ADRIANA YURIE YOKOMIZO

**“OBTENÇÃO DE ANTÍGENO VIRAL A PARTIR DE
CULTURAS DE CÉLULAS *VERO* EM
MICROCARREGADORES POROSOS”**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós – Graduação Interunidades USP/IPT/
INSTITUTO BUTANTAN para obtenção
do título de Mestre

Área de concentração: Biotecnologia
Orientador: Dr. Carlos Augusto Pereira

São Paulo

2.001

**"As pessoas podem até entrar em
nossas vidas por acaso, mas não
é por acaso que elas permanecem."**

Lilian Tonet

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

Aos meus pais Takumi e Alice,
por possibilitarem a
realização dos meus objetivos.

Agradecimentos

Às minhas irmãs

Cristina, Silvia, Mari e Claudia,

e meus cunhados

Laerte e Ademo, pelo respeito ao meu trabalho.

Às minhas sobrinhas

Fernanda, Rafaela e Yuri, pelos momentos de
descontração e grandes alegrias.

Agradecimentos

Ao Dr. Carlos Augusto Pereira,
por acreditar na minha capacidade e
pessoa, pelo apoio e competente
orientação ao meu trabalho e pelo
profissionalismo e estímulo ao
conhecimento científico que levaram
ao desenvolvimento deste projeto.

Agradecimentos

À Dra. Hisako Gondo Higashi, Diretora do Instituto Butantan, pela autorização para realização deste trabalho.

À Dra. Cleide Aschenbrenner Consales, pelo incentivo ao início deste projeto.

À amiga e irmã “torta” Dra. Terezinha Regina Prupere Ogata, sempre apoiando, acreditando, incentivando e pela ajuda “técnica” e principalmente pessoal em todos os momentos.

À amiga Dra. Soraia Attie Calil Jorge, pela enorme colaboração, companheirismo, confiança, compreensão e toda boa energia que só uma boa “dupla” pode ter.

À Dra. Marta Maria Antoniazzi e Maria Helena Ferreira da Seção de Biologia Celular do Instituto Butantan, responsáveis pela realização da microscopia óptica e eletrônica de transmissão, pela orientação na exposição de resultados e paciência às minhas cobranças.

À Dra. Marcia Martins Marques Jaeger da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, por possibilitar a realização da microscopia eletrônica de varredura.

À Patrícia Leonel Galdino e Nilton Azambuja Júnior, pela execução da microscopia eletrônica de varredura e acima de tudo por aguentarem minhas “perseguições”.

Ao Dr. Maurício Wilson Suazo Soto, do laboratório de Biologia Celular do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela grande colaboração na realização das fotos de microscopia óptica.

Agradecimentos

Ao Dr. José Luiz Guerra, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, por permitir a utilização dos microscópios do departamento.

À Comissão de Pós Graduação do Programa Interunidades USP/IPT/Instituto Butantan, pela aprovação do meu projeto.

Ao corpo docente dos departamentos de Biotecnologia, Microbiologia e da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, do Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, que muito contribuíram na minha formação.

Ao Sr. Issao e Sr. Clodoaldo, secretários do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, pelos serviços prestados.

À Maria Lucia da Silva Gomes, pelo carinho desde o primeiro momento demonstrado e pronta colaboração sempre que necessária.

À Elizabeth Juliana Guiuro Valentini e Neuza Maria Frazatti Gallina, responsáveis pela Seção de Raiva do Instituto Butantan, pelo respeito profissional e contribuições prestadas.

Aos companheiros de trabalho Regina, Rosana, Elaine, Luci e Siqueira, que aceitaram minha dividida condição de funcionária e aluna.

À Iraci e Jovina pela contribuição com meus materiais e acima de tudo pelo carinho sempre demonstrado.

Agradecimentos

À amiga Ziva Maria dos Santos por tudo que treze anos de convívio possam significar.

Ao amigo Roberto Carlos dos Santos pela eficiente “assessoria técnica”, amizade e carinho.

À amiga Fernanda A. Barrence pelo companheirismo, colaborações, “dicas” de biologia celular, valorização do meu trabalho e longas horas de conversas que tornaram mais fáceis e agradáveis nossas viagens.

Aos amigos Janaina, Vânia, Valdelene, Graça e Rene que aguentaram meus altos e baixos nestes três anos.....ou mais!!

À amiga Caroline Maki Takahashi cuja fiel amizade superou contratempos e distância.

À amiga Mariana Toledo pela força, incentivo e companheirismo sempre demonstrados.

Às amigas Sara, Cristiane e Valéria pelo apoio, colaboração, respeito ao meu trabalho, carinho e acima de tudo pelos agradáveis bate papos e grandes momentos de descontração.

À todos que de alguma forma se fizeram presente neste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC = Coleção de culturas celulares americana (American Type Culture Collection)

ATV = Solução de Associação de Tripsina e Versene

BHK = Células de rim de hamster de um dia de idade (Baby Hamster Kidney Cells)

CCL = Certificado de linhagem celular (Certified Cell Line)

cél = célula

CHO = Células de ovário de hamster chinês (Chinese Ovary Hamster)

DEAE = Dietil aminoetil - dextrana

Eagle MEM = Meio mínimo essencial Eagle (Eagle Minimum Essential Medium)

EDTA = ácido etilenodiamino tetraacético

FFD₅₀ = Diluição na qual 50% dos campos observados ao microscópio contém um ou mais focos de células infectadas

g = grama

HMDS = Hexametildisilazane

L₁₅ = Meio de cultura Leibovitz

m = metro

mc = microcarregador

mg = miligrama

mL = mililitro

MOI = multiplicidade de infecção (Multiplicity of infection)

MTT = (3-(4,5-dimetil 2 tiazolil)-2,5 difenil-2H-tetrazoliobromuro)

µm = micrômetro

nº = número

nm = nanômetro

Lista de abreviaturas

PBS = Solução salina tamponada com fosfatos (Phosphate Buffer Saline)

PV/VERO = linhagem Pasteur do vírus rábico

RFFIT = Rápido teste de inibição de focos fluorescentes (Rapid fluorescent
focus inhibition test)

rpm = rotações por minuto

SFB = soro fetal bovino

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMO	01
ABSTRACT	05
1. INTRODUÇÃO.....	07
1.1. Culturas de células	07
1.2. Culturas de células aderentes.....	09
1.3. Microcarregadores.....	11
1.4. Monitoramento de parâmetros para otimização de processos	13
1.5. Produtos obtidos de culturas de células animais em microcarregadores.....	16
1.6. Replicação viral em microcarregadores porosos	17
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Meios de cultura, soro fetal bovino e soluções.....	25
3.1.1. Meios de cultura.....	25
3.1.2. Soro fetal bovino.....	26
3.1.3. Solução de Associação de Tripsina e Versene (Solução de ATV).....	26
3.1.4. Solução de violeta de genciana a 0,1% em ácido citríco 0,1M.....	26
3.2. Células.....	27
3.2.1. Estoque e manutenção celular.....	27
3.3. Microcarregadores.....	28
3.3.1. Tipos de microcarregadores.....	28
3.3.2. Preparo dos microcarregadores.....	28
3.4. Cultura de células sobre microcarregadores.....	28
3.4.1. Concentração de células iniciais.....	29

3.4.2. Concentração celular.....	29
3.4.3. Adesão das células aos microcarregadores.....	30
3.4.4. Cobertura celular dos microcarregadores.....	30
3.5. Infecção viral.....	31
3.5.1. Cepa de vírus.....	31
3.5.2. Inoculação das culturas.....	31
3.5.3. Titulação do vírus.....	32
3.6. Microscopia óptica.....	33
3.6.1. Preparo de amostras analisadas em cortes histológicos.....	34
3.7. Microscopia eletrônica de varredura.....	34
3.8. Microscopia eletrônica de transmissão.....	35
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Lise das células e liberação dos núcleos para determinação da concentração celular.....	38
4.2. Cinética de adesão celular.....	40
4.3. Cinética da multiplicação celular.....	42
4.4. Número de células por microcarregador.....	45
4.5. Produção de vírus rábico em culturas de células VERO aderidas a microcarregadores.....	47
4.6. Microscopia óptica.....	49
4.7. Microscopia eletrônica de varredura.....	57
4.8. Microscopia eletônica de transmissão.....	67
5. DISCUSSÃO.....	75
6. CONCLUSÕES.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

RESUMO

RESUMO

Este trabalho teve por principal objetivo o estudo do cultivo de células VERO em microcarregadores porosos compostos de celulose (Cytopore). Comparações foram feitas com culturas de células VERO utilizando microcarregadores porosos de gelatina (Cultispher G) e sólidos de DEAE-dextrana (Cytodex tipo 1). Um rendimento celular até três vezes maior foi regularmente obtido nas culturas realizadas nos microcarregadores porosos quando comparado ao rendimento celular obtido nas culturas realizadas nos microcarregadores sólidos Cytodex 1. Em culturas nos microcarregadores porosos Cytopore e Cultispher G obtivemos 1.265 e 1.103 células/microcarregador, respectivamente, enquanto que nos microcarregadores sólidos Cytodex 1 obtivemos 256 células/microcarregador. A concentração de células nos microcarregadores porosos Cytopore aumentou, em média 43 vezes a concentração celular inicial. Nos microcarregadores porosos Cultispher G esse aumento foi de 37,5 vezes, enquanto que no Cytodex 1 foi de 17 vezes o número inicial de células.

As culturas de células VERO nos microcarregadores porosos foram utilizadas com êxito para a replicação da cepa vacinal Pasteur do vírus rábico (PV/VERO), quando infectadas com MOI de 0,05. Títulos de $10^{4,8}$ FFD₅₀/mL em amostras destas culturas foram obtidos 96 horas após a infecção, quando determinados pelo método de inibição de focos fluorescentes (RFFIT). Nas mesmas condições de cultura e infecção e mesmo período, nos microcarregadores sólidos Cytodex 1, o título obtido foi de $10^{3,2}$ FFD₅₀/mL.

Estudos de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura e transmissão realizados para análise da estrutura dos microcarregadores, da população de células, assim como da permissividade celular à infecção viral,

mostraram a boa colonização celular dos microcarregadores e a eficiência da replicação viral nas células aderidas.

Nossos resultados de cultura em infecção viral de células VERO utilizando microcarregadores porosos indicam a utilidade destes suportes porosos para produção de antígenos e vacinas virais e a possibilidade de futuras otimizações para a obtenção de produtos biotecnológicos em geral.

ABSTRACT

ABSTRACT

The aim of this work was the study of VERO cell cultures on cellulose porous microcarriers (Cytopore). Comparisons were performed with VERO cell cultures on gelatin porous microcarriers (Cultispher G) and DEAE-dextran solid microcarriers (Cytodex type 1). A total cellular yield up to 3 times higher was regularly obtained in porous microcarriers cultures when compared to the cellular yield obtained in the cultures on solid microcarriers Cytodex 1. In the cultures on porous microcarriers Cytopore and Cultispher G we obtained 1.265 and 1.103 cells/microcarrier, respectively, while on solid microcarriers Cytodex 1, we obtained 256 cells/microcarrier. The cell concentration increase from the initial cell number was, on average, of 43 times for the Cytopore microcarriers, of 37,5 times for the Cultispher G microcarriers and of 17 times for the Cytodex 1 microcarriers.

The VERO cell cultures on porous microcarriers were efficiently used for the replication of the vaccinal Pasteur strain of rabies virus (PV/VERO). When infected with 0,05 MOI, titers of $10^{4.8}$ FFD₅₀/mL in culture samples were obtained 96 hours post-infection as determined by the fluorescent focus inhibition method (RFFIT). In the same conditions of culture and infection and in the same period, on solid microcarriers Cytodex 1, the titers obtained were $10^{3.2}$ FFD₅₀/mL.

Studies on light microscopy as well as scanning or transmission electronic microscopy carried out to analyse the microcarrier structure, the cell population and their permissivity to virus infection showed a good cell population of porous microcarriers and efficiency of virus infection of the cells.

Our data for culture and virus infection of VERO cells on porous microcarriers indicate the usefulness of these porous supports for antigen and viral vaccine production and possibilities of further optimizations for the attainment of biotechnological products in general.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Culturas de células

A tecnologia de culturas de células animais junto aos processos microbianos de bactérias e fungos formam a essência da produção baseada em fermentação (FRESHNEY, 1994; BUTLER, 1991). As culturas de células animais diferenciam-se das culturas bacterianas por seu crescimento mais lento, pelas mais rigorosas exigências no processo, como a necessidade de ambiente de trabalho estritamente em condições assépticas, pela maior complexidade dos nutrientes requeridos para manutenção das culturas e dos produtos obtidos destes sistemas. Tendo em vista o alto valor agregado e o aumento do número de produtos biotecnológicos obtidos de culturas de células animais, pesquisas e desenvolvimento das metodologias envolvidas para operações em escalas industriais vem sendo alvo de grande interesse (HU et al, 1997).

Vários foram os eventos que determinaram a evolução da tecnologia de cultura de células "in vitro" (RIZZO et al, 1983; BUTLER, 1991). Claude Bernard em 1878 foi um dos pioneiros ao perceber a necessidade de se isolar células em sistemas artificiais para estudo do metabolismo celular sem influência do organismo. Vários pesquisadores passaram então a se dedicar ao estudo de diferentes tipos celulares, como Wilhelm Roux em 1885 que trabalhou com o cultivo de placa neural de embrião de galinha, von Recklinghausen em 1886, com glóbulos de anfíbios, Loeb em 1897 que estabeleceu células isoladas do sangue e do tecido conectivo em soro e plasma, Ljunggren em 1898 e seus estudos com explante de pele humana em líquido ascítico e Jolly em 1903 que descreveu suas observações sobre a divisão celular de leucócitos de salamandra "in vitro". Foi somente a partir de

1907, com os trabalhos de Harrison em célula de tecido embrionário de sapo que se considera o verdadeiro início dos trabalhos com culturas celulares.

