

**SÉRGIO ALVES DO NASCIMENTO**

**CÉLULAS DE CÓRNEA FETAL CAPRINA NATURALMENTE  
IMORTALIZADA PARA PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DO VÍRUS DA  
ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA**

**RECIFE**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**CÉLULAS DE CÓRNEA FETAL CAPRINA NATURALMENTE**  
**IMORTALIZADA PARA PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DO VÍRUS DA**  
**ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Soares Castro.

Co-orientadora: Prof. Dra. Rita de Cassia  
Carvalho Maia

**RECIFE**

**2012**

Ficha Catalográfica

N244c Nascimento, Sérgio Alves do  
Células de córnea fetal caprina naturalmente imortalizada  
para produção de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina  
/ Sérgio Alves do Nascimento. -- Recife, 2012.  
50 f.: il.

Orientador: Roberto Soares de Castro.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de  
Medicina Veterinária, Recife, 2012.  
Referências.

1. DMEM/F12 2. RPMI 1640 3. Células CorFC 4. SFB  
I. Castro, Roberto Soares de, Orientador II. Título

CDD 636.089

## **DEDICATÓRIA**

***A minha família, fonte de inspiração e vida.***

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a São Judas Tadeu meu refúgio e devoção.

Aos meus pais pelo respeito e afeição.

A Rosana, esposa dedicada por seu carinho, paciência e companheirismo.

A meus filhos Pedro Vitor e Maria Luiza, essência de vida.

Ao amigo e orientador, Prof. Dr. Roberto Soares de Castro, por todos os ensinamentos.

A Maria Cristina e Giliate Coelho pela presença fraterna e exemplo de vida.

A Sylvana Pontual e Múcio Morais amigos e parceiros de tantas jornadas.

A Professora Rita Maia por seu apoio e eterno bom humor.

As Amigas Inês Maria, Ana Cláudia e Miriam Teixeira pelo carinho e atenção.

Aos professores Rinaldo Mota, Leonildo Bento, Jean Carlos grandes incentivadores.

A todos do LAVIAN: Karin Fontes, Cecilia Nascimento, Luiz Cosme, Luciana Coutinho, Ana lisa Gomes, Rosana Leo, Daniela Pereira companheiros de labuta.

A Luís Antônio de Menezes (Tom), sempre dedicado e atencioso.

Aos companheiros do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

A BIOVETECH - Indústria e Comércio de Produtos Biotecnológicos Ltda pelo apoio.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelos recursos financeiros.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária pelos avanços implementados.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente, ajudaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

As células que crescem em cultivo *in vitro* estão divididas em três classes: primárias, de linhagem finita ou cultivos secundários e de linhagem contínua, que podem ser multiplicadas indefinidamente. Estas derivam de tumores ou células transformadas artificial ou naturalmente. Neste trabalho é descrita uma linhagem de células de córnea de feto caprino (CorFC) e seu cultivo em meios suplementados com baixo teor de SFB visando à produção de antígenos do vírus da artrite-encefalite caprina para pesquisa de anticorpos pela imunodifusão em gel de Agar. A linhagem celular CorFC apresenta aparência fibroblástica e vem sendo cultivada há mais de 2 anos, por mais de 40 passagens, sem alteração perceptível na morfologia ou na taxa de multiplicação celular. Das 163 amostras de soros testados pela micro-IDGA, com antígeno (Ag) comercial (Biovotech, Brasil), 29 (17,79%) apresentaram resultado positivo; dessas, 28 também foram positivas à micro-IDGA com Ag-MEM e Ag-DMEM/12 e 29 com o Ag-RPMI 1640. Foi observada ótima concordância ajustada de  $kappa$  ( $k$ ) entre os testes de micro-IDGA empregando-se o Ag comercial, Ag-MEM e Ag-DMEM/F12 ( $k = 0,98$ ) e perfeita entre o antígeno comercial e Ag-RPMI 1640 ( $k = 1,00$ ). Devido às suas características de crescimento as células CorFC têm se comportado como de linhagem contínua, o que só poderá ser definitivamente comprovado com a continuação das passagens. Os meios de cultivo celular estudados (MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640) demonstraram-se adequados para nutrir as células de linhagem CorFC. Entretanto, considerando em conjunto, o meio RPMI 1640 seria o mais recomendado para seu cultivo, nas suplementações de 2% de SFB para escalonamento e de 0,1% para manutenção. As células da linhagem CorFC cultivadas em MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640 mostraram-se altamente permissíveis à replicação do vírus CAEV em meio com baixo teor de SFB, com produção de antígenos de melhor qualidade, redução de custos com insumos e simplificação no processos de purificação de proteínas, sobretudo quando o meio RPMI 1640 é usado.

Palavras-chave: DMEM/F12, RPMI 1640, células CorFC, SFB

## **ABSTRACT**

Cells which grow in vitro culture is divided into three categories: primary, secondary or crop finite line and continuous line, that can be grown indefinitely. These tumors derived from transformed cells or artificially or naturally. This work describes a cell line of fetal goat cornea (CorFC) and its growth in media supplemented with low FBS aimed at producing virus antigens caprine arthritis-encephalitis for antibodies by agar gel immunodiffusion. The cell line has CorFC fibroblastic appearance and has been cultivated for more than two years, more than 40 passages without noticeable change in the morphology or the rate of cell multiplication. Of the 163 serum samples tested by micro-AGID with antigen (Ag) commercial (Biovetech, Brazil), 29 (17.79%) were positive, of these, 28 were also positive for micro-AGID-MEM with Ag and Ag -DMEM/12 Ag and 29 with RPMI-1640. We observed excellent agreement adjusted kappa (k) between the micro-AGID tests employing the commercial Ag, Ag-MEM and Ag-DMEM/F12 (k = 0.98) between the antigen and perfect commercial and Ag-RPMI 1640 (k = 1,00). Due to their growth characteristics of cells CorFC have behaved as a continuous lineage, which can only be definitively confirmed with continued passages. The studied cell culture media (MEM, DMEM/F12 and RPMI 1640) showed to be adequate to nourish the cell lineage CorFC. However, considering jointly the medium RPMI 1640 was the most recommended for cultivation, in supplementation of 2% FBS for scheduling and 0.1% to manutenção. As CorFC cell line grown in MEM, and DMEM/F12 RPMI 1640 proved to be highly permissive to CAEV replication of the virus in medium with low FBS, with production of higher quality antigens, reducing input costs and simplify the processes of purification of proteins, especially when the RPMI 1640 is used.

Key-words: DMEM/F12, RPMI 1640, cells CorFC, FBS

# SUMÁRIO

	Pág.
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
<b>2.1 Histórico</b>	14
<b>2.2 Células em Cultivo</b>	15
2.2.1 Tipos de Células	15
2.2.2 Subcultura	16
<b>2.3 Meios</b>	17
<b>2.4 Suplementos</b>	18
<b>2.5 Vírus da artrite encefalite caprina (CAEV)</b>	19
2.5.1 Classificação e Estrutura	19
2.5.2 Diagnóstico	20
<b>3 REFERÊNCIAS</b>	21
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO</b>	30
<b>4.1 Células de córnea fetal caprina naturalmente imortalizada para produção de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina</b>	31



## **LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1 - Resultados de soros caprinos testados pela imunodifusão em gel de Ágar (micro-IDGA) empregando o Ag-MEM em comparação com o Ag-comercial. 49
- Tabela 2 - Resultados de soros caprinos testados pela imunodifusão em gel de Ágar (micro-IDGA) empregando o Ag-DMEM/F12 em comparação com o Ag-comercial. 50
- Tabela 3 - Resultados de soros caprinos testados pela imunodifusão em gel de Ágar (micro-IDGA) empregando o Ag-RPMI 1640 em comparação com o Ag-comercial. 50

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Camada de células de córnea fetal caprina (CorFC) com 72h de cultivo em meio RPMI 1640: A - Suplementação com 0,1% SFB (60x); B - Suplementação com 2% SFB (60x). 47
- Figura 2. Camada de células de córnea fetal caprina (CorFC) cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 0,1% SFB. Efeito citopático (sincios em destaque) 18 dias pós inoculação (40x). 48
- Figura 3. Curva de crescimento de células de córnea fetal caprina (CorFC) cultivadas em MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640 suplementados com 0,1% ou 2% de SFB. 48
- Figura 4. Reações de imunodifusão em gel de ágar (micro-IDGA): A - Ag-MEM; B - Ag-DMEM/F12; C - Ag-RPMI 1640. Nos poços 1, 3 e 5 são distribuídos 10  $\mu$ L de soro padrão; nos poços 2, 4 e 6, 30  $\mu$ L dos soros a serem testados e no poço 7, 10  $\mu$ L do antígeno. 49

## 1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia, que por definição consiste no uso de organismos, sistemas e processos biológicos para obtenção de produtos e serviços, data dos primórdios da civilização (SCHEPER, 2000; BUTLER, 2007). Os trabalhos no campo do cultivo de células e de tecidos tiveram sua origem no século XIX quando se começou a estudar com maior detalhe os órgãos e tecidos inseridos em vasos de vidro (UNCHERN, 1999).

Os avanços das técnicas de cultivo de células têm sido de suma importância para o desenvolvimento de estudos nas áreas de virologia, genética, fisiologia celular, cultivo de queratinócitos (ANDREASSI, 1992; BURLESON, et al., 1992; PEREZ e CURI, 2005), produção de biofármacos entre outros (EKWALL et al., 1990; MORGAN e DARLING, 1995; VINCI e PAREKH, 2003; MEYER, 2009).

O alto valor agregado e o aumento do número de produtos biotecnológicos obtidos a partir de cultura de células animais, pesquisa e desenvolvimento das metodologias envolvidas no processo tem sido alvo de grande interesse (EVEN et al., 2006).

