DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DOS COMPONENTES DE MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE VACINAS

DAYSE MARIA DE MAGALHÃES FIGUEIREDO

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Setembro - 1988

Para

Maria Lígia Magalhães

AGRADECIMENTOS

Expressamos nosso reconhecimento e agradecimento a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente :

- Prof. João Lúcio de Azevedo, pela sua maneira simples, mas sábia, de aliar o conhecimento científico aos sentimentos de humanidade.
- Profa. Mari C.S. Armelin, pela iniciação nos conhecimentos de cultura de células de mamíferos e pela inestimável contribuição em todas as etapas deste trabalho.
- Prof. Marcos Luiz dos Mares Guia, Luciano Vilela, Josef Ernst Thiemann, Maria Alice de Magalhães Figueiredo.
- Prof. Hugo Armelin.
- Prof. Rogério Meneghini
- Maria Helena P. Fungaro, Itamar S. Mello, Luzia D. Paccola, Genovefa Peisino, Vanda Lúcia N.L. Souza, Prof. Claudio L. Souza Junior, Profa. Aline Pizzirani-Kleiner.
- Hélio Darci de Melo, Antônia Andrade Nascimento, Edna I. P. Dutra de Moraes.
- Professores e colegas dos Cursos de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e Genética e Melhoramento de Plantas.

.iii.

- Vallée Nordeste S.A
- Biobrás - Bioquímica do Brasil S/A, pela oportunidade de desenvolver este projeto no seu Departamento de Pesquisas.
- CAPES.

I N D I C E

	<u>Página</u>
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Cultura de células	3
2.2. Cultura de células e a Virologia	7
2.3. Meios de cultura e fatores peptídicos de crescimento	8
2.4. Cultura de células animais e produção de vacinas virais	15
2.5. Controle de qualidade em cultura de células	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Célula utilizada	25
3.2. Meios de cultura e soluções	25

	<u>Página</u>
3.2.1. Meios mínimos essenciais	25
3.2.2. Soros	28
3.2.3. Caldo tripticaseína fosfato (CTF)....	28
3.2.4. Solução de hidrolisado de lactoalbumi na	29
3.2.5. Solução de tripsina	30
3.2.6. Solução salina fosfato pH 7,2 (PBS)...	30
3.2.7. Solução salina fosfato sem Ca^{2+} e Mg^{2+} pH 7,2 (PBSA)	31
3.2.8. Solução de azul de tripan	31
3.2.9. Solução de vermelho fenol a 1%,...	32
3.2.10. Solução de cristal violeta	32
3.3. Preparação de suspensão homogênea de célu- las	32
3.4. Manutenção e congelamento de estoques	33
3.4.1. Preparo de estoques celulares	33
3.4.2. Congelamento de células	33
3.4.3. Descongelamento de células	34
3.5. Crescimento celular em monocamada	35
3.5.1. Determinação de T_D e D_S através de curvas de crescimento	35

	<u>Página</u>
3.5.2. Coleta de células para contagem da curva de crescimento	36
3.5.3. Determinação da eficiência de plaquea- mento (E.P.)	36
3.6. Crescimento celular em suspensão	37
3.6.1. Crescimento em frasco "spinner"	37
3.6.2. Crescimento em escala industrial	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Análise do crescimento de células BHK-21 em monocamada	39
4.1.1. Eficiência de plaqueamento	40
4.1.2. Curvas de crescimento	46
4.2. Análise do crescimento de células BHK-21 em suspensão líquida	65
4.2.1. Escala laboratorial	65
4.2.2. Escala industrial	66
4.3. Análise comparativa dos métodos de cultivo..	69
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Composição (mg/ml) dos meios mínimos essenciais	26
2 - Relação das amostras de caldo tripticaseína fosfato(CTF)	29
3 - Efeito do tipo de meio de cultura e soro na eficiência de plaqueamento de células BHK-21 cultivadas em meio mínimo + 8% soro + 10% CTF	41
4 - Efeito de diferentes tipos de CTF na eficiência de plaqueamento de células BHK-21 cultivadas em meio mínimo + 8% soro + 10% CTF.....	43
5 - Resultados de eficiência de plaqueamento para células BHK-21 em diferentes ensaios, Células cultivadas em meio MEM + 8% SB + 10% CTF (Difco ou F01)	45
6 - Valores de T_D e D_S para células BHK-21 crescendo em meio mínimo + 8% SB + 10% CTF	49
7 - Valores de T_D e D_S para células BHK-21 crescendo em meio mínimo + 8% soro + 10% CTF-Difco	53

TabelaPágina

8 - Valores de T_D e D_S para células BHK-21 crescendo em meio mínimo + 8% soro + 10% CTF.....	58
9 - Valores de T_D e D_S para células BHK-21 crescendo em meio mínimo + 8% SB + 10% CTF	64
10 - Valores de T_D e D_S para células BHK-21 crescendo em meio MGM + 8% SB + 10% CTF, suplementado ou não com 10% HL	71

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Atividade estimulatória de CTF sobre crescimento de células BHK-21 em meios DME e MEM suplementados com SB	48
2 - Atividade estimulatória de CTF sobre crescimento de células BHK-21 em meios MEM e MGM suplementados com SB	50
3 - Efeito de soros bovino e fetal bovino sobre o crescimento de células BHK-21 mantidas em meio DME suplementado com CTF-Difco	52
4 - Efeito de soros bovino e fetal bovino sobre o crescimento de células BHK-21 mantidas em meio MEM suplementado com CTF-Difco	54
5 - Efeito de soros bovino e fetal bovino sobre o crescimento de células BHK-21 mantidas em meio MGM suplementado com CTF-Difco	55
6 - Efeito da suplementação do meio DME com diferentes soros e CTFs na promoção de crescimento de células BHK-21	57

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
7 - Efeito da suplementação do meio MEM com diferentes soros e CTFs na promoção de crescimento de células BHK-21	60
8 - Efeito da suplementação do meio MGM com diferentes soros e CTFs na promoção de crescimento de células BHK-21	61
9 - Efeito dos meios MEM e MGM na avaliação da atividade mitogênica de diferentes amostras de CTF na promoção do crescimento de células BHK-21	63
10 - Crescimento de células BHK-21 em suspensão <u>lí</u> quida (escala de laboratório) em meio MGM suplementado com 8% SB + 10% CTF	65
11 - Crescimento de células BHK-21 em suspensão <u>lí</u> quida (escala industrial) em meio MGM suplementado com 8% SB + 10% CTF	67
12 - Crescimento de células BHK-21 em suspensão <u>lí</u> quida (escala industrial) em meio MGM suplementado com 8% SB + 10% CTF	68

FiguraPágina

- 13 - Curvas de crescimento (monocamada) para células BHK-21 mantidas em meio MGM suplementado com 8% SB + 10% CTF e 10% HL 70
- 14 - Crescimento de células BHK-21 em suspensão líquida (escala de laboratório) em meio MGM + 8% SB + 10% CTF suplementado ou não com 10% HL 72
- 15 - Crescimento de células BHK-21 em suspensão líquida (escala industrial) em meio MGM + 8% SB + 10% CTF suplementado ou não com 10% HL 73

LISTA DE ABREVIATURAS

CTF : caldo tripticaseína fosfato

DME : Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: dimetil sulfóxido

D_s : densidade máxima ou de saturação

EP : eficiência de plaqueamento

HL : hidrolisado de lactoalbumina

MEM : minimun essencial medium

MGM : Eagle's medium Glasgow modified

PBS : solução salina fosfato pH 7,2

PBSA: solução salina fosfato sem Ca^{2+} e Mg^{2+} : pH 7,2

SB : soro bovino

SFB : soro fetal bovino

T_D : tempo de dobramento da população

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
ANÁLISE DOS COMPONENTES DE MEIOS
DE CULTURA UTILIZADOS NA PRODUÇÃO
INDUSTRIAL DE VACINAS

Dayse Maria de Magalhães Figueiredo

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

- Orientador -

RESUMO

As vacinas virais, que representam os principais produtos obtidos a partir de células animais, continuam sendo produzidas com partículas virais obtidas a partir de culturas de células em grande escala.

A produção industrial da vacina contra febre aftosa envolve o crescimento, em suspensão líquida, de células BHK-21 ("baby hamster kidney cells") usadas como hospedeiras para multiplicação do vírus. Essas células são normalmente cultivadas em um meio nutritivo (Eagle's medium Glasgow modified - MGM) suplementado com soro animal e/ou outros suplementos quimicamente indefinidos como caldo triptícaseína fosfato (CTF) e hidrolisado de lactoalbumina. A função desses suplementos é estimular o crescimento das células para assegurar a manutenção contínua da cultura.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver uma metodologia prática, pouco dispendiosa e em escala de laboratório, capaz de avaliar com rapidez e confiabilidade, a atividade promotora de crescimento dos meios de cultura utilizados na fabricação industrial de vacinas.

A determinação do tempo de dobramento (T_D) e da densidade máxima ou de saturação (D_S) através de curvas de crescimento em monocamada mostrou-se um método bastante eficaz para avaliar os níveis de atividade promotora de crescimento de diferentes meios de cultura, soros e CTF usados no cultivo de células BHK-21. Os resultados obtidos em monocamada se aplicam a células crescendo em suspensão líquida e reproduzem, com excelente aproximação, aqueles obtidos na indústria. Além de permitir o estudo dos fatores promotores de crescimento, esta metodologia oferece perspectivas concretas no sentido da eliminação do soro no cultivo de células BHK-21.

DEVELOPMENT OF A METHODOLOGY FOR THE
ANALYSIS OF CULTURE MEDIA COMPONENTS
USED IN VACCINES' INDUSTRIAL PRODUCTION

Dayse Maria de Magalhães Figueiredo

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

- Adviser -

SUMMARY

Viral vaccines, the main product obtained from animal cells, have long been produced with viral particles obtained from large scale cell culture.

The industrial production of the foot-and-mouth disease (FMD) vaccine involves growth, in liquid suspension, of baby hamster kidney (BHK) cells used as the host for viral replication. Normally, these cells are cultured in nutrient medium (Eagle's medium Glasgow modified, MGM) supplemented with animal serum and/or other chemically undefined supplements like tryptose phosphate broth (TPB) and lactalbumin hydrolysate. These supplements stimulate cell growth and thus warrant continuous maintenance of the culture.

The objective of the present work was to develop a practical, unexpensive method to rapid and reproducibly

evaluate the growth promoting activity of culture media components utilized in the industrial production of vaccines, in laboratory scale.

Determination of the doubling time (T_D) and saturation density (D_S) through growth curves is shown to be an efficient and adequate method to evaluate the levels of growth promoting activity displayed by the different culture media, sera and TPBs utilized in BHK-21 cells culture. The results obtained in monolayer are shown to directly apply to suspension cultures both in laboratory and in industrial scale. In addition to allowing the study of growth promoting factors, this methodology offers concrete perspectives for the complete elimination of serum as a medium supplement in BHK-21 cultures.

1. INTRODUÇÃO

A origem da cultura de célula em grande escala empregada atualmente remonta há mais de vinte anos com a adaptação da célula BHK para crescimento em suspensão (CAPSTICK et alii, 1962 e TELLING e ELLSWORTH, 1965). Desde então, os princípios e processos desta tecnologia têm sido desenvolvidos e melhorados culminando com a produção de vacinas virais (humanas e veterinárias) anticorpos monoclonais, interferon, enzimas, hormônios, fatores peptídicos de crescimento e outros produtos biológicos relevantes (MIZRAHI, 1986b e RATAFIA, 1987b). As vacinas virais, que representam os principais produtos obtidos a partir de células animais, continuam sendo produzidas com partículas virais obtidas a partir de culturas de células em grande escala (PHILLIPS et alii, 1985). A vacina contra febre aftosa, que afeta tanto bovinos como suínos, é considerada o mais importante produto obtido por cultura de células animais, com um consumo estimado em 1,5 bilhão de doses anuais, sendo a América do Sul consumidora de

5 milhões de doses/ano(DOEL, 1985 e SPIER, 1982).

O meio de cultura utilizado para crescimento das células contém 50 ou mais componentes, sendo ainda suplementado com soro animal e/ou peptonas. A produção dos meios de cultura e o controle de qualidade das matérias primas envolvidas neste processo representam não só notáveis desafios, mas também altos custos para os processos em grande escala. É de fundamental importância dispor de procedimentos práticos e pouco dispendiosos para testar os diversos componentes do meio.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia para avaliar com rapidez e confiabilidade, a atividade promotora de crescimento dos meios de cultura utilizados na fabricação de vacinas. O caldo tripticaseina fosfato (CTF) que é um dos suplementos adicionados ao meio de cultura para crescimento da célula BHK-21 na produção de vacina anti-aftosa, serviu de instrumento para validar o método. O procedimento deve ser simples, de fácil execução, baixo custo e capaz de mimetizar as condições industriais, reproduzindo, em pequena escala, os resultados obtidos na indústria.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura de células

A cultura de células iniciou-se nas primeiras décadas do século XX com a aceitação da idéia de que células pertencentes a animais superiores poderiam ser removidas do animal e colocadas para crescer e multiplicar "in vitro". Esta idéia foi comprovada com os experimentos de HARRISON (1907) que acompanhou a diferenciação de células de pedaços de tubo neural de rã, em sistema gota pendente de linfa de rã, demonstrando que a função normal continuava in vitro. Esta técnica foi aplicada a outras células de tecidos animais homeotermos, usando plasma ou soro como meio para crescimento (BURROWS, 1910; CARREL e BURROWS, 1910 e EBELING, 1913).

Para eliminar as limitações dos métodos até então empregados (cultura em gota pendente) foi desenvolvida a técnica de cultura em frasco (CARREL, 1923) a qual permite

cultivar maior quantidade de células aderidas a uma superfície adequada, o que facilita a renovação do meio. Posteriormente, com a intensificação das pesquisas sobre metabolismo e crescimento, houve necessidade de se criar um outro sistema, o "roller flask", que possibilita cultivar grande quantidade de células sobre uma superfície adequada (igual à do método anterior) porém com grande economia de meio de cultura uma vez que as garrafas são mantidas numa plataforma giratória, onde a superfície celular é banhada constantemente, mas com pequeno volume de meio (GEY, 1933).

