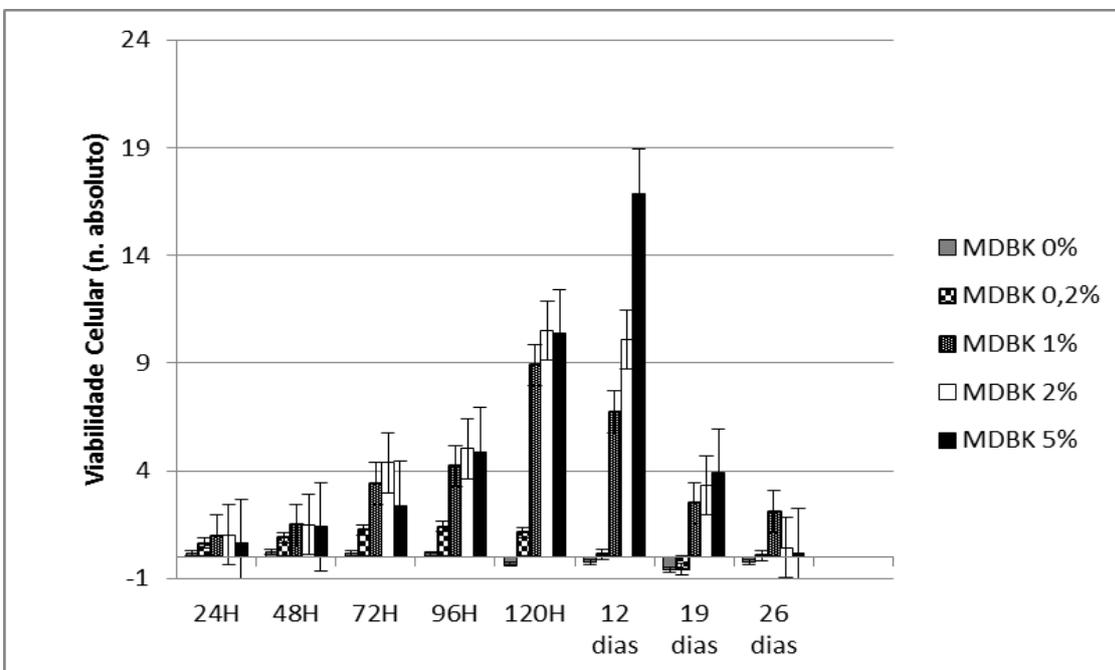


Figura 15 - Avaliação da viabilidade celular com diferentes concentrações SFB no cultivo das células MDBK - Método MTT. Todas as medidas foram obtidas através da média da leitura das triplicatas.

4.2.4 Caracterização Imunocitoquímica

No experimento para caracterização imunocitoquímica (Fig. 16A) as células CorBov apresentaram marcação positiva para Vimentina caracterizando a origem mesenquimal desta linhagem. O controle positivo (Fig. 16B) apresentou a devida marcação para a Vimentina e o controle negativo (Fig. 16C) não apresentou marcação.

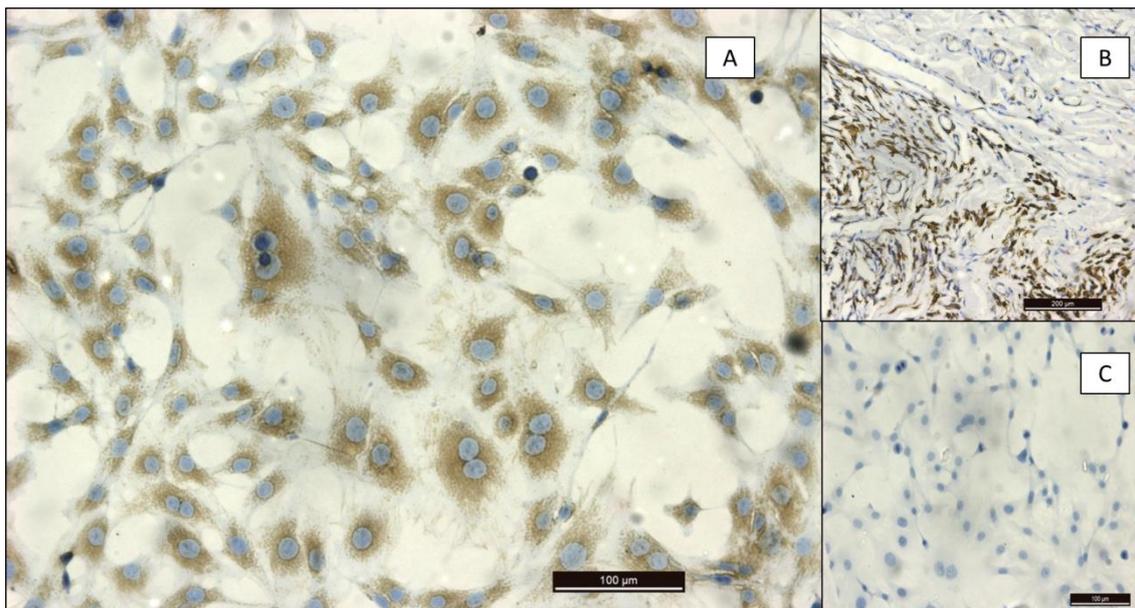


Figura 16 - Marcação Imunocitoquímica das células CorBov. Reação com Estreptavidina-Biotina-Peroxidase (DAKO, USA) e anticorpos primários para Vimentina (Monoclonal Mouse Anti-Vimentin Clone V9). (A) Célula CorBov marcadas positivamente. Aumento 200X. (B) Controle Positivo – pele. Aumento 100X. (C) Controle Negativo – CorBov. Aumento 200X.

4.2.5 Eficiência de Plaqueamento

A células CorBov apresentaram baixa capacidade proliferativa quando plaqueadas em baixas densidades celulares em 4% e 10% de SFB (Fig. 17A). Estas células apresentaram valores próximos a 2% de eficiência de plaqueamento na presença de 10% de SFB (Fig. 18). Enquanto que as células MDBK apresentaram maior eficiência de plaqueamento, atingindo aproximadamente 22% (Fig. 18). Entretanto, a diferença entre as linhagens quando comparadas na presença da mesma quantidade de SFB, não foi estatisticamente significativa ($p=0,08$).

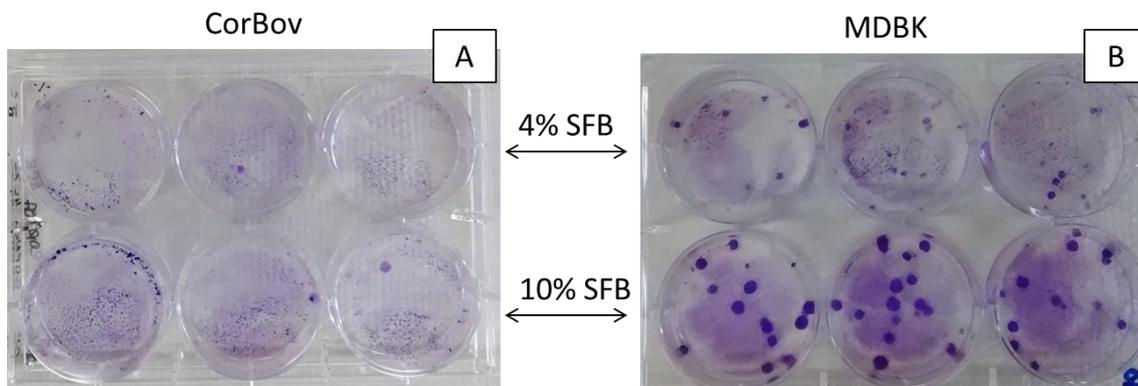


Figura 17 - Imagens das colônias de células formadas após 11 dias no teste de Eficiência de Plaqueamento das Células CorBov e MDBK em baixas densidades na presença de 4% e 10% de SFB. Todas as medidas foram obtidas de triplicatas.

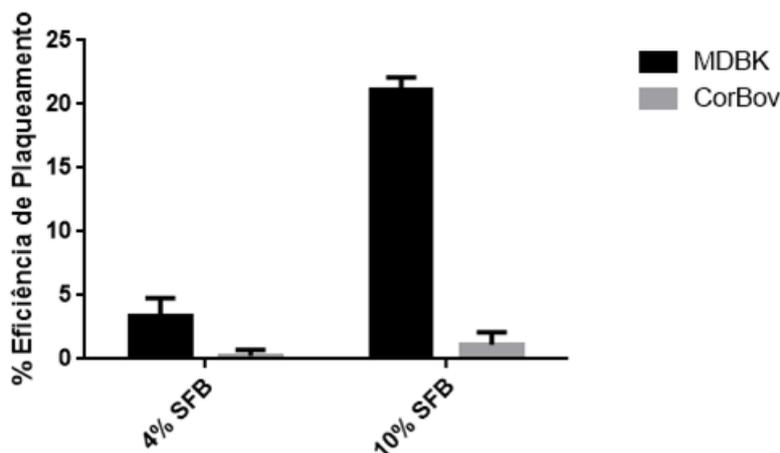


Figura 18 - Eficiência de Plaqueamento das células CorBov e MDBK em baixas densidades na presença de 4% e 10% SFB após 11 dias. Todas as medidas foram obtidas através do cálculo baseado na contagem das triplicatas.