Estudos recentes demonstraram que o cultivo de células é utilizado em larga escala por indústrias farmacêuticas e companhias de biotecnologia, na obtenção de produtos biológicos com alto grau de pureza e representando cerca de metade dos lucros com novas biotecnologias (BUTLER, 2007).

Eagle (1955) relatou o meio essencial mínimo (MEM), necessário para o cultivo de células de mamíferos aderentes ou em suspensão, o qual inclui 29 nutrientes sendo treze aminoácidos, oito vitaminas, seis espécies de íons, glucose e suplemento de soro animal. Este meio tornou-se a referência para o desenvolvimento de outros meios e suas variantes, os quais foram estabelecidos com objetivo de atender as necessidades da ampla gama de culturas celulares existentes (PAUL, 1975; FRESHNEY, 2005).

Apesar do considerável progresso no desenvolvimento das técnicas de cultivo de células, a manutenção e o crescimento das culturas são rotineiramente suplementadas com soro de origem animal, em especial o soro fetal bovino (SFB), e esta suplementação induz diversas variáveis nos protocolos de pesquisa, o que vem gerando preocupações e discussões éticas e de segurança na comunidade científica (EVEN et al., 2006; FALKNER, et al., 2006; EIBL et al., 2008).

As vantagens e disponibilidade dos meios livre de soro (MLS) são amplamente reconhecidas, eles fornecem uma forma mais definida e controle do ambiente de cultura, entretanto, o uso continuado de soro no meio de cultura celular parece basear-se

essencialmente da prática histórica, em vez da necessidade científica (FRESHNEY, 2005; BUTLER, 2007).

As células em cultura, pelo fato de manterem os mecanismos fundamentais de proliferação, representam um modelo experimental vivo considerado em muitos testes, substituto do modelo animal, preservando primordialmente a vida e as espécies, em diversas situações experimentais.

Linhagens contínuas, podem ser multiplicadas indefinidamente, derivadas de tumores ou células transformadas artificialmente, ou naturalmente, resultado da seleção, por inúmeras passagens, de células adaptadas plenamente às condições de cultivo *in vitro* (MORGAN e DARLING, 1995; VIRGINIO e TEIXEIRA, 2004; PEREZ e CURI, 2005). As células de linhagem geralmente são mais fáceis de manter, multiplicam-se rapidamente produzindo maior rendimento de células por frasco de cultivo, podem crescer mesmo quando semeadas em baixas concentrações, possuem potencial de cultivo indefinido e se adaptam melhor às condições de meio livre de soro (FRESHNEY, 2005).

O processo de produção de antígeno viral realizado pela indústria baseia-se, essencialmente, no cultivo de células animais em garrafas *roller* ou em biorreatores de tanque agitado. Para tanto, em diversas etapas do ciclo de produção, quer seja durante a multiplicação viral ou o escalonamento dos cultivos celulares, é necessária a utilização de quantidades significativas de soro de animais adultos ou de fetos, geralmente de origem bovina, como suplemento do meio de cultura.

Meios de cultura livres de proteínas de origem animal para o cultivo de células animais são comercializados há anos, e sua utilização para a obtenção de cultivos com alta densidade de linhagens celulares tem sido o foco de diversos estudos. Deste modo, espera-se que os principais benefícios técnicos com a não utilização de SFB sejam: uma maior velocidade no processo de concentração, segurança na redução do risco de contaminação, bem como, a redução do custo de reagentes e suplementos utilizados nestas culturas celulares, contribuindo assim para o bem-estar animal.

Neste contexto, objetivou-se descrever uma linhagem de células de córnea de feto caprino (CorFC) e seu cultivo em meios suplementados com baixo teor de SFB visando à produção de antígenos do vírus da artrite encefalite (CAEV) para pesquisa de anticorpos pela imunodifusão em gel de agarose (IDGA).

# REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 Histórico

O cultivo de células animais *in vitro* teve sua origem no século XIX como um conjunto de procedimentos experimentais usados para isolar e manter células viáveis a partir de órgãos de diversos animais, pelo menos por alguns dias. A partir destas origens modestas e ao longo de um pouco mais de 100 anos, a cultura de células animais tem evoluído para uma tecnologia moderna, baseada em princípios científicos e de engenharia (MORGAN e DARLING, 1995; ASSIS et al., 2002; FRESHNEY, 2005).

A história da cultura de célula pode ser dividida em três fases: A primeira fase vai até 1838 reflete o período das definições e hipóteses sobre a morfologia e a origem celular; A segunda fase estendeu-se de 1839 até 1902, sendo de relativa inatividade, dando-se destaque ao trabalho de Wilhem Roux, em 1885, que manteve por vários dias explante de medula de embrião de galinha em solução salina aquecida, e ao de Lunggren, que em 1898, manteve *in vitro* fragmentos de pele humana imersos em fluidos ascéticos; A terceira fase, que se estende até os dias atuais, teve seu início a partir de 1903 tendo como referência o trabalho de Jolly quando realizou estudos sobre a sobrevivência e divisão celular em cultivo (WHITE, 1954; WASLEY e MAY, 1970; PAUL, 1975; MATHER e ROBERTS, 1998; MEYER, 2009).

Em 1907 Ross Harrison acompanhou a diferenciação celular dos fragmentos de cordão espinhal de girino, dispostos em linfa de rã, demonstrando que sua função normal mantinha-se *in vitro*. Este estudo lhe conferiu o título de pai do cultivo celular. Harrison e Burrows em 1910 ajustaram as técnicas de cultivo de tecidos de anfíbios aos tecidos de animais homeotermos, descobrindo a importância do plasma sanguíneo em cultura (WITKOWSKI, 1979; DILS, 1984; AMARAL e SANTELLI, 2011).

Alexis Carrel, Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1912, trouxe para o laboratório de cultura celular as técnicas de assepsia utilizadas nas intervenções cirúrgicas. Esta abordagem permitiu-o subcultivar uma linhagem celular de fibroblasto de galinha durante 34 anos, contudo suas técnicas eram tão meticulosas que desestimulavam muitos pesquisadores (MORGAN e DARLING, 1995; PEREZ e CURI, 2005).

Na década de 30, Fischer utilizou substâncias aceleradoras do crescimento, demonstrando que tecidos e células mantidas fora do organismo animal requerem um número maior de substâncias não necessárias para o desenvolvimento no ambiente de origem. Com o

advento dos antibióticos em 1940 foi possível simplificar sensivelmente as técnicas de cultivos de células em função de se controlar as contaminações provocadas por microrganismos. (HELGASON e MILLER, 1998; ASSIS et al., 2002; FRESHNEY, 2005).

## 2.2 Células em Cultivo

Na atualidade pode-se cultivar *in vitro* por período de tempo variável células animais oriundas de um amplo número de tecidos que podem ser obtidos tanto de organismos embrionários como adultos (CRUZ et al., 1992; ASSIS et al., 2002).

Nos seres multicelulares os diferentes tipos de células podem ser identificados por suas características morfológicas em um organismo íntegro, entretanto em cultivo estas diferenças desaparecem e várias propriedades das células em cultivo incluindo sua forma e bioquímica podem ser afetadas devido às condições usadas para estabelecer e manter a cultura (BURLESON, CHAMBERS e WIEDBRAUK, 1992; WISE, 2004). Tais alterações, que permitem a sobrevivência, refletem o caráter das células sobreviventes diante às pressões seletivas na população como a seleção natural que opera nas populações de organismos em evolução. A população resultante baseia-se no sucesso reprodutivo das células que se adaptaram melhor às condições de cultura prevalecente (PAUL, 1975; NOVIKOFF e HOLTZAN, 1995).

### 2.2.1 Tipos de Células

As células que crescem em cultivo, seja em suspensão ou aderentes, estão divididas em três classes: células primárias, células linhagem finita e células de linhagem continua (BURLESON et al., 1992; FRESNEY, 2006).

Células primárias são aquelas obtidas diretamente do órgão ou tecido, após a desagregação enzimática, ou mecânica. Esta cultura é constituída por uma população mista e retém algumas características do tecido de origem.

A população derivada de passagens e dispersão subsequentes realizadas no cultivo primário são denominadas células de linhagem finita ou cultivos secundários, estas mantêm o cariótipo do tecido de origem, entretanto não podem ser subcultivadas indefinidamente. (MATHER e ROBERTS, 1998; WHO, 1998; WISE, 2004; COSTA et al., 2005; FRESNEY, 2006).

As linhagens de células são constituídas por células que derivam de tumores e células transformadas; estas por sua vez podem ser obtidas mediante a transfecção com oncogenes, manipuladas com a utilização de elementos carcinogênicos ou pela transformação das células de um cultivo primário, resultado de inúmeras passagens, havendo uma mutação lenta de algumas células que se sobrepõem ao restante da cultura, tornando-se predominantes sem contudo manter as características das células que as originaram (MORGAN e DARLING, 1995; VIRGINIO e TEIXEIRA, 2004; PEREZ e CURI, 2005).

As células de linhagem, invariavelmente, além de portarem um número anormal de cromossomos, multiplicam-se mais rapidamente, crescem em alta densidade, não demonstrando muita evidência de orientação espacial e raramente apresentam função especializada, podendo crescer mesmo quando semeadas em baixas concentrações e possuem um potencial de cultivo indefinido, entretanto dependem dos mesmos requerimentos nutricionais das células anteriormente citadas (FRESHNEY, 2005).

### 2.2.2 Subcultura

Quando as células atingem a fase estacionária, observa-se uma redução na taxa de crescimento celular, devido a um esgotamento do meio e/ou uma inibição por confluência, portanto as células devem ser subcultivadas antes que alcancem uma densidade populacional que leve todo sistema a uma condição de crise e a fase degenerativa (MORGAN e DARLING, 1995; MATHER e ROBERTS, 1998; GIBCO, 2011).