Um avanço importante foi a descoberta de métodos para obtenção de suspensão de células viáveis. Trabalhos iniciais usavam tripsina para liberar as células viáveis dos seus tecidos parentais (ROUS e JONES, 1916) para transferir células entre culturas de plasma (SIMMS e STILLMAN, 1937) e para separar epiderme (MEDAWAR, 1941). Somente com os trabalhos de MOSCONA e MOSCONA (1952) foram definidas as técnicas de tripsinização de cultura de células, em meio sem Ca^{2+} e Mg^{2+} , permitindo as suas aplicações no crescimento quantitativo das células (RINALDINI, 1954 e PUCK e MARCUS, 1955) e no preparo de monocamadas de células para a multiplicação de vírus (DULBECCO, 1952 e YOUNGER, 1954). O estudo quantitativo do crescimento de células de mamíferos desenvolvido por PUCK e MARCUS (1955) e baseado no crescimento independente de cada célula de uma determinada população até formação de uma colônia macroscópica possibilitou não só estudar o crescimento

to, a genética, a fisiologia e a bioquímica celulares como também a ação de drogas, vírus, radiações e outros agentes sobre as células.

Mais recentemente quelantes de Ca^{++} (EDTA, por exemplo) passaram a ser usados ao lado de tripsina (ou mesmo substituindo-a). A grande vantagem consiste, naturalmente, em reduzir os efeitos deletérios da enzima que atua sobre qualquer proteína celular podendo levar a grande perda de viabilidade (GRIFFITHS, 1985a).

Os métodos desenvolvidos para o cultivo de células animais encontraram sua grande aplicação na produção de vacinas virais a partir de células que cresciam aderidas a uma superfície (TOLBERT e FEDER, 1983). A adaptação das células BHK (baby hamster kidney) para crescimento em suspensão (CAPSTICK et alii, 1962) permitiu o escalonamento das culturas celulares para os atuais sistemas de cultura em tanques de 8000 l, usados na produção de interferon (PHILLIPS et alii, 1985).

A tecnologia de cultura de células de mamíferos em grande escala tem apresentado um rápido desenvolvimento nos últimos anos. Para as células que podem crescer em suspensão têm sido adaptados os métodos usados nas fermentações microbianas (LYNN e ACTON, 1974 e ZWERNER et alii, 1981). As células que necessitam crescer aderidas a uma superfície também podem ser cultivadas em suspensão, usando-se partículas

microscópicas ("microcarriers") como suportes para adesão das células (VAN WEZEL e VAN der VELDEN-de GROOT, 1978; SPIER 1980; TOLBERT e FEDER, 1983). Outros processos que têm sido desenvolvidos baseiam-se em técnicas de crescimento celular nas paredes de fibras ocas-"hollow fibers" (KNAZEK et alii, 1972 e KU et alii, 1981) e na microencapsulação de células (JARVIS e GRDINA, 1983).

O desenvolvimento das técnicas de hibridização de células somáticas (HARRIS e WATKINS, 1965 e OKADA e MURAYAMA, 1965) e a descoberta da possibilidade de manter continuamente em cultura uma célula que secreta anticorpo (KOHLER e MILSTEIN, 1975) permitiram a produção de anticorpos monoclonais em grande escala, através da cultura de células (BIRCH et alii, 1985 e KARKARE et alii, 1985).

As implicações e consequências do uso das técnicas de DNA recombinante e hibridoma estão atualmente sob intensa investigação, principalmente a produção de muitas proteínas complexas de interesse farmacológico como antígenos virais, enzimas, hormônios, ativador tissular de plasminogênio, interferon (ARATHOON e BIRCH, 1986; MIZRAHI, 1986a; SPIER, 1988 e SPIER e HORAUD, 1985). A complexidade bioquímica desses materiais impede a sua síntese nos sistemas microbianos recombinantes, que são incapazes de efetuar as glicosilações específicas, as corretas ligações dissulfeto e a configuração tridimensional da molécula. No entanto as células animais, além de traduzir e sintetizar corretamente as proteínas clo

nadas, também secretam-nas para o meio de cultura, o que facilita os processos de purificação e isolamento desses produtos (WOOD et alii, 1984 e BERMAN et alii, 1985). Assim, é esperado que na próxima década a cultura de células animais assumirá maior importância na produção de fármacos.

2.2. Cultura de células e a Virologia

O impacto da cultura de células na virologia foi enorme, levando ao desenvolvimento não só de técnicas analíticas como também a possibilidade de produzir vírus in vitro. O crescimento de vírus em cultura de células foi tentado inicialmente por STEINHARDT et alii (1913) e PARKER e NYE (1925). Posteriormente, MAITLAND e MAITLAND (1928) usaram a cultura em frasco para crescimento do vírus de Vaccinia. Grande impulso foi dado pelos trabalhos de ENDERS et alii (1949) mostrando o crescimento da linhagem Lansing de poliovírus em cultura de células e o emprego do efeito citopático apresentado pelas células como um indicador de crescimento do vírus. A utilização da cultura de células para a multiplicação de vírus prosseguiu com o desenvolvimento do ensaio de placa (DULBECCO, 1952 e DULBECCO e FREEMAN, 1959) e do ensaio de foco (TEMIN e RUBIN, 1958).

A produção do poliovírus em cultura de células e o sistema de "roller flask" para crescimento de células

permitiram o aparecimento de diversos processos para produção de vacinas à partir de culturas em monocamada como as vacinas contra adenovírus (HILLEMANN, 1958) febre aftosa (PATTY et alii, 1960 e MOWAT e CHAPMAN, 1962), caxumba (BUYNACK e HILLEMANN, 1966), sarampo (HILLEMANN et alii, 1968) e rubéola (BUYNACK et alii, 1968).

2.3. Meios de cultura e fatores peptídicos de crescimento

No período inicial dos trabalhos com cultura de tecidos quando plasma era usado como meio de crescimento LEWIS e LEWIS (1912) mantinham os tecidos em soluções salinas. Estes autores verificaram então que a sobrevivência das células aumentava pela suplementação da solução salina com glicose e aminoácidos. Essas observações sugeriam a importância de se trabalhar com meios de composição conhecida. Entretanto a descoberta de que a adição de extrato de embrião aumentava o crescimento dos tecidos em plasma (CARREL, 1913) retardou os estudos para desenvolvimento de meios de composição definida.

O primeiro meio de cultura definido foi desenvolvido por WHITE (1946) sendo composto de glicose, sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas e hormônios, como insulina e tiroxina, levando em consideração também fatores físico-químicos como osmolaridade, pH e composição gasosa. Este meio permitia uma sobrevivência prolongada, mas não a proliferação

dos tecidos. Logo depois, foi descrito o meio 199 (MORGAN et alii, 1950) mais complexo que o anterior, porém permitindo apenas a manutenção da célula.

Com o estabelecimento de células em cultura especificamente das linhagens L (SANFORD et alii, 1948) e HeLa (SCHERER et alii, 1953) tornou-se possível trabalhar com uma população celular uniforme e reprodutível, o que permitiu um rápido avanço na formulação dos meios definidos. A década de 50 foi marcada pelo grande número de estudos visando estabelecer os requisitos nutricionais mínimos para crescimento de várias linhagens de células de mamíferos. Foi demonstrado que, além da presença de soro, as células HeLa e L necessitavam de 13 aminoácidos (arginina, cistina, fenilalanina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, tirosina, treonina, triptofano e valina) 8 vitaminas (ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, inositol, nicotinamida, piridoxal, tiamina e riboflavina) 6 íons inorgânicos (Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Cl^- e H_2PO_4^-) e glicose (EAGLE, 1955a; EAGLE, 1955b; EAGLE, 1959 e EAGLE et alii, 1957). Esses dados formaram a base do clássico meio mínimo essencial (MEM) de Eagle, usado até hoje.

Em seguida surgiram inúmeros meios de cultura formulados com vários componentes e visando melhorar o crescimento de várias células, mas sem a preocupação de identificar os seus requerimentos específicos (RIZZINO et alii, 1979).

O uso de meios definidos possibilitou a iden-

tificação de outros requerimentos nutricionais como ácidos graxos (ácido linoleico) poliaminas (putrescina) e elementos traço (HAM, 1963; HAM, 1965; HAM e McKEEHAN, 1979 e HIGUCHI, 1973).

Entretanto, o soro permanecia como um componente essencial para o crescimento da maioria das células. O soro é uma mistura complexa, com alguns dos seus componentes pouco ou nada caracterizados e outros cujas concentrações variam drasticamente entre diferentes partidas. Vários problemas associados ao uso e à natureza complexa e indefinida do soro têm sido reconhecidos. O seu custo é muito elevado, além de apresentar uma escassez periódica sazonal e um suprimento limitado para produção em grande escala. Uma das grandes objeções ao uso do soro no preparo de produtos celulares para uso humano é o seu potencial como fonte de contaminação por agentes infecciosos como vírus, bactérias e micoplasmas. Outro problema é sua possível interferência na purificação de determinados produtos, como é o caso das imunoglobulinas nos produtos imunológicos (GRIFFITHS, 1986a e LAMBERT e BIRCH, 1985).

Diversas tentativas foram feitas para eliminar a necessidade de soro no meio de cultura através da adaptação de linhagens celulares ao meio sem soro (KATSUTA e TAKAOKA, 1973) ou da purificação dos seus componentes ativos (FISHER et alii, 1958 e HIGUCHI, 1973). Entretanto a complexidade do soro, as baixas concentrações das substâncias ativas

e as alterações apresentadas pelas células selecionadas não favoreceram a aplicação prática desses experimentos.

O desenvolvimento de um método para otimizar os meios definidos e eliminar as quantidades de soro, através de um cuidadoso ajuste da composição e balanço dos nutrientes (McKEEHAN et alii, 1977; HAM e McKEEHAN, 1979 e HAM, 1982) mostrou-se de grande utilidade e importância para os estudos de crescimento de células em meio sem soro.

O desenvolvimento de linhagens celulares hormônio-dependentes (ARMELIN, 1975) levou à hipótese de que uma das principais funções do soro seria fornecer hormônios e fatores de crescimento necessários ao crescimento das células (ARMELIN, 1973; ARMELIN, 1975; SATO, 1975 e MATHER e SATO, 1978). Esta hipótese foi inicialmente comprovada pelo crescimento da célula GH₃, de pituitária, em meio sem soro suplementado com hormônios, fatores de crescimento e transferrina (HAYASHI e SATO, 1976).

Além dos hormônios, o soro também fornece:

- a) proteínas de transporte, como transferrina, que facilitam a entrada nas células de nutrientes e minerais exigidos por estas;
- b) outras proteínas, tais como albumina e fetuina, que podem detoxificar o meio ao se ligarem a metais tóxicos, estabilizar substâncias lábeis e atuar como substância tampicante (GUILBERT e ISCOVE, 1976; ISCOVE e MELCHERS, 1978 e RUDLAND et alii, 1977);
- c) fatores proteicos como fibronectin

na, necessários à adesão e espraiamento das células na superfície de crescimento (HOLMES, 1967; HÖÖK et alii, 1977 e YAMADA e OLDEN, 1978); d) nutrientes de baixo peso molecular tais como aminoácidos, vitaminas, minerais, ausentes no meio basal ou presentes em concentrações sub-ótimas (HOLLEY, 1974 e HOLLEY e KIERNAN, 1974); e) inibidores de protease que inativam a tripsina utilizada para remover as células da superfície ou para dissociar os tecidos (HAM e McKEEHAN, 1979); f) fatores proteicos chamados fatores de crescimento como PDGF, IGFs, etc (ver mais adiante).

O conhecimento das funções do soro na cultura de células e o desenvolvimento de uma metodologia adequada para se estudar sua substituição permitiram a formulação de meios que mantêm o crescimento de inúmeras linhagens celulares na ausência ou em baixa concentração de soro, suplementados com hormônios, fatores de crescimento e proteínas de transporte (BARNES e SATO, 1980; BOTTENSTEIN et alii, 1979 e BOTTENSTEIN, 1983). O primeiro meio sem soro foi descrito para a célula GH₃, de pituitária de rato, sendo composto de seis hormônios, transferrina, selênio e cádmio (HAYASHI et alii, 1978 e HAYASHI e SATO, 1976). Em seguida surgiram inúmeros meios definidos sem soro, otimizados para a proliferação específica de determinadas células, originadas de diferentes tecidos, como : HeLa (HUTCHINGS e SATO, 1978 e WU e SATO, 1978); M2R (MATHER e SATO, 1979); B104 (BOTTENSTEIN e SATO, 1979 e BOTTENSTEIN e SATO, 1980); BHK (MACIAG et alii, 1980); SV40-Balb/3T3 (ROCKWELL

et alii, 1980); FLOW 2000 (WALTHALL e HAM, 1981); WI 38 (BETTGER et alii, 1981); 3T3 (SHIPLEY e HAM, 1983). A principal conclusão destes trabalhos foi que cada tipo de célula requer uma combinação específica dos fatores do soro permitindo descrever os papéis desses fatores na estimulação do crescimento dessas células.