4.2.6 Análise de Microrganismos Contaminantes por PCR

Alíquotas de 0,5 mL das células descongeladas foram reservadas e mantidas a -20°C para análise de microrganismos contaminantes. Posteriormente, amostras na passagem oito também foram submetidas às mesmas análises.

Inicialmente foi avaliada a amplificação do gene GAPDH (bovino), presente nestes tipos celulares, como controle das extrações de DNA total. A eficiência das extrações foi comprovada através da visualização das bandas de aproximadamente 230 pb em gel de agarose correspondentes à amplificação do fragmento do gene GAPDH em todas as amostras avaliadas (Fig. 19).

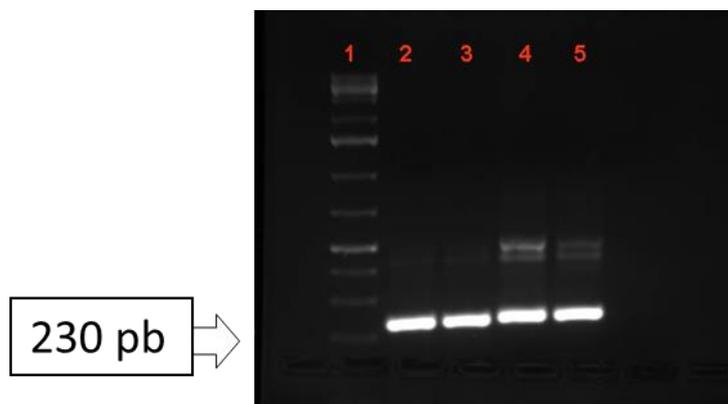


Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose da cPCR para detecção do gene GAPDH (230 pb). Canaleta 1: Marcador Molecular. Canaleta 2: Amostra CorBov1 em MEM. Canaleta 3: Amostra CorBov 2 em MEM e SFB. Canaleta 4: Amostra Corbov 3 em MEM e SFB. Canaleta 5: Amostra CorBov 4 em MEM. Amostras descritas na Tabela 2.

Após confirmação da presença de material genético amplificável, o DNA e/ou RNA extraído das células CorBov (Tab. 3 – Materiais e Métodos) foi submetido a PCR para verificação da presença dos principais contaminantes encontrados em cultivo celulares: Micoplasma, BVDV, PPV, PCV-1 e BTV (Rawadi e Dussurget, 1995; WHO, 2010; Oliveira, 2012; Pinheiro de Oliveira et al., 2013). Os resultados indicaram que as amostras um e quatro, nas passagens cinco e oito, respectivamente, estavam livres dos microrganismos contaminantes avaliados (Tab. 4). Entretanto, as amostras dois e três foram positivas somente em um dos dois testes realizados para a detecção do BVDV (Tab. 4).

Tabela 4 - Resultados dos Testes PCR para os Contaminantes Pesquisados nas Amostras de Células da Córnea Bovina

		Amostras			
	Tipo PCR	1	2	3	4
Micoplasma	c PCR	-	-	-	-
BVDV	RT-c PCR	-	+	+	-
	RT-qPCR	-	-	-	-
PPV	c PCR	-	-	-	-
PCV-1	c PCR	-	-	-	-
BTV	RT-qPCR	-	-	-	-

Conforme descrito na Tabela 3 as células CorBov nas amostras um e quatro foram diluídas apenas em MEM e as amostras dois e três diluídas em MEM e SFB. Estas amostras diluídas em SFB apresentaram-se positivas na RT-PCR convencional para BVDV e negativas na RT-qPCR. O SFB, analisado separadamente, sem as células e meio de cultivo, apresentou resultado positivo na RT-PCR convencional para este mesmo agente em testes anteriores (resultados não mostrados).

A amostra um, negativa em todos os testes, foi replicada e utilizada nos experimentos de caracterização da CorBov.

4.2.7 Infecção pelo BVDV e pelo BoHV-1

Na avaliação da infecção das células CorBov pelo BVDV e BoHV-1 os ECPs começaram a ser visualizados em pequenas áreas da monocamada 24 horas após infecção pelos vírus. Após 72 horas 80 a 90% das monocamadas apresentavam ECP. Os controles negativos das linhagens CorBov e MDBK apresentaram monocamada uniforme com 100% de confluência durante todo o experimento.

As células CorBov apresentaram ECP na infecção pelo BVDV com áreas de lise na monocamada e presença de células arredondadas e outras com prolongamento das extremidades (Fig. 19). Na infecção pelo BoHV-1, a monocamada das células CorBov, apresentou áreas de lise e células arredondadas agrupadas formando estruturas semelhantes a cachos de uva (Fig. 20).

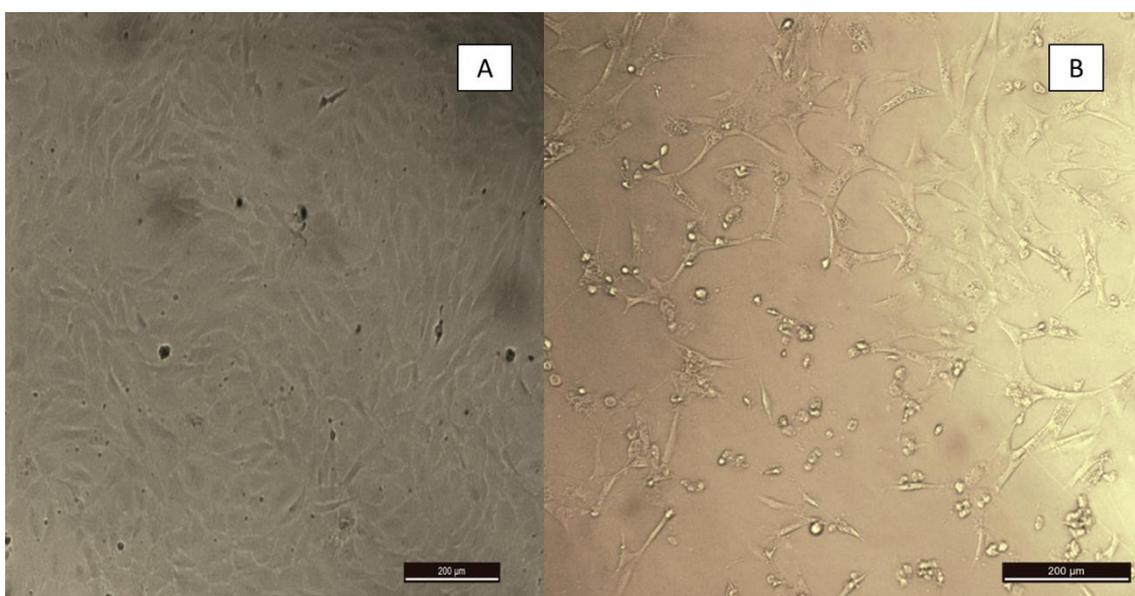


Figura 20 - Efeito citopático (ECP) após infecção das Células CorBov pelo BVDV; 72 horas após infecção. Aumento 100X. Controle negativo com monocamada das células CorBov (A) e ECP provocado pelo BVDV na monocamada das células CorBov (B).

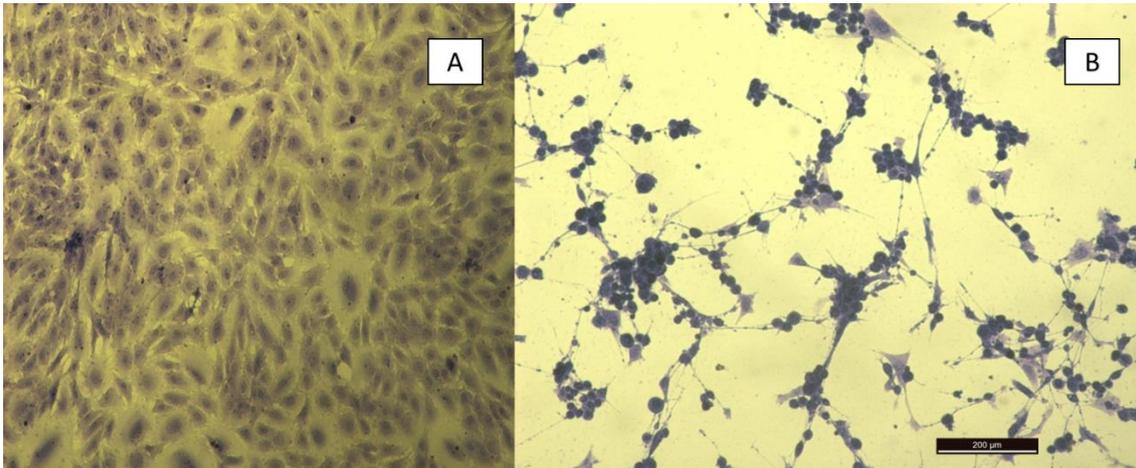


Figura 21 - Efeito citopático (ECP) após infecção das Células CorBov pelo BoHV-1; 72 horas após infecção. Aumento 100X. Coloração por Cristal Violeta. Controle negativo com monocamada das células CorBov (A) e ECP provocado pelo BoHV-1 na monocamada das células CorBov (B).