O processo de passagem ou subcultura consiste em transferir as células que estão aderidas à superfície do frasco de cultura para outro, permitindo assim que estas voltem a multiplicar-se. Para tanto, faz-se necessário desprender e dispersar as células através da técnica de raspagem ou pela ação enzimática (RIZZO et al., 1983; DOYLE e GRIFFITHS, 1998).

Mather e Roberts (1998) reportam que o método de raspagem é um processo mecânico que consiste em desprender as células aderidas com um tipo de rodo plástico com base de borracha denominada de *scrapping*. Entretanto, esta técnica além da destruição de grande número de células devido ao atrito proporciona uma suspensão pouco dispersa com muitos grumos.

O emprego de enzimas proteolíticas é o método mais difundido para a dispersão celular e entre as mais utilizadas estão a tripsina, pancreatinina, elastase e colagenase (RIZZO, 1977; FRESHNEY, 2005).

No processo de tripsinização, o tempo para se obter uma suspensão celular dispersa depende de cada cultura e condição da monocamada, contudo deve-se ter cuidado com exposição excessiva das células a associação tripsina-versene (ATV) pois esta pode causar danos irreversíveis a estrutura celular. A ação da tripsina é inibida pela presença de fatores anti-proteolíticos contidos no SFB, enquanto o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é inibido pelos íons cálcio e magnésio presentes no meio de cultura utilizado na realização de subculturas (MORGAN e DARLING, 1995; VAN DER VALK et al., 2010).

### 2.3 Meios

O princípio básico para o sucesso do crescimento e manutenção das células oriundas de culturas primárias ou linhagens contínuas *in vitro*, é que este deve representar o mais próximo possível do encontrado *in vivo*. Estabelecendo-se um sistema onde fatores ambientais importantes como o substrato sobre o qual as células crescem, temperatura, pH e o meio de cultivo irá determinar o desenvolvimento das células e o estabelecimento da cultura (FRESHNEY, 2005; BUTLER, 2007; GSTRAUNTHALER, 2010).

O meio para cultura celular é constituído por uma salina tamponada e isotônica, contendo os nutrientes essenciais para o metabolismo, crescimento e proliferação celular tais como vitaminas, aminoácidos, íons inorgânicos, precursores de ácidos nucléicos, carboidratos e outros suplementos. A clássica solução Ringer é o meio mais simples que foi desenvolvido com concentrações de diferentes sais para preservar tecido muscular do coração de sapos. (MORGAN e DARLING, 1995; HARTUNG et al., 2002)

Eagle (1955) relatou que o meio essencial mínimo (MEM), necessário para o cultivo de células de mamíferos aderentes ou em suspensão, inclui 29 nutrientes sendo 13 aminoácidos, 8 vitaminas, 6 espécies de íons, glucose e suplemento de soro animal. Seguido por Ham em 1965, constituíram a base sobre a qual os meios de cultura foram estabelecidos com objetivo de atender as necessidades da ampla gama de culturas celulares existentes (PAUL, 1975; FRESHNEY, 2005; MEYER, 2009).

Meios livres de soro (MLS) não necessitam de suplementação com soro, mas podem conter frações protéicas oriundas de tecidos animais ou extratos de plantas. Nos últimos 10 anos, investigações sobre a função das células levaram à identificação de um crescente número de componentes úteis para o desenvolvimento de meios de cultura livre de soro. Várias linhagens de células transformadas ou recém-transfectadas podem ser mantidas nestes meios enriquecidos sem adaptação (BRUNNER et al., 2010).



É evidente que todas as células têm suas próprias necessidades em matéria de suplementos, tipos de células diferentes têm diferentes receptores envolvidos na sobrevivência, crescimento e diferenciação (ROMIJN, 1988).

Atualmente existem mais de 100 diferentes formulações de MLS que podem ser facilmente adaptadas para novas culturas sem grande investimentos em tempo e dinheiro combinações de meio padrão podem ser testadas para determinar aquelas que resultam em cultivos com crescimento e produtividade em níveis séricos mínimo. O Meio Eagle Modificado por Dulbecco's (DMEM) e a mistura de nutrientes F12 (HAN'S F12) e o Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) demonstraram que o soro pode ser reduzido ou omitido sem necessidade de seleção de células (FRESHNEY, 2005 CHEN T. e CHEN K., 2009; BRUNNER et al., 2010).

## **2.4 Suplementos**

Suplementos são frequentemente adicionados ao meio de cultivo, o mais comum é soro de origem animal. O soro mais utilizado é o de origem bovina, normalmente na forma de SFB, pois de modo geral quanto mais jovem o animal, maior é o poder de promoção de crescimento celular (VAN DER VALK et al., 2004; ISAAC et al., 2011).

O SFB é uma mistura complexa de diferentes fatores contendo um grande número de componentes, como proteínas, vitaminas, minerais, lipídeos e hormônios essenciais para o crescimento e manutenção das células, sendo, portanto, um suplemento de crescimento universal e eficaz com a maioria dos tipos de células humanos e animais (MATHER e ROBERTS, 1998; BRUNNER et al., 2010).

No entanto, a utilização do SFB em cultura celular também tem um número de desvantagens: 1) as preocupações éticas e questões de bem-estar animal - o SFB é colhido de fetos de vacas gestantes durante o abate e é geralmente obtido por meio de punção cardíaca, sem anestesia, provocando sofrimento desnecessário para o bezerro. A quantidade de SFB produzida para o mercado mundial é estimada em 500.000 litros por ano. Como consequência, mais de 1.000.000 de fetos bovinos devem ser colhidos e esses números deverão aumentar anualmente; 2) variações na composição do soro de lote para lote devido às diferenças das condições sazonais e continentais, resultando em variações nas culturas de células e resultados; 3) o soro pode ser uma fonte potencial de contaminação microbiana, tais como fungos, bactérias, micoplasmas, vírus ou príons; 4) custo elevado, um vez que o valor varia conforme a origem do produto e taxa cambial (ROMIJN, 1988; VAN DER VALK et al.,

2004; FRESHNEY, 2005; EVEN et al., 2006; FALKNER et al., 2006; BRUNNER et al., 2010; COSTA et al., 2010).

## **2.5 Vírus da artrite encefalite caprina (CAEV)**

### 2.5.1 Classificação e Estrutura

O vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) é um lentivírus pertencente à família *Retroviridae*. Foi descrito por Cork et al. (1974) como agente de encefalite em caprinos jovens e em animais adultos com artrite crônica, consubstanciado como um retrovírus por Crawford et al. (1980).

Além de manifestações de artrite e encefalite, a infecção está associada à mastite e à pneumonia (KENNEDY-STOSKOPF et al., 1985; NARAYAN et al., 1989). Estas formas de apresentação da doença são observadas em ovinos infectados pelo lentivírus Maedi-Visna (MVV) (NARAYAN et al., 1997).

Devido à possibilidade de infecção cruzada entre caprinos e ovinos, foram denominados lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) (JOAG et al., 1996), sendo os detectados na Europa e nas Américas (NARAYAN e CLEMENTS, 1989; CALLADO et al., 2001), inclusive no Brasil (MOOJEN et al., 1986; CASTRO et al., 1999).

Os lentivírus apresentam estruturas esféricas, envelopadas com diâmetro variando de 80 nm a 100 nm, núcleo denso, contendo moléculas idênticas de RNA fita simples, uma molécula de transcriptase reversa dependente de Mg<sup>2+</sup> e proteínas do nucleocapsídeo (PEPIN et al., 1998).

O envelope está associado com as glicoproteínas transmembranárias e de superfície. Outra estrutura presente na partícula viral é a matriz que situa-se entre o capsídeo. O ciclo de replicação dos LVPR está dividido em duas fases: infecção e expressão. A fase de infecção dá origem ao provírus e a fase de expressão resulta na produção do RNA viral, proteínas e formação de vírions (ARAÚJO, et al., 2010). O ciclo de replicação dos LVPR consiste na ligação do vírus pelas glicoproteínas do envelope aos receptores da superfície celular, fusão do envelope com a membrana celular, liberação do RNA viral no citoplasma da célula, que é transcrito em DNA por ação da transcriptase reversa, trânsito de DNA para o núcleo da célula, integração do DNA com sítios do DNA celular para a formação do provírus, síntese do RNA viral pela RNA polimerase II usando o provírus como molde, transcrição do genoma em

RNA-mensageiros, síntese das proteínas virais, montagem e brotamento do vírus (CALLADO et al., 2001).

Os LVPR *in vivo* apresentam tropismo pelas células monócito-fagocitárias (NARAYAN et al., 1982), principalmente os macrófagos (BRODIE et al., 1995).

*In vitro* diversos estudos têm sido utilizado uma variedade de tipos células para isolamento e replicação dos LVPR mantidas em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, nutridas com MEM e suplemento de 5 a 15% de soro animal: células de córnea (HECKERT et al., 1992; SIMARD et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2008), membrana sinovial (NARAYAN et al., 1980; CRAWFORD e ADAMS, 1981; KLEVJER-ANDERSON e CHEEVERS, 1981; ABREU et al., 1998; ARRUDA et al., 2011), fibroblastos caprinos imortalizados (TEIXEIRA et al., 1997) células do plexo coróide (CHEBLOUNE et al., 1996) células epiteliais mamárias (ZANONI et al., 1994; LERONDELLE et al., 1999) formando efeito citopático (ECP) caracterizado por vacuolização e formação de células multinucleadas seguido por morte celular (ABREU et al., 1998).

### 2.5.2 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da artrite-encefalite caprina (CAE) é baseado primariamente na detecção de anticorpos, tendo vários métodos envolvidos, tais como, imunodifusão em gel de agarose (IDGA), imunofluorescência indireta (IFI), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) e Western blot (WB) (ANDRÉS et al., 2005).