A partir deste período foram desenvolvidos uma série de trabalhos voltados a superar as dificuldades na repetição dos experimentos e no estabelecimento de sistemas celulares. Warren e Lewis em 1911 e 1912 iniciaram os estudos dos meios de culturas e seus componentes utilizados para a manutenção e crescimento dos variados tipos celulares, seguidos por Baker, Carrel, Fischer, Parker, Healy, Morgan, White, Waymouth e Eagle, o que resultou na diversidade dos meios de culturas em uso atualmente. A partir de 1913, os esforços centraram-se no desenvolvimento de métodos de cultura celular e a introdução de técnicas de assepsia, permitindo a manutenção de culturas em multiplicação por períodos mais longos. Em 1916, Rous e Jones introduziram o uso da tripsina para o subcultivo de células aderentes. Em 1923 foram utilizados os primeiros frascos desenhados especificamente para cultura de células e somente em 1940 foi introduzido o uso de antibióticos para evitar os constantes problemas de contaminação. Neste período, as culturas celulares passaram a ter importante papel na obtenção de produtos com grande potencial econômico para as áreas clínicas e médicas. Dentre estes produtos podemos citar os anticorpos monoclonais, interferon, produtos de expressão gênica e vacinas virais humanas e animais e a utilização de alguns tipos celulares no diagnóstico de viroses. Enders, Weller e Robbins em 1948 demonstraram a capacidade do vírus da pólio replicar-se em cultura de tecidos de origem não nervosa. É na área de virologia que as culturas de células animais têm algumas vantagens sobre as culturas bacterianas, pois permitem isolar vírus, são convenientes para a produção de vacinas e antígenos virais, permitem realizar testes de neutralização e deram grande impulso aos estudos de biologia molecular e dos mecanismos de infecção dos vírus.

1.2. Culturas de células aderentes

Culturas de tecidos foram desenvolvidas como um método de estudo do comportamento das células animais sem a interferência das variações de temperatura e stress que podem ocorrer no animal durante um experimento. Harrison presumivelmente trabalhou com células de sapo devido ao fato de ser um animal de sangue frio e com isso não seria necessário a incubação das culturas, além do fato da regeneração de tecidos ser mais comum em invertebrados inferiores. O estímulo da ciência médica levou ao interesse pelos trabalhos com animais de sangue quente, onde o desenvolvimento normal e patológico são mais próximos ao humano.

Vários tipos celulares passaram a ser utilizados, como as células de ovos embrionados de galinha. O advento dos experimentos com células de roedores de linhagens geneticamente puras, levou as células de mamíferos a serem consideradas o tipo celular de preferência.

Mais recentemente as necessidades da agricultura e controles de pestes despertou o interesse no estudo de aspectos virológicos e de toxicidade em insetos e o desenvolvimento em engenharia genética tem sugerido que linhagens de células de insetos com baculovírus e outros vetores podem ser úteis produtores de linhagens celulares com menores exigências de controle de temperatura (FRESHNEY, 1994).

Existem três métodos para o início de uma cultura. As culturas de órgãos implicam que as características da arquitetura do tecido "in vivo" sejam mantidas. A multiplicação celular é lenta, limita-se à periferia de um explante, é restrito principalmente para tecidos embrionários e conseqüentemente não podem ser propagados. Possuem assim baixa reprodutibilidade e a quantidade de material que pode ser cultivado é limitado as dimensões do explante. A manutenção das específicas interações

histológicas que reproduzem as características de um tecido, fazem das culturas de órgãos uma importante técnica de cultivo celular.

Nas culturas de explante primário um fragmento de um tecido é colocado numa interface de vidro ou plástico e líquido, onde seguido da adesão, a migração celular é promovida no plano de um substrato sólido.

As culturas de células implicam que um tecido seja disperso mecanicamente ou enzimaticamente numa suspensão, que pode então ser cultivado como uma monocamada aderente ou um substrato sólido, ou ainda como uma suspensão em meio de cultura. Uma monocamada ou suspensão celular com significativa fração de crescimento podem ser dispersas por tratamento enzimático ou simples diluição e subcultivadas em novas culturas. Este mecanismo constitui o que definimos como passagem e as subculturas então formadas são o começo de uma linhagem celular.

As culturas em suspensão são derivadas de células que podem sobreviver e proliferar sem adesão a um substrato. Como exemplo podemos citar as células hematopoiéticas, linhagens celulares transformadas, células de tumores malignos e células de insetos.

Células aderentes são aquelas que requerem um substrato para crescimento e multiplicação. A adesão da célula à superfície de cultivo ocorre em quatro etapas: a) adsorção de fatores de adesão à superfície de cultivo; b) contato entre as células e a superfície de crescimento; c) fixação das células ao substrato e d) expansão das células aderidas (PHARMACIA, UPPSALA, 1981). A multiplicação celular ocorre somente após a etapa de expansão e envolve cátions bivalentes e glicoproteínas originadas do soro utilizado em cultura de células aderentes e outras sintetizadas pela própria célula.

1.3. Microcarregadores

Uma grande variedade de recipientes foram desenvolvidos para multiplicação de células aderentes. Placas de Petri, garrafas Roux e as denominadas garrafas “roller” são alguns exemplos de recipientes que usam como substrato vidro ou poliestireno. Estes recipientes apresentam como desvantagem, além das limitações de tamanho, dificuldades de se trabalhar em sistemas de múltiplas etapas para obtenção de produtos em larga escala. Custos de equipamentos, espaço e operadores bem treinados também devem ser considerados na escolha de um sistema (LEVINE et al, 1979).

A utilização das culturas de células para obtenção de produtos em larga escala levou ao desenvolvimento de novos sistemas no sentido de superar as limitações dos métodos até então conhecidos. Frascos para cultura com múltiplas superfícies de cultivos, garrafas “roller” modificadas e os chamados microcarregadores passaram a ser estudados (VAN WEZEL, 1967; GLACKEN et al, 1983).

Microcarregadores foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar a superfície de crescimento para obtenção de alta densidade celular de células aderentes em relação as culturas estáticas. Desde os primeiros relatos descritos por Van Wezel (1967), diferentes materiais e técnicas têm sido utilizados no preparo de microcarregadores (GRÖHN et al, 1997; NILSSON et al, 1986), entre eles a dextrana (LEVINE et al, 1979), o poliestireno (JOHANSON et al, 1980), a poliacrilamida (REUVENY et al, 1983), a celulose (REUVENY et al, 1982), a gelatina (NILSSON et al, 1986) e microesferas cobertas por proteínas (ALTANKOV et al, 1991; LAZAR et al, 1985).

Os primeiros microcarregadores desenvolvidos constituíam-se de pequenas esferas sólidas que atuavam de substrato para adesão e crescimento celular. Entretanto, esta conformação de suporte ainda limitava

a área para multiplicação celular oferecendo baixa razão de área de superfície por volume de cultura e minimizando o potencial máximo de carga celular (número de células por microcarregador).

Os microcarregadores porosos, constituídos da mesma variedade de materiais que para os microcarregadores sólidos, foram criados por sua capacidade de suportar muito maior número de células que os suportes sólidos convencionalmente utilizados.

Os Cytopore são suportes porosos constituídos de uma matriz baseada numa ligação cruzada de celulose que é substituída com grupos N,N-dietilaminoetil carregados positivamente. Os Cultispher G, suportes também porosos, são constituídos de gelatina, um derivado do colágeno. O comportamento e multiplicação celular, assim como a composição dos microcarregadores porosos são geralmente comparados aos microcarregadores sólidos Cytodex, cuja matriz é baseada numa ligação cruzada de dextrana que é substituída com grupos N,N-dietilaminoetil carregados positivamente.

Estes três tipos de microcarregadores possuem densidades semelhantes, variando entre 1,02 e 1,04 g/mL. As principais diferenças, além da constituição referem-se a área superficial efetiva para o crescimento celular e o número de microcarregadores por grama seca do produto. A superfície de cultivo é de 1,1 m²/g seca para o Cytopore, 1,5 m²/g para o Cultispher G e 0,4 m²/g para o Cytodex 1.

O número de microcarregadores por grama seca do suporte pode ser facilmente determinado por contagem de amostras do suporte hidratados em volume padronizado de tampão PBS por observação ao microscópio óptico. Os valores oferecidos pelos fabricantes são de 3,2 x 10⁶ microcarregadores/grama seca para o Cytopore, 10⁶ para o Cultispher G e 4,3 x 10⁶ para o Cytodex 1.

Com base nos dados sobre a área de cultivo e o número de microcarregadores por grama da partícula, os microcarregadores porosos Cytopore e Cultispher G apresentam, por grama seca, área cerca de 3 a 4 vezes maior que os microcarregadores sólidos Cytodex 1. Quando considerada a área por microcarregador, o Cytopore é cerca de 4 vezes maior que o Cytodex 1 e 4 vezes menor que o Cultispher G. Com relação ao Cultispher G, o Cytodex 1 apresenta uma área por microcarregador 16 vezes menor. O quadro a seguir mostra estas características comparando os três tipos de suporte:

Microcarregador	Constituição	Nº de mc*/g	Área (m ² /g)	Área (mm ² /mc)	Diâmetro (µm)
Cytopore	Celulose	3,2 x 10 ⁶	1,1	0,343	200-280
Cultispher G	Gelatina	10 ⁶	1,5	1,5	130-380
Cytodex 1	Dextrana	4,3 x 10 ⁶	0,4	0,093	150-250

(*) mc = microcarregadores

Para os microcarregadores porosos considera-se ainda o diâmetro médio dos poros das partículas após a hidratação em tampão PBS, sendo de 30µm para o Cytopore e de 20µm para o Cultispher G.

1.4. Monitoramento de parâmetros para otimização de processos

As culturas de células aderentes em frascos "spinners" e biorreatores utilizando microcarregadores têm a vantagem de um melhor monitoramento do cultivo que as culturas estáticas, das várias etapas que envolvem o processo em condições estéreis, possibilitando a manipulação das células por longos períodos (HANDA-CORRIGAN, 1991).

Parâmetros como temperatura, pH, agitação, concentração de soro, células e microcarregadores (KILBURN, 1991; CROUGHAN et al, 1987; HU et al, 1985; FORESTELL et al, 1992; HIMES et al, 1987; PREISSMANN, 1997) são alguns dos fatores que exigem maior atenção. Cada tipo de célula, assim como cada produto que se pretende obter, necessitam a otimização de cada

um destes parâmetros. Alguns deles são bem estabelecidos para determinadas células nos microcarregadores sólidos. Para os microcarregadores porosos os dados relacionados ao estudo das condições de cultivo ainda são limitados. O fato das células se multiplicarem no interior destes suportes levaram a uma maior atenção quanto as condições metabólicas destas células quando comparadas aos microcarregadores sólidos (CAHN et al, 1990; MIGNOT et al, 1990; NIKOLAI et al, 1992).

O aspecto primeiramente observado foi com relação ao aumento do rendimento celular nos microcarregadores porosos, que pode ser até três vezes o obtido nos microcarregadores sólidos Cytodex 1. Considerando uma satisfatória distribuição celular o número de células por microcarregador no início e na fase do cultivo onde a concentração celular atinge número máximo pode ser estimado. Trabalhos sugerem a semeadura de pelo menos 8 a 10 células/microcarregador para as culturas em Cytodex 1, sendo o valor ideal de 15 a 30 células/microcarregador (CROUGHAN et al, 1987; GLACKEN et al, 1983). Nos microcarregadores porosos os valores sugeridos também variam de 15 a 30 células/microcarregador. Em seus experimentos, NG et al (1995) trabalhou com números variando de 15 a 590 células/microcarregador poroso. Valores acima de 50 células/microcarregador determinaram uma queda na multiplicação celular. Enquanto que para cultivos semeados com 30 células/microcarregador o aumento na concentração celular foi em torno de 39 vezes, nas culturas com 590 células/microcarregador iniciais o número máximo de células não foi muito superior a duas vezes a concentração semeada.

As variações nas técnicas de determinação da concentração de células aderidas a microcarregadores pelo método indireto de contagem de núcleos soltos pela lise celular, também são aspectos importantes no monitoramento de um processo. As diferenças de comportamento das soluções utilizadas para lise celular determinam os tempos para liberação dos

núcleos para contagem. Fleischaker (1987) demonstrou a eficiência da solução de Triton X-100 a 1% em ácido cítrico 0,1M na lise das células de amostras de culturas utilizando microcarregadores para liberação dos núcleos. A liberação dos núcleos de amostras nesta solução ocorre após aproximadamente 10 minutos à temperatura ambiente.

Patterson (1979) e Butler (1991) pelo mesmo princípio de contagem de núcleos para determinação da concentração celular, utilizaram como tampão de lise a solução de violeta de genciana a 0,1% em ácido cítrico 0,1M. Nesta solução as amostras são incubadas à temperatura de 37°C e os núcleos soltos são corados pela violeta de genciana. Para amostras de culturas em microcarregadores sólidos o tempo de incubação para lise celular foi semelhante ao determinado para a solução de Triton X-100 a 1% em ácido cítrico 0,1M, variando entre 7 e 10 minutos. Para células aderidas aos microcarregadores porosos o período de incubação estabelecido por estes autores foi de 2 a 4 horas. Foi demonstrado ainda que para facilitar a liberação das células lisadas do interior dos microcarregadores, a agitação das amostras em vórtex durante o período de incubação é recomendável.

A dissolução dos microcarregadores constituídos de gelatina por ação da tripsina permite a determinação da concentração celular por contagem direta de células. SHIRAGAMI et al (1993) e NG et al (1995) em seus trabalhos utilizaram para liberação das células uma solução de tripsina a 0,25% em ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) em tampão PBS. Após 10 minutos de incubação à 37°C, os microcarregadores são dissolvidos e as células soltas são coradas com uma solução de trypan blue 0,2 ou 0,4% para contagem. Este método tem a vantagem de permitir a avaliação da viabilidade celular que não é possível pelo método de contagem de núcleos.

Estes autores estudaram também os efeitos hidrodinâmicos das culturas em biorreatores no crescimento das células em cultivos utilizando microcarregadores. Com base nos trabalhos de Martens et al (1997),

Croughan et al (1987) e Wu et al (2000) verificaram que o estabelecimento das condições ideais para que as células não sofram danos mecânicos devido a agitação do sistema, devem ser criteriosamente analisados para cada tipo de célula. Estes autores mostraram que em estágios mais avançados, as células que crescem na superfície externa dos microcarregadores porosos são susceptíveis a danos mecânicos tanto pela agitação do meio de cultura quanto pelo choque entre as partículas.

