

RV-IAL, NOVA LINHAGEM CELULAR DE RIM DE VITELLO.
CARACTERÍSTICAS E SUSCEPTIBILIDADE A
ALGUNS VÍRUS *

Aurea S. CRUZ **
Mary E. SAKUMA **
Clélia H. MARTINEZ **

RIALA6/573

CRUZ, A. S.; SAKUMA, M. E. & MARTINEZ, C. H. — RV-IAL, nova linhagem celular de rim de vitelo. Características e susceptibilidade a alguns vírus. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(1):55-59, 1984.

RESUMO: Foi isolada nova linhagem celular de rim de vitelo, a qual vem sendo cultivada há mais de 3 anos. Os testes de susceptibilidade celular frente aos vírus do herpes simples (*Herpesvirus hominis*) tipo 1, sarampo, vacínia, rubéola, vírus da estomatite vesicular, varíola bovina, poliovírus tipo 1, vírus Ilhéus, e o teste da sensibilidade, comparada com a de outras culturas celulares, tais como Vero, HEp₂, Av₁₉, BHK-21 e RC-IAL, revelam que a cultura RV-IAL pode ser utilizada para estudos virológicos em seres humanos e em animais, e nas pesquisas com interferon. Morfológicamente esta linhagem tem aparência fibroblástica com discretas alterações, desde o início do cultivo. O maior índice de multiplicação foi obtido entre os 4.^o e 6.^o dias de crescimento. Análises cromossômicas feitas entre as passagens 50-55 indicam que esta linhagem, inicialmente diplóide, tornou-se heteroplóide.

DESCRITORES: célula, isolamento; linhagem celular de rim de vitelo (RV-IAL), susceptibilidade a vírus; vírus, cultivo em cultura de células de rim de vitelo (RV-IAL).

INTRODUÇÃO

As células primárias de rim de vitelo têm sido empregadas para estudos de vírus bovinos^{1, 5, 12} e vírus humanos^{5, 6, 12}, havendo pois interesse no estabelecimento de linhagens permanentes destas células.

Neste trabalho apresentamos nova linhagem celular de rim de vitelo com aparência fibroblástica, a qual designamos como RV-IAL (Instituto Adolfo Lutz), seguida de suas características, comportamento *in vitro* e susceptibilidade para alguns vírus humanos e animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura primária

Rim de vitelo de 7 dias, colhido assepticamente após a sangria do animal, foi colocado em solução salina tamponada, pH 7,5, com antibióticos (100 U.I. de penicilina e 100 µg de estreptomicina/ml). Depois de limpo, foi retalhado e colocado em Meio Mínimo de Eagle em solução salina balanceada de Earle (MME), suplementado com 10% de soro de vitelo (SV)⁴ inativado, com antibióticos. Após 24 horas, o rim foi picado e lavado 3 vezes com solução salina tamponada com

* Realizado na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

antibióticos. A tripsinização foi efetuada pelo método de Youngner⁷. As células foram suspensas em MME com 10% SV, na concentração de 5×10^5 células/ml, semeadas em frascos apropriados para culturas de células, e incubadas a 36 °C até formarem camada celular confluenta.

Cultura secundária

A primeira subcultura foi feita no 15.º dia, sendo que para a dispersão do tapete de células foi utilizada uma associação de tripsina a 0,20% e Versene, a 0,02%⁷. As células foram ressuspensas em MME com 10% de SV, semeadas em frascos de culturas de células e incubadas a 36 °C, por um período de 7 dias. As passagens seguintes foram feitas em intervalos semanais, na proporção de 1:2.

Congelamento celular — Células RV-IAL foram ressuspensas em MME com 10% de SV, contendo 5% de glicerol. A suspensão celular foi estocada, tanto em congelador a -70 °C, como em nitrogênio líquido, a -196 °C.

Curva de crescimento — Em intervalos de 24 horas, durante o período de 8 dias consecutivos, fez-se a contagem de células de 3 tubos de ensaio, utilizando-se a câmara de Neubauer. A partir do número de células contadas em cada tubo, calculou-se a média que foi utilizada para a elaboração da curva de crescimento. Este estudo foi realizado na 38.ª passagem, e todos os tubos foram semeados no mesmo dia, sem nenhuma troca de meio durante os dias de contagem.

Cariótipo — Para as análises cromossômicas, tubos com lamínulas foram semeados com 1×10^5 a 2×10^5 de células/ml. A técnica utilizada foi a mesma descrita por TJJO & PUCK¹¹, com modificações na solução hipotônica (KCL 0,075 M), no fixador (álcool metílico e ácido acético glacial na proporção de 3:1) e no corante usado, que foi o Giemsa, em solução-tampão de fosfato. As placas metafásicas foram observadas com a objetiva de imersão.