O cultivo de células em meios hormonalmente de finidos tem demonstrado que múltiplos fatores de crescimento controlam a proliferação celular (ARMELIN, 1973; ARMELIN, 1975; PLEDGER et alii, 1977 e BARNES e SATO, 1980). Esses fatores de crescimento estimulam a síntese de DNA de células em repouso (G_0) e impedem que células em ativo crescimento entrem em repouso, mas são insuficientes para estimular a proliferação de culturas mantidas na ausência de fatores nutricionais adequados (CHERINGTON, 1984). Além disso, um único fator não é suficiente para induzir máxima síntese de DNA em células bloqueadas em G_0 por remoção de soro do meio de cultura. A necessidade de uma combinação de fatores foi relatada pela primeira vez por ARMELIN (1973) ao observar que a combinação de suplementos nutricionais, hidrocortisona, insulina e um extrato de pituitária (que provavelmente seria FGF-"fibroblast growth factor") estimulava a síntese de DNA e a proliferação das células 3T3 mais do que qualquer um dos fatores isoladamente. Este trabalho, ao introduzir um ensaio de atividade biológica relativamente simples e eficiente, que consiste em medir a estimulação de entrada em fase S de células 3T3 em repouso (es

tado G_0), permitiu isolar e purificar FGF e outros fatores de crescimento.

FGF foi encontrado em hipófises bovinas (ARMELIN, 1973) e cérebro bovino (GOSPODAROWICZ, 1974). PDGF ("platelet-derived growth factor") um polipeptídeo liberado por plaquetas humanas durante a coagulação, tem mostrado ação mitogênica para fibroblastos (ROSS et alii, 1974; KOHLER e LIPTON, 1974), assim como o fator de crescimento epitelial, EGF - "epidermal growth factor" (COHEN, 1962). Outros polipeptídeos com atividade de fator de crescimento para células em cultura foram isolados: NGF - "nerve growth factor" (LEVI-MONTALCINI e ANGELETTI, 1968), MSA - "multiplication stimulating activity" (DULAK e TEMIN, 1973), OGF - "ovarian growth factor" (GOSPODAROWICZ et alii, 1974), somatomedinas ou fatores de sulfatação e de timidina (VAN WYCK et alii, 1971 e HALL e UTHNE, 1971), NSILA - "non suppressible insulin like activity" ou IGF-I e IGF-II - "insulin-like growth factors I e II" (RINDERKNECHT e HUMBEL, 1976 e FROESCH et alii, 1979), TGFs α e β - "transforming growth factor" (SPORN e TODARO, 1980).

O estudo dos fatores de crescimento proporcionou grandes avanços na análise do ciclo celular. A ação de fatores como FGF e PDGF leva células Balb-3T3 que estão em repouso (G_0) a se comprometer com um programa de transcrição que culmina com a divisão celular. De acordo com alguns autores (PLEDGER et alii, 1977 e STILES et alii, 1979) uma sequência ordenada

de eventos ocorre dependendo da presença de dois tipos de controladores representados por PDGF (presente apenas no soro) e IGFs (presentes no soro e no plasma). PDGF tornaria as células "competentes" para a divisão celular, que só ocorrerá com o suprimento dos chamados fatores de progressão EGF e IGFs. PDGF e FGF são, portanto, considerados fatores de competência e EGF e IGF fatores de progressão, para células 3T3 (LEOF et alii, 1982).

2.4. Cultura de células animais e produção de vacinas virais

Há dois grandes grupos de produtos originados de células animais : vacinas virais e proteínas biologicamente ativas. O número de proteínas purificadas produzidas comercialmente é limitado. Entre estas encontram-se α e β interferon e anticorpos monoclonais, seguidos pela recente produção do ativador tissular de plasminogênio (CARTWRIGHT, 1987).

A necessidade de vacinas virais conduziu a cultura de células para os processos de grande escala iniciados com a produção da vacina Salk contra a poliomielite, em 1954. As principais vacinas humanas produzidas a partir de células animais são Salk e Sabin (poliomielite), sarampo, cachumba, rubéola, raiva, febre amarela e influenza (GRIFFITHS, 1985b).

O número de vacinas veterinárias é muito maior, destacando-se a vacina anti-aftosa, que representa o maior produto obtido por cultura de células animais : 1,5 bilhão de doses por ano, que corresponde a mais de 2 milhões de litros de meio de cultura (CARTWRIGHT, 1987).

Inicialmente as vacinas para febre aftosa eram produzidas a partir de vírus cultivado em fragmento de epitélio lingual de bovino, mantido temporariamente "in vitro" (FRENKEL, 1947 e CARTWRIGHT et alii, 1957). Esse método foi suplantado pelo uso de células de rim bovino cultivadas "in vitro" (SELLERS, 1955; PATTY et alii, 1960 e PLEDGER, 1961) e posteriormente pelo estabelecimento de linhagens celulares altamente sensíveis ao vírus da febre aftosa : célula BHK (MOWATT e CHAPMAN, 1962) e célula IB-RS-2 (CASTRO, 1964).

A célula BHK-21 ("baby hamster kidney") foi isolada de culturas de rim de hamster de um dia de idade cultivadas em monocamada no meio basal de Eagle modificado (contendo o dobro da concentração normal de aminoácidos e vitaminas) adicionado de 10% de soro bovino e 10% de caldo tripti-caseína fosfato (MACPHERSON e STOKER, 1962) no qual apresentam rápido crescimento associado à formação de uma densa camada de células. A partir dessas células foram cultivados 8 clones; sendo que um deles, designado de BHK-21/13 (ou C13) foi bastante estudado tornando-se o estoque padrão distribuído pelo laboratório da Universidade de Glasgow (STOKER e MACPHERSON,

1964). As células BHK-21 são alongadas e crescem com uma orientação paralela, como fibroblastos. Durante o crescimento logarítmico, no meio descrito acima, apresentam um tempo de dobramento médio de doze horas. O crescimento continua mesmo depois de atingir a confluência, o que resulta numa densidade de saturação muito elevada, aproximadamente 10^6 células por cm^2 de superfície (MACPHERSON, 1963 e STOKER e MACPHERSON, 1964).

Os sistemas de cultura desenvolvidos para as células de rim bovino e BHK eram baseados no crescimento de células aderidas à superfície de frascos de vidro (monocamadas) estacionários ou rotativos. Uma mudança marcante foi introduzida pela adaptação das células BHK-21 para crescimento em suspensão (CAPSTICK et alii, 1962). Os experimentos para verificar as mudanças ocorridas durante esse processo de adaptação mostraram uma alteração permanente nas características de crescimento em monocamada, o desenvolvimento de células gigantes multinucleadas e um aumento na velocidade de desenvolvimento de tumor (CAPSTICK et alii, 1966).

A utilização da célula BHK-21 na produção comercial de vacina anti-aftosa incentivou a pesquisa para aumentar os rendimentos celulares nas culturas em suspensão (TELLING e ELSWORTH, 1965 e TELLING, 1969). A complementação do meio com hidrolisado de lactoalbumina associada ao aumento da concentração de outros componentes permitiu dobrar os rendimentos até então conseguidos (RADLETT et alii, 1971).

TELLING e RADLETT (1971) demonstraram a dependência do crescimento de células animais em relação a diferentes parâmetros químicos e físicos e ao controle do pH da cultura por injeção de CO_2 e ar. Posteriormente determinaram um valor ótimo para pO_2 em 80 mm Hg para as células BHK e observaram uma redução na densidade celular máxima e na velocidade de crescimento em outros valores de pO_2 (RADLETT et alii, 1972).

Apesar da produção do vírus da febre aftosa em monocamada de células BHK não ser um procedimento comum nas operações industriais, existem três processos que usam este sistema de produção. Um deles usa "roller bottles" para crescimento das células, sendo necessário um número muito grande de garrafas para a produção industrial (SPIER, 1983). Os outros sistemas são processos unitários, onde o aumento da produtividade decorre do aumento do tamanho do equipamento e não do número de unidades. O primeiro deles foi descrito por SPIER e WHITESIDE (1976a e 1976b) sendo baseado no crescimento das células BHK na superfície de esferas de vidro de 3 mm mostrando o crescimento de quatro linhagens do vírus da febre aftosa nessas células. Posteriormente esse processo foi escalonado para 100 litros de meio (WHITESIDE e SPIER, 1981). O segundo sistema baseia-se no crescimento das células na superfície de partículas microscópicas ("microcarriers") com escalonamento para 150-170 litros (MEIGNIER, 1979 e MEIGNIER et alii, 1981).

Os trabalhos de MIZRAHI e AVIHOO (1976) mostraram que hidrolisado de lactoalbumina e caldo triptose

fosfato são as principais fontes de aminoácidos para o crescimento das células BHK. Na tentativa de diminuir o custo do meio de cultura procurou-se substituir o soro por peptonas com bons resultados de crescimento das células BHK e de vírus, seja vírus da estomatite vesicular (KEAY, 1975) ou vírus da encefalomiocardite (MIZRAHI, 1977). TOMEI e ISSEL (1975) mostraram a produção do vírus da febre aftosa em células BHK cultivadas em meio sem soro com rendimentos comparáveis aos obtidos com células que crescem em meio suplementado com soro.

2.5 Controle de qualidade em cultura de células

As células representam a base do processo de produção de vacinas e outros produtos de interesse. A reprodutibilidade dos parâmetros de crescimento e produtividade celulares destaca-se como sendo o ponto mais crítico dentro deste processo, o que requer grandes cuidados na manutenção e manipulação das células. De grande importância também é a disponibilidade de um suprimento constante de células bem caracterizadas e com qualidade padronizada empregando-se o método de estocagem em tanques de nitrogênio líquido (SCHEIRER, 1987).

É de fundamental importância levar em consideração os seguintes fatores : a) água; b) matérias-primas; c) meio de cultura; d) soro e e) esterilidade.

A água utilizada em cultura de células deve ser altamente purificada empregando-se destilador de vidro (água bi ou tri-destilada) ou outros sistemas equivalentes, como osmose-reversa. A água usada na formulação de meios de cultura deve ser analisada periodicamente para verificar a ausência de pirogênio (PUMPER, 1973 e McLIMANS, 1979).

As substâncias químicas usadas devem ser da melhor qualidade e devem conter um certificado de análise para cada lote. Os procedimentos usados no controle de qualidade das matérias-primas devem ser altamente padronizados, além de mimetizar as condições usadas na produção (MORTON e MORGAN, 1973 e SPIER, 1982).

As funções de um meio para crescimento de células podem ser definidas como : manutenção das condições físico-químicas desejadas e fornecimento dos nutrientes para a síntese de biomassa celular e de produtos. Dentro deste concelto, os parâmetros básicos de controle de qualidade para meios de cultura são fatores físico-químicos (pH e osmolaridade) esterilidade do meio, capacidade promotora de crescimento celular e formação de produtos (LAMBERT e BIRCH, 1985).

Diferentes tipos celulares exigem distintos valores de pH dentro da faixa 6,9 - 7,8 para atingirem um nível ótimo de crescimento. No início da cultura o pH deve estar próximo de 7,4; não devendo cair abaixo de 7,0 durante o cultivo. Normalmente um pH abaixo de 6,8 é inibitório para o crescimen

to da célula (EALGE, 1973). Tradicionalmente o meio de cultura de células é tamponado pelo sistema CO_2 -bicarbonato, análogo ao do sangue. É possível melhorar a capacidade tamponante do meio e estabilizar o pH usando um tampão orgânico, como Hepes (10-20 mM), juntamente com o bicarbonato ou substituindo-o (EAGLE, 1971). Além disso, a medida final do pH deve ser efetuada a 37°C, após esterilização, dentro das condições usadas na prática, incluindo o equilíbrio com a correta mistura de gás (LAMBERT e BIRCH, 1985).

Osmolaridade é a medida da atividade osmótica total, que é fornecida pelos íons e moléculas não ionizadas do meio, sendo expressa como miliosmoles por volume de solvente. Uma condição essencial para ótima nutrição e metabolismo das células em cultura é um adequado balanceamento iônico, já que o transporte de íons e as mudanças nas concentrações iônicas dentro e fora das células afetam o transporte de outros nutrientes, como aminoácidos e açúcares, que direta ou indiretamente irão afetar os sistemas básicos de síntese celular. Desde que a maior parte da atividade osmótica no meio de cultura para células é fornecida pelos íons, seu controle é importante para regular o metabolismo celular, além de manter a tonicidade. As medidas de osmolaridade são úteis para conferir erros no preparo de meios, já que uma determinada formulação deve ser reproduzida lote a lote. A osmolaridade pode ser calculada através de tabelas de coeficientes osmóticos, mas para os fins do controle de qualidade é preferível medi-la diretamente atra

vés de um osmômetro (WAYMOUTH, 1973).

Entre as entidades biológicas que podem contaminar as culturas de células estão bactérias (em particular micoplasmas), fungos e vírus. Tudo que entra em contato com as células, tanto quanto os próprios estoques de células, podem servir de fontes de contaminação. Para controlar a contaminação é importante estar seguro da ausência de organismos indesejáveis nos estoques e dispor de procedimentos capazes de determinar a presença de micoplasma e vírus, que são difíceis de controlar porque não podem ser removidos através das técnicas de filtração (RATAFIA, 1987a). A contaminação por micoplasma pode ser detectada por cultura direta, em caldo e ágar apropriados, ou por imunofluorescência (HAYFLICK, 1973 e McGARRITY, 1979) enquanto que a presença de vírus é difícil de ser determinada, exigindo condições muito elaboradas e específicas (LAMBERT e BIRCH, 1985 e SCHEIRER, 1987). Em geral as contaminações por fungos e bactérias são facilmente reconhecidas por uma inspeção grosseira, mas alguns contaminantes somente produzem pequenas mudanças no meio e são compatíveis com o crescimento das células na cultura. Os procedimentos usados na verificação dessas contaminações devem ser adequados para detectar todos os contaminantes conhecidos, podendo ser aplicados às culturas de células e aos meios de cultura, soro, tripsina ou outros aditivos. Normalmente uma amostra de 10 ml do meio a testar é suficiente para inocular, em duplicata, os diferentes meios : caldo tioglicolato, caldo soja

tripticaseína, caldo Sabouraud dextrosado, ágar sangue e ágar desoxicolato, que devem ser incubados a 30°C e 37°C por 14 dias (CORIELL, 1973).