Manter os microcarregadores em suspensão homogênea, sem causar danos as células, requer um sistema com adequada agitação (HU et al, 1984; GOETGHEBEUR et al, 1990). O aumento da velocidade de agitação no período em que a cultura atinge alta concentração celular, ou seja, quando os microcarregadores cheios de células têm maior peso e tendem a sedimentar, sugerido pelo fabricante, foi demonstrado em vários trabalhos não ser eficiente (ALVES et al, 1996; NG et al, 1995; SHIRAGAMI et al, 1993; ADEMA et al, 1990; CROUGHAN et al, 1987). Estes autores mostraram em diferentes células, um decréscimo na concentração celular quando as culturas foram submetidas a agitação igual ou superior a 100rpm.

1.5. Produtos obtidos de culturas de células animais em microcarregadores

Existe uma variada gama de produtos que se pode obter em larga escala de sistemas de cultura de células aderidas a microcarregadores. Dentre eles podemos citar: fatores de crescimento (JENKINS, 1991), produtos de expressão gênica (MacDONALD, 1991), expressão de proteínas (DICKSON, 1991), proteínas recombinantes (KENNARD et al, 1995; MIGNOT et al, 1990), hibridomas (HARBOUR et al, 1991), anticorpos monoclonais, antígenos carcinoembrionários, a própria célula como produto (SCHRIMPF et al, 1993), hormônios e vacinas virais (GRIFFITHS, 1991).

Dentre estes produtos, a obtenção de vírus com interesse vacinal tem importante expressão econômica. As vacinas contra poliomelite (SABIN, 1985), influenza (GOVORKOVA et al, 1996), rubéola (LEE et al, 1999; PETRUZZIELLO et al, 1996) e raiva (PÉREZ et al, 1997; GALLEGOS GALLEGOS et al, 1995) são algumas delas.

1.6. Replicação viral em microcarregadores porosos

Os microcarregadores porosos vêm sendo estudados nos mais variados aspectos e para obtenção dos mesmos produtos oferecidos pelas culturas de células animais utilizando microcarregadores sólidos (MIGNOT et al, 1990; BERRY et al, 1999; NIKOLAI et al, 1992).

Vários trabalhos sobre a utilização do microcarregadores porosos Cultispher G encontram-se na literatura tanto para o estudo da otimização do sistema para obtenção de alta densidade celular como para a obtenção de produtos. Alguns exemplos são os trabalhos nos quais estes microcarregadores foram testados para a multiplicação do vírus da estomatite vesicular (NIKOLAI et al, 1992), para o cultivo de hepatócitos HepZ humanos imortalizados (WERNER et al, 2000), para produção do reovírus tipo 1 e tipo 3 (BERRY et al, 1999), para análise de produtividade das células BHK₂₁ (ALVES et al, 1996) e para estudos mostrando a possibilidade de ampliação de escala em microcarregadores porosos (OHLSON et al, 1994) mostrando a variedade dos aspectos de interesse nestes sistemas. A literatura referente a utilização do Cytopore, tanto quanto pudemos apurar, é mais restrita, limitando-se aos trabalhos de RAIHAN et al (1997) para imobilização de células bacterianas para biotransformações anaeróbicas e ZHAOLIE et al (1999) para o estudo da produção de rt-PA em células CHO recombinantes.

Tendo em vista que vários trabalhos utilizando microcarregadores porosos obtiveram resultados satisfatórios e com vantagens, a possibilidade

de substituição dos microcarregadores sólidos pelos suporte porosos em vários sistemas é considerada viável para muitos autores.

A linhagem celular VERO é aceita pela Organização Mundial de Saúde para produção de imunobiológicos de uso humano, como por exemplo, as vacinas virais. Além disso, por sua característica de aderência para multiplicação, é também adequada para o estudo de substratos para cultivo como os microcarregadores (WHO 1987; MONTAGNON et al, 1984). A susceptibilidade das células VERO ao vírus rábico (MENDONÇA et al, 1994; MENDONÇA et al, 1993; PÉREZ et al, 1997; GUIDOLIN et al, 1983) e o conhecimento do mecanismo de infecção do vírus (SUPERTI et al, 1984; WUNNER et al, 1988; BUSSEAU et al, 1982; CONTI et al, 1990) sugere a possibilidade de utilização dos microcarregadores porosos para a replicação deste vírus.

O vírus rábico pertencente a família Rabdoviridae, gênero Lysavírus, quando observados ao microscópio eletrônico, apresenta uma forma de projétil com aproximadamente 180 nm de comprimento e 65 nm de largura. Seu genoma consiste em RNA de fita única, linear, não segmentado, com peso molecular de $4,6 \times 10^6$. É composto ainda de proteína (67%), lipídio (26%) e carboidrato (3%). A proteína refere-se a uma glicoproteína do envoltório. O envoltório é uma membrana contendo lipídios que circunda a partícula viral e é adquirida durante a maturação viral por um processo de brotamento através da membrana celular (SUPERTI et al, 1986). A replicação do vírus ocorre em etapas iniciando-se pela penetração em células hospedeiras pela ligação da partícula ao seu receptor através de suas espículas de glicoproteínas (RUSTICI et al, 1993). Após a remoção do envelope viral a partícula é internalizada por endocitose em vesículas com pH ácido, levando a transferência do genoma viral para o citoplasma. Tem lugar então os processos de transcrição e tradução viral que precedem a montagem das partículas virais ao nível da membrana celular de onde elas

são liberadas por brotamento e podem infectar células vizinhas iniciando outro ciclo de multiplicação (JAWETZ et al, 1991; HUMMELER et al, 1969; TORDO, 1996; CONTI et al, 1985).

A replicação viral pode ser acompanhada por técnicas de titulação, sendo o método de inibição de focos fluorescentes (RFFIT) (SMITH et al, 1996; ZALAN et al, 1979; FITZGERALD et al, 1979) uma delas. Tendo em vista que nos microcarregadores porosos as células se multiplicam também e principalmente no interior das partículas, um estudo não somente de titulação viral deve ser considerado, mas também estudos de microscopia óptica e eletrônica com vistas ao monitoramento da presença de células no interior dos microcarregadores contribuem decisivamente para a análise detalhada não só do bom aproveitamento da área superficial da partícula para multiplicação celular, mas também para a verificação da extensão da infecção e replicação viral nas células que ocupam o interior dos microcarregadores (WUNNER et al, 1984; TANABE et al, 1979; SUPERTI et al, 1984; BANCEL et al, 1996; LIM et al, 1992).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este trabalho surgiu do grande interesse sobre os vários aspectos que envolvem a tecnologia de cultura de células, assim como dos produtos obtidos por esta metodologia.

O objetivo geral deste trabalho foi o estabelecimento de culturas de células VERO sobre os microcarregadores porosos principalmente compostos de celulose (Cytopore), mas também os compostos de gelatina (Cultispher G), tendo como referência o cultivo sobre microcarregadores sólidos (Cytodex 1).

Os objetivos específicos incluíram numa primeira etapa a análise, em estudos cinéticos, da melhor concentração de microcarregadores e de células iniciais para a obtenção de um bom rendimento celular final. Por microscopia óptica de fase observamos os três tipos de microcarregadores em suspensão vazios ou cobertos por células em diferentes fases do crescimento celular.

Numa segunda etapa, objetivamos estudar a possibilidade de utilização das culturas de células VERO sobre microcarregadores porosos para a replicação do vírus rábico, através da infecção das culturas com a cepa vacinal Pasteur do vírus rábico (PV/VERO). Para medida da capacidade de replicação viral nas células, procedemos por técnicas de imunofluorescência a titulação viral em amostras coletadas e exame histológico dos microcarregadores porosos contendo células infectadas.

Numa terceira etapa, foi nosso objetivo analisar, através de cortes histológicos, a estrutura dos microcarregadores porosos, a distribuição e a capacidade das células de se multiplicarem no interior dos mesmos, e por microscopia eletrônica de transmissão a morfologia destas células. Por microscopia eletrônica de varredura foi feito a análise topográfica deste material.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Meios de cultura, soro fetal bovino e soluções

3.1.1. Meios de cultura

O meio de cultura Leibovitz (L₁₅) (CULTILAB) foi utilizado para multiplicação e manutenção das células para infecção viral. Para isto, o meio foi dissolvido em água bidestilada, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (CULTILAB), esterilizado por filtração em membranas planas de 0,22 µm (MILLIPORE) e armazenado à temperatura de 2 a 8°C. Para manutenção das culturas infectadas, o meio foi suplementado com 2% de SFB. O meio suplementado com SFB apresentou pH 7,5 – 8,2 e foi aquecido à temperatura de 37°C no momento do uso.

Composição do meio Leibovitz, segundo fabricante:

Sais orgânicos	Aminoácidos
Ca Cl ₂	DL – alanina
KCl	L – arginina
KH ₂ PO ₄	L – asparigina
MgCl ₂	L – cisteína
MgCl ₂ 6H ₂ O	L – glutamina
MgSO ₄	Glicina
MgSO ₄ 7H ₂ O	L – histidina
NaCl	DL – isoleucina
Na ₂ HPO ₄	L – leucina
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	L – lisina
	DL – metionina
	DL – fenilalanina
	DL –valina
Vitaminas	L –serina
Pantotenato de Cálcio	DL – treonina
Cloreto de Colina	L – triptofano
Ácido Fólico	L tirosina
Inositol	
Piridoxal HCl	Outros componentes
Nicotinamida	D (+) galactose
Riboflavina	Vermelho de fenol
Tiamina	Piruvato de sódio

3.1.2. Soro fetal bovino

Soro fetal bovino (SFB) (CULTILAB) livre de contaminação por bactérias, vírus e micoplasma foi acrescentado ao meio de cultura e sua ação foi testada sobre o crescimento celular em seis subcultivos consecutivos. A morfologia celular foi observada cuidadosamente a cada passagem em microscópio invertido (NIKON).

3.1.3. Solução de Associação de Tripsina e Versene (Solução de ATV)

A solução utilizada na tripsinização das culturas celulares para subcultivo consiste de uma associação de tripsina (DIFCO LABORATORIES) e ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (VETEC), em concentrações respectivas de 0,2% e 0,02%, dissolvidos em tampão PBS e acrescida de glicose (MERCK) e vermelho de fenol (MERCK) como indicador de pH. O pH da solução foi ajustado para 7,3 (RIZZO et al, 1983).

A solução foi esterilizada por filtração em membranas planas de 0,22 µm (MILLIPORE) e armazenada à temperatura de 2 a 8°C. No momento do uso, a solução foi aquecida à temperatura de 37°C.

3.1.4. Solução de violeta de genciana a 0,1% em ácido cítrico 0,1M

Uma solução de violeta de genciana (SYNTH) dissolvida a uma concentração de 0,1% em solução aquosa de ácido cítrico (REAGEN) 0,1M, foi utilizada para lise das células aderidas aos microcarregadores e liberação dos núcleos. A concentração celular das culturas em microcarregadores é determinada indiretamente pela contagem de núcleos soltos e corados.

3.2. Células

Para o cultivo em microcarregadores e infecção viral foi utilizada a linhagem celular VERO, iniciada de rim de macaco verde africano normal em 1962 na Universidade de Chiba no Japão por Yoshihiro Yasumura e Yosio Kawakita. Proveniente do American Type Culture Collection (ATCC), tem certificado de linhagem celular número 81 (ATCC CCL 81) e são intensamente utilizadas no estudo de replicação viral e em ensaios “in vitro” (EARLEY et al, 1988).

Para a titulação do vírus pelo teste de inibição de focos fluorescentes (RFFIT) foi utilizada a linhagem celular BHK₂₁, iniciada de rim de hamsters de um dia de idade, por Ian A. Macpherson e Michael G. P. Stoker. Proveniente do American Type Culture Collection (ATCC), tem certificado de linhagem celular número 10 (ATCC 10) e são também utilizadas no estudo de replicação viral e em ensaios “in vitro” (STOKER et al, 1961).

3.2.1. Estoque e manutenção celular

Para estoque celular, culturas de células VERO confluentes foram tripsinizadas com a solução de associação de tripsina e versene (ATV) e ressuspensas em meio de cultura Leibovitz (L₁₅) suplementado com 10% de SFB, de forma a se obter uma suspensão com 8×10^6 células/mL. Acrescida de 5% de dimetil sulfoxide (DMSO) (MERCK), a suspensão foi distribuída em alíquotas de 1 mL em criotubos (NUNCTM BRAND PRODUCTS) de 1,5 mL e congeladas à temperatura de -70°C (ACTON et al, 1979).

As culturas das células congeladas foram estabelecidas em frascos de poliestireno (NUNCTM BRAND PRODUCTS) de 75 e 150 cm², mantidas em meio de cultura Leibovitz (L₁₅), suplementado com 10% de SFB, em câmara umedecida à temperatura de 37°C e atmosfera com 2,5% de CO₂. As culturas foram subcultivadas por tripsinização nas passagens 150 a 180.

3.3. Microcarregadores

3.3.1. Tipos de microcarregadores

Como suporte para a multiplicação das células VERO foram utilizados os microcarregadores porosos Cytopore (PHARMACIA) e Cultispher G (PERCELL BIOLYTICA) e microcarregadores sólidos Cytodex tipo 1 (PHARMACIA), cujas características principais são:

Microcarregador	Constituição	Nº de mc*/g	Área (m ² /g)	Área (mm ² /mc)
Cytopore	Celulose	3,2 x 10 ⁶	1,1	0,343
Cultispher G	Gelatina	10 ⁶	1,5	1,5
Cytodex 1	Dextrana	4,3 x 10 ⁶	0,4	0,093

(*) mc = microcarregadores

3.3.2. Preparo dos microcarregadores

Os microcarregadores porosos Cytopore e Cultispher G e microcarregadores sólidos Cytodex 1 foram hidratados em tampão PBS. Conforme orientação dos fabricantes, o Cytopore foi mantido em tampão PBS por 10 minutos, o Cultispher G por 1 hora e o Cytodex 1 por 3 horas a temperatura ambiente em frasco siliconizado, sendo ocasionalmente agitado. Após o período de hidratação foi feita uma troca do tampão e o material foi esterilizado por autoclavação por 30 minutos à temperatura de 121°C.