A IDGA baseia-se na migração do antígeno e anticorpo através do gel de agarose. O encontro dos reagentes, leva à formação de complexos antígeno-anticorpo insolúveis que precipitam, tornando-se visíveis sob a forma de uma linha ou banda de precipitação (TORTORA et al., 2000; ARRUDA et al., 2011),

A imunodifusão em gel de agarose é a forma de diagnóstico mais utilizada em todo mundo, recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2012) para o diagnóstico dos LVPR, apresenta baixo custo e alta especificidade, credenciando-a para a realização dos diagnósticos de triagem (VAREA et al., 2001; ARRUDA et al., 2011).

### 3. REFERÊNCIAS

ABREU, S.R.O.; CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, S.A.; SOUZA, M.G. Produção de antígeno nucleoproteico do vírus da Artrite-Encefalite Caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em agar gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v.18, n.2, p.57-60, 1998.

ADAMS, D. S.; OLIVER, R. E.; AMEGHINO, E.; DEMARTINE, J. C., VERWOERD, D. W., HOWERS, D. J., WAGHELA, S., GORHAM, J. R., HYLLSETH, B.; DAWSON, M.; TRIGO, F. J.; MCGUIRE, T. C.; Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Veterinary Record**, v.115, n.19, p.493-495, 1984.

AMARAL, J. B.; SANTELLI, G. M. M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia** (eISSN:2177-0727) Rio Claro, v.34, p. 1-20, 2011.

ANDREASSI, L. History of keratinocyte cultivation. **Clinical report**. Italy, v.18 , n. 1, p. 52-54, 1992.

ANDRÉS, D.; KLEIN, D.; WATT, N.J.; BERRIATUA, E.; TORSTCINSDOTTIR, S.; BLACKLAWS, B.A.; HARKISS, G.D. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses **Veterinary Microbiology**. v. 107, p. 49-62, 2005.

ARAÚJO, S.A.C.; PINHEIRO, R.R.; DANTAS, T.V.M.; ANDRIOLI, A.; LIMA, F.E.S.; DIAS, R.P.; CAMPELLO, C.C.; COSTA, E.C.; RICARTE, A.R.F.; MELO, V.S.P.; ROLIM, B.N.; SILVA, J.B.A. TEIXEIRA, M.F.S. Inibição dos lentivírus de pequenos ruminantes por drogas antivirais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.2, p.225-232, abr./jun., 2010

ARRUDA, E. T.; OLIVEIRA, M. M. M.; NASCIMENTO, S. A.; CAMPOS, A. C.; CASTRO, R. S. Avaliação de uma microimunodifusão em gel de ágar para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos. **Ciência Animal Brasileira**., Goiânia, v.12, n.3, p. 560-565, jul./set. 2011.

ASSIS, M. F.; SANTOS E. C. O.; JESUS I. M.; PINTO W. V. M.; MEDEIROS R. L. F.; SILVA D. F. L. Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em Medicina e biologia. **Caderno Saúde coletiva**. Rio de Janeiro, v. 15, p. 425 – 432, 2002.

BRODIE, S.; PEARSON, L.; ZINK, M. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but no entry, is restricted to macrophages of specific tissues. **American Journal of Pathology**, v.146, p.250-263, 1995.

BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H.; SCHÖFFL, H.; PFALLER, W.; GSTRANTHALER, G., Serum free cell culture: the serum-free media interactive online database. **ALTEX** v. 27, p. 53-62, 2010.

BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. **Virology: A laboratory manual**. London: Academic Press, 1992. p.8-15.

BUTLER, M. **Cell culture and upstream processing. In: Technology (ESACT) and Protein Expression in Animal Cells (PEACe)**. New York: Taylor & Francis Group, 2007. 202p

CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Lentiviruses of small ruminants (CAEV and Maedi-Visna): a review and perspectives. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 21. n.3. p.87-97. 2001.

CASTRO, R. S.; LEITE, R. C.; RESENDE, M.; GOUVEIA, A. M. G. A labelled avidinbiotin ELISA to detect antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goats' sera. **Veterinary Research Communications**, v.23, p.515-522, 1999.

CHEBLOUNE, Y.; KARR, B.; SHEFFER, D. et al. Restrictive type of replication of ovine/caprino lentiviruses in ovine fibroblast cell culture. **Virology**, v. 222, p. 21-30, 1996.

CHEN T.; CHEN K. Investigation and Application Progress of Vero Cell Serum-free Culture. **International Journal of Biology**, v.1, p 41-47, 2009.

COFFIN, J. M. **Retroviridae: the virus their of replication**. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CNANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. 3 ed. Fields Virology, Philadelphia, Lippincott-Raven, p. 1767-1847, 1996.

CORK, L. C.; HADLOW, W. J.; CRAWFORD, T. B. Infectious leucoencephalomyelitis of young goats. **Journal of Infection Diseases**, v.129, n. 2, p. 134-141, 1974.

COSTA A. R.; RODRIGUES M. E.; HENRIQUES M.; AZEREDO J.; OLIVEIRA R. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, p.127-138, 2010.

COSTA, U.M.; REISCHAK, D.; SILVA, J.; RAVAZZOLO, A.P.; Establishment and partial characterization of an ovine synovial membrane cell line obtained by transformation with Simian Virus 40 T antigen. **Journal of Virological Methods**, v. 128, n.1-2, p.72-78, 2005

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected populations. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.178, p.713-719, 1981.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S.; CHEEVERS, W. P.; CORK, L. C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. **Science**, v.207, p.997-999, 1980.

CRUZ, A. S.; FIGUEIREDO, C. A.; BARBOSA, M. L.; SALLES-GOMES, L.F. Linhagem celular continua de rim de coelho - Características e substrato para replicação de vírus. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.26, n. 6 , p. 392-399, 1992.

DILS, R. R. Explants and disaggregated tissue preparations as model systems in nutritional research: advantages and pitfalls. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.43, p.133-140, 1984.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v.122, n.3168, p. 501-504, 1955.

EIBL, D.; EIBL, R.; PÖRTNER, R. **Mammalian Cell Culture Technology: An Emerging Field**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. 363p.

EKWALL, B.; SILANO, V.; PAGANUZZI-STAMMATI, A.; ZUCCO, F. **Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures**, Published by John Wiley & Sons Ltd, 1990. 208p.

EVEN M. S.; SANDUSKY C. B.; BARNARD N. D. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. **TRENDS in Biotechnology**, v.24. p.105-108, 2006.

DOYLE, A.; GRIFFITHS J. B.; **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology**, Oxford: John Wiley & Sons Ltd, 1998. 354p.

FALKNER, A. B. E.; APPL, B. H.; EDER, B. C.; LOSERT, A.U.M.; SCHÖZ, B. H.; PFALLER, B. W. Serum free cell culture: The free access online database **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 395–400, 2006.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 15. ed., New York: John Wiley & Sons, Inc. 2005. 580p.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Cells for Tissue Engineering**, edited by Gordana Vunjak-Novakovic and Copyright John Wiley & Sons, Inc., 2006, 404p.

**GIBCO® Cell Culture Basics Handbook**. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Global/forms/pdf-request-form.html>>. Acessado em 16 de maio de 2011.

GONDA, M. A. Molecular biology and vírus-host interations of lentiruses. Annual New York Academic. **Science**, v. 724, p. 22-42, 1994.

GSTRAUNTHALER, G. Innovative technologies, concepts and approaches Good Cell Culture Practice. **Altex** 27, Special Issue, p. 141-146, 2010.

HARTUNG, T.; BALLS, M.; BARDOUILLE, C.; BLANCK, O.; COECKE, S.; GSTRAUNTHALER, G.; LEWIS, D. Good Cell Culture Practice **Atla** 30, p. 407.414, 2002.

HECKERT, R.A.; McNAB, W.B.; RICHARDSON, S.M.; BISCOE, M.R. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.56, p.237-241, 1992.

HELGASON C. D.; MILLER C. L. **Methods in Molecular Biology.: Basic Cell Culture Protocols**. Totowa: Humana Press Inc. 3. ed. v. 290, 1998.

ISAAC, C.; MATTOS, C. N.; RÊGO, F. M. P.; CARDIM, L. N.; ALTRAN, S. C.; PAGGIARO, A. O.; CARNEIRO, R. M.; FERREIRA, M. C. Substituição de soro bovino fetal por soro humano como suplemento para cultura de fibroblastos humanos **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.26, n.3, p.379-384, 2011.

JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B.; NARAYAN, O. **Lentiviroses**. In: FIELDS, M. D.; KNIPE, D. M. *Fields Virology*, 3ª Ed. New Iork: Raven Press, 1996. p.1977-1996.

KENNEDY-STOSKOPF, S.; NARAYAN, O.; STRANDBERG, J.D. The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal Comparative Pathology**, v.95, p.609-617, 1985.

KLEVJER-ANDERSON, P.; CHEEVERS, W.P. Characterization of the infection of caprine synovial membrane cells by the retrovirus caprine arthritis-encephalitis virus. **Virology**, v.110, p.113-119, 1981.

LERONDELLE, C.; GODET, M.; MORNEX, J. F. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. **Veterinary Research**, v. 30, p. 467-474, 1999.

MATHER J. P.; ROBERTS P. E. **Introduction to cell and tissue culture: theory and technique**. London: Plenum Press, 1998. 314p.

MEYER, U. **The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective**. London: Hardcover, 2009. 339p.



MOOJEN, V.; SOARES, H. C.; RAVAZZOLO, A. P.; PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivírus (Maedi/Visna - Artrite Encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS**, v. 1, p.77-78, 1986.

MORGAN, S. J.; DARLING, D. C. **Cultivo de células animais**. Zaragoza: Acribia, 1995. 160p

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. **Journal of General Virology**, v.70, p.1617-1639, 1989.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E.; STRANBERG, J. D.; CORK, L. C.; GRIFFIN, D. E. Biological characterization of virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. **The Journal of General Virology**, v 50, p.69-79, 1980.

NARAYAN, O.; WOLINSKY, J.S.; CLEMENTS, J.E et al. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. **Journal of general Virology**, v. 59, p. 345-356, 1982.