Ao se estudar crescimento, no sentido de proliferação celular, deve-se levar em conta a complexidade das interações entre as células e seus ambientes físico, nutricional e hormonal. Em cultura, as células crescem segundo o clássico modelo de fases lag, crescimento exponencial, estacionária e declínio. A morte das células pode ser causada pela exaustão de nutrientes e /ou fatores de crescimento, acúmulo de componentes tóxicos ou em resposta a sinais externos. Para verificar as condições da cultura é fundamental acompanhar o estado da célula através do exame microscópico direto com corantes apropriados, o que fornece informações a respeito da densidade da população celular, viabilidade, índice mitótico, morfologia geral da célula e quantidade de detritos celulares presentes (ARATHOON e BIRCH, 1986 e PATTERSON, 1979).

A capacidade promotora de crescimento do meio de cultura ou algum dos seus componentes pode ser quantitativamente estimada através de diversos parâmetros de crescimento que medem o número total de células (tempo de dobramento, densidade de saturação e eficiência de plaqueamento) ou a massa celular total (peso seco, determinação de proteínas) de forma direta ou indireta (GRIFFITHS, 1986b).

Devido à grande variabilidade na sua qualidade o soro deve ser testado quanto à sua capacidade promotora de crescimento celular e de formação de produto, sua pureza e sua não-interferência nos processos de purificação, sempre em paralelo com um lote padrão conhecido. Ao analisar a capacidade do soro em promover o crescimento das células, alguns pontos devem ser considerados : duração adequada do teste, incluindo múltiplas passagens; medida quantitativa do crescimento (velocidade de crescimento e rendimento celular) e uso de condições (células, meio e substrato de crescimento) idênticas àsquelas usadas na prática (LAMBERT e BIRCH, 1985; CARTWRIGHT , 1987 e RATAFIA, 1987a).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Célula utilizada

Neste trabalho utilizou-se a célula BHK-21(C13) originária de hamster (MACPHERSON e STOKER, 1962). Amostras desta linhagem celular, originalmente obtidas da Vallée Nordeste, são mantidas congeladas em reservatório de nitrogênio líquido.

3.2. Meios de cultura e soluções

3.2.1. Meios mínimos essenciais

Os seguintes meios foram utilizados: DME (Dulbecco's modified Eagle's medium) e MEM (minimum essential medium) adquiridos do laboratório Flow e o MGM (Eagle's medium Glasgow modified) formulado e preparado no laboratório. A composição desses meios é apresentada na Tabela 1. Todos os meios foram dissolvidos em água tratada por osmose reversa ou bi-destilada e

esterilizados por filtração no sistema Millipore, com membrana GS (diâmetro dos poros de $0,22 \mu$) distribuídos em porções de 200 ml por frasco estéril e estocados em geladeira (4°C) por um período máximo de 60 dias.

Tabela 1 - Composição (mg/l) dos meios mínimos essenciais

Componente	DME	MEM	MGM
CaCl_2 (anidro)	200,00	200,00	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$			265,00
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,10		0,10
KCl	400,00	400,00	400,00
MgSO_4 (anidro)	97,72	97,72	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			200,00
NaCl	6400,00	6800,00	6400,00
NaHCO_3	1200,00	1200,00	2750,00
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	124,00	140,00	124,00
Glicose	4500,00	4500,00	4500,00
Piruvato de sódio	110,00		
Vermelho de fenol	15,00	10,00	15,00
Ampicilina	25,00	25,00	25,00
Estreptomicina	100,00	100,00	100,00
Fungison	2,50	2,50	2,50
L-Arginina.HCl	84,00	126,00	42,00
L-Cistina			24,00
L-Cistina.2HCl	62,57	31,29	

L-Fenilalanina	66,00	32,00	33,00
Glicina	30,00		
L-Glutamina	584,00	292,00	292,00
L- Histidina.HCl.H ₂ O	42,00	42,00	21,00
L-Isoleucina	105,00	52,50	52,40
L-Leucina	105,00	52,40	52,40
L-Lisina.HCl	146,00	72,50	73,10
L-Metionina	30,00	15,00	15,00
L-Serina	42,00		
L-Tirosina			36,20
L-Tirosina(Sal dissódico)	104,20	52,10	
L-Treonina	95,00	48,00	47,60
L-Triptofano	16,00	10,00	8,00
L-Valina	94,00	46,00	46,80
Ácido fólico	4,00	1,00	2,00
Cloreto de colina	4,00	1,00	2,00
Inositol	7,20	2,00	3,60
Nicotinamida	4,00	1,00	2,00
Pantotenato de cálcio	4,00	1,00	2,00
Piridoxal.HCl	4,00	1,00	2,00
Riboflavina	0,40	0,10	0,20
Tiamina.HCl	4,00	1,00	2,00

Fonte : Manual Gibco (1974)

3.2.2. Soros

Dois tipos de soros foram usados : soro fetal bovino (SFB) e soro bovino (SB). Estoques destes soros eram mantidos congelados [-20°C) em alíquotas de 20 ml.

3.2.3. Caldo tripticaseína fosfato (CTF)

Triptose	20,0 g
Glicose	2,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato bibásico de sódio	2,5 g
Água bi-destilada	1.000 ml
pH 7,3 $\pm$ 0,2	

O CTF foi esterilizado por filtração em filtro Millipore, com membrana GS (0,22 μ) distribuído em porções de 200 ml por frasco estéril e mantido em geladeira (4°C).

As amostras de CTF que foram utilizadas encontram-se relacionadas na Tabela 2. Os diferentes lotes de CTF-Biobrãs foram propositalmente formulados com matérias-primas de qualidade variável e testados na indústria.

Tabela 2 - Relação das amostras de caldo de tripticaseína fosfato(CTF)

CTF	Procedência	Classificação das amostras
F01	BIOBRÁS	R
F209	BIOBRÁS	A
PP70	BIOBRÁS	R
Difco	DIFCO	A
Merck	MERCK	A

R = reprovada

A = aprovada

3.2.4. Solução de hidrolisado de lactoalbumina

Hidrolisado de lactoalbumina 25,00 g

Água bidestilada 1000,00 ml

A solução era esterilizada por filtração em filtro Millipore, com membrana GS (0,22 μ) distribuída em porções de 200 ml por frasco estéril e mantida em geladeira (4°C).

3.2.5. Solução de tripsina

NaCl	8,20 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ (anidro)	1,14 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
Na ₄ EDTA	0,29 g
Vermelho fenol (sol.alcalina 1%).....	1,5 ml
Tripsina (1:250)	1,00 g
Água bidestilada	1000,0ml

Após a dissolução dos sais, a solução permanecia em agitação, em baixa rotação, por 1 hora, sendo esterilizada por filtração em sistema Millipore (membrana GS 0,22 μ) e estocada congelada (-20°C) em alíquotas de 20 ml.

3.2.6. Solução salina fosfato pH 7,2 (PBS)

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ (anidro)	0,14 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,10 g
CaCl ₂ (anidro)	0,10 g
Água bidestilada	1000,0 ml

O Na₂HPO₄ era dissolvido separadamente, em 100-200 ml de água bidestilada e os outros sais dissolvidos em conjunto no volume restante de água sendo acrescentados à solução de Na₂HPO₄. Após agitação, a solução era esterilizada por

filtração em sistema Millipore (membrana GS 0,22 μ) e distribuída em porções de 200 ml por frasco estéril e estocada em geladeira (4°C).

3.2.7. Solução salina fosfato sem Ca^{2+} e Mg^{2+} , pH 7,2 (PBSA)

NaCl	0,20 g
KCl	0,20 g
Na_2HPO_4 (anidro)	1,14 g
KH_2PO_4	0,20 g
Água bidestilada	1000,0 ml

A solução era preparada segundo o item 3.2.6, sendo que todos os sais eram dissolvidos ao mesmo tempo.

3.2.8. Solução de azul de tripan

KCl	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
Na_2HPO_4	1,44 g
Azul de tripan	5,00 g
Água bidestilada	1000,0 ml

A solução era esterilizada por filtração no sistema Millipore (membrana GS 0,22 μ) e estocada em geladeira a 4°C.

3.2.9. Solução de vermelho fenol a 1%

Vermelho fenol	1,0 g
NaOH 1 N	3,0 ml
Água bidestilada qsp	100,0 ml

A solução era estocada em geladeira (4°C).

3.2.10. Solução de cristal violeta

Cristal violeta	5,0 g
Metanol	700,0 ml
Água bidestilada	300,0 ml

A solução era preparada dissolvendo-se o cristal violeta no metanol, acrescentando-se a água bidestilada e deixando em agitação durante 1-2 horas, sendo estocada em temperatura ambiente.

3.3. Preparação de suspensão homogênea de células

Culturas de células BHK-21 crescendo em substrato sólido (monocamadas) eram tripsinizadas para remover as células da superfície. Para tanto, o meio de cultura era aspirado com pipeta Pasteur (ligada a bomba de vácuo) e a camada de células lavada com PBSA, tomando-se o cuidado de não despre-

gar as células mitóticas. Para garrafas de 25cm² a tripsinização era feita com 0,5 ml de solução de tripsina. Quando as células começavam a despregar, era adicionado 1,0 ml de PBSA. As células eram separadas pipetando-se com pipeta Pasteur de ponta fina, para cima e para baixo e, rapidamente, adicionava-se 0,5 ml de meio contendo soro (DME + 10% SFB) pipetando-se para cima e para baixo para formar uma suspensão homogênea de células (sem grumos). Quando necessário, a suspensão era diluída, acrescentando-se mais PBSA.

3.4. Manutenção e congelamento de estoques

3.4.1. Preparo de estoques celulares

Novas culturas eram preparadas adicionando-se uma amostra da suspensão de células a uma garrafa de 25cm² contendo 4 ml de meio fresco (DME + 10% SFB) pipetando-se para cima e para baixo, para homogeneizar a suspensão. Após injeção da mistura de 5% CO₂ + 95% ar comprimido, as garrafas eram vedadas e incubadas a 37°C durante 9-12 dias, o meio era trocado a cada 3 dias.

3.4.2. Congelamento de células

A suspensão de células recém-preparada era

centrifugada a 2000 g por aproximadamente 3 minutos para eliminar tripsina. Após remoção do sobrenadante, as células eram ressuspensas em meio DME contendo 10% DMSO (dimetil sul-fóxido) previamente esterilizado em filtro Seitz e 10% SFB para uma concentração de 1 a 2×10^6 células/ml. Após distribuição de 1 ml desta suspensão por ampola, as amostras eram incubadas por 30 minutos a 4°C e depois transferidas para tanque de nitrogênio líquido.

3.4.3 Descongelamento de células

Uma ampola era retirada do nitrogênio líquido e colocada em banho maria a 37°C. Logo após o descongelamento, o conteúdo da ampola era transferido para garrafas de 25cm² contendo 4 ml de DME + 10% SFB (previamente injetadas com a mistura de 5% CO₂ e 95% ar comprimido e incubadas a 37°C) e incubadas a 37°C durante 3-5 horas até as células aderirem à garrafa. O meio era então trocado para eliminar o DMSO e as garrafas novamente incubadas a 37°C, após injeção da mistura de CO₂ + ar comprimido.

3.5. Crescimento celular em monocamada

3.5.1. Determinação de T_D e D_S através de curvas de crescimento

A partir de uma suspensão homogênea de células feita em meio MEM + 5% SB, conforme descrito no item 3.3, 5×10^4 células eram distribuídas por placa de Petri de plástico, descartável, de 3,5 cm de diâmetro, num volume de 2 ml por placa. As placas eram incubadas a 37°C, em câmara úmida (caixas de plástico contendo, no fundo, uma camada de espuma embebida em água, devidamente seladas com vaselina) após injeção da mistura de 5% CO_2 e 95% ar comprimido. Após 24 horas de incubação 2 placas eram coletadas para contagem de células, conforme descrito no item 3.5.2. O restante das placas tinha o meio removido, a camada de células lavada com PBS e os diferentes meios a serem testados eram adicionados, sendo 82% meio mínimo essencial (DME, MEM ou MGM) + 8% soro (SB ou SFB) + 10% CTF. Estas placas eram reincubadas e, durante um período de 8 dias, a cada 24 horas, 1-2 placas eram coletadas para observação ao microscópio e contagem das células. O meio era trocado a cada 3 dias. Após determinação do número de células/placa para cada ponto, traçava-se o gráfico do número de células/placa em função do tempo (horas) para determinar T_D (tempo de dobramento da população, unidade em horas) e D_S (densidade máxima ou de saturação que a célula atinge, representada por número de células/cm²). Os desvios entre as duplicatas estão indicados

nos gráficos e não ultrapassaram 10%.

3.5.2. Coleta de células para contagem da curva de crescimento

O meio das placas era removido e a camada de células lavada rapidamente com 2,0 ml de PBSA e tripsinizada com 0,5 ml de solução de tripsina e 0,4 ml de PBSA. Após remoção das células da superfície e dissociação das mesmas com auxílio da pipeta Pasteur, a suspensão homogênea de células (0,9 ml) era transferida para um tubo de ensaio, fixada com 0,1 ml de formaldeído 40% e contada em câmara de Neubauer.

3.5.3. Determinação da eficiência de plaqueamento (E.P.)

Uma diluição seriada era feita a partir de uma suspensão homogênea de células em meio MEM + 5% SB, como descrito no item 3.3. Conforme descrito no item 3.5.1, 1×10^3 células eram distribuídas por placa de Petri. Após 24 horas de incubação o meio de todas as placas era removido e a camada de células lavada com PBS antes de adicionar os diferentes meios a serem testados (82% meio mínimo essencial + 8% soro + 10% CTF). As placas eram novamente incubadas e o meio renovado periodicamente a cada 3 dias até o aparecimento de colônias macroscópicas

(+ 7 dias). Após este período, o meio das placas era removido e as células fixadas com 10% formaldeído em PBS por 5-10 minutos. Depois da remoção do formaldeído, as células eram coradas utilizando cristal violeta 0,5%. Colônias com mais de 50 células eram contadas (a olho nú) e a eficiência de plaqueamento (EP) determinada segundo a fórmula :

$$EP(\%) = \frac{\text{número de colônias}}{\text{número de células plaqueadas}} \times 100$$

Todas as determinações foram feitas em duplicata, sendo os desvios menores do que 10%.