3.4. Cultura de células sobre microcarregadores

As culturas de células VERO aderidas à microcarregadores para infecção viral foram realizadas em frascos "spinner" de 250 mL (BELLCO BIOTECHNOLOGY) previamente siliconizados, com volume de trabalho de 200 mL, à temperatura de 37°C e agitação contínua de 60 rpm. A concentração de microcarregadores para o Cytopore foi de 0,5 mg/mL, que corresponde em número de microcarregadores à concentração utilizada para o Cultispher G de

1,7 mg/ml (NG et al, 1995; Berry et al, 1999). O Cytopore foi utilizado também na concentração de 1 mg/mL. O Cytodex 1 foi utilizado na concentração de 2mg/mL. Para análise de rendimento celular o Cytodex 1 foi também utilizado na concentração de 0,4 mg/mL, com equivalente número de microcarregadores do Cytopore com concentração de 0,5 mg/mL.

Conforme orientação dos fabricantes, antes da semeadura das células foi retirado o tampão PBS de hidratação dos microcarregadores e acrescentado meio de cultura Leibovitz (L₁₅) suplementado com 10% de SFB. O soro cobre os microcarregadores com proteínas de ligação que auxiliam na aderência e espreadimento das células. O Cytopore e o Cultispher G foram mantidos por uma noite em meio suplementado com SFB e o Cytodex 1 por 30 minutos antes do início do cultivo.

As culturas foram mantidas em meio de cultura Leibovitz (L₁₅) suplementado com 10% de SFB. Após o terceiro dia de cultivo metade do volume de meio foi trocado a cada 48 horas devido a depleção de nutrientes.

3.4.1. Concentração de células iniciais

Com base na literatura (NG et al, 1995; MENDONÇA et al, 1999), nos cultivos utilizando Cytopore com concentração de 0,5 mg/mL, Cultispher G 1,7 mg/mL e Cytodex 1, 0,4 mg/mL, o número inicial de células foi de 5×10^4 células/mL que corresponde a cerca de 30 células/microcarregador. No cultivo com 1 mg/mL de Cytopore iniciou-se com 10^5 células/mL.

Nos cultivos com 2 mg/mL de Cytodex 1 a concentração inicial de células foi de $1,3 \times 10^5$ células/mL, ou seja, aproximadamente 15 células/microcarregador.

3.4.2. Determinação da concentração celular

Foram retiradas diariamente dos cultivos amostras de 1mL para a determinação da concentração celular pelo método indireto de contagem de

núcleos soltos e corados. O princípio do método baseia-se na lise celular causada por uma solução hiperosmótica. Para isto foi utilizado a solução de violeta de genciana a 0,1% em ácido cítrico 0,1M. Os microcarregadores foram sedimentados, o meio sobrenadante retirado e acrescentado igual volume de tampão de lise. Nos microcarregadores porosos as contagens foram feitas entre 15 minutos e 3 horas após incubação da amostra à temperatura de 37°C com agitação em vórtex a cada 30 minutos (PATTERSON JR, 1979; FLEISCHAKER, 1987; BUTLER, M. 1991). As amostras das culturas em Cytodex 1 foram contadas após 7 a 10 minutos de incubação da amostra à temperatura de 37°C.

3.4.3. Adesão das células aos microcarregadores

A determinação da cinética de adesão das células aos microcarregadores foi feita pela razão de desaparecimento de células soltas na cultura. Amostras do sobrenadante das culturas foram retiradas por um período de até 3 horas após a semeadura das células (NIKOLAI et al, 1992). No período de adsorção celular, o tipo de agitação variou entre intermitente e contínua. A agitação intermitente das culturas foi estabelecida com os seguintes tempos: 2 minutos agitando e 20 minutos parada (2'/20'); 5 minutos agitando e 15 minutos parada (5'/15'); 3 minutos agitando e 30 minutos parada (3'/30') e 3 minutos agitando e 20 minutos parada (3'/20'). A rotação para os dois tipos de agitação foi de 60 rpm.

3.4.4. Cobertura celular dos microcarregadores

Nos cultivos utilizando o Cytopore e o Cultispher G a observação da cobertura celular dos microcarregadores pode ser considerada qualitativa e é realizada pela análise de cortes histológicos de amostras fixadas e incluídas em resina apropriada. A distribuição das células aderidas ao Cytodex 1 é parcialmente quantitativa. Para o Cytodex 1 foi feito uma contagem distinguindo-se microcarregadores totalmente e parcialmente cheios de células

e microcarregadores vazios, em amostras retiradas entre o terceiro e sexto dia de cultivo, observadas ao microscópio invertido (NIKON) sendo o resultado dado pela porcentagem de cobertura em função do número de microcarregadores contados. Este tipo de análise da cobertura celular nos cultivos utilizando o Cytodex 1 é feita com o objetivo de se determinar o período ideal para a infecção viral.

3.5. Infecção viral

3.5.1. Cepa de vírus

Foi utilizada a cepa do vírus rábico PV/VERO, proveniente do Stock I do Instituto Pasteur de Paris, adaptadas em cultura de células VERO, título de $10^{4,30}$ FFD₅₀/0,05 mL obtido pelo teste de titulação em células BHK₂₁ (RFFIT) (SMITH et al, 1996) e mantidas à temperatura de -70°C.

3.5.2. Inoculação das culturas

A inoculação do vírus nas culturas utilizando Cytopore e Cultispher G foi feita entre o quinto e sétimo dia de cultivo. Estes tempos compreendem a fase logarítmica do crescimento celular. A infecção viral das células aderidas ao Cytodex 1 foi realizada entre o terceiro e quinto dia de cultivo, quando 70 a 80% dos microcarregadores estavam totalmente cobertos por células.

No momento da inoculação os microcarregadores contendo células foram sedimentados, retirado o sobrenadante da cultura e adicionado a suspensão de vírus com multiplicidade de infecção (MOI) de 0,05. A multiplicidade de infecção é determinada pela relação entre o título de vírus e a concentração celular no momento da infecção e é dada pela equação:

$$\text{MOI} = \text{título de vírus} / \text{número de células}$$

O cultivo foi mantido por uma hora, com agitação a 60 rpm a cada 15 minutos para adsorção do vírus à célula. Após este período foi acrescentado

meio de cultura Leibovitz (L₁₅) suplementado com 2% de SFB e a agitação passou a ser contínua.

3.5.3. Titulação do vírus

A multiplicação viral foi acompanhada por titulação de amostras retiradas entre 48 e 96 horas após a infecção das células. O título foi determinado pelo método de inibição do focos fluorescentes (RFFIT) (SMITH et al, 1996).

Para realização do teste foram utilizadas as células BHK₂₁ (ATCC 10) mantidas meio de cultura Minimum Essential Medium Eagle (Eagle MEM) com sais de Earle's (CULTILAB). O meio foi dissolvido em água bidestilada, suplementado com 10% de SFB (CULTILAB) para manutenção celular e com 2,5% para utilização no teste de titulação, esterilizado por filtração em membranas planas de 0,22 µm (MILLIPORE) e armazenado à temperatura de 2 a 8°C. O meio suplementado com SFB apresentou pH 7,2 – 7,5 e foi aquecido à temperatura de 37°C no momento do uso. As culturas foram estabelecidas em frascos de poliestireno (NUNCTM BRAND PRODUCTS) de 75 cm², mantidas em câmara umedecida à temperatura de 37°C e subcultivadas por tripsinização. As células do teste foram utilizadas nas passagens 75 – 80.

Neste método de titulação, diluições seriadas das amostras das suspensões virais a serem tituladas foram feitas em placas de poliestireno (NUNCTM BRAND PRODUCTS) de 96 orifícios. Sobre as diluições de vírus foram semeadas células BHK₂₁ na concentração de 3×10^5 células/mL no volume de 0,1mL/orifício e a placa incubada em câmara umedecida à temperatura de 37°C e atmosfera com 5% de CO₂ por 22 horas.

Em seguida foi feita uma lavagem da cultura com tampão PBS e as células foram fixadas com uma solução aquosa de acetona (VETEC) a 80%. A seguir, as células foram coradas para imunofluorescência conforme segue:

- a) retirada da solução de acetona;

- b) coloração das células fixadas com conjugado antinucleocapsídeo rábico com fluoresceína (SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR) diluído a 1:20 em solução de Azul de Evans (INLAB) em tampão PBS a 1:40.000;
- c) incubação da placa à temperatura de 37°C por 60 minutos; retirada do conjugado;
- d) lavagem das células fixadas e coradas com tampão PBS e água destilada;
- e) adição de solução de tampão carbonato / bicarbonato (MERCK) 1:10 em glicerina (NUCLEAR), para visualização da fluorescência ao microscópio.

Após a coloração, a leitura foi realizada por observação em microscópio de fluorescência (NIKON – ECLIPSE – TE 300). Para cada diluição da amostra foi feita a leitura de dez campos, sendo o resultado positivo para o campo que apresentou um ou mais focos fluorescentes. Após a leitura de todas as diluições, o título ou dose formadora de focos fluorescentes em 50% dos campos inoculados (FFD₅₀) foi calculado pelo método de Spearman - Karber (ZALAN et al, 1979).

3.6. Microscopia óptica

Com auxílio da microscopia óptica pudemos observar os microcarregadores vazios hidratados em tampão PBS. Estes foram analisados e fotografados ao microscópio óptico de fase (CARL ZEISS – JENA; ZEISS - AXIOVERT 25) (CAHN, 1990).

Por microscopia óptica observamos também amostras de suspensão de culturas de células aderidas ao Cytodex 1 fixadas em solução de paraformaldeído (SIGMA) a 4% em tampão PBS 0,1M e pH 7,2.

3.6.1. Processamento de amostras analisadas em cortes histológicos

Para observação por microscopia óptica, os microcarregadores porosos vazios hidratados em tampão PBS e em cultura contendo células em diferentes estágios do cultivo foram fixados em uma solução de paraformaldeído (SIGMA) a 4% em tampão PBS 0,1M e pH 7,2, desidratados em solução de etanol (SYNTH) em concentrações crescentes de 70%, 90% e 100% e incluídos em resina tipo metacrilato (LEICA) (JUNQUEIRA, 1995).

Após a inclusão, foram feitos cortes de 2 – 4 µm de espessura utilizando navalha de vidro em micrótomo histológico (SPENCER). Em seguida os cortes foram corados em solução de azul de toluidina (REAGEN) a 0,1% acrescido de bórax (MERCK) a 1% ou solução de Giemsa (REAGEN) a 2%.

Os cortes foram analisados e fotografados em microscópio óptico (CARL ZEISS – JENA e NIKON LABOPHOTO). Nesta etapa foi analisada a estrutura dos microcarregadores porosos e a distribuição das células no interior dos mesmos.

3.7. Microscopia eletrônica de varredura

Amostras dos microcarregadores vazios e contendo células em diferentes estágios do cultivo, inclusive após a infecção viral, foram retiradas para a análise topográfica por microscopia eletrônica de varredura. Para a fixação do material foi utilizada uma solução contendo glutaraldeído (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES – EMS) a 2,0% em tampão PBS (MURPHY et al, 1984).

Após a fixação inicial, o material foi processado conforme as seguintes etapas:

- a) pós fixação em solução de tetróxido de ósmio (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES – EMS) a 1% em tampão PBS;
- b) desidratação do material em solução de etanol (SYNTH) em

- concentrações crescentes de 30%, 50%, 70%, 90%, 96% e 100%;
- c) tratamento com hexamethyldisilazane (HMDS) (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES – EMS) que retira o resíduo de álcool;
- d) cobertura do material com ouro (SPUTTERING) utilizando metalizador (BALZERS UNION /FL – 9496, BALZERS/ FÜRSTENTUM LIECHTENSTEIN).

As amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 430 (CAMBRIDGE; Co – operation ZEISS – LEICA) operando a 15kV, I. Probe = 3,0 nA.

3.8. Microscopia eletrônica de transmissão

Para observação por microscopia eletrônica de transmissão foram retiradas amostras em diferentes estágios dos cultivos dos microcarregadores porosos, inclusive após a infecção viral. As células foram fixadas com o fixador de Karnovsky, uma solução contendo glutaraldeído (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES – EMS) a 2,5% e paraformaldeído (SIGMA) a 2% em tampão cacodilato (SERVA) 0,1M e pH 7,2 (BOZZOLA et al., 1998; SOUZA, 1998).

Após a fixação inicial, o material foi processado conforme as seguintes etapas:

- a) pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio (MERCK) a 2% em tampão cacodilato 0,1M e pH 7,2;
- b) lavagem em tampão cacodilato 0,1M;
- c) passagem em solução aquosa de acetato de uranila (BAKER) 0,5% contendo sacarose (MERCK);
- d) lavagem em tampão cacodilato 0,1M;
- e) desidratação do material em solução de etanol (SYNTH) em concentrações crescentes de 70%, 90% e 100%;
- f) passagem em uma mistura, em partes iguais, de etanol e óxido de propileno (ALDRICH), seguida de uma passagem em óxido de

propileno puro e então em uma mistura em partes iguais de óxido de propileno e resina;

g) inclusão em resina tipo epon (POLYBED – POLYSCIENCES).

Em seguida foram feitos cortes ultrafinos de 60 – 70nm de espessura utilizando navalha de diamante em ultramicrotomo (SORVALL MT 6000). Os cortes foram contrastados em solução de acetato de uranila (BAKER) a 2,0% e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), analisados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E operando a 80 KV.

Nesta etapa foi analisada a aderência das células sobre os microcarregadores porosos, a morfologia e condição metabólica da célula.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Lise das células e liberação dos núcleos para determinação da concentração celular

Para os microcarregadores porosos Cytopore e Cultispher G não é possível determinar, após tratamento com tampão de lise, por observação direta ao microscópio óptico, o momento em que todos os microcarregadores encontram-se vazios, ou seja, o tempo necessário para lise das células e liberação dos núcleos para determinação da concentração celular. O tempo para a lise celular nos microcarregadores porosos utilizando a solução de violeta de genciana a 0,1% em ácido cítrico 0,1M foi determinado por contagens feitas entre 15 minutos e 3 horas após incubação à temperatura de 37°C. A **figura 1** mostra que o tempo mínimo para a liberação dos núcleos das células do cultivos utilizando o Cytopore foi de 1 hora.