Avaliação da Replicação do BoHV1 em células CorBov

As células CorBov apresentaram ECP característicos do BoHV1, 12 horas após infecção. A monocamada apresentou 70-80% de destruição após 48 horas. Enquanto que a linhagem MDBK, indicada para o teste de vírusneutralização (OIE, 2010) começou a apresentar ECP após 24 horas e a monocamada apresentou 80% de destruição com 72 horas.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os títulos de vírus obtidos na CorBov ou MDBK ($p=0,1$). Contudo, as suspensões obtidas da cultura das células CorBov apresentaram títulos virais em torno de 2×10^7 TCID₅₀/mL após 72 horas de cultivo (Fig. 21), contra 7×10^6 TCID₅₀/mL das células MDBK, no mesmo período.

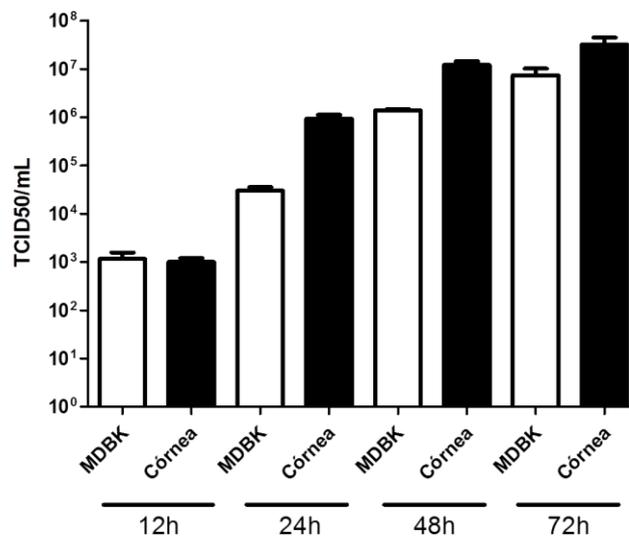


Figura 22 - Comparação do padrão de replicação do BoHV1 em células MDBK e CorBov.

5 Discussão

Meios para cultivo de células capazes de proporcionar a proliferação celular na ausência de suplementos de origem animal são, geralmente, desenvolvidos especificamente para cada tipo celular (Barnes et al., 1987; Gstraunthaler, 2003). Entretanto, na prática, por motivos econômicos, buscam-se meios de cultivo capazes de manter uma variedade maior de tipos celulares. Desta forma, verificou-se o padrão de adaptação de duas linhagens celulares amplamente utilizadas em diversas rotinas laboratoriais, VERO e MDBK, frente à substituição gradual do SFB pelo hidrolisado de soja 5% ou 10% e meio VP-SFM.

O padrão de crescimento celular e a manutenção da morfologia das células MDBK cultivadas na presença de 50% do meio VP-SFM (SMT 3) e uma concentração final de 2,5% de SFB corroboram com os resultados apresentados por Cardoso e colaboradores (2007) que obteve sucesso na adaptação das células MDBK ao meio VP-SFM® (GIBCO-BR) apenas quando adicionaram o fator IGF-1 (*insulin-like growth factor*). A necessidade do IGF-1 no cultivo das células MDBK pode ser justificado pela especificidade do meio VP-SFM à célula VERO, uma vez que este meio foi desenvolvido inicialmente para o aporte de nutrientes da linhagem VERO (GIBCO, 2002).

As células VERO são aprovadas para a produção de vacina viral sob diretrizes regulatórias específicas (WHO, 1987). Além disso, segundo Butler e colaboradores (2000) estas células são empregadas também para produzir suspensão com o vírus da estomatite vesicular bovina, o vírus do herpes simplex, vírus da gripe e reovírus (Butler et al., 2000). Historicamente, a cada nova doença surgida, as células VERO foram usadas como a primeira linhagem celular para produzir vacinas para estas novas patologias, como no surto de gripe aviária (Chen e Chen, 2009).

Assim, vários estudos buscam a adaptação desta linhagem a meios livres de produtos de origem animal e a comprovação da eficiência na produção viral. O meio isento de soro, o M-VSFM, desenvolvido por Butler e colaboradores (2000), livre de componentes de origem animal e com baixo teor de proteínas (90µg/L) demonstrou manter perfil de crescimento comparável aos meios suplementados por SFB por mais de dez passagens (Butler et al., 2000).

No presente estudo, as células VERO, quando cultivadas apenas com o meio VP-SFM apresentaram aderência ao substrato, mesmo padrão de proliferação celular e mantiveram a mesma morfologia observada nos meios suplementados com SFB, corroborando trabalhos e descrições anteriores. (GIBCO, 2002; Cardoso et al., 2007; Chen e Chen, 2009).

Frazzati-Gallina e colaboradores (2001) sugeriram que os vestígios de tripsina seriam responsáveis pela redução na multiplicação celular inicial em VP-SFM. Então, acrescentaram 1% de FCS (*fetal calf serum*) para proporcionar a aderência, a proliferação e a manutenção das células VERO acima de dez passagens em VP-SFM e alcançar uma densidade celular elevada comparável à que foi obtida nos cultivos com 5% de FCS. Butler e colaboradores (2000) também apontam a necessidade da neutralização da tripsina pelo soro ou inibidores para uma proliferação eficiente (Butler et al., 2000).

Neste estudo, frente à ausência de SFB na fase quatro, as células VERO apresentaram aderência ao substrato sem a necessidade de nenhum aditivo e padrão de crescimento superior ao observado no controle contradizendo o comportamento encontrado por Frazzati-Gallina e colaboradores (2001) e Butler e colaboradores (2000).

Os sistemas de cultivo celular suplementados com produtos de origem animal são cada vez mais indesejados devido à suas inúmeras desvantagens, como a grande variação na composição dos lotes produzidos; proteínas em concentrações elevadas; risco de contaminação por BSE; presença de agentes patogênicos para as células dos mamíferos como bactérias, fungos, micoplasma e vírus dentre outros (Stoll et al., 1996; Merten et al., 1997; Merten et al., 1999; Butler et al., 2000; Van der Valk et al., 2004; Li e Wen, 2013).

Assim, hidrolisados proteicos obtidos a partir de fontes não animais (de soja, glúten de trigo, levedura, arroz, etc.) estão disponíveis comercialmente e apresentam efeitos diferentes em cada tipo celular (Sung

et al., 2004; Chun et al., 2007; Lee et al., 2008; Martin-Ibañez et al., 2008; Phillips et al., 2008; Grad et al., 2010; Kunova et al., 2011).

Segundo T'Joel e Cornelissen (2012) os hidrolisados são geralmente produzidos por processos enzimáticos ou hidrólise, seguidos por ultracentrifugação e cromatografia para obtenção de produtos puros. Além disso, é geralmente aceito que os agentes patogênicos de plantas que possam estar presentes nos hidrolisados produzidos não são patogênicos para células dos mamíferos (T'Joel e Cornelissen, 2012).

As células MDBK mantidas em meio MEM suplementado com hidrolisado de soja concomitantemente ao SFB mantiveram padrões de crescimento próximos aos encontrados no controle, demonstrando ser possível a redução em 50% na quantidade de SFB utilizado. Uma vez que culturas de células animais são empregadas na obtenção de uma grande variedade de produtos destinados à investigação, uso diagnóstico e terapêutico, controle biológico na agricultura e em diversos processos biotecnológicos (Malajovich, 2012) e com o aumento na procura destes produtos, a alta proliferação celular e a substituição do SA passaram a ser um requisito para maior capacidade de produção e segurança de produtos obtidos na bioindústria (Merten et al., 1999; Butler, 2005).