3.6. Crescimento celular em suspensão

3.6.1. Crescimento em frasco "spinner"

Uma suspensão homogênea de células era preparada de acordo com o item 3.3 de Material e Métodos. $7,5 \times 10^6$ células, em pequeno volume (1 a 2 ml) de meio MGM + 8% SB, eram inoculadas em um frasco tipo "spinner" contendo 15 ml do meio a ser testado (MGM + 8% SB + 10% CTF) de modo a obter, inicialmente, 5×10^5 células/ml. Os frascos "spinner" eram então injetados com 5% CO₂ + 95% ar comprimido e incubados em estufa a 37°C, com agitação constante de aproximadamente 250 rpm (sobre um agitador magnético rotativo). A cada 24 horas, durante 10 dias, coletavam-se amostras (1ml) da cultura,

as quais eram diluídas com 1 ml de solução de azul de tripan e contadas em câmara de Neubauer para determinar o número de células viáveis /ml (as células viáveis excluem o corante e permanecem transparentes, ao contrário das células mortas que tornam-se azuis). A cultura era então diluída para a densidade inicial (5×10^5 células/ml) através da retirada de volume adequado de suspensão e adição de igual volume de meio fresco, e novamente incubada.

3.6.2. Crescimento em escala industrial

Conforme descrito em 3.6.1., mas utilizando-se frascos com capacidade para 1000 ml e contendo 400 ml de meio sobre uma mesa com agitação magnética rotativa de 250 rpm, dentro de uma sala-estufa a 37°C. Nesse sistema o ajuste do pH era feito, se necessário, pela injeção de CO₂ (para abaixar o pH) ou de ar comprimido.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise do crescimento de células BHK-21 em monocamada

Diversos tipos de meios de cultura têm sido utilizados para a cultura de células "in vitro" (HAM e McKEEHAN, 1979). Independente do tipo de meio, entretanto, a suplementação com soro (geralmente bovino) é considerada essencial. Para determinadas aplicações têm sido utilizados outros suplementos além do soro, como os complexos proteicos indefinidos de peptonas, hidrolisado de lactoalbumina ou caldo triptícaseína fosfato (SPIER, 1980 e TELLING e RADLET, 1971). Os ensaios de eficiência de plaqueamento e determinação de T_D e D_S através de curvas de crescimento são procedimentos de pequena escala que podem ser usados para estimar quantitativamente a capacidade promotora de crescimento de meios de cultura ou algum dos seus componentes (GRIFFITHS, 1986b). Para determinar as condições ideais para testar meios de cultura e suplementos usados

na produção industrial de vacinas, células BHK-21 foram submetidas a crescimento em diversos meios de cultura suplementados com diferentes tipos de soro e diferentes amostras de CTF. Inicialmente procurou-se verificar a eficácia do ensaio de eficiência de plaqueamento na avaliação do potencial mitogênico de alguns meios de cultura e suplementos.

4.1.1. Eficiência de Plaqueamento

Para determinar as condições ideais de cultura, células BHK-21 foram submetidas a ensaios de eficiência de plaqueamento em meios DME, MEM e MGM suplementados com caldo tripticaseína fosfato (CTF) e/ou soro bovino (SB) ou soro fetal bovino (SFB). Os resultados desses experimentos encontram-se nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Efeito do tipo de meio de cultura e soro na eficiência de plaqueamento (E.P) de células BHK-21 cultivadas em meio mínimo + 8% soro + 10% CTF.

Meio de cultura	Soro	CTF	E.P (%)
DME		Difco	22,6
		—	1,3
	SB		
MEM		Difco	36,6
		—	3,8
	SB		
MGM		Difco	6,8
		—	0,4
	SB		
		Difco	32,2
		—	3,0
	SB		
		Difco	1,4
		—	0,2
	SB		
		Difco	15,3
		—	1,7
	SB		

Os dados da Tabela 3 mostram como o meio de cultura e o soro afetam o crescimento de células BHK-21. A atividade promotora de crescimento do SFB é muito superior à do SB, sendo este efeito mais acentuado no meio MGM. O meio DME proporciona melhores condições para o crescimento e desenvolvimento de colônias do que o MEM, enquanto que o crescimento no meio MGM é bem inferior aos outros. Quando se compara DME e MEM suplementados com SFB, nenhuma diferença significativa é encontrada, mas quando a suplementação é feita com SB, existe uma grande diferença, ou seja, a capacidade promotora de crescimento do MEM + SB é muito mais baixa. A suplementação com CTF é essencial uma vez que na ausência de CTF observa-se drástica redução na eficiência de plaqueamento (de mais de 90%, independente do meio de cultura utilizado). Como pode ser visto, os meios MGM e MEM suplementados apenas com SB conduzem a uma eficiência de plaqueamento baixíssima, menor que 1%.

Tabela 4 - Efeito de diferentes tipos de CTF na eficiência de plaqueamento (E.P) de células BHK-21 cultivadas em meio mínimo + 8% soro + 10% CTF.

Meio de cultura	Soro	CTF	E.P (%)
DME	SB	F209	6,9
		Difco	22,6
		—	1,3
	SFB	F209	6,7
		Difco	36,6
		—	3,8
MEM	SB	F209	3,6
		Difco	6,8
		—	0,4
	SFB	F209	3,8
		Difco	32,2
		—	3,0
MGM	SB	F209	2,6
		Difco	1,4
		—	0,2
	SFB	F209	2,6
		Difco	15,3
		—	1,7

Ao analisar diferentes amostras de CTF (F209 e Difco) cujos resultados estão na Tabela 4 nota-se uma diferença nas respostas aos diferentes CTFs. Tanto CTF-Difco quanto F209 proporcionam melhor crescimento para células BHK no UME, seguido do MEM e MGM. Entretanto, ao usar CTF-F209, os soros bovino e fetal bovino apresentam o mesmo efeito na proliferação das células, ao contrário do CTF-Difco. Em todas as condições os resultados de eficiência de plaqueamento para CTF-Difco foram bem superiores.

De um ensaio para outro foi notada uma enorme variabilidade nos resultados de eficiência de plaqueamento para o mesmo CTF. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos em diferentes ensaios, quando células BHK-21 foram cultivadas em meio suplementado com diferentes amostras de CTF, sendo uma delas de qualidade comprovada (CTF-Difco) e outra reprovada (CTF-F01).

Tabela 5 - Resultados de eficiência de plaqueamento (E.P)para células BHK-21 em diferentes ensaios . Células cultivadas em meio MEM + 8% SB + 10% CTF (Difco ou F01).

Ensaio	E.P.(%)		
	CTF - Difco	CTF-F01	Difco/F01
A	4,9	0,4	12,3
B	36,7	5,2	7,1
C	9,8	3,0	3,3
D	42,8	0,9	47,6
E	3,7	1,4	2,6
F	25,8	8,6	3,0
G	11,7	0,2	58,5
H	7,5	0,0	—
$\bar{X}$	17,86	2,46	
s	15,21	3,03	

Nota-se que o CTF-Difco esteve sempre melhor que CTF-F01, sendo que este último chegou a apresentar resultados nulos ou quase nulos. Pode-se verificar porém que os valores de eficiência de plaqueamento para um mesmo CTF são muito variáveis de um ensaio para outro. Além disso, a razão entre CTF-Difco e CTF-F01 também foi muito variável.

A densidade celular inicial no plaqueamento e o estado fisiológico da cultura original a partir da qual é preparada a suspensão de plaqueamento são as principais responsáveis por essa variabilidade. É muito importante que a cultura original esteja em condições ótimas : fase exponencial, meio não exaurido e pH não muito ácido nem muito alcalino, para garantir melhor viabilidade das células. A suspensão de células deve ser homogênea, com um número reduzido de células para permitir que cada célula fique totalmente isolada da outra impedindo a ocorrência de "cross-feeding" (uma célula complementando as carências das outras) e "condicionamento do meio" (acúmulo de substâncias secretadas pelas células propiciando o crescimento das mesmas) (ARMELIN, 1986).

Apesar da medida da eficiência de plaqueamento ser o melhor e mais rigoroso indicador de viabilidade celular, a grande variabilidade de resultados inviabilizou a sua utilização na avaliação da atividade estimulatória do crescimento celular de CTF ou outros suplementos. Daí passar-se a utilizar curvas de crescimento para avaliar a atividade mitogênica dos diversos componentes do meio na promoção do crescimento de células BHK-21.

4.1.2. Curvas de crescimento

Células BHK-21 foram submetidas a ensaios de

determinação de T_D e D_S através de curvas de crescimento para verificar a importância do meio basal, do soro e de suplementos na sua proliferação.

As Figuras 1 e 2 e a Tabela 6 mostram a atividade estimulatória de CTF sobre o crescimento de células BHK-21 em diferentes meios : DME, MEM e MGM.

Na Figura 1 pode-se verificar que o meio MEM suplementado apenas com soro bovino não permite o crescimento de células BHK-21, sendo necessário suplementá-lo com CTF. A adição de CTF leva a uma redução do T_D para aproximadamente a metade (de 65 para 36 horas) e a um aumento dramático na D_S , conforme mostram os dados da Tabela 6. Ao contrário, o meio DME suplementado somente com SB favorece um crescimento razoável das células, sendo melhorado pela suplementação com CTF. Não ocorre muita diferença nos valores de T_D e D_S (Tabela 6). Esses resultados indicam que : a) o meio DME é melhor do que MEM; b) o CTF é um suplemento importante para a proliferação de células BHK sendo absolutamente essencial quando as células são mantidas em MEM + SB.

Figura 1 - Atividade estimulatória de CTF sobre crescimento de células BHK-21 em meios DME e MEM suplementados com SB. ○—○ MEM + 8% SB; ▲—▲ MEM + 8% SB + 10% CTF-Difco; △—△ DME + 8% SB; ●—● DME + 8% SB + 10% CTF-Difco.

Tabela 6 - Valores de T_D e D_S para células BHK-21 crescendo em meio mínimo + 8% SB + 10% CTF.

Meio de cultura	CTF	T_D (horas)	D_S (células/cm ² × 10 ⁵)
DME	—	30	2,2
	Difco	24	5,2
MEM	—	66	0,09
	Difco	36	3,1
MGM	—	∞	0,05
	Difco	15	2,2

Figura 2 - Atividade estimulatória de CTF sobre o crescimento de células BHK-21 em meios MEM e MGM suplementados com SB. X—X MGM + 8% SB; ●—● MGM + 8% SB + 10% CTF-Difco; ○—○ MEM + 8% SB; ▲—▲ MEM + 8% SB + 10% CTF-Difco.

Pelos resultados da Figura 2 e da Tabela 6 nota-se que os meios MEM e MGM são semelhantes, só promovendo o crescimento quando suplementados com soro e CTF. Na ausência de CTF as densidades máximas de crescimento atingidas foram muito baixas, inferiores a $0,1 \times 10^5$ células/cm² e os valores de T₀ muito elevados (66 horas para MEM) ou até nulos (em MGM não houve dobramento da população dentro de um período de 190 horas). A adição de CTF proporciona uma redução do T₀ (36 e 15 horas para MEM e MGM, respectivamente) e uma elevação na D_S para $3,1$ e $2,2 \times 10^5$ células/cm², respectivamente.

As Figuras 3, 4 e 5 e a Tabela 7 mostram o efeito dos soros bovino e fetal bovino e suas interações com os meios de cultura na promoção do crescimento de células BHK-21.

Figura 3 - Efeito de soros bovino e fetal bovino sobre o crescimento de células BHK-21 mantidas em meio DME suplementado com CTF-Difco. □—□ DME + 8% SFB; ■—■ DME + 8% SFB + 10% CTF-Difco; △—△ DME + 8% SB; ●—● DME + 8% SB + 10% CTF-Difco.

Para a proliferação de células BHK-21, o SFB é superior em relação ao SB e a combinação DME + SFB praticamente dispensa a adição de CTF, de acordo com a Figura 3. A resposta à adição de CTF é mais acentuada quando se usa SB, com aumento da D_S de $2,2 \times 10^5$ no DME + SB para $5,2 \times 10^5$ células/cm² no DME + SB + CTF (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores de T_D e D_S para células BHK-21 crescendo em meio mínimo + 8% soro + 10% CTF-Difco.

Meio de cultura	Soro	CTF	T_D (horas)	D_S (células/cm ² x 10 ⁵)
DME	SB	—	30	2,2
		Difco	24	5,2
	SFB	—	46	4,4
		Difco	30	6,4
MEM	SB	—	66	0,09
		Difco	36	3,1
	SFB	—	28	1,0
		Difco	26	5,1
MGM	SB	—	∞	0,05
		Difco	15	2,2
	SFB	—	36	1,0
		Difco	40	4,6

Os dados da Tabela 7 mostram que ocorre uma redução no T_D com a adição de CTF. Entretanto, era de se esperar que a associação DME e SFB resultasse em valores de T_D menores do que a combinação DME + SB, o que não aconteceu.

Figura 4 - Efeito de soros bovino e fetal bovino sobre o crescimento de células BHK-21 mantidas em meio MEM suplementado com CTF-Difco.
 ▽—▽ MEM + 8% SFB; ⊠—⊠ MEM + 8% SFB + 10% CTF-Difco; ○—○ MEM + 8% SB; ▲—▲ MEM + 8% SB + 10% CTF-Difco.

Figura 5 - Efeito de soros bovino e fetal bovino sobre o crescimento de células BHK-21 mantidas em meio MGM suplementado com CTF-Difco. ◊—◊ MGM + 8% SFB, ■—■ MGM + 8% SFB + 10% CTF-Difco, ×—× MGM + 8% SB, ●—● MGM + 8% SB + 10% CTF-Difco.