Nas amostras com Cytodex tipo 1 tratadas com solução de violeta de genciana a 0,1% em ácido cítrico 0,1M, é possível observar por microscopia óptica, todos os microcarregadores vazios após 7 a 10 minutos de incubação à temperatura de 37°C.

Figura 1. Concentração de células VERO de culturas utilizando Cytopore, determinada por contagem de núcleos corados, liberados pela lise das células causada pela solução de violeta de genciana a 0,1% em ácido cítrico 0,1M. Os resultados representam valores de 3 ensaios diferentes.

4.2. Cinética de adesão celular

O tempo de adesão das células VERO aos três tipos de microcarregadores com diferentes regimes de agitação foi analisado comparativamente. O tipo de agitação determina além do tempo para a adesão celular, a melhor distribuição das células nos microcarregadores.

Conforme mostrado na **figura 2**, foi observado que a adesão das células aos microcarregadores Cultispher G, constituídos de gelatina, ocorre nos diferentes regimes de agitação, mais lentamente que aos microcarregadores Cytopore e Cytodex 1. O tempo de adesão das células ao Cultispher G foi sempre superior aos 180 minutos analisados. No Cytopore, constituído de celulose, foram obtidos resultados semelhantes ao Cytodex 1, havendo cultivos com 100% de adesão após 30 a 60 minutos da semeadura das células, como pode ser observado na **figura 2d**. No Cytodex 1, constituído de DEAE-dextran, após 30 a 60 minutos cerca de 90% das células estavam aderidas e com 120 minutos os cultivos não mais apresentavam células soltas. Verificamos que estabelecido adequado número de células/microcarregador, o tempo de adesão não depende da concentração de células semeadas. Assim, nas culturas utilizando o Cytopore tanto na concentração de 1 mg/mL quanto 0,5 mg/mL, mantida a proporção de 30 células/microcarregador, a cinética de adesão manteve-se semelhante (**Figura 2a e 2b**).

Figura 2. Cinética de adesão das células VERO aos microcarregadores porosos Cytopore e Cultispher G e microcarregadores sólidos Cytodex 1, em função das condições de agitação da cultura. Observamos as curvas de desaparecimento de células soltas durante as três primeiras horas de cultivo com regime de agitação de 2 minutos a 60 rpm e 20 minutos parado (**figura 2a**), com regime de agitação de 3 minutos a 60 rpm e 30 minutos parado (**figura 2b**) e com regime de agitação contínua (**figura 2c**). Na **figura 2d** temos culturas utilizando o Cytopore, com diferentes regimes de agitação, com 100% adesão das células após 60 minutos de cultivo.

4.3. Cinética da multiplicação celular

A cinética da multiplicação celular nos cultivos de células VERO aderidas à microcarregadores porosos e sólidos foi acompanhada pela determinação da concentração celular em amostras retiradas diariamente destes cultivos (**figura 3**).

As células foram mantidas por um período de até 14 dias, com troca de metade do volume de meio de cultura de manutenção a cada 48 horas após o terceiro dia de cultivo.

Na curva da cultura sobre Cytopore com concentração de 0,5 mg/mL iniciada com 5×10^4 células/mL, como mostra a **figura 3a**, podemos observar que o número máximo obtido de células foi de $2,1 \times 10^6$ células/mL no 12º dia, correspondendo a 43 vezes o número inicial. Na cultura com concentração de 1 mg/mL, iniciada com 10^5 células/mL o aumento foi de 15 vezes, atingindo o valor máximo de $1,5 \times 10^6$ células/mL no 13º dia de cultivo, indicando que o maior aumento do número de células iniciais ocorreu quando utilizamos menores concentrações de microcarregadores.

A **figura 3b** mostra curvas de crescimento das células sobre microcarregadores porosos Cultispher G (1,7 mg/mL). As culturas atingiram número máximo de $1,7 \times 10^6$ células/mL a $1,8 \times 10^6$ células/mL, no 10º e 11º dia correspondendo a 34 e 37,5 vezes, respectivamente, o número inicial de 5×10^4 células/mL semeadas. Não observamos portanto, diferença no rendimento celular quando as culturas foram mantidas em regime de agitação contínuo ou intermitente (3'/30') no período de adsorção das células.

Na **figura 3c** temos a cinética de multiplicação celular nos cultivos utilizando microcarregadores sólidos Cytodex 1. As células entraram em crescimento exponencial a partir do segundo dia, atingindo concentração máxima por volta do 10º e 11º dia de cultivo, dependendo das condições utilizadas. Nos cultivos com concentração de 2 mg/mL, obtivemos $2,2 \times 10^6$

células/mL, correspondendo a 17 vezes o número inicial de $1,3 \times 10^5$ células/mL. Nos cultivos com concentração de 0,4 mg/mL, obtivemos 10^6 células/mL, correspondendo a 20 vezes o número inicial de 5×10^4 células/mL semeadas na cultura. Os resultados indicam que para o Cytodex 1, embora a diferença no aumento do número de células iniciais nas concentrações de 0,4 mg/mL para 2 mg/mL não seja tão grande como verificado para o Cytopore, o maior rendimento ocorreu na menor concentração de microcarregadores.

Figura 3. Cinética da multiplicação de células VERO em microcarregadores porosos Cytopore e Cultispher G e microcarregadores sólidos Cytodex 1 em função da concentração celular inicial e regime de agitação no período de três horas de adsorção das células. As culturas foram realizadas em frascos "spinners" com volume de trabalho de 200 mL em meio Leibovitz (L₁₅) suplementado com 10% de SFB e mantidas à temperatura de 37°C.

4.4. Número de células por microcarregador

A multiplicação celular foi estudada também com o objetivo de se analisar a quantidade máxima de células por microcarregador nos suportes porosos Cytopore e Cultispher G, comparando os valores obtidos nos microcarregadores sólidos Cytodex 1.

Neste trabalho, os cultivos foram iniciados com 30 células/microcarregador para os suportes porosos Cytopore e Cultispher G. No Cytodex 1 com concentração de 0,4 mg/mL, foram utilizadas 30 células/microcarregador e com concentração de 2 mg/mL, 15 células/microcarregador. A **tabela 2** mostra que no Cytopore 0,5 mg/mL conseguimos atingir no 12^o dia de cultivo o valor máximo de 1.265 células/microcarregador, no Cultispher G 1,7 mg/mL, no 13^o dia, 1.103 células/microcarregador e no Cytodex 1 com 2 mg/mL e 0,4 mg/mL obtivemos 256 células/microcarregador no 11^o dia de cultivo e 588 células/microcarregador no 10^o dia, respectivamente.

Tabela 2. Distribuição das células VERO nos microcarregadores Cytopore, Cultispher G e Cytodex 1, na fase inicial de cultivo e onde a concentração celular atingiu o número máximo.

mc.	mg/mL	mc/g seca	mc/mL	cél/mL inicial	cél/mL máximo	dia	cél/mc inicial	cél/mc máximo	Rendimento*
Cytopore	0,5	3,2 x 10 ⁶	1.700	5 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁶	12 ^a	30	1.265	43x
Cultispher G	1,7	10 ⁶	1.700	5 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁶	13 ^a	30	1.103	37,5x
Cytodex 1	2	4,3 x 10 ⁶	8.600	1,3 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁶	11 ^a	15	256	17x
Cytodex 1	0,4	4,3 x 10 ⁶	1.700	5 x 10 ⁴	10 ⁶	10 ^a	30	588	20x

mc = microcarregadores

* Rendimento = aumento do número de células iniciais em relação ao número de células finais

4.5. Produção de vírus rábico em culturas de células VERO aderidas a microcarregadores

A produção do vírus rábico em culturas de células VERO utilizando microcarregadores porosos Cytopore e Cultispher G e microcarregadores sólidos Cytodex 1 está demonstrada na **figura 4**.

A concentração celular no momento da inoculação no cultivo com 0,5 mg/mL de Cytopore foi de $3,5 \times 10^5$ células/mL (**figura 4a**) e com 1 mg/mL, $4,5 \times 10^5$ células/mL (**figura 4b**). Para o Cultispher G, o número de células na infecção foi de $2,5 \times 10^5$ células/mL (**figura 4c**) e para o Cytodex 1 com concentração de 2 mg/mL, $1,4 \times 10^6$ células/mL (**figura 4d**).

No Cytopore com concentração de 0,5 mg/mL o título obtido 96 horas após a infecção foi de $10^{4,8}$ FFD₅₀/mL quando a concentração celular atingiu 5×10^5 células/mL. Na concentração de 1 mg/mL, a concentração celular atingiu também 5×10^5 células/mL nas 96 horas após a infecção e o título obtido foi de $10^{4,5}$ FFD₅₀/mL. O título obtido no Cultispher G no mesmo período foi de $10^{4,7}$ FFD₅₀/mL e concentração celular de $3,8 \times 10^5$ células/mL.

No Cytodex com 2 mg/mL, nas condições de trabalho utilizadas, a replicação viral não mostrou bom rendimento. A concentração celular atingida após as 96 horas foi superior ao número obtido nos microcarregadores porosos, alcançando $1,3 \times 10^6$ células/mL, porém o título máximo foi de $10^{3,2}$ FFD₅₀/mL, mostrando que a infecção, replicação e liberação do vírus rábico no sobrenadante ocorreu de forma mais efetiva nas células cultivadas nos microcarregadores porosos e que a concentração celular é também fator determinante para a obtenção de um bom título viral.

Figura 4. Produção do vírus rábico (PV/VERO) em culturas de células VERO aderidas à microcarregadores porosos Cytopore e Cultispher G e sólidos Cytodex 1, infectadas com 0,05 MOI. As culturas foram mantidas à temperatura de 37°C sob agitação intermitente (3'/15') a 60 rpm por um período de uma hora para adsorção do vírus às células e em seguida passou a agitação contínua. A titulação do vírus foi realizada em amostras do sobrenadante retiradas 48, 72 e 96 horas após a infecção.

4.6. Microscopia óptica

Na microscopia óptica os microcarregadores porosos Cytopore e Cultispher G e sólidos Cytodex 1 foram observados em diversas condições.

Primeiramente os microcarregadores foram fotografados vazios hidratados em tampão PBS. As **figuras 5 e 6** mostram as diferenças estruturais entre os três tipos de suportes. Podemos observar que o Cytopore apresenta homogeneidade no tamanho dos microcarregadores (**figuras 5a e 5b**). O Cultispher G é o de maior irregularidade, tanto no formato quanto no tamanho dos microcarregadores (**figura 6a**). O Cytodex 1 apresenta irregularidade apenas no tamanho dos microcarregadores (**figura 6b**).

A estrutura dos microcarregadores porosos foi observada também em cortes histológicos dos suportes incluídos em historesina. Os microcarregadores Cytopore coram-se em rosa pela coloração de Giemsa. Os Cultispher G foram corados com solução de azul de toluidina. As **figuras 7a e 7b** mostram as superfícies disponíveis para a adesão celular.

Por microscopia óptica foi possível a observação das células VERO aderidas ao Cytodex 1, como pode ser visto na **figura 8**. A figura mostra que é possível para o suporte sólido a análise e avaliação da cobertura celular por observação ao microscópio óptico.

Os microcarregadores porosos contendo células VERO foram analisados em cortes histológicos incluídos em historesina. As **figuras 9 e 10** mostram as células VERO colonizando o Cytopore e a **figura 11** o Cultispher G.

(a)

(b)

Figura 5. Fotomicrografia de microcarregadores porosos Cytopore hidratados em tampão PBS, mostrando homogeneidade de tamanho e forma do suporte. Figura 5a, aumento 154x e Figura 5b 93x.

(a)

(b)

Figura 6. Fotomicrografia de microcarregadores porosos Cultispher G e sólidos Cytodex 1 hidratados em tampão PBS. A figura 6a mostra grande irregularidade na forma e tamanho do Cultispher G. Aumento 154x. A figura 6b mostra diferenças no tamanho dos microcarregadores sólidos Cytodex 1. Aumento 180x.

(a)

(b)

Figura 7. Fotomicrografia de corte histológico de microcarregadores porosos Cytopore e Cultispher G vazios e incluídos em historesina. Na figura 7a, as cabeças de seta indicam as superfícies de adesão celular do Cytopore corado por Giemsa. Aumento 627x. A figura 7b mostra o Cultispher G corado por azul de toluidina. As setas indicam as superfícies de adesão celular. Aumento 211x.

Figura 8. Fotomicrografia de microcarregadores sólidos Cytodex 1 totalmente cobertos por células VERO no 4^º dia de cultivo. As setas indicam os microcarregadores vazios. Aumento 204x.

Figura 9. Fotomicrografia de corte histológico de Cytopore contendo células VERO no 6^a dia de cultivo e corados por Giemsa. Na figura 9a a seta maior indica as células coradas em azul, populando a superfície externa do suporte (seta menor) e corado em rosa. Aumento 198x. A figura 9b mostra o mesmo microcarregador em aumento de 596x. A seta indica uma camada celular sobreposta às células aderidas ao microcarregador indicado pela cabeça de seta.

Figura 10. Fotomicrografia de corte histológico do Cytopore com 5 dias de cultivo contendo células VERO ocupando a periferia do suporte (figura 10a). Aumento 755x. Na figura 10b observa-se o Cytopore no 6º dia de cultura, com poucas células aderidas (*), com células na periferia do suporte (**) e ocupando a superfície interna do mesmo (***). Aumento 198x. Coloração de Giemsa.

(a)

(b)

Figura 11. Fotomicrografia de corte histológico do Cultispher G contendo células VERO com 6 dias de cultivo, corado por Giemsa. Na figura 11a verifica-se a formação de monocamada de células na superfície externa do suporte. Aumento de 295x. Na figura 11b observa-se que os microcarregadores tendem a se unir pela característica de aderência das células VERO que recobrem o suporte. Aumento 152x.