NARAYAN, O.; JOAG, S. V.; CHEBLOUNE, Y.; ZINK, M. C.; CLEMENTS, J. E. Visna-maedi: the prototype lentiviral disease. **Viral Pathogenesis**. Philadelphia: N. Nathanson. Lippincott-Raven, p.657-668, 1997.

NOVIKOFF, A. B.; HOLTZAN, E. **Células e estruturas celulares**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1995. p. 412-420

OLIVEIRA, M.M.M.; MELO, M.A.; ANDRADE, P.P.; GOMES, S.M.; CAMPOS, A.C.; NASCIMENTO, S.A.; CASTRO, R.S. Western blot para o diagnóstico das infecções pelos lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos: um método simples para a produção de antígeno. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.3, p.263-270, 2008.

OIE – World Organization of Animal Health. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2008/pdf/2.07.03-04\\_CAE\\_MV.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.07.03-04_CAE_MV.pdf)>. Acessado em 06 de janeiro de 2012.

PAUL, J. **Cell and tissue culture**. London: Churchill Livingstone, 1975. 484p.

PEPIN, M.; VITU, C.; RUSSO, P.; MORNEX, J. P.; PETERHANS, E. Maedi-visna virus infections in sheep: a review. **Veterinary Research**, v. 29, p. 341-367, 1998.

PEREZ, C. M.; CURI R., **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 283p.

RIZZO, E. Effect of pH, temperature and time of stirring on solubility of trypsin used in cell cultures. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 8 n. 3, p. 94-97, 1977.

RIZZO, E.; TUCHIYA, H. N.; MARTINEZ, C. H. **Técnicas básicas de cultura celular**. São Paulo, Instituto Butantan - Instituto Adolfo Lutz, 1983. 134p.

ROMIJN H, J. Development and advantages of serum-free, chemically defined nutrient media for culturing of nerve tissue. **Biology of the Cell**, v. 63, p. 263-268, 1988.

SCHEPER T. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, vol. 69 Springer-Verlag, 2000. 277p

SIMARD, C. L.; KIBENGE, M. T.; SINGH, P. et al. Simple and Rapid Method for Production of Whole-Virus Antigen for Serodiagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 352 – 356, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 5.ed., Porto Alegre: ArtMed, 2000. 827p.

TEIXEIRA, M. F. S.; VERONIQUE, L.; MSEBLILAKAHL, L.; CHETTAB, A., CHEBLOUNE, Y.; MORNEX, J. F. Immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. **American Journal Veterinary Research**, v. 58, p. 579 - 584, 1997.

UNCHERN, S. Basic techniques in animal cell culture **Drug delivery system workshop**, Bangkok, Thailand, p. 1- 30, 1999.

VAN DER VALK, J.; MELLOR, D.; BRANDS, R.; FISCHER, R.; GRUBER, F.; GSTRAUNTHALER, G.; HELLEBREKERS, L.; HYLLNER, J.; JONKER, F.H.; PRIETO, P.; THALEN, M.; BAUMANS, V. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicology in Vitro**, v.18, n.1, p.1-12, 2004.

VAN DER VALK, J. V. D.; BRUNNER, D.; DE SMET, K.; SVENNINGSSEN, Å. F.; HONEGGER, P.; KNUDSEN, L.E.; LINDL, T.; NORABERG, J.; PRICE, A.; SCARINO, M.L.; GSTRAUNTHALER, G.; Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p.1053-1063, 2010.

VAREA, R.; MONLEON, E.; PACHECO, C.; LUJAN, L.; BOLEA, R.; VARGAS, M. A.; VAN EYNDE, G.; SAMAN, E.; DICKSON, L.; HARKISS, G.; AMORENA, B.; BADIOLA, J. J. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p. 301-307, 2001.

VINCI, V. A.; PAREKH, S. R. **Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial, and plant cells**. Humana Press Inc 2003. 547p.

VIRGINIO C. G.; TEIXEIRA M. F. S. Uso de células de linhagem tífef para cultivo e produção de lentivírus ovino. **Ciência Animal**, v.14, n.2, p.69-75, 2004.

WASLEY, G. D.; MAY, J. W. **Animal cell culture methods**. Oxford: Blackwell scientific publication, 1970. 194p.

WITKOWSKI, J. A. Alexis carrel and the mysticism of tissue culture **Medical History**, v.23, p.179-296, 1979.

WISE, C. Methods in Molecular Biology, vol. 188: **Epithelial Cell Culture Protocols** Humana Press Inc., 2004. 388p.

WHITE, P. R. **The cultivation of animal and plant cells.** New York, The Ronald press company, 1954. 239p

WHO World Health Organization. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologics. **Technical report series**, No. 878, p.19- 56, 1998.

ZANONI, R.G.; VOGT, H.R.; POHL, B.; BÖTTCHER, J.; BOMMELI, W.; PETERHANS, E. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, v. 41, p. 662-669. 1994.

#### **4. ARTIGO**

---

**Células de córnea fetal caprina naturalmente imortalizada para produção de  
antígenos do vírus da artrite encefalite caprina.**

---

Células de córnea fetal caprina naturalmente imortalizada para produção de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina

Corneal cells naturally immortalized fetal goats for the production of virus antigens caprine arthritis encephalitis.

SA Nascimento<sup>1</sup>, MIMR Silva<sup>1</sup>, RCC Maia<sup>1</sup>, RS Castro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. UFRPE. \*Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n-Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. [rscastro@dmv.ufrpe.br](mailto:rscastro@dmv.ufrpe.br)

## Resumo

As células que crescem em cultivo *in vitro* estão divididas em três classes: primárias, de linhagem finita ou cultivos secundários e de linhagem contínua, que podem ser multiplicadas indefinidamente. Estas derivam de tumores ou células transformadas artificial ou naturalmente. Neste trabalho é descrita uma linhagem de células de córnea de feto caprino (CorFC) e seu cultivo em meios suplementados com baixo teor de SFB visando à produção de antígenos do vírus da artrite-encefalite caprina para pesquisa de anticorpos pela imunodifusão em gel de Agar. A linhagem celular CorFC apresenta aparência fibroblástica e vem sendo cultivada há mais de 2 anos, por mais de 40 passagens, sem alteração perceptível na morfologia ou na taxa de multiplicação celular. Das 163 amostras de soros testados pela micro-IDGA, com antígeno (Ag) comercial (Biovotech, Brasil), 29 (17,79%) apresentaram resultado positivo; dessas, 28 também foram positivas à micro-IDGA com Ag-MEM e Ag-DMEM/12 e 29 com o Ag-RPMI 1640. Foi observada ótima concordância ajustada de *kappa* (*k*) entre os testes de micro-IDGA empregando-se o Ag comercial, Ag-MEM e Ag-DMEM/F12 (*k* = 0,98) e perfeita entre o antígeno comercial e Ag-RPMI 1640 (*k* = 1,00). Devido às suas características de crescimento as células CorFC têm se comportado como de linhagem contínua, o que só poderá ser definitivamente comprovado com a continuação das passagens. Os meios de cultivo celular estudados (MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640)

demonstraram-se adequados para nutrir as células de linhagem CorFC. Entretanto, considerando em conjunto, o meio RPMI 1640 seria o mais recomendado para seu cultivo, nas suplementações de 2% de SFB para escalonamento e de 0,1% para manutenção. As células da linhagem CorFC cultivadas em MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640 mostraram-se altamente permissíveis à replicação do vírus CAEV em meio com baixo teor de SFB, com produção de antígenos de melhor qualidade, redução de custos com insumos e simplificação no processos de purificação de proteínas, sobretudo quando o meio RPMI 1640 é usado.

Palavras-chave: DMEM/F12, RPMI 1640, células CorFC, SFB

### **Abstract**

Cells which grow in vitro culture is divided into three categories: primary, secondary or crop finite line and continuous line, that can be grown indefinitely. These tumors derived from transformed cells or artificially or naturally. This work describes a cell line of fetal goat cornea (CorFC) and its growth in media supplemented with low FBS aimed at producing virus antigens caprine arthritis-encephalitis for antibodies by agar gel immunodiffusion. The cell line has CorFC fibroblastic appearance and has been cultivated for more than two years, more than 40 passages without noticeable change in the morphology or the rate of cell multiplication. Of the 163 serum samples tested by micro-AGID with antigen (Ag) commercial (Biovotech, Brazil), 29 (17.79%) were positive, of these, 28 were also positive for micro-AGID-MEM with Ag and Ag -DMEM/12 Ag and 29 with RPMI-1640. We observed excellent agreement adjusted kappa (k) between the micro-AGID tests employing the commercial Ag, Ag-MEM and Ag-DMEM/F12 (k = 0.98) between the antigen and perfect commercial and Ag-RPMI 1640 (k = 1,00). Due to their growth characteristics of cells CorFC

have behaved as a continuous lineage, which can only be definitively confirmed with continued passages. The studied cell culture media (MEM, DMEM/F12 and RPMI 1640) showed to be adequate to nourish the cell lineage CorFC. However, considering jointly the medium RPMI 1640 was the most recommended for cultivation, in supplementation of 2% FBS for scheduling and 0.1% to manutenção. As CorFC cell line grown in MEM, and DMEM/F12 RPMI 1640 proved to be highly permissive to CAEV replication of the virus in medium with low FBS, with production of higher quality antigens, reducing input costs and simplify the processes of purification of proteins, especially when the RPMI 1640 is used

**Key-words:** DMEM/F12, RPMI 1640, cells CorFC, FBS



## **Introdução**

As células que crescem em cultivo *in vitro* estão divididas em três classes: primárias, que são aquelas obtidas diretamente do órgão ou tecido após a desagregação enzimática ou mecânica; de linhagem finita ou cultivos secundários, derivadas de passagens realizadas no cultivo primário; e de linhagem contínua, que podem ser multiplicadas indefinidamente, derivadas de tumores ou células transformadas artificialmente, ou naturalmente, resultado da seleção, por inúmeras passagens, de células adaptadas plenamente às condições de cultivo *in vitro* (MORGAN e DARLING, 1995; VIRGINIO e TEIXEIRA, 2004; PEREZ e CURI, 2005). As células de linhagem geralmente são mais fáceis de manter, multiplicam-se rapidamente produzindo maior rendimento de células por frasco de cultivo, podem crescer mesmo quando semeadas em baixas concentrações, possuem potencial de cultivo indefinido e se adaptam melhor às condições de meio livre de soro (FRESHNEY, 2005).