As células VERO mantiveram, estatisticamente, o mesmo padrão de crescimento observado no controle celular quando mantidas em meio MEM suplementado com hidrolisado de soja. Estes resultados corroboram com achados de Zhenglun e Xianping (Chen e Chen, 2009) relatando que células VERO cultivadas em meio básico suplementado com extrato de levedura e hidrolisado de soja apresentaram boa taxa de proliferação.

Chun e colaboradores (2007) obtiveram os mesmos resultados, porém utilizando outro tipo celular. Este autor aumentou a proliferação e a viabilidade das células CHO com a utilização de hidrolisados de proteína de soja frente a outros tipos de hidrolisados, como hidrolisados de levedura e de arroz. Kim e Lee (2009) observaram que a suplementação deveria ser realizada concomitantemente com hidrolisado de soja e de glúten de trigo para melhorar as taxas de proliferação e com hidrolisado de levedura para otimizar a produção de anticorpos.

Assim, o meio VP-SFM e o suplemento hidrolisado de soja, durante as fases de adaptação, proporcionaram, estatisticamente, o mesmo padrão de proliferação para as células MDBK e VERO, quando comparado aos padrões obtidos com o SFB. O uso do meio VP-SFM representou um aumento de quatro vezes no custo em relação ao MEM suplementado com SFB e o hidrolisado de soja representou uma redução de aproximadamente metade do custo na manutenção das células. O emprego de meios para cultivo isentos de proteína animal ou mesmo livre de SA representam uma alternativa cientificamente valiosa a fim de garantir o bem estar animal, diminuir a necessidade de fetos bovinos para a produção do SFB, padronizar e favorecer a reprodutibilidade da cultura de células e garantir a segurança biológica dos produtos obtidos.

A cultura de células de mamíferos é a base dos sistemas de bio-produção. As indústrias farmacêuticas e de biotecnologia dependem enormemente destes cultivos para a fabricação de vários insumos utilizados nas pesquisas, diagnósticos ou para fins terapêuticos, como por exemplo, produção de anticorpos, interferons, hormônios, fatores de coagulação e vacinas (Merten, 2006) e utilização em testes de toxicidade em substituição aos animais de laboratório (Borenfreund e Borrero, 1984).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010) e Merten (2006) as características de crescimento da linhagem devem ser bem identificadas para assegurar a consistência das respostas e garantir o desenvolvimento de processos de produção. Assim, os dados sobre as características de proliferação, como a viabilidade, morfologia, os tempos de duplicação nas concentrações celulares, a clonagem e/ou eficiência de plaqueamento devem ser conhecidos.

As monocamadas das células CorBov foram obtidas 60 dias após o cultivo primário, utilizando apenas meio de cultivo MEM com SFB, antibióticos e antifúngico. Fan e colaboradores (2009) obtiveram uma monocamada de células de córnea de coelhos após 25 dias. Borenfreund e Borrero (1984) relatam a obtenção células de córnea de coelho, porém em um período mais curto, seis a oito dias. Gospodarowicz e colaboradores (1977) obtiveram células de córnea bovina após quatro dias utilizando 10% SA e fator de

crescimento para fibroblastos (FGF). Buss e colaboradores (2010) obtiveram células de córnea equina após três a cinco dias utilizando explantes deste tecido na presença de 10% de SFB. Portanto, a obtenção de células de córnea pode variar de três a 60 dias dependendo dos fatores de crescimento utilizados e da espécie cujas células foram isoladas.

As células CorBov também foram capazes de suportar a criopreservação e o descongelamento permitindo a continuidade do cultivo. Esta observação corrobora com Mathes e colaboradores (2009) que também obteve sucesso na criopreservação e recuperação das células de córnea de equinos.

Na análise da morfologia, as células CorBov aderidas em monocamadas, distinguiram-se por um formato fusiforme, presença de citoplasma volumoso com prolongamentos e núcleos elípticos, possuindo um ou mais nucléolos. Propriedades características de células fibroblásticas.

Conhecer o padrão de crescimento da cultura celular, os parâmetros cinéticos e seus estágios de crescimento são fatores críticos em qualquer experimento envolvendo cultivos celulares. As células se comportam de forma diferente em cada fase do ciclo de proliferação devido às atividades enzimáticas, condições do metabolismo e nível de diferenciação celular que podem levar à síntese de produtos específicos (Freshney, 2005). Além destes fatores, as células são bastante sensíveis às condições do meio de cultivo e se adaptam facilmente às condições empregadas. Assim, um controle maior destas condições faz-se necessário para garantir a estabilidade e a reprodutibilidade das características da linhagem celular utilizada (Federoff, 1977; Freshney, 2005).

As linhagens CorBov e MDBK variam significativamente quanto às suas características de crescimento, presença e duração das diferentes fases de proliferação - lag, log e platô. As células CorBov apresentaram um padrão de crescimento sem uma nítida caracterização das fases Lag, Log e platô. Sua proliferação aconteceu de forma lenta, gradual e contínua ao longo dos experimentos assim como a célula NCI-H1395, obtida de um adenocarcinoma de pulmão humano, caracterizadas por Assanga e colaboradores (2013). Este autor classifica a linhagem celular NCI-H1395 como de baixo crescimento.

Freshney (2005) descreve que as células que atingem a fase estacionária tendem a aumentar a produção de matriz extracelular tornando mais difícil desagregar as células da monocamada. As células CorBov não apresentaram uma fase estacionária detectável e provavelmente, não produziram grandes quantidades de matriz extracelular, explicando o fato de, desagregarem facilmente do substrato e da monocamada e não necessitarem de prolongados períodos em contato com a tripsina. Entretanto, as células MDBK atingiram um platô e formaram mais grumos a partir do sexto dia, mesmo frente a um maior período de exposição ao STVIX.

Várias linhagens celulares quando formam a monocamada mantêm um mesmo número de células durante a fase estacionária demonstrando um equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose (Kato et al., 1997; Joyce, 2003; Freshney, 2005). As células da córnea foram capazes de formar a monocamada, mas não demonstraram atingir a fase estacionária, aumentando de forma gradual a quantidade de células presentes em cultivo até o 31º dia, mesmo sem reposição do meio de cultivo. Esta observação indica a ausência da inibição por contato nas células CorBov, característica presente em células de linhagem contínua (Joyce, 2003), sugerindo que as linhagens de córnea podem ser naturalmente imortalizadas como proposto por Fan e colaboradores (2009) e Nascimento (2012).

A maioria das células obtidas através do cultivo primário permanece viável por um número finito de passagens (Freshney, 2005). As Células CorBov obtidas neste estudo permaneceram viáveis e proliferativas por 24 passagens e apresentaram indícios de suportarem ainda mais passagens.

As células de linhagem contínua são capazes de continuar se multiplicando e se sobrepor, aumentando a concentração celular e após atingir a fase estacionária entram em senescência. A linhagem MDBK suplementada com 5% e 10% de SFB demonstrou atingir o platô no quinto dia. Frente à reposição do meio as células retornaram a uma taxa mais elevada de proliferação celular no sétimo dia, atingindo novo pico de concentração de células no oitavo dia (MDBK + 10% de SFB) e no décimo dia (MDBK + 5% de SFB). Hassel e Engelhardt (1977) e Freshney (2005) definem que algumas culturas de linhagem contínua, frente à reposição de meio, voltam a proliferar mesmo em baixas taxas, após atingirem o platô, gerando camadas sobrepostas de células. Quando comparados os picos, pontos com maior quantidade de células,

CorBov com 10% de SFB e MDBK suplementada com 5% de SFB, a maior taxa de crescimento celular da CorBov ocorreu apenas no 31º dia e produziu 67% menos células que a MDBK em seu oitavo dia de cultivo. Indicando uma característica de linhagem finita para as células CorBov.

É importante considerar a duração de cada fase, o melhor momento para introduzir o estímulo e a duração do experimento. Assim, conhecer os parâmetros e padrões do ciclo de replicação de cada tipo celular proporciona melhor planejamento do experimento, a escolha da melhor linhagem, qual ou quais os melhores momentos para introduzir o tratamento e coletar as amostras. Segundo Freshney (2005), geralmente os cultivos celulares são mais consistentes e uniformes na fase exponencial (log) e a obtenção de células no terço final desta fase apresentam maior rendimento e maior reprodutibilidade. Contudo, as células de córnea não apresentam fase log e fase estacionária. Assim, os melhores períodos com maiores taxas de proliferação destas células, com suplementação de 5% ou 10% de SFB, seriam entre o quarto e quinto (4º e 5º) dias; e no segundo e terceiro (2º e 3º) dias para suplementações com 1% e 2% de SFB. O período ideal para obtenção das células MDBK, levando em consideração as condições do experimento, seria entre o quarto e quinto dia, quando estão prestes a iniciar a fase estacionária.