4.7. Microscopia eletrônica de varredura

Na microscopia eletrônica de varredura os microcarregadores porosos Cytopore e Cultispher G e sólidos Cytodex 1 foram analisados vazios e contendo células, antes e após a infecção com o vírus rábico.

A **figura 12** mostra o Cytopore vazio e as **figuras 13 e 14**, contendo células VERO. Podemos verificar que as células aderem-se à superfície do suporte deixando espaços entre os poros, o que permite pela agitação do sistema, a circulação do meio de cultura para nutrição das células dispostas na parte interna do microcarregador. **Na figura 15** as células estão infectadas com o vírus rábico.

Nas **figuras 16 e 17** observamos o Cultispher G vazio e coberto por células VERO. Como verificado na microscopia óptica, o Cultispher G apresenta menor espaço interno para crescimento celular, o que leva as células a cobrir externamente o suporte. Como para o Cytopore, pequenos espaços entre as células permite que o meio de cultura circule adequadamente no interior do microcarregador. A **figura 18** mostra células VERO infectadas com o vírus rábico aderidas ao Cultispher G.

As **figuras 19 e 20** mostram os microcarregadores Cytodex 1 vazio (**19a**) e cobertos por células VERO não infectadas (**19b**) e células VERO, 96 horas após a infecção pelo vírus rábico, mantendo sua integridade e aderência ao microcarregador (**20 c e 20d**). Verifica-se a homogênea distribuição das células sobre o microcarregador e do vírus sobre as células.

Figura 12. Elétron micrografias dos microcarregadores porosos Cytopore vazios hidratados em tampão PBS em aumento de 49x na figura 12a e de 290x na figura 12b. A seta indica a área da superfície interna do suporte disponível para adesão celular.

Figura 13. Elétron micrografias de microcarregadores porosos Cytopore contendo células VERO no 6^a dia de cultivo. Na figura 13a as setas indicam as células ocupando os poros do suporte. Aumento de 220x. Na figura 13b as setas indicam os espaços pelos quais o meio de cultura circula para nutrição das células na região interna do microcarregador. Aumento 2.500x.

Figura 14. Elétron micrografias das células VERO aderidas ao microcarregador poroso Cytopore em aumento (a) 1.174x e (b) 1040x.

Figura 15. Elétron micrografias de microcarregadores porosos Cytopore contendo células VERO, 96 horas após infecção com o vírus rábico (PV/VERO). Figura 15a, aumento 364x. Na figura 15b a seta indica células sem vírus expostos superficialmente e na figura 15c células dispostas mais internamente no suporte cobertas por vírus. Aumento (a) 2570x e (b) 3025x.

(a)

(b)

Figura 16. Elétron micrografia do microcarregador poroso Cultispher G vazio (figura 16a) em aumento de 464x e contendo células VERO no 6^o dia de cultivo em aumento de 136x (figura 16b).

(a)

(b)

Figura 17. Elétron micrografia de um microcarregador Cultispher G contendo células VERO no 6^a dia de cultivo em aumento de 434x na figura 17a e o mesmo microcarregador na figura 17b, em aumento de 1.667x, mostrando a disposição das células na superfície do suporte.

Figura 18. Elétron micrografia do microcarregador poroso Cultispher G contendo células VERO 96 horas após infecção com o vírus rábico (PV/VERO) em aumento de 800x na figura 18a e o mesmo microcarregador em aumento de 1.670x na figura 18b e 4.940x na figura 18c.

Figura 19. Elétron micrografia do microcarregador sólido Cytodex 1, na figura 19a, em aumento de 520x e na figura 19b, contendo células VERO no 6^º dia de cultivo, em aumento de 420x.

Figura 20. Elétron micrografia do microcarregador sólido Cytodex 1, contendo células VERO 96 horas após a infecção com o vírus rábico (PV/VERO), em aumento de 630x na figura 20a e em aumento de 870x na figura 20b, mostrando os vírus expostos na superfície da célula.

4.8 Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para análise das células VERO quanto a sua viabilidade e aderência aos microcarregadores porosos Cytopore e Cultispher G. As células foram observadas também após a infecção com o vírus rábico Pasteur (PV/VERO).

Na **figura 21** podemos observar a célula VERO no 6^o dia de cultivo e nas **figuras 22 e 23** a célula VERO 96 horas após a infecção viral, aderida ao Cytopore.

As células VERO em cultivos utilizando o microcarregador Cultispher G estão na **figura 24**, também no 6^o dia de cultivo e nas **figuras 25 e 26**, 96 horas após a infecção.

Por este tipo de microscopia podemos observar o vírus na superfície e no interior da célula, assim como nos espaços entre a célula e o microcarregador após sua liberação no meio.

(a)

(b)

Figura 21. Elétron micrografia das células VERO (c) aderidas ao microcarregador poroso Cytopore (mc). Aumento 10.550x.

Figura 22. Elétron micrografia das células VERO (c) aderidas ao microcarregador Cytopore (mc) e infectadas com o vírus rábico PV/VERO indicados pelas setas. Figura 22a aumento de 10.070x e figura 22b aumento de 32.425x.

Figura 23. Elétron micrografia da célula VERO (c) infectada com o vírus rábico. As setas indicam os vírus formados e as cabeças de setas mostram o vírus em interação com a membrana celular. Podemos observar ainda a formação de uma vesícula (v) no citoplasma da célula contendo grande quantidade de vírus. Aumento 47.765x.

Figura 24. Elétron micrografia das células VERO (c) aderidas ao microcarregador poroso Cultispher G (mc). Figura 24a aumento de 8.375x e figura 24b aumento de 6.612x.

Figura 25. Elétron micrografia das células VERO (c) aderidas ao microcarregador Cultispher G (mc) e infectadas com o vírus rábico PV/VERO indicado pelas setas. Figura 25a aumento 36.880x e figura 25b aumento de 10.480x.

Figura 26. Elétron micrografia das células VERO (c) aderidas ao microcarregador Cultispher G (mc), infectadas com o vírus rábico. As setas indicam os vírus formados. Aumento 6.606x.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Células de mamíferos têm se tornado de grande interesse para obtenção de produtos biotecnológicos de potencial importância comercial e de alto valor agregado (GLACKEN et al, 1983; HU et al, 1997).

Embora as culturas de células aderidas a microcarregadores sejam conhecidas desde a década de 60 (VAN WEZEL, 1967), muitos pesquisadores ainda se dedicam ao estudo destes cultivos nos mais variados aspectos para o estabelecimento de um sistema bem definido que permita a produção em larga escala de produtos biológicos.

Neste trabalho procuramos estudar alguns dos fatores que envolvem o bom cultivo de células VERO utilizando microcarregadores porosos, como a constituição do suporte, a concentração de microcarregadores e de células, a adesão e distribuição celular, comparando com seu comportamento em microcarregadores sólidos e a possível utilização destas culturas na obtenção de antígenos virais.

O primeiro aspecto analisado foi relativo à determinação da concentração de células aderidas à microcarregadores pelo método indireto de contagem de núcleos liberados pela lise celular. Verificamos que os microcarregadores porosos têm a desvantagem de necessitar de um tempo muito superior de incubação à temperatura de 37°C das amostras tratadas com o ácido cítrico para a lise das células, que foi de no mínimo 1 hora, em relação aos microcarregadores sólidos que foi de 7 minutos, além de não permitir a visualização direta dos microcarregadores totalmente vazios para o estabelecimento deste tempo e determinação do período de infecção viral, como ocorre para os microcarregadores sólidos Cytodex 1.

A velocidade e o tipo de agitação do sistema no período de adesão das células são, entre outros fatores, determinantes para uma boa

distribuição das células nos microcarregadores e consequentemente para o melhor aproveitamento da área de cultivo do suporte. Neste trabalho variamos apenas o tipo agitação nas três primeiras horas de cultivo das culturas realizadas para avaliação do tempo de adesão das células. Tanto no regime intermitente, incluindo as variações nos tempos de agitação, quanto no regime contínuo, observamos que com duas horas de cultivo não havia mais células soltas no sobrenadante das culturas utilizando o Cytopore e o Cytodex 1, ao contrário dos cultivos em Cultispher G, que necessitaram de um período superior a 3 horas para adesão total das células semeadas nas culturas. Para o Cytodex 1, foi possível verificar por microscopia óptica de amostras das culturas, que no regime contínuo obtivemos melhor distribuição das células nos microcarregadores. Verificamos que, em geral, com 2 horas de cultivo 100% das células semeadas estavam aderidas. NG et al (1995) e LIM et al (1992), estudaram a interferência das variações no regime de agitação na distribuição das células nos microcarregadores e a formação de agregados celulares. Nestes trabalhos, foi observado que em culturas utilizando o Cytodex 1, sob o regime de agitação contínuo, 95 a 100% dos microcarregadores estavam ocupados após a adesão total das células, enquanto que no regime intermitente mais de 10% dos microcarregadores ainda se apresentavam vazios após 2 horas de cultivo. Para os cultivos utilizando o Cultispher G, estes autores mostraram que no regime contínuo de agitação ocorreu a formação de agregados de células, o que por sua vez, leva a uma irregular ocupação dos microcarregadores, enquanto que sob regime intermitente de agitação (3' / 33'; 40rpm) a adesão celular melhorou significativamente, diminuindo a ocorrência de agregados e a distribuição das células ocorreu de forma mais uniforme. Estes trabalhos mostraram ainda culturas com 20% das células soltas após 6 horas de cultivo. Nos experimentos realizados neste trabalho não foi observado a formação de agregados para nenhum dos três tipos de

microcarregadores. A impossibilidade de visualizar as células nos microcarregadores porosos dificultou uma análise mais detalhada destas culturas.

O tempo para adesão das células VERO aos microcarregadores depende também a influência da composição do suporte. Os microcarregadores comercialmente conhecidos, são constituídos por dextrana, gelatina, celulose, plásticos (poliestireno e poliacrilamida) e vidro (BUTLER, 1991; NILSSON et al, 1986; NIKOLAI et al, 1992). Nas culturas realizadas, verificamos que o maior tempo para a adesão celular ocorreu nos microcarregadores porosos compostos de gelatina Cultispher G, fato também descrito nos trabalhos de CAHN (1990) e NIKOLAI et al. (1992).

O número de células iniciais, assim como a concentração de microcarregadores, são fatores limitantes no rendimento celular. As culturas realizadas com 1 mg/mL de Cytopore atingiram em média 470 células/microcarregador, ou seja, 15 vezes a quantidade inicial e com 0,5 mg/mL, chegou a 1.265 células/microcarregador, equivalente a 43 vezes o semeado. Nas culturas em Cytodex 1 com concentração de 0,4 mg/mL obtivemos 588 células/microcarregador, um rendimento de 20 vezes o número inicial, enquanto que nas culturas com 2 mg/mL, o rendimento foi de 17 vezes, sendo obtido 256 células/ microcarregador. FORESTELL et al (1991), CROUGHAN et al (1987) e SHIRAGAMI et al (1993) estudaram os efeitos da concentração de células e microcarregadores e os efeitos hidrodinâmicos do meio e das colisões entre os microcarregadores na cultura. SHIRAGAMI et al (1993) verificou que em seus experimentos, células CHO, cultivadas sobre microcarregadores porosos com concentração de 5 g/L de Cultispher G e agitação de 60 rpm, atingiram o número máximo de 560 células/microcarregador, correspondendo a densidade celular de $2,2 \times 10^6$ células/mL. Com concentração de 0,5 g/L foi obtido 1.200 células/microcarregador.

NG et al (1995) estudaram também a multiplicação celular em função do número de células/microcarregador iniciais, variando de 15 a 590 células/microcarregador. Culturas semeadas com 30 células/microcarregador atingiram 1.176 células/microcarregador, que corresponde à um aumento de 39 vezes, valores semelhantes aos obtidos no nosso trabalho e quando iniciadas com 590 células/microcarregador o rendimento foi de apenas 2,8 vezes, obtendo o número de 1.667 células/microcarregador. Nossos dados mostram uma boa performance das culturas utilizando microcarregadores porosos e a possibilidade de futuras otimizações. Verificamos ainda que os microcarregadores porosos podem ser utilizados em baixas concentrações para obtenção de equivalente número de células ao que pode ser alcançado em maiores concentrações de Cytodex 1. Em uma cultura com 0,5 mg/mL de Cytopore chegamos ao número de $2,1 \times 10^6$ células/mL, enquanto que com 2 mg/mL de Cytodex 1 obtivemos $2,2 \times 10^6$ células/mL. A possibilidade de uso de menores concentrações de microcarregadores porosos indica não só uma possível redução de custo, mas também a otimização da concentração celular.

A redução de custo na utilização do microcarregador poroso foi avaliada comparativamente com o Cytodex, com base nos valores oferecidos por fornecedores. Os microcarregadores porosos Cytopore são comercializados em frasco de 20 gramas pelo preço de R\$ 903,94 e o Cytodex 1 em frasco de 25 gramas por R\$ 316,00. Considerando uma cultura de 1 litro na qual podemos utilizar o Cytopore em concentração de 0,5 mg/mL para obtenção de equivalente número de células que uma cultura com 2 mg/mL de Cytodex 1, como descrito anteriormente, temos que o custo, em microcarregador, da cultura para o Cytopore é aproximadamente de R\$ 22,60, enquanto que para o Cytodex 1 o custo é cerca de R\$ 26,33.

Outro fato observado também, foi que os microcarregadores porosos compostos por gelatina são susceptíveis à ação de restos de tripsina. Esta

ação foi observada após a semeadura das células, pela fragmentação dos microcarregadores, provavelmente pela presença de resíduos de tripsina que podem permanecer no preparo da suspensão celular. A fragmentação dos microcarregadores foi evitada com a centrifugação e ressuspensão em novo meio de cultura das células, para total neutralização da ação da tripsina, antes de serem transferidas para o cultivo. No entanto este procedimento não é indicado e viável para culturas em grandes volumes e o uso de inibidores da tripsina devem ser estudados.