Analisando as Figuras 4 e 5 percebe-se que os meios MEM e MGM atuam de maneira similar na proliferação de células BHK-21. Suplementação tanto de MEM como de MGM apenas com SFB permite o crescimento de células BHK, mas a suplementação com SB apenas não é eficaz.

A adição de CTF propicia um grande efeito estimulatório do desenvolvimento celular, principalmente nas combinações de MEM ou MGM com SB. Os valores de T_D são inferiores no meio MEM, principalmente quando combinado com SFB. Grande redução de T_D e aumento de D_S ocorrem quando CTF é adicionado aos meios suplementados com SB (ver Tabela 7).

Figura 6 - Efeito da suplementação do meio DME com diferentes soros e CTFs na promoção de crescimento de células BHK-21. □—□ DME + 8% SFB; ◇—◇ DME + 8% SFB + 10% CTF-F209; ■—■ DME + 8% SFB + 10% CTF-Difco; △—△ DME + 8% SB; ▼—▼ DME + 8% SB + 10% CTF-F209; ●—● DME + 8% SB + 10% CTF-Difco.

Tabela 8 - Valores de T_D e D_S para células BHK-21 crescendo em meio mínimo + 8% soro + 10% CTF.

Meio de cultura	Soro	CTF	T_D (horas)	D_S (células/cm ² X 10 ⁵)
	SB	—	30	2,2
		Difco	24	5,2
		F-209	34	5,2
DME	SFB	—	46	4,4
		Difco	30	6,4
		F-209	24	6,4
	SB	—	66	0,09
		Difco	36	3,1
		F-209	24	5,4
MEM	SFB	—	28	1,0
		Difco	26	5,1
		F-209	18	6,4
	SB	—	∞	0,05
		Difco	15	2,2
		F-209	16	4,6
MGM	SFB	—	36	1,0
		Difco	40	4,6
		F-209	16	4,6

A suplementação do meio DME com SB ou SFB e diferentes amostras de CTF promove o crescimento de células BHK-21 de maneira semelhante, conforme mostra a Figura 6. Os valores obtidos de D_S foram semelhantes e os de T_D menores para CTF-Difco na combinação DME + SB e para CTF-F209 na DME + SFB, segundo os dados da Tabela 8.

É importante ressaltar que a formulação utilizada na indústria de produção de vacinas, por exemplo, é muito semelhante ao MEM (ou MGM) sendo DME economicamente inviável.

Ao analisar as Figuras 7 e 8 nota-se que nos meios MEM ou MGM suplementados com CTF células BHK crescem melhor na presença de SFB do que de SB independentemente da amostra de CTF usada. Estas mesmas amostras apresentam resultados diferentes quando se trabalha com SB, notando-se que o CTF-F209 é superior ao CTF-Difco na estimulação do crescimento das células, como pode ser verificado pelos resultados obtidos de D_S e T_D (Tabela 8).

Figura 7 - Efeito da suplementação do meio MEM com diferentes soros e CTFs na promoção de crescimento de células BHK-21. ∇ — ∇ MEM + 8% SFB; +—+ MEM + 8% SFB + 10% CTF-F209; $\boxtimes$ — $\boxtimes$ MEM + 8% SFB + 10% CTF-Difco; $\circ$ — $\circ$ MEM + 8% SB; $\diamond$ — $\diamond$ MEM + 8% SB + 10% CTF-F209; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ MEM + 8% SB + 10% CTF-Difco.

Figura 8 - Efeito da suplementação do meio MGM com diferentes soros e CTFs na promoção de crescimento de células BHK-21. ◇—◇ MGM + 8% SFB; ○—○ MGM + 8% SFB + 10% CTF-F-209; ■—■ MGM + 8% SFB + 10% CTF-Difco; ×—× MGM + 8% SB; △—△ MGM + 8% SB + 10% CTF - F-209; ●—● MGM + 8% SB + 10% CTF-Difco.

Os resultados apresentados até aqui mostram que o meio DME, sobretudo quando combinado com SFB, não é adequado para avaliar a capacidade promotora de crescimento de CTF ou outros aditivos porque o crescimento basal é alto mascarando, assim, o efeito dos suplementos. O mesmo não ocorre com MEM ou MGM, pois estes dois meios permitem avaliar a ação do CTF e detectar diferenças entre as diversas amostras do produto (conforme mostra a Figura 9).

Entretanto, ao analisar as amostras de CTF-F01 e PP070 nos meios MEM e MGM suplementados com SB, pode-se verificar que o meio MGM é mais eficiente na avaliação da atividade estimulatória do CTF (Figura 9). No meio MEM a estimulação da proliferação celular é semelhante para as amostras de CTF-PP70 e Difco, que apresentam valores bem próximos para T_D e D_S , contrastando com o CTF-F01 que é bem inferior e mostra um T_D muito elevado e uma D_S baixíssima (ver Tabela 9). Já no MGM pode-se realmente perceber as variações existentes entre essas amostras: a inibição do crescimento celular pelas amostras de CTF-F01 e PP70 ($T_D = \infty$ e D_S inferiores a $0,01 \times 10^5$ células/cm²) opõe-se à atividade estimulatória do CTF-Difco ($T_D = 10$ horas e $D_S = 0,8 \times 10^5$ células/cm²) como mostram os dados da Tabela 9.

Figura 9 - Efeito dos meios MEM e MGM na avaliação da atividade mitogênica de diferentes amostras de CTF na promoção do crescimento de células BHK-21. X—X MGM + 8% SB; ●—● MGM + 8% SB + 10% CTF-F01; ◻—◻ MGM + 8% SB + 10% CTF-PP70; ●—● MGM + 8% SB + 10% CTF-Difco; ○—○ MEM + 8% SB; △—△ MEM + 8% SB + 10% CTF-F01; ◆—◆ MEM + 8% SB + 10% CTF-PP70; ▲—▲ MEM + 8% SB + 10% CTF-Difco.

Tabela 9 - Valores de T_D e D_S para células BHK-21 crescendo em meio mínimo + 8% SB + 10% CTF.

Meio de cultura	CTF	T_D (horas)	D_S (células/cm ² x 10 ⁵)
MEM	—	∞	0,086
	F01	64	0,180
	PP70	10	2,300
	Difco	10	3,400
MGM	—	∞	0,019
	F01	∞	0,015
	PP70	∞	0,029
	Difco	12	0,800

Portanto, a determinação de T_D e D_S através de curvas de crescimento em meio MGM suplementado com 8% de SB e 10% CTF mostrou-se um método bastante eficaz para ensaiar a capacidade promotora de crescimento de CTF. Tornou-se necessário, porém, verificar se os resultados obtidos em monocamada eram aplicáveis também a células crescendo em suspensão líquida (como são as culturas utilizadas na produção de vacinas, por exemplo).

4.2. Análise do crescimento de células BHK-21 em suspensão líquida

4.2.1. Escala laboratorial

Células BHK-21 foram submetidas a crescimento em suspensão líquida em frascos tipo "spinner", em condições (meio, soro, inóculo de células, etc) que mimetizam aquelas utilizadas na indústria, conforme descrito no item 3.6.1 de Material e Métodos. Os resultados obtidos com o meio MGM suplementado com SB e CTF encontram-se na Figura 10.

Figura 10 - Crescimento de células BHK-21 em suspensão líquida (escala de laboratório) em meio MGM suplementado com 8% SB + 10% CTF. MGM + SB; MGM + SB + CTF-F209; MGM + SB + CTF-Difco.

Nota-se que o meio MGM suplementado apenas com SB não permite o crescimento das células e que o CTF F-209 é melhor que o CTF Difco. Aqui também está evidenciado que o CTF é um suplemento importante e que as diferenças entre as amostras de CTF também são detectadas nas culturas líquidas.

4.2.2. Escala industrial

Células BHK-21 foram submetidas a crescimento em suspensão líquida em escala industrial conforme descrito em Material e Métodos (ítem 3.6.2). Os resultados obtidos en contram-se nas Figuras 11 e 12.

A Figura 11 mostra o crescimento de células BHK em meio MGM suplementado com SB e CTF. Pode-se verificar o efeito inibidor do CTF-F01 sobre o crescimento de células BHK em oposição à atividade promotora de crescimento do CTF-Difco e, numa proporção bem menor, à do CTF-PP70.

Figura 11 - Crescimento de células BHK-21 em suspensão líquida (escala industrial) em meio MGM suplementado com 8% SB + 10% CTF. CTF-Difco; CTF-PP70; CTF-F01.

Na Figura 12 pode-se comparar o crescimento de células BHK-21 em meio MGM suplementado com SB e diferentes CTFs. Nota-se que o CTF-F209 é mais eficiente na promoção do crescimento celular do que o CTF-Difco.

Figura 12 - Crescimento de células BHK-21 em suspensão líquida (escala industrial) em meio MGM suplementado com 8% SB + 10% CTF. CTF-Difco; CTF-F-209.

Os resultados obtidos com células crescendo em suspensão líquida reforçam aqueles do cultivo em monocamada: a) importância da suplementação com CTF na proliferação de células BHK-21 e b) possibilidade de avaliação analítica da qualidade do suplemento.

4.3. Análise comparativa dos métodos de cultivo

As Figuras 13, 14 e 15 apresentam os resultados de um ensaio comparativo dos métodos de cultivo em monocamada e em suspensão líquida. Neste ensaio procurou-se usar a mesma partida de meio MGM suplementado com SB para testar duas amostras de CTF e também o efeito da suplementação adicional com hidrolisado de lactoalbumina (HL).

Pelo ensaio em monocamada nota-se que o CTF-F209 é melhor promotor da proliferação de células BHK do que o CTF-Merck (Figura 13) atingindo D_S de 8,3 e $4,5 \times 10^5$ células/cm², respectivamente. A suplementação do meio MGM + SB + CTF-F209 com hidrolisado de lactoalbumina, não melhorou o crescimento das células ($T_D = 20$ horas e $D_S = 5,2 \times 10^5$ células/cm²) como mostram os dados da Tabela 10.

Figura 13 - Curvas de crescimento (monocamada) para células BHK-21 mantidas em meio MGM suplementado com 8% SB + 10% CTF e 10% HL. Δ - Δ CTF-F-209; $\blacksquare$ - $\blacksquare$ CTF-F-209 + HL; $\odot$ - $\odot$ CTF-Merck.

Tabela 10 - Valores de T_D e D_S para células BHK-21 crescendo em meio MGM + 8% SB + 10% CTF, suplementado ou não com 10% HL.

CTF	Suplemento	T_D (horas)	D_S (células/cm ² x 10 ⁵)
	—	24	6,3
F-209	HL	20	5,2
Merck	—	24	4,5

Figura 14 - Crescimento de células BHK-21 em suspensão líquida (escala de laboratório) em meio MGM + 8% SB + 10% CTF suplementado ou não com 10% HL. CTF-Merck; . . . CTF-F209; / / / CTF-F209 + HL.

Os resultados obtidos com o cultivo em suspensão líquida em escala de laboratório (Figura 14) são semelhantes aos de monocamada (Figura 13) ou seja : o CTF-F-209 foi superior em relação ao CTF-Merck e a suplementação com hidrolí-

sado de lactoalbumina não teve efeito significativo.

Figura 15 - Crescimento de células BHK-21 em suspensão líquida (escala industrial) em meio MGM + 8% SB + 10% CTF suplementado ou não com 10% HL. CTF-Merck; CTF-F 209; CTF-F 209 + HL.

Células BHK crescendo em suspensão líquida (escala industrial) praticamente não responderam à suplementação adicional com hidrolisado de lactoalbumina (Figura 15). Tanto meio suplementado apenas com SB + CTF quanto o meio com SB + CTF + HL têm o mesmo efeito na promoção do crescimento dessas células. Além disso, o CTF-Merck não estimula a proliferação das células como o CTF-F 209 (Figura 15). Esses resultados confirmam os anteriores (Figuras 13 e 14) demonstrando que é possível testar os suplementos de meios de cultura em escala de laboratório, com tremenda economia. Na execução do ensaio em monocamada (curva de crescimento) são consumidos apenas 100 ml do meio mínimo, 8 ml soro bovino e 0,3 g de CTF, enquanto que para o teste em escala industrial seriam necessários 5000 ml do meio mínimo, 400 ml soro bovino e 15,0 g de CTF.

5. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões :

1. Diferentes meios de cultura e soros apresentam diferentes níveis de atividade mitogênica, ou seja, promotora de crescimento de células BHK, sendo que DME suplementado com SFB representa a melhor condição para manutenção dessas células. Entretanto, DME e SFB não são economicamente viáveis na indústria, daí a necessidade de usar formulações semelhantes a MEM e MGM além de substituir SFB por SB e de introduzir um suplemento adicional (CTF).
2. CTF é um suplemento extremamente importante para a proliferação de células BHK-21 principalmente quando o meio basal for menos rico (MEM, MGM) e o soro for bovino (e não fetal bovino).

3. O ensaio de eficiência de plaqueamento, o primeiro ataque experimental adotado, não funcionou adequadamente para avaliar a atividade estimulatória do crescimento celular de CTF ou outros suplementos.
4. Meios de cultura e suplementos usados na produção industrial de vacinas podem ser testados em escala de laboratório pela determinação de T_D e D_S através de curvas de crescimento em monocamada. Esse procedimento mostrou ser simples, de fácil execução, baixo custo e, acima de tudo, capaz de mimetizar as condições industriais, reproduzindo, com excelente aproximação, os resultados obtidos na indústria.
5. A determinação de T_D e D_S através de curvas de crescimento em meio MGM suplementado com 8% SB e 10% CTF mostrou-se um método bastante eficaz para o controle de qualidade dos suplementos de meios de cultura como CTF. Além de permitir o estudo dos fatores promotores de crescimento, esta metodologia oferece perspectivas concretas no sentido da eliminação do soro no cultivo das células BHK-21, tão importantes na produção de vacinas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARATHOON, W.R. e J.R.BIRCH, 1986.Large-scale cell culture in biotechnology.Science, 232:1390-1395.