A redução do número de células da Córnea e MDBK por volta do quinto dia frente à ausência de SFB, verificada também no método MTT, corrobora com os resultados encontrados por Hassel em 1977 que observou a redução na quantidade de células, no mesmo período, quando cultivo das células VERO foi mantido sem suplementação de SFB.

Segundo Mosmann (1983), utilizando uma população de células homogêneas, a quantidade de cristais de formazan gerados é diretamente proporcional à quantidade de células, mas apenas as células ativas são capazes de reduzir o MTT e produzir estes cristais. As células CorBov exibiram uma proliferação mais lenta que as células MDBK, marcada por uma coloração menos intensa no ensaio do MTT ao longo do experimento. Estes resultados demonstram que as células de córnea ativas podem ser menos eficientes no metabolismo do MTT e/ou apresentarem menor quantidade de células ativas capazes de reduzir o MTT.

As células CorBov quando suplementadas com 1% e 5% SFB apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas com as células MDBK com as mesmas concentrações de SFB no experimento do MTT, mas não apresentaram diferença estatisticamente na contagem manual. Este fato pode ser entendido pela presença de menor número de células CorBov ativas capazes de reduzir o MTT em cristal de formazan nestas concentrações de SFB.

Os resultados mais altos encontrados nas leituras do MTT para as duas linhagens, de forma geral, não coincidem com os dias com maior número de células/cm², encontrados na contagem manual. Por exemplo, o maior resultado do MTT para a célula MDBK com 5% de SFB foi atingido no décimo segundo dia e na contagem manual no quinto dia. Este fato sugere que na contagem manual, no décimo segundo dia, um maior número de células, apesar de ativas apresentaram permeabilidade da membrana permitindo a entrada do Azul de Tripán e conseqüentemente a contagem destas como inviáveis. Entretanto, estas células consideradas 'inviáveis' pelo método do Azul de Tripán poderiam apresentar metabolismo ativo, capazes de reduzir o MTT e formar cristais de formazan. Fato que possivelmente gerou uma coloração mais forte no décimo segundo dia. Esta discordância entre ambos os métodos também foi observada por Assanga e colaboradores (2013) quando a célula com maior proliferação celular (RAW 264.7) avaliada por contagem manual utilizando o Azul de Tripán não foi a linhagem com maior atividade detectada pelo método MTT.

No terceiro dia as células MDBK suplementadas com 1% de SFB apresentaram a mesma quantidade de células/cm² quando suplementada com 5% de SFB pela contagem utilizando o Azul de Tripán. Quando analisadas pelo método MTT, as células com 1% de SFB demonstraram uma maior atividade celular quando comparadas às células com 5% de SFB. Estes resultados indicam que a proliferação e a manutenção das células MDBK poderia ser realizada com 1% de SFB, reduzindo o consumo deste produto.

A técnica de contagem manual evidenciou que a quantidade de células presentes é diretamente proporcional à concentração do SFB, demonstrando a relação de dose dependência. Esta relação foi evidenciada no quinto dia da curva de proliferação das duas linhagens, CorBov e MDBK. Entretanto, esta

dependência observada na contagem manual através do método de exclusão pelo Azul de Tripán, não pôde ser observada nas análises dos resultados pelo método do MTT. Neste último, também era esperada uma quantidade de células diretamente proporcional à concentração do SFB, uma vez que as suspensões celulares e as concentrações de SFB foram utilizadas de uma mesma suspensão (diluição) de origem.

Para verificar a origem embrionária das células CorBov pesquisou-se a expressão de Vimentina, um componente proteico intermediário capaz de formar microfilamentos citoplasmáticos característicos de células mesenquimais (Mathes et al., 2009; Pang et al., 2010). A população de células CorBov apresentou marcação positiva para vimentina demonstrando a provável origem mesenquimal destas células. Franke e colaboradores (1978) demonstraram que células epiteliais não apresentavam a vimentina em suas estruturas. Ensaio com anticorpos para Fator de Von Willebrand (relacionado ao Fator VIII) e Citoqueratina foram realizados para complementar a imunocitoquímica. Porém, precisaram ser repetidos para confirmar as marcações apresentadas. Por falta de reagente e tempo hábil para as repetições, os ensaios foram postergados. A presença da marcação positiva para o fator de Von Willebrand caracterizaria células endoteliais com propriedades angiogênicas (Yablonka-Reuveni, 1989) e a marcação para a Citoqueratina caracterizaria células de origem epitelial (Moll et al., 1982).

A heterogeneidade na proliferação apresentada por determinados clones pertencentes à mesma linhagem geralmente não pode ser detectada em ensaios com monocamadas. Assim, a eficiência de plaqueamento é um ensaio apropriado para avaliar a capacidade de sobrevivência, da conservação da regeneração celular e a capacidade proliferativa em baixas concentrações através de várias gerações celulares. No ensaio de eficiência de plaqueamento as células CorBov apresentaram baixas porcentagens de proliferação. Este comportamento foi justificado por Freshney (2005) que relata situações de baixa densidade onde as células perdem o contato intercelular e poucos clones são capazes de sobreviver, mesmo sob condições ideais de cultivo.

Outro fator que poderia interferir na eficiência de plaqueamento, segundo Vandersickel e colaboradores (2011) seria o número elevado de clones não proliferativos obtidos nos cultivos primários, devido à presença de diversos tipos celulares. Para minimizar esse fator o ensaio de eficiência de plaqueamento foi conduzido na passagem número 16, pois as células que sobrevivem e expandem em cultura são aquelas com a capacidade proliferativa mais robusta (Huang et al., 2010).

Um dos princípios para alcançar a consistência e a segurança no cultivo celular, segundo Schiff (2005) é a comprovação da ausência de contaminantes no material de partida. A OIE e Schiff (2005) recomendam que linhagens celulares de mamíferos sejam testadas para vírus de origem bovina e suína levando-se em conta a origem do tecido e os insumos utilizados para sua manutenção *in vitro*. Os resultados das PCRs para os contaminantes celulares comprovaram a ausência de material genômico de: *Mycoplasma*, PCV-1, PPV e BTV. Na RT-qPCR utilizada para detectar a presença do BVDV, utilizando primer específico para os subtipos BVDV-1 e BVDV-2, todas as amostras apresentaram resultado negativo. A RT-PCR convencional utilizada para detectar agentes pertencentes ao gênero *Pestivirus* (BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3, peste suína clássica – CSFV, vírus da doença da fronteira – BDV) apresentou resultados positivos nas amostras dois e três provavelmente devido à presença de SFB comprovadamente contaminado por material genômico de *pestivirus* e a especificidade do primer utilizado que provavelmente não detectou a estirpe viral presente. Assim, estes resultados indicam que algum agente pertencente ao gênero *Pestivirus* poderia estar presente fazendo-se necessário outro ensaio, como o sequenciamento para definir o contaminante detectado nas amostras positivas. Logo, as amostras positivas não foram utilizadas para a realização dos experimentos.

O lote de SFB utilizado foi analisado no LANAGRO e na Escola de Veterinária e apresentou resultado positivo na RT-PCR convencional para *Pestivirus* e na qPCR para BTV (resultados não mostrados). Estes resultados sugerem que este insumo poderia ser a possível fonte de contaminação, gerando os resultados positivos nas referidas amostras de células CorBov na RT-PCR convencional para *Pestivirus*. Entretanto, o BTV não foi detectado em nenhuma das amostras testadas. Assim, os resultados sugerem que o material genômico do BTV presente no SFB não foi adsorvido pelas células ou não apresenta potencial infectante.

Uma das principais utilidades dos cultivos celulares é permitir a replicação do vírus de interesse na Medicina Veterinária ou humana para estudos de patogenia, produção de insumos para diagnóstico e

vacinas. Obter novos tipos celulares, susceptíveis aos vírus de interesse e capazes de produzir maiores quantidades de antígenos são interesses constantes dos pesquisadores e da indústria biotecnológica. As células do cultivo primário se apresentam mais susceptíveis à infecção e mais sensíveis para o isolamento viral (Wilcox, 1969; Flores, 2007). Assim, obter novas células através do cultivo primário e testá-las quanto a sua susceptibilidade aos diferentes vírus faz-se necessário. A célula CorBov demonstrou susceptibilidade ao BVDV e ao BoHV-1 apresentando os mesmos ECP observados nas células MDBK. Crandell e colaboradores (1976) e Madin e colaboradores (1956) utilizaram células BEK (cultivo primários de células de rim de embriões bovinos) para propagação do BoHV-1 e observaram os mesmos ECPs apresentados na monocamada das células CorBov. Wilcox (1969) relatou a susceptibilidade das células endoteliais de córnea bovina para infecção da estirpe N569 do BoHV-1, dentre outros vírus.