O princípio básico para o sucesso do crescimento e manutenção das células *in vitro* é que este deve ser o mais próximo possível do encontrado *in vivo*, no que diz respeito ao substrato sobre o qual as células crescem, temperatura, pH e o meio nutritivo, que deve suprir minerais, vitaminas, aminoácidos e fatores de crescimento essenciais às células (FRESHNEY, 2005; BUTLER, 2007; GSTRAUNTHALER, 2010).

Apesar do considerável progresso no desenvolvimento das técnicas de cultivo de células, a manutenção e o crescimento das culturas são rotineiramente feitos com meios suplementados com soro de origem animal, em especial o soro fetal bovino (SFB), em concentrações de 2% a 20%. A obtenção de fetos e a falta de homogeneidade entre os lotes de SFB, que induz a diversas variáveis nos protocolos de pesquisa e produção, vêm gerando preocupações e discussões éticas e de segurança na comunidade científica (VAN DER VALK et al., 2004; EVEN et al, 2006; FALKNER et al, 2006; EIBL et al, 2008). Por isto, esforços têm sido feitos para obter meios que resultem em cultivos celulares com crescimento e produtividade em

níveis desejáveis sem ou com suplementação mínima de SFB. Os meios Eagle Modificado por Dulbecco's (DMEM), F12 (HAN'S F12) e do Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) têm sido empregados com sucesso (FRESHNEY, 2005; CHEN T. e CHEN K., 2009; BRUNNER et al, 2010).

Células de origem caprina para diferentes usos têm sido obtidas de diversos tipos de tecidos: testículo (MAZUR, C. e MACHADO, R. D., 1990), rins (OLIVEIRA et al, 1998), membrana sinovial (CRAWFORD e ADAMS, 1981), plexo coróide (CHEBLOUNE et al., 1996), mama (LERONDELLE et al.,1999) e ovário (LAMARA et al, 2001). Também têm sido descritas células fibroblásticas de linhagem contínua imortalizadas por transformação com SV-40 (TEIXEIRA et al., 1997). Não há registro de linhagens contínuas de origem caprina naturalmente imortalizadas.

Culturas de células de membrana sinovial caprina, cultivadas com 2 a 5 % de SFB, têm sido as mais frequentemente empregadas para produção de antígenos do vírus da Artrite-encefalite caprina (CAEV) para pesquisa de anticorpos precipitantes, através da imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (KIRKLAND e BATTY, 1987; ABREU et al, 1998; PINHEIRO et al, 2005). Células de córnea de linhagem finita têm se mostrado permissíveis ao CAEV e têm sido empregadas para produção de antígenos virais para uso em ensaios imunoenzimáticos - ELISA (SIMARD et al, 2001; OLIVEIRA et al, 2008).

Neste trabalho é descrita uma linhagem de células de córnea de feto caprino (CorFC) e seu cultivo em meios suplementados com baixo teor de SFB visando à produção de antígenos do CAEV para pesquisa de anticorpos pela IDGA.

## **Material e Métodos**

### **Cultivo celular**

Foram utilizadas células (CorFC) obtidas inicialmente por explantação de córnea de feto caprino coletado em abatedouro, provenientes do banco de células da Indústria e Comércio de Produtos Biotecnológicos Ltda ME (Biovotech). Após estabelecidas, as culturas foram testadas por PCR para CAEV, Maedi-Visna, Ectima, BVD e micoplasmas, e foram mantidas por sucessivas passagens em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) (GIBCO Cat. N° 61100-061, USA), contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina B, incubadas a 37°C. Como suplementação do MEM foram utilizados 10% de SFB para passagens e 2% para manutenção.

As células CorFC foram submetidas a uma tentativa de imortalização artificial utilizando-se o “T-Large Antigen” do vírus SV-40 com o plasmídeo pBR-SV (TEIXEIRA et al., 1997). Neste processo a cultura celular transfectada com o plasmídeo precisa ser selecionada naturalmente por meio da morte por senescência das células não-transfectadas. Depois de várias tentativas percebeu-se que as células continuavam vivas por meses e não entravam em senescência.

### **Avaliação do crescimento das células CorFC em meios suplementados com baixo teor de SFB**

Durante as passagens, as culturas de CorFC foram tripsinizadas e subcultivadas em frascos de 25cm<sup>2</sup>, com concentração de  $4 \times 10^4$  células/mL, incubadas a 37°C em sistema fechado para a obtenção das monocamadas. As culturas de CorFC foram adaptadas aos meios DMEM/F12 (GIBCO Cat. N° 12400-024, USA) e RPMI 1640 (GIBCO Cat. N° 23400-021, USA) por mudança direta do meio e redução progressiva do percentual de SFB (GIBCO Cat. N° 12657 /

Lot. Nº 210125K, BRASIL) de forma escalonada de 10%, 5%, 2% e 0,1% com intervalo de 7 dias entre cada etapa.

Após o período de adaptação foi avaliado o crescimento celular nos meios MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640 suplementados com 2% ou 0,1% de SFB. Para isto, foi construída uma curva de crescimento, com base na densidade celular de frascos de 25cm<sup>2</sup> semeados com 5 mL de células na concentração de  $4 \times 10^4$  células/mL. As células foram coletadas por tripsinização a cada 24 horas, por um período de 168 horas. A contagem de células por mililitro foi determinada utilizando-se o hemacitômetro de Neubauer. A diferenciação entre as células viáveis e as não viáveis foi feita através da adição do corante Azul de Tripán com concentração de 0,4 M (Sigma T-8154, USA). (MORGAN e DARLING, 1995).

### **Produção de antígenos do CAEV e avaliação na IDGA**

Monocamadas de CorFC dos grupos MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640, foram estabelecidas por passagens por tripsinização e cultivo com 2% de SFB no volume de 80 mL em frascos de 150cm<sup>2</sup>. As monocamadas semi-confluentes foram lavadas com PBS e inoculadas com 1,0 mL da amostra viral CAEV Cork com o título de  $10^{4,5}$ . Após 30 minutos de adsorção foi acrescentado o meio de cultivo suplementado com 0,1% de SFB. A partir do 10º dia pós-inoculação (PI), a cada 7 dias, o sobrenadante de cada cultura foi coletado e congelado. Os frascos de cultivo foram substituídos quando apresentaram mais de 70% de destruição da monocamada celular.

Para produção dos antígenos (Ag) de CAEV, os sobrenadantes foram congelados e descongelados três vezes, clarificados por centrifugação a 3.300g por 20 minutos, a 4°C e dialisados em membrana (THOMAS SCIENTIFIC Swedesboro, NJ, USA 3787-d10), contra polietilenoglicol (PEG 6.000) a 40% em PBS (pH 7,6), a 4°C durante 48 a 72 horas, até a concentração de aproximadamente 50 vezes, quando foi coletado e armazenado a -20°C

(ABREU et al., 1998). O antígeno foi diluído em PBS (pH 7,6) e titulado, com diluições duplas, frente ao soro controle positivo do kit para diagnóstico de CAE (IDGA) (Biovotech, Brasil) e usado como duas unidades precipitantes (UP).

A Avaliação dos antígenos, denominados Ag-MEM, Ag-DMEM/F12 e Ag-RPMI 1640, foi realizada através de uma micro-IDGA descrita por Arruda et al. (2011). Foram utilizadas 163 amostras obtidas no banco de soro do Laboratório de Virologia Animal (LAVIAN) do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, provenientes de caprinos do Estado de Pernambuco, previamente testadas pela micro-IDGA (Arruda et al., 2011), empregando antígeno e soro controle positivo do kit para diagnóstico da CAE (IDGA) (Biovotech, Brasil). Os resultados dos testes com os três antígenos foram comparados através do indicador de concordância ajustada *Kappa* (*K*), sensibilidade e especificidade relativas aos resultados com antígeno comercial (PEREIRA, 2008).

## Resultados e Discussão

A linhagem celular CorFC apresenta aparência fibroblástica (Figura 1) e vem sendo cultivada há mais de 2 anos, por mais de 40 passagens, sem alteração perceptível na morfologia ou na taxa de multiplicação celular. Essas células foram submetidas a um processo artificial de imortalização quando foi observado que as mesmas não entraram em senescência, indicativo de sua natural imortalização. Uma das hipóteses para explicar esse fenômeno seria que células-tronco, naturalmente existentes no limbo do tecido da córnea (NISHIDA, 2003), foram selecionadas no processo de contínuas passagens resultando na sua imortalização. A transformação natural de células animais em linhagens contínuas tem sido relatada, como, por exemplo, células vero (*African Green monkey kidney cells*), BHK21 (*Baby hamster kidney cells*) e CHO (*Chinese hamster ovary cells*) (WHO, 1998). A obtenção de células imortalizadas representa importante avanço, pois torna desnecessária a obtenção de novas amostras de tecidos e novo processo para estabelecimento das culturas, minimizando os riscos de contaminação por vírus, micoplasmas e prions (VAN DER VALK et al., 2004; EVEN et al., 2006; FALKNER et al., 2006; EIBL et al., 2008)). Por outro lado, as células CorFC já foram testadas negativamente para micoplasmas e os principais vírus caprinos, o que garante maior segurança no seu uso.