A escolha da célula, a otimização dos vários aspectos que envolvem o sistema de cultura celular e o produto que se pretende obter devem ser bem definidos e estabelecidos. Microcarregadores porosos foram estudados com diferentes objetivos, como a análise da cultura de diferentes tipos celulares quanto a cinética de adesão e multiplicação celular, a composição dos suportes existentes e a possibilidade de sua utilização na obtenção de produtos. Cultura de hepatócitos (WERNER et al; 2.000), cultura de células tumorais (MAURER et al, 1999), replicação viral (NIKOLAI et al, 1992; BERRY et al, 1.999) e crescimento de células bacterianas (RAIHAN et al, 1997) são alguns exemplos da utilização dos microcarregadores porosos.

O conhecimento do mecanismo de infecção célula a célula do vírus rábico (SUPERTI et al, 1984; HUMMELER et al, 1969), da resposta celular à infecção pelo vírus (BUSSREAU et al, 1982; TANABE et al, 1979) e de resultados obtidos em microcarregadores sólidos Cytodex 1 (MENDONÇA et al, 1993), nos levou a prever êxito na replicação do vírus rábico em células VERO utilizando suportes porosos. Neste trabalho, os títulos virais obtidos nas culturas utilizando microcarregadores porosos foram satisfatórios no período de replicação viral analisado, uma vez que os valores obtidos foram superiores aos do Cytodex 1. Condições ideais de cultivo, como agitação de 50rpm e temperatura de 34°C após a inoculação do vírus deverão ainda ser objetos de estudo (GUIDOLIN et al, 1983; MENDONÇA et al, 1993). A

otimização destes parâmetros poderiam nos levar a títulos ainda mais altos. Pelos dados obtidos, verificamos ainda que a replicação viral não é determinada somente pela concentração celular, uma vez que o maior número de células no Cytodex 1 não resultou em maior título do vírus nas mesmas condições de infecção.

Para monitoramento e avaliação do crescimento celular foi utilizado método de microscopia óptica de observação direta do material em suspensão, ou em cortes histológicos incluídos em resina e microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

Os três tipos de microscopias utilizadas neste trabalho exerceram funções complementares entre si. Embora não possam ser utilizadas como métodos de rotina, foram conclusivos na demonstração de vários aspectos das culturas em microcarregadores, como a estrutura dos microcarregadores a ocupação dos suportes pelas células e as interações dos vírus com as células.

A microscopia óptica por observação direta das células aderidas aos microcarregadores foi útil apenas para o Cytodex tipo 1. Como verificado nos trabalhos de BERRY et al. (1999) e GOETGHEBEUR et al. (1991), este método permite a observação da morfologia celular, assim como sua distribuição nos microcarregadores e como parâmetro para determinação do período de infecção viral. Para os microcarregadores porosos, este método foi possível na demonstração das diferenças superficiais de forma e tamanho dos suportes vazios. Como descrito na literatura, a observação direta das células nos microcarregadores porosos em suspensão só foi possível por técnica de coloração com solução de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), utilizada por RASEY et al (1996), ou solução de vermelho neutro a 0,1% em tampão PBS, utilizada por NG et al (1995). Neste trabalho, a observação da ocupação celular nos microcarregadores porosos foi realizada em cortes histológicos do material incluído em

historesina. CAHN (1990) trabalhando com células CV-1, GOETGHEBEUR et al (1991) com células 293, CHO, células testicular de porco e VERO e RASEY et al (1996) com células A549, KB 3-1, KB 8-5 e V79 sugerem que as células colonizam inicialmente a periferia do microcarregador e com a multiplicação migram para o interior do mesmo, com a formação de monocamadas. Estes autores contrariaram dados descritos por BANCEL et al (1996), sobre a ocupação periférica das células nos microcarregadores. Os microcarregadores sólidos não foram observados em cortes histológicos pela ocorrência de danos mecânicos provocados pela secção do material, uma vez que a resina não tem boa impregnação devido a conformação do suporte.

A microscopia eletrônica de varredura possibilitou o estudo topográfico dos suportes e das células antes e após a infecção, complementando em alguns aspectos a microscopia óptica. No Cytopore foi possível observar que os vírus têm a capacidade de atingir células situadas no centro dos microcarregadores. Desta forma, não só as células como também os vírus podem ser protegidos dos danos físicos decorrentes da agitação do sistema. A disposição das células nos três suportes também são bem distintas. No Cytopore elas distribuem-se mais internamente, sendo que a observação de microcarregadores cobertos externamente pelas células ocorre quando a cultura atinge concentrações celulares mais altas. No Cultispher G, visto o menor espaço interno para ocupação das células, demonstrado nos cortes histológicos do suporte pela microscopia óptica, a maioria dos microcarregadores aparece totalmente recobertos pelas células. No Cytodex 1 a nítida individualização das células foi a característica mais diferenciada das células com relação aos microcarregadore porosos.

No Cytodex observamos nas imagens de microscopia eletrônica de varredura que os vírus se expõem de forma regular por toda a membrana das células que cobrem o microcarregador (WUNNER et al, 1984). No

Cytopore podemos propor a possibilidade do vírus infectar inicialmente a células na superfície do microcarregador e posteriormente, com sua liberação no meio de cultura, ou pela capacidade de infecção célula a célula infectar as células no centro do microcarregador.

A microscopia eletrônica de transmissão por sua vez, mostrou que as células que populam o microcarregador poroso, mantiveram-se viáveis. O estudo da morfologia destas células, permite o estudo do estabelecimento das condições ideais de agitação e meio de cultura do sistema. Este método possibilitou também um estudo morfológico do vírus, sendo possível a observação dos vírus em interação com a membrana celular e após sua liberação no meio. Como descrito na literatura, a agitação superior a 100rpm determina uma queda no rendimento celular, podendo interferir também em sua viabilidade (ALVES et al, 1995; NG et al, 1995; SHIRAGAMI et al, 1993; ADEMA et al, 1990; CROUGHAN et al, 1986).

Assim, os resultados obtidos pela microscopia óptica, na qual pudemos observar a ocupação de toda a parte interna dos microcarregadores porosos com células, a observação pela microscopia eletrônica e de varredura da condição metabólica destas células e sua interação com o vírus, os títulos alcançados e a maior densidade celular atingida em baixas concentrações de microcarregadores porosos em relação ao Cytodex 1, indicam a utilidade destes suportes porosos e a potencialidade do sistema para otimização posterior na obtenção produtos biotecnológicos em geral.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- As células VERO mostraram capacidade de adesão aos microcarregadores porosos Cytopore, constituído de celulose semelhante ao observado nos microcarregadores sólidos Cytodex 1, constituídos de DEAE-dextrana. No Cultispher G, constituído de gelatina, as células necessitaram de um período mais longo para aderirem-se ao suporte.

- A maior área de superfície de cultivo dos microcarregadores porosos permite uma multiplicação das células VERO superior ao do Cytodex 1. Nas mesmas condições de cultivo, o aumento máximo alcançado no Cytodex foi 1 de 20 vezes o número de células iniciais, enquanto que no microcarregador poroso Cytopore foi de 43 vezes e no poroso Cultispher G foi de 37,5 vezes.

- Os microcarregadores porosos Cytopore, assim como o microcarregador poroso Cultispher G, apresenta rendimento celular superior ao microcarregador sólido Cytodex 1. No Cytopore foi possível atingir um número 1.265 células/microcarregador e no Cultispher G 1.103 células/microcarregador, enquanto que no Cytodex 1, o máximo alcançado foi de 588 células/microcarregador, mas mesmas condições de cultura.

- As células VERO cultivadas em microcarregadores porosos Cytopore e Cultispher G podem ser utilizados com êxito na replicação do vírus rábico, cepa vacinal Pasteur do vírus rábico (PV/VERO), mesmo em baixas concentrações celulares.

- Os microcarregadores porosos Cytopore podem ser utilizados com concentração do suporte e de células menores que as utilizadas para os cultivos no Cytodex 1, levando a obtenção de número de células equivalente. Uma cultura utilizando Cytodex 1 com concentração de 2 mg/mL iniciada com $1,3 \times 10^5$ células/mL atingiu mesmo número de células que nos cultivos utilizando Cytopore com concentração de 0,5 mg/mL semeado com 5×10^4 células/mL. A possibilidade de utilização em menores concentrações dos microcarregadores porosos indica não só uma possível redução de custo, como também a otimização da concentração celular necessária na semeadura das culturas.

- Microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura e transmissão foram conclusivos na demonstração da eficiência dos microcarregadores porosos em vários aspectos. Pela microscopia óptica verificamos a ocupação do interior dos microcarregadores pelas células VERO, com aproveitamento máximo do espaço interior do suporte e a distribuição das células no mesmo. A microscopia eletrônica de varredura nos ofereceu uma demonstração topográfica e tridimensional do sistema, quanto a distribuição celular nos microcarregadores, a exposição dos vírus na superfície das células VERO e a disposição das células de forma a não obstruir totalmente os poros do suporte, permitindo a circulação do meio de cultura para nutrição das células dispostas no interior do microcarregador. Na microscopia eletrônica de transmissão podemos verificar a viabilidade das células e sua interação com o microcarregador e com o vírus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTON, R.T.; BARSTAD, P. A.; ZWERNER, R. K. Propagation and Scaling-Up of Suspension Cultures. In: **Methods in Enzymology - Volume LVIII – Cell Culture**. Academic Press, Inc., p. 220-221, 1979.

ADEMA, E.; SHNEK, D.; CAHN, F.; SINSKEY, A. J. Use of Porous Microcarriers in Agitated Cultures. **BioPharmaceuticals** v. 3, p. 20 – 24, 1990.

AHN, F. Biomaterials aspects porous microcarriers for animal cell culture. **Trends Biotechnol.**, v. 8(5), p. 131-136, 1990.

ALVES, P. M.; MOREIRA, J. L.; RODRIGUES, J. M.; AUNINS, J. G.; CARRONDO, M. J. T. Two-Dimensional Versus Three-Dimensional Culture Systems: Effects on Growth and Productivity of BHK Cells. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 52, p. 429 - 432, 1996.

ALTANKOV, G.; BRODVAROVA, I.; RASHKOV, I. Synthesis of protein-coated gelatin microspheres and their use as microcarriers for cell-culture. Part I. Derivatization with native collagen. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.**, v. 2, p. 81 – 89, 1991.

BANCEL, S.; Hu, W.-S. Confocal Laser Scanning Microscopy Examination of Cell Distribution in Macroporous Microcarriers. **Biotechnol. Prog.**, v. 12, p. 398 – 402, 1996.

- BERRY, J. M.; BARNABÉ, N.; COOMBS, K. M.; BUTLER, M. Production of Reovirus Type-1 and Type-3 from VERO Cells Grown on Solid and Macroporous Microcarriers. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 62(1), p. 12 – 9, 1999.
- BOZZOLA, J. J.; RUSSEL, L. D. In: **Electron Microscopy 2^a ed.** Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts, 1998
- BUSSEAU, F.; PERRIN, P. Cellular Response to Rabies Virus Infection. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 5 (1 – 3), p. 49 – 59, 1982.
- BUTLER, M. The characteristics and growth of cultured cells. In: **Mammalian Cell Biotechnology – A Practical Approach**, Oxford University Press, p. 20-21, 1991.
- CAHN, F. Biomaterials aspects of porous microcarriers for animal cell culture. **Trends Biotechnol.**, v. 8(5), p. 131 – 136, 1990;
- CONTI, C.; TSIANG, H. Effect of concanavalin A on the early events of rabies virus infection of CER cells. **Intervirology**, v. 24(3), p. 166 – 169, 1985.
- CONTI, C.; SUPERTI, F.; DIVIZIA, M.; PANA, A.; ORSI, N. Effect of inhibitors of cytoplasmic structures and functions on rabies virus infection in vitro. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 13(3), p. 137 – 146, 1990.
- CROUGHAN, M. S.; HAMEL, J.-F.; WANG, D. I. C. Hydrodynamic Effects on Animal Cells Grown in Microcarrier Cultures. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 29, p. 130 – 141, 1987

- CROUGHAN, M. S.; HAMEL, J.- F.; WANG, D. I. C. Effects of Microcarrier Concentration in Animal Cell Culture. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 32, p. 975 – 982, 1988
- DICKSON, A. J. Protein expression and processing. In: **Mammalian Cell Biotechnology – A Practical Approach**, Oxford University Press, p. 85 - 108, 1991.
- EARLEY, E. M.; JOHNSON, K. M. The lineage of the VERO, VERO 76 and its clone C1008 in the United States. In: **VERO CELLS – Origin, Properties and Biomedical Applications**, Department of Microbiology School of Medicine Chiba University, p. 26-29, 1988.
- FITZGERALD, E. A.; CABASSO, V. J.; SMITH, J. S.; RASTOGI, S. C. A collaborative study on the testing of rabies immune globulin (human) by the mouse neutralization test (MNT) and the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT). **J. Biol. Stand.**, v. 7, p. 67 – 72, 1979.
- FLEISCHAKER, R. Microcarrier Cell Culture. In: **Large Scale Cell Culture Technology** Carl Hanser Verlag, Munich, Vienna, New York, p. 66-67, 1987.
- FORESTELL, S. P.; KALOGERAKIS, N.; BEHIE, L. A.; GERSON, D. F. Development of the optimal inoculation conditions for microcarriers cultures. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 39, p. 305 – 313, 1992.
- FRESHNEY, R. I. In: **Culture of Animal Cells – Third Edition – A Manual of Basic Technique**, John Wiley & Sons, Inc., Publication, New York, 1994

GALLEGOS GALLEGOS, R. M.; ESPINOSA LARIOS, E. L.; RAMOS RAMIREZ, L.; KRETSCHMER SCHMID, R.; AGUILAR SETIEN, A. Rabies veterinary virus vaccine produced in BHK-21 cells grown on microcarriers in a bioreactor. **Arch. Med. Res.**, v. 26(1), p. 59 – 63, 1995.

GLACKEN, M. W.; FLEISCHAKER, R. J.; SINSKEY, A. J. Large-scale Production of Mammalian Cells and Their Products: Engineering Principles and Barriers to Scale-up. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 413, p. 355 – 372, 1983.

GOETGHEBEUR, S.; HU, W.-S. Cultivation of anchorage-dependent animal cells in microsphere-induced aggregate culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 34, p. 735 – 741, 1991.