As células CorBov apresentaram títulos do vírus BoHV-1 estatisticamente semelhantes aos títulos detectados nas células controle, MDBK. Assim, os resultados obtidos neste experimento, com células CorBov e MDBK cultivadas sob as mesmas concentrações de SFB, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os títulos obtidos para o BoHV-1. Entretanto, quando avaliados os tempos iniciais requeridos para o aparecimento dos primeiros sinais de ECP nas monocamadas as células CorBov apresentaram ECP após 12 horas e as células MDBK 24 horas após a infecção dos vírus BoHV-1. Nas células CorBov, os títulos do BoHV-1 aumentaram gradualmente e durante o período de observação, o maior título foi atingido após 72 horas PI, com uma diferença de aproximadamente um log acima dos títulos de BoHV-1 produzidos pela MDBK, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa. Wilcox (1969) relata que obteve títulos virais similares aos obtidos em cultivos de células de testículos bovinos e os pontos finais destes títulos virais foram melhor definidos nas células da córnea bovina, corroborando com os resultados obtidos com as células CorBov.

Os experimentos para caracterização da célula CorBov demonstraram padrões semelhantes aos de linhagens finitas e alguns indícios de ser naturalmente imortalizadas. Subseqüentes passagens e sua manutenção em cultivo por longo período determinarão se estas células constituem-se uma linhagem contínua.

Comprovadamente livre de contaminantes, as células CorBov representam uma alternativa para as pesquisas baseadas no cultivo de células, principalmente para virologia, pois, apresentaram susceptibilidade aos vírus BVDV e BoHV-1 produzindo títulos virais semelhantes aos produzidos no sistema padrão. Outros vírus de origem bovina e de outras espécies poderão ser testados nestas células.

6 Conclusões

- ✓ O meio VP-SFM apresentou-se como um substituto adequado para adaptação das células VERO e permitiu o cultivo na ausência de SFB (fase 4).
- ✓ O hidrolisado de soja pode ser utilizado simultaneamente ao SFB, na proporção 1:1, na manutenção de células VERO e MDBK, contribuindo para a redução em 50% na quantidade de SFB utilizado (fase 2).
- ✓ As células de córnea bovina, CorBov, foram obtidas e mantidas em cultivo por 24 passagens.
- ✓ As células CorBov apresentaram alta viabilidade após criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C) até 24 passagens.
- ✓ As células apresentaram marcação imunocitoquímica positiva para vimentina indicando sua origem mesenquimal.
- ✓ As células CorBov não apresentaram evidências da presença de Micoplasma, BVDV, PPV, PCV-1 e BTV.
- ✓ As células CorBov apresentaram susceptibilidade ao vírus da diarreia bovina a vírus (BVDV) e ao Herpesvirus bovino tipo-1 (BoHV-1), produzindo títulos virais semelhantes, estatisticamente, aos produzidos no sistema padrão com células MDBK.

7 Referências Bibliográficas

- ASSANGA, I.S.B.; GIL-SALIDO, A.A.; LEWIS LUJÁN, L.M.; et al. Cell Growth Curves for Different Cell Lines and Their Relationship with biological activities. *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res.*, v.4, n.4, p.60-70, 2013.
- BARNES, D., MCKEEHAN, W. L.; SATO, G. H. (1987). Cellular Endocrinology: Integrated physiology in vitro. *In Vitro Cell & Dev. Biol.*, v.23, n.10, p.659-662, 1987.
- BARNES, D.; SATO, G. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal. Biochem.*, v.102, p.255-270. 1980a
- BARNES, D.; SATO, G. Serum free cell culture: a unifying approach. *Cell*, v.22, p.649-655, 1980b.
- BATISTA, F. R. X. *Formulação de meio de cultura livre de proteínas animais para células de Drosophila melanogaster produtoras da glicoproteína G do vírus da raiva*. 2007. 156f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- BJARE, U. Serum-free cell culture. *Pharmac. Ther.*, v.53, p.355-374, 1992.
- BORENFREUND, E.; BORRERO, O. In vitro cytotoxicity assays. Potential alternatives to the Draize ocular allergy test. *Cell Biology and Toxicology*, v. 1, n. 1, p.55-65, 1984.
- BOTTENSTEIN, J.; HAYASHI, I.; HUTCHINGS, S. et al. The growth of cells in serum-free hormone-supplemented media. *Methods Enzymol.*, v.58, p.94-109, 1979.
- BRÂNZEU, D.G.T.; FEIER, V.; HERBECK, R. et al. Microbial and fungal contamination of keratinocyte and fibroblast cell cultures. *J. Exp. Med. Surg. Res.* v.15, n.3, P.123-128, 2008.
- BUENO, E.M.; SAEIDI, N.; MELOTTI, S.; RUBERTI, J.W. Effect of Serum and Insulin Modulation on the Organization and Morphology of Matrix Synthesized by Bovine Corneal Stromal Cells. *Tissue Engineering: Part A*, v.15, n.11, p.3559-3573, 2009.
- BUSS, D.G.; GIULIANO, E.A.; SHARMA, A.; MOHAN, R.R. Isolation and cultivation of equine corneal keratocytes, fibroblasts and myofibroblasts. *Vet. Ophthalmol.*, v.13, n.1, p.37-42, 2010.
- BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.68, p.283-291, 2005
- BUTLER, M. *Cell culture and upstream processing*. New York: Taylor and Francis Group, 2007. 250p.
- BUTLER, M.; BURGNER, A.; PATRICK, M.; et al. Application of a serum-free medium for the growth of vero cells and the production of Reovirus. *Biotechnol. Prog.*, v.16, p.854-858, 2000.
- BUTLER, M.; MENESES-ACOSTA, A. Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.96, p.885-894, 2012
- CAMARGOS, M.F.; OLIVEIRA, A.M.; FONSECA JR., A.A.; et al. Aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase para Detecção de Mycoplasma spp na Rotina de Cultivos Celulares. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 3, p. 786-790, 2008.
- CANDEIAS, J.A.N. *Laboratório de virologia: manual técnico*. São Paulo: EDUSP, 1996. p.165.
- CARDOSO, T.C.; FERRARI, H.F.; LUVIZOTTO, M.C.R.; et al. Bio-Safety Technology in Production of Bovine Herpesvirus Type 5 (BoHV-5) Using an Alternative Serum-Free Medium. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, v. 3, n.3, p.125-130, 2007.
- CHEN, T. R. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp. Cell Res.*, v.104, p.255-262, 1977.
- CHEN, T.; CHEN, K. Investigation and Application Progress of Vero Cell Serum-free Culture. *International Journal of Biology*, v.1, n.2, p. 41-47, 2009.

- CHOU, M.-L.; BURNOUF, T.; WANG, T.-J. Ex vivo Expansion of Bovine Corneal Endothelial Cells in Xeno-Free Medium Supplemented with Platelet Releasate. *PLOS ONE*, v.9, n.6, p.e99145, 2014.
- CHUN, B.H.; KIM, J.H.; LEE, H.J.; et al. Usability of size- excluded fractions of soy protein hydrolysates for growth and viability of Chinese hamster ovary cells in protein-free suspension culture. *Bioresour. Technol.*, v.98, p.1000-1005, 2007.
- COBO, F.; STACEY, G.N.; HUNT, C.; et al. Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardisation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.68, n.4, p.456-466, 2005.
- CRANDELL, R.A.; SELLS, D.M.; GALLINA, A.M. The isolation and characterization of a new bovine herpesvirus associated with abortion. *Theriogenology*, v.6, n.1, p.1-19, 1976.
- D'HONDT, C.; PONSARTS, R.; SRINIVAS, S. P.; et al. Reduced Intercellular Communication and Altered Morphology of Bovine Corneal Endothelial Cells with Prolonged Time in Cell Culture. *Current. Eye Research.*, v.34, 454-465, 2009.
- DAKO, Education Guide: Immunocytochemical Staining Method, Dako Corporation, 5th ed., 2009. Disponível em <http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods_5ed.pdf>. Acessado em: 13 dez. 2014.
- DONALDSON, M.S.; SHULER, M.L. Low-cost serum-free medium for the BTI-Tn5B1-4 insect cell line. *Biotechnol. Prog.*, v.14, n.4, p.573-579, 1998.
- DULBECCO, R.; ELKINGTON, J. Conditions Limiting Multiplication of Fibroblastic and Epithelial Cells in Dense Cultures. *Nature*, v.246, p.197-199, 1973.
- EKWALL, B.; SILANO, V.; PAGANUZZI-STAMMATI, A.; et al. Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures. In: Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects. 1ª ed. Ed: Bourdeau, P.; et al. Scope: John Wiley & Sons Ltda, 1990. Disponível em: <http://dgc.stanford.edu/SCOPE/SCOPE_41/SCOPE_41_2.02_Chapter_7_75-98.pdf> Acessado em: 10 dez. 2014.
- FAN, T.; WANG, D.; ZHAO, J.; et al. Establishment and characterization of a novel untransfected corneal endothelial cell line from New Zealand white rabbits. *Molecular vision*, v.15, p.1070-1078, 2009.
- FARGES-HADDANI, B.; TESSIER, B.; CHENU, S.; et al. Peptide fractions of rapessed hydrolysates as na alternative to animal proteins in CHO cell culture media. *Process Biochemistry*, v.41, p.2297-2304, 2006.
- FEDEROFF, S. *Cell, Tissue, and Organ Cultures in Neurobiology*. New York: Copyright, 1977. 693p.
- FENNER, F.; MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. *Fenner's veterinary virology*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier: Academic Press, 2011. 507p.
- FERREIRA, A.B.H. *Mini: Aurelio: o dicionário da língua portuguesa*. 8ª ed. Curitiba: Positivo, 2010. 960p.
- FLORES, E.F. (org.). *Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças víricas*. 2.ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007. 888p.
- FRANEK, F.; HOHENWARTER, O.; KATINGER, H. Plant protein hydrolysates: preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. *Biotechnol. Prog.*, v.16, p.688-692, 2000.
- FRANKE, W.W.; SCHMID, E.; OSBORN, M.; et al. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.75, n.10, p.5034-5038, 1978.
- FRAZZATI-GALLINA, N.M.; PAOLI, R.L.; MOURÃO-FUCHES, R.M.; et al. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. *J. Biotechnol.*, v.92, p.67-72, 2001.
- FREEDMAN, V.H.; SHIN, S. Cellular tumorigenicity in nude mice: Correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell*, v.3, p.355-359, 1974.
- FREITAS, T.N.P. *Conceitos básicos, métodos e técnicas em laboratório de virologia animal*. Pedro Leopoldo: Gráfica Tavares, 2006. 176p.
- FRESHNEY, R.I. *Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques*. 5.ed. New Jersey: Copyright, 2005. 642p.