ARMELIN, H.A., 1973.Pituitary extracts and steroids hormones in the control of 3T3 cell growth,Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 70:2702-2706.

ARMELIN, H.A., 1975.Hormones and regulation of cell division: mammalian cell cultures as an experimental approach. In: LITWACK, G., Ed,Biochemical Actions of Hormones.New York, Academic Press, Vol.3, p.1-21.

ARMELIN, M.C.S., 1986.Biologia Molecular da Transformação Maligna. São Paulo, USP, Departamento de Bioquímica, 79 p.

BARNES, D. e G.SATO, 1980.Methods for growth of cultured cells in serum-free medium.Analytical Biochemistry, 102:255-270.

BERMAN, P.W., T.GREGORY, D.CRASE e L.A.LASKY, 1985. Protection from genital herpes simplex virus type 2 infection by vaccination with cloned type 1 glycoprotein D.Science,277: 1490-1492.

BETTGER, W.J., S.T.BOYCE, B.J.WALTHALL e R.G.HAM, 1981.Rapid clonal growth and serial passage of human diploid fibroblasts in a lipid-enriched synthetic medium supplemented with epidermal growth factor, insulin and dexamethasone. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA),78: 5588-5592.

BIRCH, J.R., P.W.THOMPSON, K.LAMBERT e R.BORASTON, 1985. The large-scale cultivation of hybridoma cells producing monoclonal antibodies.In:FEDER. J. e W.R.TOLBERT, Ed.Large-Scale Mammalian Cell Culture. Orlando, Academic Press, p.1-16.

BOTTENSTEIN, J.E., 1983.Defined media and studies of growth factors.In:GUROFF, G., Ed.Growth & Maturation Factors .New York, John Wiley & Sons, vol.1, p.249-266.

BOTTENSTEIN, J.E. e G.H.SATO, 1979.Growth of rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 76:514-517

BOTTENSTEIN, J.E. e G.H.SATO, 1980.Fibronectin and polylysine requirement for proliferation of neuroblastoma cells in defined medium.Experimental Cell Research, 129:361-366.

BOTTENSTEIN, J., I.HAYASHI, S.HUTCHINGS, H.MASUI, J.MATHER, D.B,McCLURE, S.OHASA, A.RIZZINO, G.SATO, G. SERRERO, R.WOLFE e R.WU, 1979.The growth of cells in serum-free hormone supplemented media.In:JAKOBY, W.B. e I.H.PASTAN, Ed. Methods in Enzymology.New York, Academic Press, vol.58, p.94-109.

BURROWS, M.T., 1910.The cultivation of tissues of the chick embryo outside the body.Journal American Medical Association, 55:2057-2058.

BUYNACK, E.B. e M.R.HILLEMANN, 1966.Live attenuated mumps virus vaccine. 1-Vaccine development.Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 123:768-774.

BUYNACK, E.B., M.R.HILLEMANN, R.E.WEIBEL e J.STOKES, 1968 .Live attenuated rubella virus vaccines prepared from duck embryo cell culture.Journal American Medical Association, 204:103-108.

CAPSTICK, P.B., A.J.GARLAND, R.C.MASTERS e W.G.CHAPMAN, 1966. Some functional and morphological alterations occurring during and after the adaptation of BHK-21 clone 13 cells to suspension culture.Experimental Cell Research, 44:119-128.

CAPSTICK, P.B., R.C.TELLING, W.G.CHAPMAN e D.L.STEWART, 1962. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease.Nature, 195:1163-1166.

CARREL, A., 1913.Artificial activation of the growth "in vitro" of connective tissues.The Journal of Experimental Medicine, 17:14-19.

CARREL, A., 1923.A method for the physiological study of tissues in vitro.The Journal of Experimental Medicine, 38:407-418.

CARREL, A.e M.T.BURROWS, 1910.Cultivation of adult tissues and organs outside of the body.Journal American Medical Association, 55:1379-1381.

CARTWRIGHT, S.F., T.W.F.PAY e W.M.HENDERSON, 1957. Multiplication of the virus of foot-and-mouth disease in culture. Journal of General Microbiology, 16:730-748.

CARTWRIGHT, T., 1987. Isolation and purification of products from animal cells. Trends in Biotechnology, 5:25-30.

CASTRO, M.P., 1964. Comportamento do vírus aftoso em cultura de células: susceptibilidade da linhagem de células suínas IB-RS-2. Arquivos do Instituto Biológico, 31:63-78.

CHERINGTON, P.V., 1984. Regulation of fibroblast growth by multiple growth factors in serum-free media. In : MATHER, J.P., Ed. Mammalian cell culture. The use of serum-free hormone-supplemented media. New York, Plenum Press, p.17-52.

COHEN, S., 1962. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. The Journal of Biological Chemistry, 237: 1555-1562.

CORIELL, L.L., 1973. Detection, elimination and prevention of bacteria and fungi in tissue cultures. In: KRUSE, JR., P.F. e M.K.PATTERSON, JR., Ed. Tissue Culture : Methods and Applications. New York, Academic Press, p.718-721.

DOEL, T.R., 1985. Prospects for improved foot and mouth disease vaccines. Vaccine, 3:35-36.

DULAK, N.C. e H.M. TEMIN, 1973. A partially purified polypeptide fraction from rat liver cell conditioned medium with multiplication-stimulating activity from embryo fibroblasts. Journal of Cellular Physiology, 81:153-160.

DULBECCO, R., 1952. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 38:747-752

DULBECCO, R. e G. FREEMAN, 1959. Plaque production by the polyoma virus. Virology, 8:396-397.

EAGLE, H., 1955a. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science, 122:501-504.

EAGLE, H., 1955b. The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (strain HeLa) in tissue culture. The Journal of Experimental Medicine, 102:37-48.

EAGLE, H., 1959. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science, 130:432-437.

EAGLE, H., 1971. Buffer combinations for mammalian cell culture.
Science, 174:500-503.

EAGLE, H., 1973. The effect of environmental pH on the growth
of normal and malignant cells. Journal of Cellular
Physiology, 82:1-8.

EAGLE, H., V.I.OYAMA, M.LEVY e A.E.FREEMAN, 1957. myo-Inositol
as an essential growth factor for normal and malignant
human cells in tissue culture. The Journal of Biological
Chemistry, 226:191-206.

EBELING, A.H., 1913. The permanent life of connective tissue
outside of the organism. The Journal of Experimental Medicine,
17:273-285.

ENDERS, J.F., T.H.WELLER e F.C.ROBBINS, 1949. Cultivation of
the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of
various human embryonic tissues. Science, 109:85-87.

FISHER, H.W., T.T.PUCK e G.SATO, 1958. Molecular growth requirements
of single mammalian cells: The action of fetuin in promoting
cell attachment to glass. Proceedings of the National
Academy of Sciences (USA), 44:4-10.

FRENKEL, H.S., 1947. La culture du virus de la fièvre aphteuse sur l'épithélium de la langue des bovidés. Bulletin/Office International des Epizooties, 28:155-162.

FROESCH, E.R., J.ZAPF, E.RINDERKNECHT, B.MORELL, E.SCHOENLE e R.E.HUMBEL, 1979. Insulinlike growth factor (IGF-NSILA): structure, function and physiology. In: SATO, G.H. e R.ROSS, Ed. Hormones and Cell Culture. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol.6, p.61-77.

GEY, G.O., 1933. An improved technique for massive tissue culture. American Journal Cancer, 17:752-756.

GOSPODAROWICZ, D., 1974. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. Nature, 249:123-127.

GOSPODAROWICZ, D., K.L.JONES e G.H.SATO, 1974. Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 71:2295-2299.

GRIFFITHS, J.B., 1985a. Cell biology: experimental aspects. In: SPIER, R.E. e J.B.GRIFFITHS, Ed. Animal Cell Biotechnology. Orlando, Academic Press, vol.1, p.49-83.

GRIFFITHS, J.B., 1985b. Cell products : an overview. In: SPIER, R.E. e J.B. GRIFFITHS, Ed. Animal Cell Biotechnology. Orlando, Academic Press, vol.2, p.3-12.

GRIFFITHS, J.B. 1986a. Can cell culture medium costs be reduced ? Strategies and possibilities. Trends in Biotechnology, 4: 268-272.

GRIFFITHS, J.B., 1986b. Scaling-up of animal cell cultures. In: FRESHNEY, R.I., Ed. Animal Cell Culture: A Practical Approach. Oxford, IRL Press, p.33-69.

GUILBERT, L.J. e N.N. ISCOVE, 1976. Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. Nature, 263:594-595.

HALL, K. e K. UTHNE, 1971. Some biological properties of purified sulfation factor (SF) from human plasma. Acta Medica Scandinavica, 190:137-143.

HAM, R.G., 1963. An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. Experimental Cell Research, 29:515-526.

HAM, R.G., 1965. Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 53:288-293.

HAM, R.G., 1982. Importance of the basal nutrient medium in the design of hormonally defined media. In: SATO, G.H., A.B. PARDEE e D.A. SIRBASKU, Ed. Growth of Cells in Hormonally Defined Media. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol.9, p.27-35.

HAM, R.G. e W.L. McKEEHAN, 1979. Media and growth requirements. In: JACOBY, W.B. e I.H. PASTAN, Ed. Methods in Enzymology. New York, Academic Press, vol.58, p.44-93.

HARRIS, H. e J.F. WATKINS, 1965. Hybrid cells derived from mouse and man: Artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. Nature, 205:640-646.

HARRISON, R.G., 1907. Observations on the living developing nerve fibre. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 4:140-143.

HAYASHI, I. e G. SATO, 1976. Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. Nature, 259:132-134.

HAYASHI, I., J. LARNER e G. SATO, 1978. Hormonal growth control of cells in culture. In Vitro, 14:23-30.

HAYFLICK, L., 1973. Screening tissue cultures for mycoplasma infections. In: KRUSE, JR., P.F. e M.K. PATTERSON, JR., Ed. Tissue Culture : Methods and Applications. New York, Academic Press, p.722-728.

HIGUCHI, K., 1973. Cultivation of animal cells in chemically defined media, a review. Advances in Applied Microbiology, 16:111-136.

HILLEMAN, M.R., 1958. Efficacy of and indications for the use of adenovirus vaccine. American Journal Public Health, 48: 153-158.

HILLEMAN, M.R., E.B. BUYNACK, R.E. WEIBEL, J. STOKES, J.E. WHITMAN e M.B. LEAGUS, 1968. Development and evaluation of the Moraten measles virus vaccine. Journal American Medical Association, 206:587-589.

HOLLEY, R.W., 1974. Serum factors and growth control. In: CLARKSON, B. e R. BASERGA, Ed. Control of Proliferation in Animal Cells. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol.1, p.13-18.

HOLLEY, R.W. e J.A. KIERNAN, 1974. Control of the initiation of DNA synthesis in 3T3 cells: low-molecular-weight nutrients. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 71:2942 - 2945 .

HOLMES, R., 1967. Preparation from human serum of an alpha-one protein which induces the immediate growth of unadapted cells in vitro. The Journal of Cell Biology, 32:297-308.

HÖÖK, M., K. RUBIN, A. OLDBERG, B. ÖBRINK e A. VAHERI, 1977. Cold-insoluble globulin mediates the adhesion of rat liver cells to plastic petri dishes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 79:726-733.

HUTCHINGS, S.E. e G.H. SATO, 1978. Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 75:901-904.

ISCOVE, N.N. e F. MELCHERS, 1978. Complete replacement of serum by albumin, transferrin and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes. The Journal of Experimental Medicine, 147:923-933.

JARVIS, A.P. e T.A. GRDINA, 1983. Production of biologicals from microencapsulated living cells. Biotechniques, 1:22-27.

KARKARE, S.B., P.G.PHILLIPS, D.H.BURKE e R.C.DEAN, JR., 1985.

Continuous production of monoclonal antibodies by chemostatic and immobilized hybridoma culture. In : FEDER, J. e W.R.TOLBERT, Ed. Large-Scale Mammalian Cell Culture. Orlando, Academic Press, p.127-149.

KATSUTA, H. e T.TAKAOKA, 1973. Cultivation of cells in protein and lipid-free synthetic media. In: PRESCOTT, D.M., Ed. Methods in Cell Biology. New York, Academic Press, vol.6, p.1-42.

KEAY, L., 1975. Autoclavable low cost serum-free cell culture media. The growth of L cells and BHK cells on peptones. Biotechnology Bioengineering, 17:745-764.

KNAZEK, R.A., P.M.GUILLINO, P.O.KOHLER e R.L.DEDRICK, 1972. Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth in vitro. Science, 178:65-66.

KOHLER, G e C.MILSTEIN, 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256:495-497.

KOHLER, N. e A.LIPTON, 1974. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. Experimental Cell Research, 87: 297-301.

KU, K., M.J.KUO, J.DELENTE, B.S.WILDE e J.FEDER , 1981. Development of a hollow-fibre system for large scale culture of mammalian cells.Biotechnology Bioengineering, 23:79-95.

LAMBERT, K.J. e J.R.BIRCH, 1985.Cell growth media. In:SPIER, R.E. e J.B.GRIFFITHS, Ed.Animal Cell Biotechnology.Orlando, Academic Press, vol.1, p.85-122.

LEOF, E.B., W.WHARTON, J.J.VAN WYCK e W.J.PLEDGER, 1982.Epidermal growth factor (EGF) and somatomedin C regulate G₁ progression in competent BALB/c-3T3 cells.Experimental Cell Research, 141:107-115.

LEVI-MONTALCINI, R. e P.U.ANGELETTI, 1968,Nerve growth factor.Physiological Reviews, 48:534-550

LEWIS, W.H. e M.R.LEWIS, 1912.The cultivation of chick tissues in media of known chemical constitution,The Anatomical Record, 6:207-211.