Os resultados do efeito dos diferentes meios e concentrações de SFB sobre a proliferação das células CorFC (Figura 1) demonstram que, em linhas gerais, após o processo de adaptação as mesmas foram susceptíveis aos meios MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640. Na passagem com meios na concentração de 2% de SFB as células entraram na fase logarítmica antes de 24 horas em todos os grupos, alcançando a fase estacionária e obtendo o número máximo de células vivas após 144 horas de cultivo, independentemente do meio, contudo os frascos cultivados com RPMI 1640 apresentaram maior densidade celular. Na concentração de 0,1% de SFB houve redução de cerca de quatro vezes na taxa de crescimento das células

em todos os meios. No geral houve pequena variação no número de células entre os grupos no período de 72 horas. Neste momento o grupo MEM alcançou o *plateau* e logo em seguida iniciou um período de declínio; as células cultivadas com DMEM/F12 e RPMI 1640 continuaram em crescimento exponencial, estabelecendo sua fase estacionária com 144 horas.

A densidade e a alta viabilidade celular obtidas com os meios MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640 demonstram a capacidade de suporte nutricional desses meios para cultivo das células CorFC mesmo em baixo nível sérico. A reduzida concentração celular nas passagens com 0,1% de SFB comparativamente a 2%, conforme ilustrado na figura 3, deve-se à redução dos fatores de proliferação celular contidos no SFB necessários à maioria dos tipos de células animais cultivadas *in vitro* (MATHER e ROBERTS, 1998; BRUNNER et al., 2010). Uma vez que o uso de baixa concentração celular para replicação viral comprometeria o processo de obtenção de partículas virais de forma produtiva (FRESHNEY, 2005 CHEN T. e CHEN K., 2009; BRUNNER et al., 2010), a suplementação com 2% de SFB seria recomendada para passagens de células CorFC nos subcultivos e a de 0,1% para manutenção celular e inoculação viral, empregando-se os meios MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640.

A redução na concentração de SFB nos meios de cultivo celular é um passo importante para resolver ou minimizar certos problemas relacionados ao seu uso. Com base nos resultados, observa-se que, no cultivo de células CorFC, é possível reduzir a concentração de SFB em 5 a 10 vezes (de 10-20% para 2%), para o meio de passagem celular, e 20 vezes (2% para 0,1%) para o meio de manutenção. Isto é altamente desejável, pois implica na necessidade de menos coletas de SFB, reduzindo seu impacto negativo ao bem estar animal, bem como, em menor risco de contaminação exógena associada ao SFB (VAN DER VALK et al., 2004; FRESHNEY, 2005; EVEN et al., 2006; FALKNER et al., 2006; BRUNNER et al., 2010). A possibilidade de reduzir a concentração de SFB a níveis tão baixos na suplementação dos meios de cultivo deve ser atribuída não apenas à qualidade dos meios

DMEM/F12 e RPMI 1640, mas a interação desses com a alta capacidade de multiplicação das células CorFC, o que é uma característica das linhagens contínuas (WHO, 1998).

As células CorFC demonstraram-se permissíveis à replicação do vírus CAEV independente do meio (Figura 2), contudo houve variação quanto à necessidade de concentração dos sobrenadantes para obtenção dos antígenos na titulação de 2 UP: MEM (sobrenadante concentrado 56 vezes), DMEM/F12 (35 vezes) e RPMI 1640 (27 vezes). Além disso, as monocamadas cultivadas com RPMI 1640 tiveram um incremento na quantidade de antígeno obtido de 353% em relação ao MEM e de 62% ao DMEM. As variações no rendimento e na concentração possivelmente estão relacionadas à densidade celular, que se mostrou crescente nessa mesma ordem (Figura 3). Do ponto de vista do processo produtivo e do produto final, a necessidade de menor concentração do sobrenadante para produção do antígeno implica em maior rendimento, com menor custo, e em um produto (antígeno) menos denso e viscoso, o que reduz, durante os testes, resíduos retidos na ponteira de pipetagem, o que é desejável, sobretudo quando se emprega a micro-IDGA (ARRUDA et al., 2011) como teste sorológico, que emprega apenas 10  $\mu$ L do antígeno.

Das 163 amostras de soros testados pela micro-IDGA, com antígeno comercial, 29 (17,79%) apresentaram resultado positivo. Dessas, 28 também foram positivas à micro-IDGA com Ag-MEM e Ag-DMEM/12 e 29 com o Ag-RPMI 1640. Comparando os testes (Tabelas 1, 2 e 3) observa-se ótima concordância ajustada de *kappa* entre os testes de micro-IDGA empregando-se o antígeno comercial, Ag-MEM e Ag-DMEM/F12 ( $k = 0,98$ ) e perfeita entre o antígeno comercial e Ag-RPMI 1640 ( $k = 1,00$ ). As reações de precipitação entre antígeno e anticorpo observadas em todos os teste estão dentro dos padrões para micro-IDGA, permitindo uma leitura segura após 24 horas de incubação, o que está de acordo com Arruda et al. (2011). Entretanto, as linhas formadas pelo Ag-RPMI 1640 apresentavam-se ligeiramente mais luminosas e equilibradas em relação ao soro padrão do que as formadas



pelos Ag-MEM e Ag-DMEM/12 (Figura 4). Credita-se tal fato à menor concentração do sobrenadante para obtenção do antígeno, o que pode justificar a ligeiramente superior sensibilidade relativa (100%) do Ag-RPMI em comparação com os Ag-MEM e Ag-DMEM/F12 (96,6%). É bem conhecido que a alta concentração de proteínas do SFB dificulta a obtenção das proteínas desejáveis em cultivo celular, como, por exemplo, os antígenos virais a serem utilizados na produção de vacinas ou em kits de diagnóstico (SIMARD et al., 2001; OLIVEIRA, 2007).

## **Conclusões**

Devido às suas características de crescimento as células CorFC têm se comportado como de linhagem contínua, o que só poderá ser definitivamente comprovado com a continuação das passagens.

Os meios de cultivo celular estudados (MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640) demonstraram-se adequados para nutrir as células de linhagem CorFC. Entretanto, considerando em conjunto, o meio RPMI 1640 seria o mais recomendado para seu cultivo, nas suplementações de 2% de SFB para escalonamento e de 0,1% para manutenção.

As células da linhagem CorFC mostraram-se altamente permissíveis à replicação do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV).

Com o cultivo das células da linhagem CorFC em meio com baixo teor de SFB pode-se produzir antígenos do CAEV de melhor qualidade com redução de custos com insumos e simplificação no processos de purificação de proteínas, sobretudo quando o meio RPMI 1640 é usado

## **Agradecimentos**

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelos recursos financeiros e concessão de bolsas.

## Referências

- ABREU, S.R.O.; CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, S.A.; SOUZA, M.G. Produção de antígeno nucleoproteico do vírus da Artrite-Encefalite Caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em agar gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.18, n.2, p.57-60, 1998.
- ARRUDA, E. T.; OLIVEIRA, M. M. M.; NASCIMENTO, S. A.; CAMPOS, A. C.; CASTRO, R. S. Avaliação de uma microimunodifusão em gel de ágar para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos. **Ciência Animal Brasileira**., Goiânia, v.12, n.3, p. 560-565, 2011.
- BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H.; SCHÖFFL, H.; PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Serum free cell culture: the serum-free media interactive online database. **ALTEX** v. 27, p. 53-62, 2010.
- BUTLER, M. **Cell culture and upstream processing. In: Technology (ESACT) and Protein Expression in Animal Cells (PEACe)**. New York: Taylor & Francis Group, 2007. 202p.
- CHEBLOUNE, Y.; KARR, B.; SHEFFER, D. et al. Restrictive type of replication of ovine/caprino lentiviruses in ovine fibroblast cell culture. **Virology**, v. 222, p. 21-30, 1996.
- CHEN T.; CHEN K. Investigation and Application Progress of Vero Cell Serum-free Culture. **International Journal of Biology**, v.1, p. 41-47, 2009.
- CRAWFORD, T.B.; ADAMS, D.S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected populations. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.178, p.713-719, 1981.
- EIBL, D.; EIBL, R.; PÖRTNER, R. **Mammalian Cell Culture Technology: An Emerging Field**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. 363p.

EVEN M. S.; SANDUSKY C. B. and BARNARD N. D. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. **TRENDS in Biotechnology**, v.24. p.105-108, 2006.

FALKNER A. B. E.; APPL B. H.; EDER B. C.; LOSERT A. U.M.; SCHÖZ B H.; PFALLER B. W. Serum free cell culture: The free access online database **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 395–400, 2006.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 15. ed., New York: John Wiley & Sons, Inc 2005. 580p.

GSTRAUNTHALER, G. Innovative technologies, concepts and approaches Good Cell Culture Practice. **Altex** 27, Special Issue, p. 141-146, 2010.

KIRKLAND, P. D. and BATTY E. M. Caprine arthritis-encephalitis virus: an efficient method for the large scale production of serological antigens **Journal of Virological Methods**, v. 16 p. 323-326, 1987.

LAMARA, A; FIENI, F.; MSELLI-LAKLHAL. L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Efficient replication of caprine arthritis – encephalitis virus in goat granulosa cell. **Virus Research**. v. 79, p. 165-172. 2001.

LERONDELLE, C.; GODET, M.; MORNEX, J. F. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. **Veterinary Research**, v. 30, p. 467-474, 1999.

MATHER J. P.; ROBERTS P. E. **Introduction to cell and tissue culture: theory and technique**. London: Plenum Press, 1998. 314p

MAZUR, C.; MACHADO, R. D. The isolation and identification of the contagious ecthyma virus of caprines in cell cultures. *Veterinary Microbiology*. v. 21, n. 1, p. 127 – 130, 1990.

MORGAN, S. J.; DARLING, D. C. **Cultivo de células animales**. Zaragoza: Acribia, 1995. 160p.

NISHIDA, K. Tissue Engineering of the Cornea. **Cornea**, v. 22, p. 28 – 34, 2003.