- FROUD, S. J. The development, benefits and disadvantages of serum free media. *Dev. Biol. Stand.*, v.99, p.157-166, 1999.
- GELATT, K.N. *Veterinary Ophthalmology*. Ed: Gelatt. 4.ed. v.1. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. 535p.
- GIBCO, Life Technologies. A Guide to Serum-Free Cell Culture. Califórnia: Invitrogen Corporation, 2003. Disponível em <<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/SpecialtySFMMediaforCC.pdf>> Acessado em: 27 jun. 2013.
- GIBCO, Life Technologies. *VP-SFM*. Califórnia: Invitrogen Corporation, 2002. Disponível em http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/332_021198_VPSFM_bro.pdf?CID=cn-ws-bioon-pdpdownload-ts-31985-062-20140930 Acessado em: 10 jul. 2014.
- GIOCONDO, M.P. *Avaliação da Atividade Apoptótica de Substância Pura Isolada de Cryptocarya mandiocana em Células de Carcinoma Cervical Imortalizadas pelo Papilomavírus Humano (HPV)*. 2007. 70f. Dissertação de Mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- GOSPODAROWICZ, D.; MESCHER, A.L.; BIRDWELL, C.R. Stimulation of corneal endothelial cell proliferation in vitro by fibroblast and epidermal growth factors. *Exp. Eye Res.*, v.25, n.1, p.75-89, 1977.
- GRAD, I.; GAJDA, B.; SMORAG, Z. Effect of plant protein supplementation on in vitro development of porcine embryos. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, v.28, n.3, p.271-279, 2010.
- GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Serum-free Cell Culture. *Altex*, v.20, n.4, p.275-281, 2003.
- HARTSHORN, J.N.; MCNORTON, S.; HERNANDEZ, C.; et al. Soy Hydrolysate Optimization for Cell Culture Applications. In: THOMAS, N. *Cells and Cultures: Cell Sciences and Development*. Holanda: Springer Netherlands, 2007. V.4, capítulo 16, p.777-783.
- HASSELL, J.; ENGELHARDT, D.L. Factors regulating the multiplication of animal cells in culture. *Exp. cell res.*, v.107, n.1, p.159-167, 1977.
- HAY, R.; CAPUTO, J.; CEHN, T.R.; et al. *ATCC Cell Lines and Hybridomas*. 8.ed. Maryland: Copyright, 1994. 640p.
- HEIDEMANN, R.; ZHANG, C.; Qi, H.; et al. The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology*, v.32, p.157-67, 2000.
- HUANG, L.; HARKENRIDER, M.; THOMPSON, M.; et al. A Hierarchy of Endothelial Colony-Forming Cell Activity Displayed by Bovine Corneal Endothelial Cells. *Invest. Ophthalmol. and Vis. Sci.*, v. 51, n.8, p.3943-3949, 2010.
- HUTCHINGS, S. E. e SATO, G. H. Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. *Cell Biology*, v.75, n.2, p. 901-904, 1978.
- IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y.J.; AGATHOS, S.N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.62, p.1-20, 2003.
- JOHNSTONE, E.W. ; WONG, H.C. ; COSTER, D.J.; et al. Factors affecting bovine corneal endothelial cell density in vitro. *Brit. J. Ophth.*, v.80, n.3, p.256-262, 1996.
- JOYCE, N.C. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog. Retin. Eye Res.*, v.22, n.3, p.359-389, 2003.
- KATO, A.; TAKAHASHI, H.; TAKAHASHI, Y.; et al. Inactivation of the cyclin D-dependent kinase in the rat fibroblast cell line, 3Y1, induced by contact inhibition. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.8065-8070, 1997.
- KIM, E.J.; KIM, N.S.; LEE, G.M. Development of a serum-free medium for the production of humanized antibody from Chinese hamster ovary cells using a statistical design. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Ani.*, v.34, p.757-761, 1998.
- KIM, J.Y.; KIM, Y.G.; HAN, Y.K.; et al. Proteomic understanding of intracellular responses of recombinant Chinese hamster ovary cells cultivated in serum-free medium supplemented with hydrolysates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.89, p.1917-1928, 2011.

- KIM, S. H.; LEE, G. M. Development of serum-free medium supplemented with hydrolysates for the production of therapeutic antibodies in CHO cell cultures using design of experiments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.83, p.639-648, 2009.
- KUNOVA, M.; MATULKA, K.; EISELLEOVA, L.; et al. Development of humanized culture medium with plant-derived serum replacement for human pluripotent stem cells. *Reprod. Biomed. Online*, v.21, n.5, p.676-686, 2011.
- LANGDON SP. Cell culture contamination an overview. In: _____. *Cancer cell culture: methods and protocols*. New Jersey: Langdon Humana Press Inc., 2004. p.309-317.
- LEE, Y.K.; KIM, S.Y.; KIM, K.H.; et al. Use of soybean protein hydrolysates for promoting proliferation of human keratinocytes in serum-free medium. *Biotechnol. Lett.*, v.30, n.11, p.1931-1936, 2008.
- LI, G.; WEN, Z. Screening soy hydrolysates for the production of a recombinant therapeutic protein in commercial cell line by combined approach of near-infrared spectroscopy and chemometrics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.97, n.6, p.2653-2666, 2013.
- LIEBSCH, M.; GRUNE, B.; SEILER, A.; et al. Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. *Arch. Toxicol.*, v.85, n.8, p.841-58, 2011.
- MADIN, S.H. e DARBY, N.B.JR. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.98, n.3, p.574-576, 1958.
- MADIN, S.H.; YORK, C.J.; MCKERCHER, D.G. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science*, v.124, p.721-722, 1956.
- MAKOSCHEY, B.; PATEL, J.R.; VAN GELDER, P.T.J.A. Serum-free produced Bovine Herpesvirus type 1 and Bovine Parainfluenza type 3 virus vaccines are efficacious and safe. *Cytotechnology*, v.39, n.3, p.139-145, 2002.
- MALAJOVICH M. A. Biotecnologia 2011. Rio de Janeiro: Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012
- MARTIN-IBÁÑEZ, R.; UNGER, C.; STRÖMBERG, A.; et al. Novel cryopreservation method for dissociated human embryonic stem cells in the presence of a ROCK inhibitor. *Hum. Reprod.*, v.23, n.12, p.2744-2754, 2008.
- MATHES, R.L.; DIETRICH, U.M.; KRUNKOSKY, T.M.; et al. Establishing a reproducible method for the culture of primary equine corneal cells. *Vet. Ophth.*, v.12, n.1, 41-49, 2009.
- MCGARRITY, G.J.; KOTANI, H.; BUTTER, G.H. Mycoplasmas and tissue culture cells. In: MANILOFF, J. (Ed.). *Mycoplasmas, molecular biology and pathogenesis*. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p.445-454.
- MCKEEHAN, W.L.; BARNES, D.; REID, L.; et al. Frontiers in mammalian cell culture. *In Vitro Cell and Dev. Biol.*, v.26, n.1, p.9-23, 1990.
- MERTEN, O.-W. Introduction to animal cell culture technology—past, present and future. *Cytotechnology*, v.50, p.1-7, 2006.
- MERTEN, O.-W.; WU, R.; COUVE, E.; et al. Evaluation of the serum free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactors. *Cytotechnology*, v.25, p.35-44, 1997.
- MERTEN, O.-W.; KALLEL, H.; MANUGUERRA, J.-C.; et al. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. *Cytotechnology*, v.30, p.191-201, 1999.
- MOLL, R.; FRANKE, W.W.; SCHILLER, D.L.; et al. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, v.31, n.1, p.11-24, 1982.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Met.*, v.65, n.1, p.55-63, 1983.
- MOTEGI, Y.; USUI, T.; ISHIDA, K.; et al. Regulation of bovine corneal endothelial cell cycle by transforming growth factor- β . *Acta Ophthalmol. Scand.*, v.81, p.517-525, 2003.
- NASCIMENTO, S.A. *Células de córnea fetal caprina naturalmente imortalizada para produção de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina*. 2012. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