Susceptibilidade viral — As amostras de vírus utilizadas para testar a susceptibilidade das células RV-IAL foram: vírus da rubéola, amostra Westpoint, adaptado a células BHK-21; vírus da vacina do sarampo, amostra Edmonston, adaptado a células Vero; vírus do herpes simples tipo 1, amostra McIntyre, adaptado a células Vero; vírus da vacina usado na vacina antivariólica, amostra fornecida pelo Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, adaptado a células Sirc; vírus da varíola bovina (*cow-pox*), amostra obtida no "Center for Disease Control", Atlanta, Georgia, EUA, adaptado a células Sirc; vírus da estomatite vesicular do bovino, amostra fornecida pelo Instituto Biológico, São Paulo, Brasil, adaptada a células BHK-21; vírus Ilhéus, mantido em camundongos e adaptado a células Vero; e vírus

da pólio tipo 1, amostra Mahoney, obtida no "Center for Diseases Control", adaptado a células Vero.

Tubos de células RV-IAL, com suspensão celular de 200.000 células/ml de MME com 10% SV, foram usados para inocular os vírus acima citados. O meio de crescimento foi desprezado e 0,1 ml de cada uma das amostras de vírus contendo 100 DICT 50% foi inoculado, os tubos foram incubados a 37 °C, por 30 minutos, para adsorção viral. Em seguida, foi adicionado o meio de manutenção (MME com 5% SV), as culturas foram incubadas a 37 °C, e observadas diariamente até a leitura final aos 6-7 dias de incubação.

Foram feitas, ainda, titulações com o vírus da estomatite vesicular bovina, a fim de se comparar a sensibilidade da linhagem RV-IAL com a de outras culturas celulares, tais como: Av., Vero, HEp₂, RC-IAL e BHK-21. Para o cálculo dos títulos usou-se o método de Reed-Muench⁷.

RESULTADOS

As células RV-IAL vêm sendo cultivadas há 3 anos, sem nenhuma mudança no meio utilizado desde a sua cultura primária. Inicialmente eram necessários 7 dias para se formar uma camada confluenta com repiques de 1:2; atualmente, são necessários de 4 a 5 dias, com repiques de 1:3. Este fato foi comprovado pelo estudo da curva de crescimento que indica que o maior índice de multiplicação se dá em torno do 4.º ao 6.º dias de cultivo, chegando a quadruplicar o número de células iniciais (fig. 1).

As únicas alterações morfológicas nas células foram observadas durante as primeiras passagens em que apresentavam a aparência de fibroblasto logo no início do cultivo, isto é, após 24 horas de semeadas no frasco de cultura. Entretanto, na 10.ª passagem, as células apresentaram mudanças, pois em 24 horas de cultivo, apresentavam-se bem maiores em tamanho, e de forma arredondada quando comparadas às células das primeiras passagens; todavia, no decorrer do crescimento, tornavam-se novamente finas e alongadas, com a típica aparência de fibroblasto (fig. 2).

De acordo com as análises cromossômicas feitas entre as passagens 50-55, a cultura RV-IAL mostrou-se heteroplóide, com um número modal de 54 cromossomos (o número de cromossomos da espécie *Bos taurus* é $2n = 60$), conforme a figura.

Quanto à viabilidade celular, após o congelamento, esta linhagem mostrou-se resistente a baixas temperaturas, pois após 18 meses, a -196 °C, apresentou viabilidade de 90% e, após 3 meses, a -70 °C, apresentou também viabilidade de 90%.

A susceptibilidade da linhagem RV-IAL aos vírus experimentados está indicada na tabela 2.

Dos oito vírus usados, somente cinco causaram efeito citopático nas células RV-IAL, com algumas diferenças entre eles. Assim, o vírus do herpes simples tipo 1 (fig. 3) e o vírus da estomatite vesicular bovina

causaram efeito citopático positivo (++++) antes de completar 24 horas de incubação célula-vírus. O vírus da vacínia apresentou efeito positivo (++++), com 48 horas de incubação célula-vírus (fig. 4), o vírus Ilhéus e o vírus da variola bovina (*cow-pox*) apresentaram também efeito positivo (++++) após 48 horas de incubação célula-vírus (fig. 5). Não foram