OLIVEIRA, D. S. C.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A.; MELO, W. T. Isolamento e caracterização preliminar de amostras do vírus ectima contagioso em caprino e ovino no estado de Pernambuco. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 1, n. 1, p. 33 – 40, 1998.

OLIVEIRA, M.M.M.; MELO, M.A.; ANDRADE, P.P.; GOMES, S.M.; CAMPOS, A.C.; NASCIMENTO, S.A.; CASTRO, R.S. Western blot para o diagnóstico das infecções pelos lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos: um método simples para a produção de antígeno. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v.75, n.3, p.263-270, 2008.

PEREZ C. M.; CURI R., **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 283p.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 596p.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; YORINORI, E. H.; ANDRIOLI, A. Comparação de três técnicas de produção do antígeno do lentivírus caprino utilizado no teste de imunodifusão em gel de ágar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 453-458, 2005.

SIMARD, C. L.; KIBENGE, M. T.; SINGH, P. et al. Simple and Rapid Method for Production of Whole-Virus Antigen for Serodiagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 352– 356, 2001.

TEIXEIRA, M. F. S.; LAMBERT, V.; MSELLILAKAL, L.; CHETTAB, A.; CHEBLOUNE, Y.; MORNEX, J. F. Immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 6, p. 579-584, 1997.

VIRGINIO C. G.; TEIXEIRA M. F. S. Uso de células de linhagem tífef para cultivo e produção de lentivírus ovino. **Ciência Animal**, v.14, n.2, p.69-75, 2004.

VAN DER VALK, J., MELLOR, D., BRANDS, R., FISCHER, R., GRUBER, F., GSTRANTHALER, G., HELLEBREKERS, L., HYLLNER, J., JONKER, F.H., PRIETO, P., THALEN, M., BAUMANS, V., The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicology in Vitro** v. 18, n.1, p. 1–12, 2004.

WHO World Health Organization. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologics. **Technical report series**, No. 878, p.19- 56, 1998.

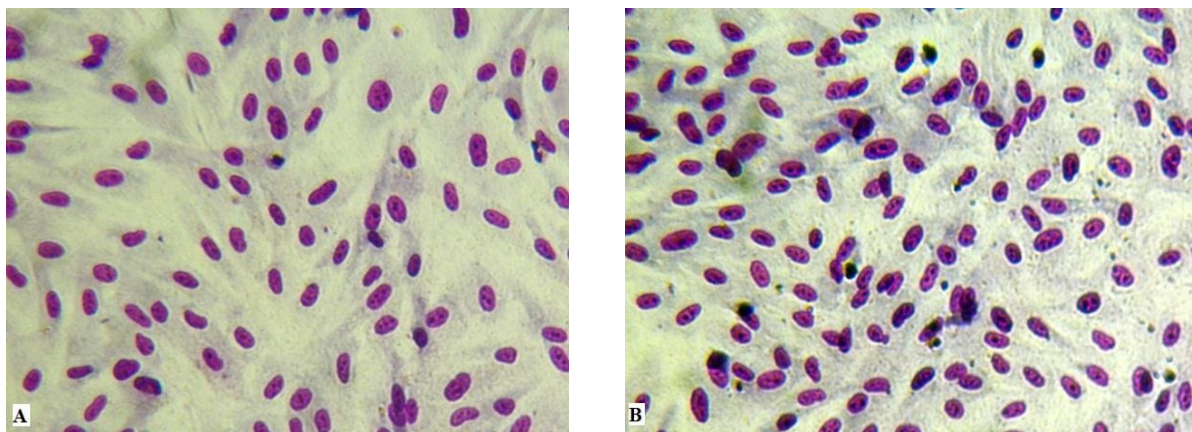


Figura 1. Camada de células de córnea fetal caprina (CorFC) com 72h de cultivo em meio RPMI 1640: A - Suplementação com 0,1% SFB (60x); B - Suplementação com 2% SFB (60x). Coloração: panótico

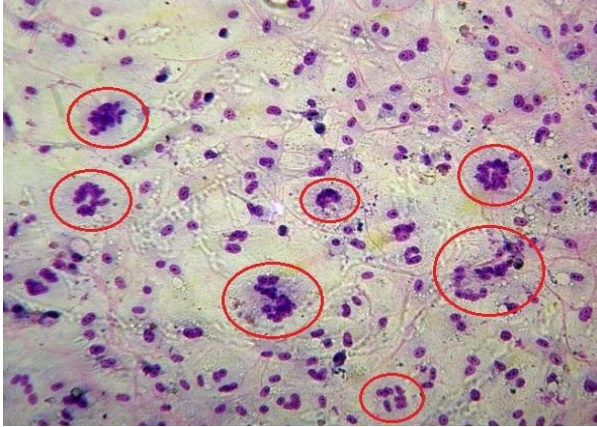


Figura 2. Camada de células de córnea fetal caprina (CorFC) cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 0,1% SFB. Efeito citopático (syncios em destaque) 18 dias pós inoculação (40x). Coloração: panótico

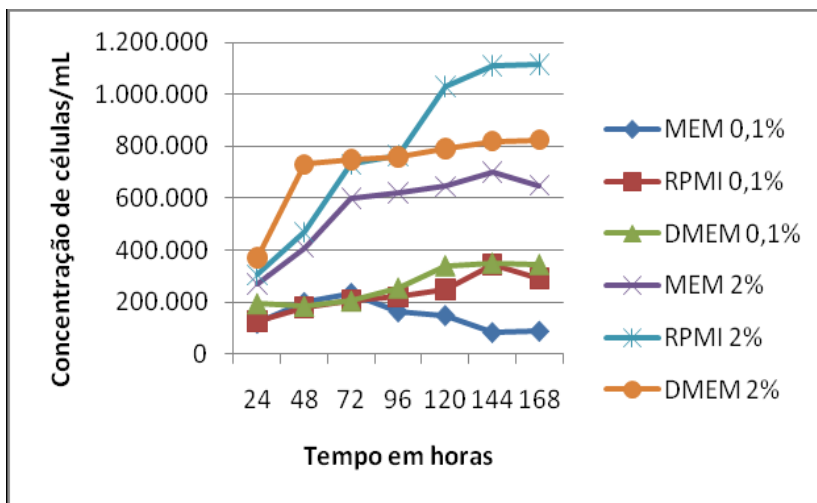


Figura 3. Curva de crescimento de células de córnea fetal caprina (CorFC) cultivadas em MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640 suplementados com 0,1% ou 2% de SFB.

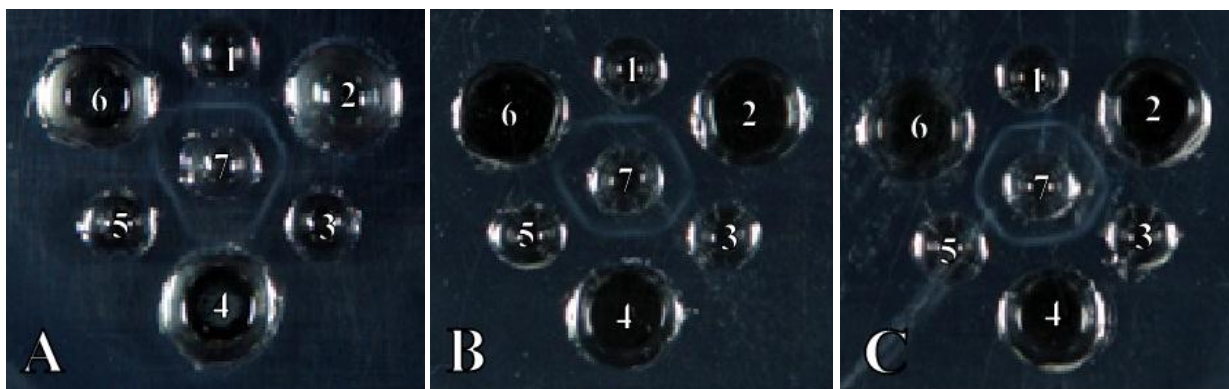


Figura 4. Reações de imunodifusão em gel de ágar (micro-IDGA): A - Ag-MEM; B - Ag-DMEM/F12 C - Ag-RPMI 1640. Nos poços 1, 3 e 5 são distribuídos 10  $\mu$ L de soro padrão; nos poços 2, 4 e 6, 30  $\mu$ L dos soros a serem testados e no poço 7, 10  $\mu$ L do antígeno.

Tabela 1 - Resultados de soros caprinos testados pela imunodifusão em gel de Ágar (micro-IDGA) empregando o Ag-MEM em comparação com o Ag-comercial

Teste		Ag-Comercial*		Total
		Positivo	Negativo	
Ag-MEM	Positivo	28	0	28
	Negativo	1	134	135
Total		29	134	163

\*Biovotech, Recife.

Sensibilidade relativa= 96,6%; Especificidade relativa= 100%; *Kappa* = 0,98.



Tabela 2 - Resultados de soros caprinos testados pela imunodifusão em gel de Ágar (micro-IDGA) empregando o Ag-DMEM/F12 em comparação com o Ag-comercial

Teste		Ag-Comercial*		Total
		Positivo	Negativo	
Ag-DMEM/F12	Positivo	28	0	28
	Negativo	1	134	135
Total		29	134	163

\*Biovotech, Recife.

Sensibilidade relativa= 96,6%; Especificidade relativa= 100%; *Kappa* = 0,98.

Tabela 3 - Resultados de soros caprinos testados pela imunodifusão em gel de Ágar (micro-IDGA) empregando o Ag-RPMI 1640 em comparação com o Ag-comercial

Teste		Ag-Comercial*		Total
		Positivo	Negativo	
Ag-RPMI 1640	Positivo	29	0	29
	Negativo	0	134	134
Total		29	134	163

\*Biovotech, Recife.

Sensibilidade relativa= 100%; Especificidade relativa= 100%; *Kappa* = 1,00