- OIE. Bovine Viral Diarrhoea: OIE – World Organisation for Animal Health, Terrestrial Manual, 2008. Cap. 2.4.8, p.698-711. Disponível em: < http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.08_BVD.pdf> Acesso em: 4 set 2014.
- OIE. Infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis: OIE – World Organisation for Animal Health, Terrestrial Manual, 2010. Cap. 2.4.13, p.1-17. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.13_IBR_IPV.pdf> Acesso em: 4 set 2014.
- OLIVEIRA, T.F.P. Padronização e aplicação da PCR para Detecção de Contaminantes em Cultivos Celulares, Soros e Tripsinas. 2012. 77f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PANG, K.; DU, L.; WU, X. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. *Biomaterials*, v.31, n.28, p.7257-7265, 2010.
- PHAM, P.L.; PERRET, S.; DOAN, H.C.; et al. Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: peptone additives improve cell growth and transfection efficiency. *Biotech. Bioeng.*, v.84, n.3, p.332-342, 2003.
- PHILLIPS, B.W.; LIM, R.Y.M.; TAN, T.T.; et al. Efficient expansion of clinical-grade human fibroblasts on microcarriers: cells suitable for ex vivo expansion of clinical-grade hESCs. *J. Biotechnol.*, v.13, p.79-87, 2008.
- PINHEIRO DE OLIVEIRA T.F.; FONSECA JUNIOR, A.A.; CAMARGOS, M.F.; et al. Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. *Biologicals*, v.41, n.6, p.407-414, 2013.
- POHLSCHIEDT, M.; LANGER, U.; MINUTH, T.; et al. Development and optimisation of a procedure for the production of *Parapoxvirus ovis* by large-scale microcarrier cell culture in non-animal, non-human and non-plant-derived medium. *Vaccine*, v.26, n.12, p.1552-1565, 2008.
- POMP, J.; WIKE, J.L.; OUWERKERK, I.J.M.; et al. Cell density dependent plating efficiency affects outcome and interpretation of colony forming assays. *Radiother. Oncol.*, v.40, n.2, p.121-125, 1996.
- PRICE, P.; GREGORY, E. Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. *In Vitro*, v.18, n.6, p.576-584, 1982.
- PUNCHARD, N.; WATSON, D.; THOMPSON, R.; et al. Production of immortal human umbilical vein endothelial cells. In: Freshney, R.I.; Freshney, M.G. (eds) *Culture of immortalized cells*. New York, Wiley-Liss, p.203-238, 1996.
- RAWADI, G.; DUSSURGET, O. Advances in PCR-based detection of mycoplasmas contaminating cell cultures. *Gen. Research.*, v.4, n.4, p.199-208, 1995.
- ROVOZZO, G.C.; BURKE, C.N. *A manual of basic virological techniques*. New Jersey: Prentice Hall, 159p, 1973.
- RUSSELL, W.; BURCH, R. *The principles of humane experimental technique*. London: Universities Federation for Animal Welfare, 238p, 1959.
- SCHIFF, L.J. Review: Production, characterization, and testing of banked mammalian cell substrates used to produce biological products. *In vitro cell. dev. biol. Anim.*, v.41, n.3-4, p.65-70, 2005.
- SCHLAEGER, E.-J. The protein hydrolysate, Primatone RL, is a cost-effective multiple growth promoter of mammalian cell culture in serum-containing and serum-free media and displays anti-apoptosis properties. *J. Immunol. Methods*, v.194, n.2, p.191-199, 1996.
- SHEN, C.F.; KIYOTA, T.; JARDIN, B.; et al. Characterization of yeastolate fractions that promote insect cell growth and recombinant protein production. *Cytotechnology*, v.54, n.1, p.25-34, 2007.
- SINGH, J. S.; HAROLDSON, T. A.; PATEL, S.P. Characteristics of the low density corneal endothelial monolayer. *Exp. Eye Res.*, v.115, p.239-245, 2013.
- STADES, F.C.; BOEVÉ, M.H.; NEUMANN, W.; et al. Fundamentos de Oftalmologia Veterinária. São Paulo: Editora Manole Ltda., 204p, 1999.
- STANBRIDGE, E.J.; REFF, M.E. The molecular biology of mycoplasmas. In: BARILE, M.F. (Ed.) *The mycoplasmas*, New York: Academic Press, 1979, v.1, p.157-185.

- STOLL, T.S.; MÜHLETHALER, K.; VON STOCKAR, U.; et al. Systematic improvement of a chemically-defined protein-free medium for hybridoma growth and monoclonal antibody production. *J. Biotech.*, v.45, n.2, p.111-123, 1996.
- SUNG, Y.H.; LIM, S.W.; CHUNG, J.Y.; et al. Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.63, n.5, p.527-536, 2004.
- SUPINO, R. MTT Assays. In: O'HARE, S.; ATTERWILL, C.K. (Ed.) *In Vitro Toxicity Testing Protocols*. New Jersey: Copyright Humana Press Inc., 1995. v.43, cap.16, p.137-141.
- T'JOEN, V.; CORNELISSEN, R. Xeno-Free Plant-Derived Hydrolysate-Based Freezing of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev.*, v.21, n.10, p.1716-1725, 2012.
- TAUB, M. The use of defined media in cell and tissue culture. *Toxicol. In Vitro*, v.4, n.3, p.213-225, 1990.
- TIMENETSKY, J.; SANTOS, L.M.; BUZINHANI, M.; et al. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Braz J Med Biol Res.*, v.39, n.7, p.907-914, 2006.
- TSENG, S.C.G.; SAVION, N.; GOSPODAROWICZ, D.; et al. Characterization of Collagens Synthesized Endothelial Cell. *J Biol. Chemist.*, v.256, n.7, p. 3361-3365, 1981.
- VAN DER VALK, J.; MELLOR, D.; BRANDS, R.; et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxic. In Vitro*, v.18, n.1, p.1-12, 2004.
- VANDERSICKEL, V.; SLABBERT, J.; THIERENS, H.; et al. Comparison of the colony formation and crystal violet cell proliferation assays to determine cellular radiosensitivity in a repair-deficient MCF10A cell line. *Radiation Measur.*, v. 46, n.1, p.72-75, 2011.
- VIANA, F.A.B. *Fundamentos de oftalmologia clínica*. Belo Horizonte: Ed. FEPMVZ, 2002. 132p.
- WEISSMAN, S.J.; LEVINGS, R.L. Collective experiences of adventitious viruses of animal-derived raw materials and what can be done about them. *Cytotechnology*, v.28, n.1-3, p.43-48, 1998.
- WHO. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. WHO – World Health Organization, Expert Committee on biological standardization, 2010. p.1-93. Disponível em: <http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf>. Acesso em: 2 fev 2015.
- WHO. Requirements for continuous cell lines used for biological production. WHO – World Health Organization, Expert Committee on biological standardization, Technical Report Series, n.745, 1987. Annex 3, p.1-152. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_745.pdf>. Acesso em: 3 out 2014.
- WILCOX, G.E. Preparation of Primary Bovine Corneal Epithelial Cell Cultures for Use in Virological Investigations. *Apl. Microb.*, v.18, n.2, p.268-269, 1969.
- YABLONKA-REUVENI, Z. The emergence of the endothelial cell lineage in the chick embryo can be detected by uptake of acetylated low density lipoprotein and the presence of a von Willebrand-like factor. *Dev. Biol.*, v.132, n.1, p.230-240, 1989.