GOVORKOVA, E. A.; MURTI, G.; MEIGNIER, B.; de TAISNE, C.; WEBSTER, R. G. African green monkey kidney (Vero) cells provide an alternative host cell system for Influenza A and B viruses. **J. Virol.**, v. 70(8), p. 5519 – 5524, 1996.

GRIFFITHS, B. Products from animal cells. In: **Mammalian Cell Biotechnology – A Practical Approach**, Oxford University Press, p. 207 - 235, 1991.

GRÖHN, P.; KLÖCK, G.; ZIMMERMANN, U. Collagen-Coated Ba²⁺ - Alginate Microcarriers for the Culture of Anchorage-Dependent Mammalian Cells. **BioTechniques**, v. 22, p. 970 – 975, 1997.

GUIDOLIN, R.; BALTAZAR, M. C.; ZELANTE, F. Produção da vacina anti-rábica veterinária em suspensão de células BHK. **Ver. Microbiol.**, São Paulo, v. 14(1), p. 27 – 35, 1983.

- HANDA-CORRIGAN, A. Bioreactors for mammalian cells. In: **Mammalian Cell Biotechnology – A Practical Approach**, Oxford University Press, p. 139-157, 1991.
- HARBOUR, C.; FLETCHER, A. Hybridomas: production and selection. In: **Mammalian Cell Biotechnology – A Practical Approach**, Oxford University Press, p. 109 - 138, 1991.
- HIMES, V. B.; HU, W-. S. Attachment and growth of mammalian cells on microcarriers with different ion exchange capacities. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 29, p. 1155 – 1163, 1987.
- HU, W-. S.; GIARD, D. J.; WANG, D. I. C. Serial Propagation of Mammalian Cells on Microcarriers. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 27, p. 1466 - 1476, 1985.
- HU, W-. S.; MEIER, J.; WANG, D. I. C. A Mechanistic Analysis of the Inoculum Requirement for the Cultivation of Mammalian Cells on Microcarriers. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 27, p. 585 - 595, 1985.
- HU, W-. S.; AUNINS, J. G. Large-scale mammalian cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 148 – 153, 1997.
- HUMMELER, K.; KOPROWSKI, H. Investigating the rabies virus. **Nature**, February 1, v. 221 (179), p. 418 – 421.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A.; BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N. Raiva e Infecções por vírus lentos. In: **Microbiologia Médica**, Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1991.

- JENKINS, N. Growth factors. In: **Mammalian Cell Biotechnology – A Practical Approach**, Oxford University Press, p. 39-55, 1991.
- JOHANSON, A.; NIELSON, V. Biosil[®] a new microcarrier. **Dev. Biol. Stand.**, v. 46, p. 125 – 129, 1980.
- JUNQUEIRA, L. C. U. Histology revisited – Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. **Ciência e Cultura (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science)**, January/April, v. 47 (1/2), p. 92 – 95, 1995.
- KENNARD, M. L.; PIRET, J. M. Membrane anchored protein production from spheroid, porous, and solid microcarrier Chinese Hamster Ovary cell cultures. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 47, p. 550 – 556, 1995.
- KILBURN, D. G. Monitoring and control of bioreactors. In: **Mammalian Cell Biotechnology – A Practical Approach**, Oxford University Press, p. 159-185, 1991.
- LAZAR, A.; SIVERSTEIN, L.; MARGEL, S.; MIZRAHI, A. Agarose-polyacrolein microsphere beads: a new microcarrier culturing system. **Dev. Biol. Stand.**, v. 60, p. 457 – 465, 1985.
- LEE, J. -Y.; MARSHALL, J. A.; BOWDEN, D. S. Localization of rubella virus core particles in Vero Cells. **Virology**, v. 265, p. 110 – 119, 1999.
- LEVINE, D. W.; WANG, D. I. C.; THILLY, W. G. Optimization of Growth Surface Parameters on Microcarrier Cell Culture. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 21, p. 821 – 845, 1979.

- LIM, H. S.; HAN, B. K.; KIM, J. H.; PESHWA, M. V.; HU, W.-S. Spatial distribution of mammalian cells grown on macroporous microcarriers with improved attachment kinetics. **Biotechnol. Prog.**, v. 8(6), p. 486 – 493, 1992.
- MacDONALD, C. Genetic engineering of animal cells. In: **Mammalian Cell Biotechnology – A Practical Approach**, Oxford University Press, p. 57 - 83, 1991.
- MARTENS, D. E.; NOLLEN, E. A. A.; HARDEVELD, M.; van der VELDEN-DE GROOT, C. A. M.; de GOOIJER, C. D.; BEUVERY, E. C.; TRAMPER, J. Death rate in a small air-lift loop reactor of VERO cells grown on solid microcarriers and in macroporous microcarriers. **Cytotechnology**, v. 23, p. 61 – 75, 1997.
- MAURER, B. J.; IHNAT, M. A.; MORGAN, C.; PULLMAN, J.; O´BRIEN, C.; JOHNSON, S. W.; RASEY, J. S.; CORNWELL, M. M. Growth of Human Tumor Cells in Macroporous Microcarriers Results in p53-Independent, Decreased Cisplatin Sensitivity Relative to Monolayers. **Mol. Pharmacol.**, v. 55, p. 938 – 947, 1999.
- MENDONÇA, R. Z.; IOSHIMOTO, L. M.; MENDONÇA, R. M. Z.; DE-FRANCO, M.; VALENTINI, E. J. G.; BEÇAK W.; RAW, I.; PEREIRA, C. A. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell culture using a microcarrier system. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 26, p. 1305 – 1317, 1993.

- MENDONÇA, R. Z.; VAZ-de-LIMA, L. R.A.; OLIVEIRA, M. I.; PEREIRA, C. A.; HOSHINO-SHIMIZU, S. Studies on the efficiency of measles virus antigen production using VERO cell culture in a microcarrier system. **Brazilian J. M. Biol. Res.**, v. 27, p. 1575 – 1587, 1994.
- MENDONÇA, R. Z.; PRADO, J. C. M.; PEREIRA, C. A. Attachment spreading and growth of VERO cells on microcarriers for the optimization of large scale cultures. **Bioprocess Engineering**, v. 20, p. 565 – 571, 1999.
- MIGNOT, G.; FAURE, T.; GANNE, V.; ARBEILLE, B.; PAVIRANI, A.; ROMET-LEMONNE, J. L. Production of recombinant Von Willebrand factor by CHO cells cultured in macroporous microcarriers. **Cytotechnology**, v. 4, p. 163 – 171, 1990.
- MURPHY, J. A.; ROOMANS, G. M. In: Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy, published by **Scanning Electron Microscopy, Inc.** 1984
- NG, Y-C.; BERRY, J. M.; BUTLER, M. Optimization of Physical Parameters for Cell Attachment and Growth on Macroporous Microcarriers. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 50, p. 627-635, 1996.
- NIKOLAI, T. J.; HU, W-S. Cultivation of mammalian cells on macroporous microcarriers. **Enzyme and Microb Technol**, v. 14, p. 203 – 208, 1992.
- NILSSON, K.; BUZSAKY, F.; MOSBACH, K. Growth on Anchorage-Dependent Cells on Macroporous Microcarriers. **Bio/Technology**, November, v. 4, p. 989 – 990, 1986.

- OHLSON, S.; BRANSCOMB, J.; NILSSON, K. Bead-to-bead transfer of Chinese hamster ovary cells using macroporous microcarriers. **Cytotechnology**, v. 14, p. 67 – 80, 1994.
- PATTERSON, M. K., JR., Measurement of Growth and Viability of Cells in Culture. In: **Methods in Enzymology - Volume LVIII – Cell Culture** Academic Press, Inc., p. 143-144, 1979.
- PÉREZ, O.; PAOLAZZI, C.C. Production methods for rabies vaccine. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 340 –347, 1997.
- PETRUZZIELLO, R.; ORSI, N.; MACCHIA, S.; RIETI, S.; FREY, T. K.; MASTROMARINO, Pathway of rubella virus infectious entry into Vero cells. **J. Gen. Virol.**, v. 77, p. 303 – 308, 1996.
- PHARMACIA. Microcarrier cell culture: Principles and methods. **Pharmacia, Uppsala**, Sweden, 1981.
- PREISSMANN, A.; WIESMANN, R.; BUCHHOLZ, R.; WERNER, R. G.; NOÉ, W. Investigations on oxygen limitations of adherent cells growing on macroporous microcarriers. **Cytotechnology**, v. 24, p. 121 – 134, 1997.
- RAIHAN, S.; AHMED, N.; MACASKIE, L. E.; LLOYD, J. R. Immobilisation of whole bacterial cells for anaerobic biotransformations. **Appl. Microbiol. and Biotechnol.**, v. 47(4), p. 352 – 357, 1997.

- RASEY, J. S.; CORNWELL, M. M.; MAURER, B. J.; BOYLES, D. J.; HOFSTRAND, P.; CHIN, L.; CERVENY, C. Growth and radiation response of cells grown in macroporous gelatin microcarriers (CultiSpher-G). **Br. J. Cancer. Suppl.**, v. 27, p. S78 – 81, 1996.
- REITER, M.; HOHENWARTER, O.; GAIDA, T.; ZACH, N.; SCHMATZ, C.; BLÜML, G.; WEIGANG, F.; NILSSON, K.; KATINGER, H. The use of macroporous gelatin carriers for the cultivation of mammalian cells in fluidised bed reactors. **Cytotechnology**, v. 3, p. 271 – 277, 1990.
- REUVENY, S.; MIZRAHI, A.; KOTLER, M.; FREEMAN, A. Factors affecting cell attachment, spreading, and growth on derivatized microcarriers. I. Establishment of working system and effect of the type of the amino-charged groups. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 25, p. 469 – 480, 1983.
- REUVENY, S.; SILBERSTEIN, L.; SHAHAR, A.; FREEMAN, A.; MIZRAHI, A. DE-52 and DE-53 cellulose microcarriers. I. Growth of primary and established anchorage-dependent cells. **In Vitro**, v. 18, p. 92 – 98, 1982.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate as high pH as na electron opaque stain in electron microscopy. **J. Cell. Biol.**, v. 17, p. 208-212, 1963
- RIZZO, E.; TUCHIYA, H. N.; MARTINEZ, C. H. **Técnicas Básicas de Cultura Celular** Instituto Butantan e Instituto Adolfo Lutz, p.124, 1983.
- RUSTICI, M.; BRACCI, L.; LOZZI, L.; NERI, P.; SANTUCCI, A.; SOLDANI, P.; SPREAFICO, A.; NICCOLAI, N. A model of the rabies virus glycoprotein active site. **Biopolymers**, v. 33(6), p. 961 – 969, 1993.

- SABIN, A. B.; Oral poliovirus vaccine: History of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. **J. Infect. Dis.**, v. 151, p. 420 – 436, 1985.
- SCHRIMPF, G.; FRIEDL, P. Growth of human vascular endothelial cells on various types of microcarriers. **Cytotechnology**, v. 13, p. 203 – 211, 1993.
- SHIRAGAMI, N.; HONDA, H.; UNNO, H. Anchorage-dependent animal cell culture by using a porous microcarrier. **Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 295 – 299, 1993.
- SHIRAGAMI, N.; HAKODA, M.; ENOMOTO, A.; HOSHINO, T. Hydrodynamic effect on cell attachment to microcarrier at initial stage of microcarrier culture. **Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 399 – 401, 1997.
- SMITH, J. S.; YAGER, P. A.; BAER, G. M. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: **Laboratory Techniques in Rabies, Fourth Edition**. World Health Organization, Geneva, 1996, Edited by F. –X. Meslin; M. M. Kaplan; H. Koprowski.
- SOUZA, W. In: **Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas** Editado pela Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, R.J., 1998
- STOKER, M.; MACPHERSON, I. Studies on Transformation of Hamster Cells by Polyoma Virus in Vitro. **Virology**, v. 14, p. 359 – 370, 1961.
- SUPERTI, F.; DERER, M.; TSIANG, H. Mechanism of rabies virus entry into CER cells. **J. Gen. Virol.**, April, v. 65 (Pt 4), p. 781 – 789, 1984.

- SUPERTI, F.; HAUTTECOEUR, B.; MORELEC, M. J.; GOLDONI, P.; BIZZINI, B.; TSIANG, H. Involvement of gangliosides in rabies virus infection. **J. Gen. Virol.**, v. 67(Pt 1), p. 47 – 56, 1986.
- TANABE, K.; MATSUMOTO, S. Characterization of multi-layered membrane generated by rabies virus. **Microbiol. Immunol.**, v. 23 (8), p. 763 – 777, 1979.
- TORDO, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus. In: **Laboratory Techniques in Rabies, Fourth Edition**. World Health Organization, Geneva, 1996, Edited by F. –X. Meslin; M. M. Kaplan; H. Koprowski.
- VAN WEZEL, A. L. Growth of Cell-strains and Primary Cells on Micro-carriers in Homogeneous Culture. **Nature**, October 7, v. 16, p. 64 - 65, 1967.
- WERNER, A.; DUVAR, S.; MUTHING, J.; BUNTEMEYER, H.; LUNSDORF, H.; STRAUSS, M.; LEHMANN, J. Cultivation of immortalized human hepatocytes HepZ on macroporous CultiSpher G microcarriers. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 68(1), p. 59 – 70, 2000.
- WU, S. –C.; HUANG, G. Y. –L. Hydrodynamic shear forces increase Japanese encephalitis virus production from microcarrier-grown Vero cells. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 229 – 233, 2000.
- WUNNER, W. H.; LARSON, J. K.; DIETZSCHOLD, B. SMITH, C. L. The molecular biology of rabies viruses. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, Suppl. 4, p. S771 – S784, 1988.

WUNNER, W. H.; REAGAN, K. J.; KOPROWSKI, H. Characterization of saturable binding sites for rabies virus. **J. Virol.**, v. 50(3), p. 691 – 697, 1984.

ZALAN, E.; WILSON, C.; PUKITIS, D. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. **J. Biol. Stand.**, v. 7, p. 213-220, 1979.

ZHAOLIE, C.; BENCHUAN, W.; HONG, L.; SHICHONG, L.; PEITANG, H. Study on rt-PA production by recombinant CHO cells immobilized with a porous microcarrier. **Chin. J. Biotechnol.**, v. 15(4), p. 239 – 244, 1999.