LYNN, J.D. e R.T.ACTON, 1974.Design of a large-scale mammalian cell, suspension culture facility.Biotechnology Bioengineering, 17:659-673.

MACIAG, T., B.KELLY, J.CERUNDOLO, S.ILSLEY, P.R.KELLEY, J. GAUDREAU e R.FORAND, 1980.Hormonal requirements of baby hamster kidney cells in culture.Cell Biology International Reports, 4:43-50.

MACPHERSON, I., 1963.Characteristics of a hamster cell clone transformed by polyoma virus.Journal of National Cancer Institute, 30:795-815.

MACPHERSON, I. e M.STOKER, 1962.Polyoma transformation of hamster cell clones-an investigation of genetic factors affecting cell competence.Virology, 16:147-151.

MAITLAND, H.B. e M.C.MAITLAND, 1928.Cultivation of vaccinia virus without tissue culture.Lancet, 215:596-597.

MANUAL GIBCO (Grand Island Biological Company), 1974.Madison.

MATHER, J.P. e G.H.SATO, 1978.Hormones and growth factors in cell culture: problems and perspectives.In: FEDEROFF, S. e L.HERTZ, Ed. Cell, tissue and organ cultures in neurobiology. New York, Academic Press, p.619-630.

MATHER, J.P. e G.H.SATO, 1979.The growth of mouse melanoma cells in hormone-supplemented serum-free medium.Experimental Cell Research, 120:191-200.

McGARRITY, G.J., 1979.Detection of contamination.In: JACOBY, W.B. e I.H.PASTAN, Ed.Methods in Enzymology. New York, Academic Press, vol.58, p.18-28.

McKEEHAN, W.L., K.A.McKEEHAN, S.L.HAMMOND e R.G.HAM, 1977. Improved medium for clonal growth of human diploid fibroblasts at low concentrations of serum protein.In Vitro ,13:399-416.

McLIMANS, W.F., 1979.Mass culture of mammalian cells. In: JACOBY, W.B. e I.H.PASTAN,Ed.Methods in Enzymology. New York, Academic Press, vol.58, p.194-211.

MEDAWAR, P.B., 1941.Sheets of pure epithelium from human skin.Nature,148:783.

MEIGNIER, B.,1979.Cell culture on beads used for the industrial production of foot-and-mouth disease virus. Developments of Biological Standardization, 42:141-145.

MEIGNIER; B., A.MANGEOT, H.FAVRE, 1981.Foot and mouth disease virus production on microcarrier grown cells. Developments of Biological Standardization, 46:249-256.

MIZRAHI, A., 1977.Primatone RL in mammalian cell culture media.Biotechnology Bioengineering, 19:1557-1561.

MIZRAHI, A., 1986a. Production of biologicals from animal cells - an overview. Process Biochemistry, 21:108-112.

MIZRAHI, A., 1986b. Biologicals from animal cells in culture. Biotechnology, 4:123-127.

MIZRAHI, A. e A. AVIHOO, 1976. A simple and cheap medium for BHK cells in suspended cultures. Journal of Biological Standardization, 4:51-56.

MORGAN, J.F., H.J. MORTON e R.C. PARKER, 1950. Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 73:1-8.

MORTON, H.J. e J.F. MORGAN, 1973. Sample preparations of media. A. Vertebrate Cells. In: KRUSE, JR., P.F. e M.K. PATTERSON, JR., Ed. Tissue Culture: Methods and Applications. New York, Academic Press, p.686-692.

MOSCONA, H. e A. MOSCONA, 1952. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. Journal of Anatomy, 86:287.

MOWATT, G.W. e W.G. CHAPMAN, 1962. Growth of foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster kidneys. Nature, 194:253-255.

OKADA, Y. e F.MURAYAMA, 1965.Multinucleated giant cell formation by fusion between cells of two different strains. Experimental Cell Research, 40:154-158.

PARKER, F.JR. e R.N.NYE, 1925.Studies on filterable viruses. I.Cultivation of vaccine virus.American Journal of Pathology, 1:325-335.

PATTERSON, M.K.JR., 1979.Measurement of growth and viability of cells in culture.In: JACOBY, W.B. e I.H.PASTAN,Ed. Methods in Enzymology.New York, Academic Press, vol.58, p.141-152.

PATTY, R.E., H.L.BACHRACH e W.R.HESS, 1960.Growth of foot-and-mouth disease virus in bovine kidney cell suspensions. American Journal in Veterinary Research, 21:144-149.

PHILLIPS, A.W., G.D.BALL, K.H.FANTES, N.B.FINTER e M.D.JOHNSTON, 1985.Experience in the cultivation of mammalian cells on the 8000 l scale.In:FEDER, J. e W.R.TOLBERT, Ed. Large-Scale Mammalian Cell Culture.Orlando, Academic Press,p.87-95.

PLEDGER, R.A., 1961.Formation and release of foot-and-mouth disease virus from bovine calf kidney cell cultures. Virology, 13:365-367.

PLEDGER, W.J., C.D.STILES, H.N.ANTONIADES e C.D.SCHER, 1977.

Induction of DNA synthesis in Balb/c-3T3 cells by serum components : reevaluation of the commitment process.Proceedings of the National Academy of Sciences(USA), 74:4481-4485.

PUCK, T.T. e P.I.MARCUS, 1955.A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture:the use of x-irradiated cells to supply conditioning factors.Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 41: 432-437.

PUMPER, R.W., 1973.Purification and standardization of water for tissue culture.In:KRUSE, JR., P.F. e M,K.PATTERSON,JR., Ed.Tissue Culture:Methods and Applications.New York, Academic Press, p.674-677.

RADLETT,P.J., R.C.TELLING, C.J.STONE e J.P.WHITESIDE , 1971.
Improvements in the growth of BHK-21 cells in submerged culture.Applied Microbiology, 22:534-537.

RADLETT, P.J., R.C.TELLING, J.P.WHITESIDE e M.A.MASKELL,1972.
The supply of oxygen to submerged cultures of BHK-21 cells.
Biotechnology Bioengineering, 14:437-445.

RATAFIA, M., 1987a. Issues in mammalian cell culture production.
Pharmaceutical Technology, 11:48-56.

RATAFIA, M., 1987b. Mammalian cell culture: worldwide activities
and markets. Biotechnology, 5:692-694.

RINALDINI, L.M., 1954. A quantitative method for growing animal
cells in vitro. Nature, 173:1134-1135.

RINDERKNECHT, E. e R.E. HUMBEL, 1976. Polypeptides with non-
suppressible insulin-like and cell-growth promoting activities
in human serum: isolation, chemical characterization and
some biological properties of forms I and II. Proceedings
of the National Academy of Sciences (USA), 73:2365-2369.

RIZZINO, A., H. RIZZINO e G. SATO, 1979. Defined media and the
determination of nutritional and hormonal requirements of
mammalian cells in culture. Nutrition Reviews, 37: 369-378.

ROCKWELL, G.A., G.H. SATO e D.B. McCLURE, 1980. The growth
requirements of SV40 virus-transformed Balb/c-3T3 cells in
serum-free monolayer culture. Journal of Cellular Physiology,
103:323-331.

ROSS, R., J.GLOMSET, B.KARIYA e L.HARKER, 1974. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro.Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 71:1207-1210.

ROUS, P. e F.S.JONES, 1916. A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues for the plating out of individual cells.The Journal of Experimental Medicine, 23:549-555.

RUDLAND, P.S., H.DURBIN, D.CLINGAN e L.JIMENEZ DE ASUA, 1977. Iron salts and transferrin are specifically required for cell division of cultured 3T3 cells.Biochemical and Biophysical Research Communications, 75:556-562.

SANFORD, K.K., W.R.EARLE e G.D.LIKELY, 1948. The growth " in vitro " of single isolated tissue cells.Journal of the National Cancer Institute, 9:229-246.

SATO, G., 1975. The role of serum in cell culture. In: LITWAK, G., Ed. Biochemical Action of Hormones. New York, Academic Press, vol.3, p.391-396.

SCHEIRER, W., 1987. Laboratory management of animal cell culture processes.Trends in Biotechnology, 5:261-265.

SCHERER, W.F., J.T.SYVERTON e G.O.GEY, 1953.Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. VI - Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix.The Journal of Experimental Medicine, 97:695-710.

SELLERS, R.F., 1955.Growth and titration of the viruses of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis in kidney monolayer tissue cultures. Nature, 176:547-549.

SHIPLEY, G.D. e R.G.HAM, 1983.Multiplication of Swiss 3T3 cells in a serum-free medium.Experimental Cell Research, 146:249-260.

SIMMS, H.S. e N.P.STILLMAN, 1937.Substances affecting adult tissue in vitro.I - The stimulating action of trypsin on fresh adult tissues.The Journal of General Physiology,20: 603-619.

SPIER, R.E., 1980.Recent developments in the large scale cultivation of animal cells in monolayers . Advances in Biochemical Engineering, 14:119-162.

SPIER, R.E., 1982.Animal cell technology ; an overview. Journal Chemical Technology Biotechnology, 23:304-312.

SPIER, R.E., 1983. Production of veterinary vaccines. In: MIZRAHI, A. e A.L.VAN WEZEL, Ed. Advances in Biotechnological Processes. New York, Alan R. Liss Inc., vol. 2, p.33-59.

SPIER, R., 1988. Animal cells in culture : moving into the exponential phase. Trends in Biotechnology, 6:2-6.

SPIER, R.E. e F.HORAUD, 1985. The biotechnological future of animal cells in culture. In: SPIER, R.E. e J.B.GRIFFITHS, Ed. Animal Cell Biotechnology. Orlando, Academic Press, vol.2, p.431-458.

SPIER, R.E. e J.P.WHITESIDE, 1976a. The production of foot and mouth disease virus from BHK 21 C13 cells grown on the surface of glass spheres. Biotechnology Bioengineering, 18:649-657.

SPIER, R.E. e J.P.WHITESIDE, 1976b. The production of foot-and mouth disease virus from BHK 21 C13 cells grown on the surface of DEAE-Sephadex A50 beads. Biotechnology Bioengineering, 18:659-667.

SPORN, M.B. e G.J.TODARO, 1980. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. The New England Journal of Medicine, 303:878-880.

STEINHARDT, E., C.ISRAELI e R.A.LAMBERT, 1913.Studies on the cultivation of the virus of vaccinia,The Journal of Infectious Diseases, 13:294-300.

STILES, C.D., G.T.CAPONE, H.N.ANTONIADES, J.J.VAN WYCK e W.J. PLEDGER, 1979.Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor.Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 76:1279-1283.

STOKER, M. e I.MACPHERSON, 1964.Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivatives. Nature, 203:1355-1357.

TELLING, R.C., 1969.Foot and mouth disease vaccine. Process Biochemistry, 4:49-52.

TELLING, R.C. e P.J.RADLETT, 1971.Large scale cultivation of mammalian cells.Advances in Applied Microbiology,13:91-119.

TELLING, R.C. e R.ELSWORTH, 1965.Submerged culture of hamster kidney cells in a stainless steel vessel. Biotechnology Bioengineering, 7:417-434.

TEMIN, H.M. e H.RUBIN, 1958.Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture.Virology, 6:669-688.

TOLBERT, W.R. e J.FEDER, 1983.Large scale cell culture technology.
Annual Reports on Fermentation Processes, 6:35-74.

TOMEI, L.D. e C.J.ISSEL, 1975.Growth and immunogenicity of
foot-and-mouth disease virus in baby hamster kidney cells
adapted to and continuously grown in a serum-free chemically
defined media.Biotechnology Bioengineering, 17:765-778.

VAN WEZEL, A.L. e C.A.M.VAN DER VELDEN-de GROOT, 1978. Large
scale cultivation of animal cells in microcarrier culture.
Process Biochemistry, 13:6-8.

VAN WYCK, J.J., K.HALL, J,L.VAN DER BRANDE e R.P.WEAVER,1971.
Further purification and characterization of sulfation factor
and thymidine factor from acromegalic plasma. Journal of
Clinical Endocrinology, 32:389-396.

WALTHALL, B.J. e R.G.HAM, 1981.Multiplication of human diploid
fibroblasts in a synthetic medium supplemented with EGF,
insulin and dexamethasone.Experimental Cell Research, 134:
303-311.

WAYMOUTH, C., 1973.Determination and survey of osmolality in
culture media.In:KRUSE, JR., P.F. e M.K.PATTERSON,JR., Ed.
Tissue Culture:Methods and Applications,New York, Academic
Press, p.703-709.

WHITE, P.R., 1946.Cultivation of animal tissues "in vitro" in nutrients of precisely known constitution .Growth,10:231-289.

WHITESIDE, J.P. e R.E.SPIER, 1981.The scale-up from 0,1 to 100 litres of a unit process system based on 3mm diameter glass spheres for the production of four strains of FMDV from BHK monolayer cells.Biotechnology Bioengineering, 23:551-565.

WOOD, W.I., D.J.CAPON, C.S.SIMONSEN, D.L.EATON, J.GITSCHIER, B.KEYT, P.H.SEEBURG, D.H.SMITH, P.HOLLINGSHEAD, K.L.WION; E.DELWART, E.G.D.TUDDENHAM, G.A.VEHAR e R.M.LAWN,1984.Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. Nature, 312:330-337.

WU, R. e G.H.SATO, 1978.Replacement of serum in cell culture by hormones : a study of hormonal regulation of cell growth and specific gene expression.Journal of Toxicology and Environmental Health, 4:427-448.

YAMADA, M. e K.OLDEN, 1978.Fibronectins - Adhesive glycoproteins of cell surface and blood.Nature, 275:179-184.

YOUNGER, J.,1954.Monolayer tissue cultures, 1 - Preparation and standardisation of suspension of trypsin-dispersed monkey Kidney cells.Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 85:202-205.

ZWERNER, R.K., R.M.COX, J.D.LYNN e R.T.ACTON, 1981, Five years perspective of the large-scale growth of mammalian cells in suspension culture. Biotechnology Bioengineering, 23: 2717-2735.