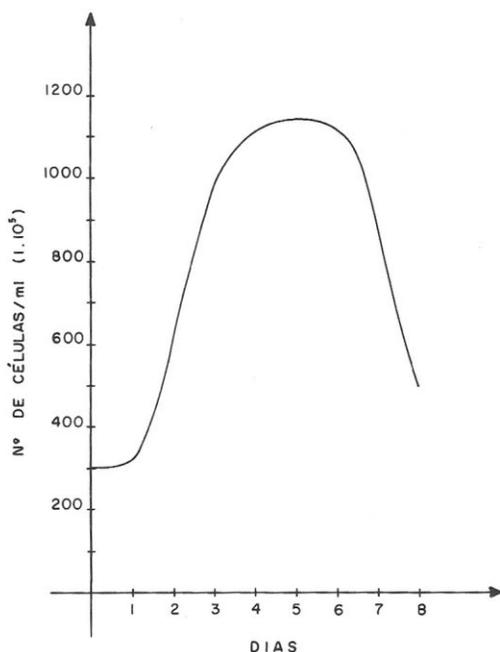


FIGURA 1 — Curva de crescimento da linhagem celular RV-IAL.

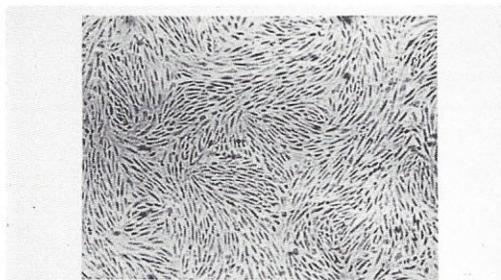


FIGURA 2 — Células RV-IAL não inoculadas.

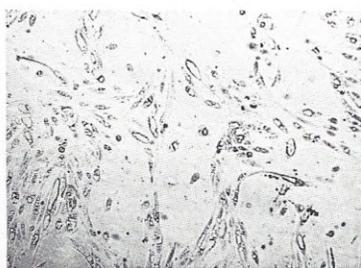


FIGURA 3 — Células RV-IAL inoculadas com o vírus do herpes simples, tipo 1.

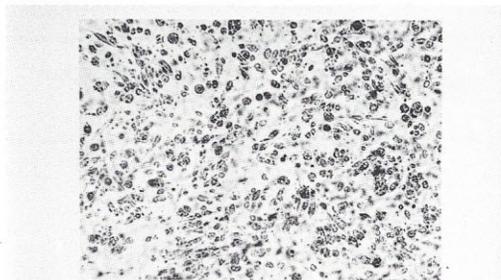


FIGURA 4 — Células RV-IAL inoculadas com o vírus da vacínia.

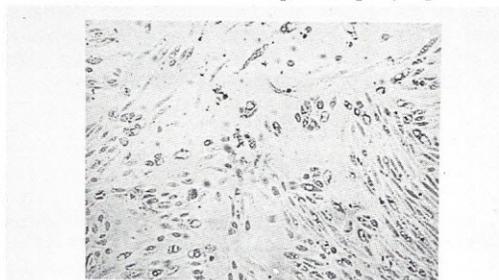


FIGURA 5 — Células RV-IAL inoculadas com o vírus da variola bovina (*cow pox*).

observados efeitos citopáticos nas células inoculadas com os vírus da rubéola, sarampo, ou poliovírus tipo 1. É importante ressaltar que não houve nenhuma adaptação anterior destes vírus à linhagem RV-IAL, e que não foi feita qualquer passagem cega nestas células para verificação de posterior efeito citopático. Também não foi estudado, pela imunofluorescência, se houve crescimento ou não dos vírus que não causaram efeito citopático.

A comparação do título do vírus da estomatite vesicular, na cultura celular RV-IAL, com o de outras culturas celulares está indicada na tabela 3, onde se pode observar que as células RV-IAL são mais sensíveis que as células Av₃, e HEp₂, igualmente sensíveis às células RC-IAL, e menos sensíveis que as células BHK-21 e Vero.

DISCUSSÃO

Segundo a literatura, a maioria das células bovinas isoladas em diferentes laboratórios passou por uma fase de crescimento mais lento^{3, 5, 6} e por algumas mudanças morfológicas^{6, 8, 10}, variando de fibroblasto para epitelial, e de epitelial para fibroblasto. A única célula que não apresentou alterações foi a da linhagem epitelial isolada por BRION & GRUEST². Este é um achado importante, pois o mesmo aconteceu às células RV-IAL que não apresentaram modificações tão evidentes na sua morfologia. Quanto ao seu crescimento, todas as linhagens bovinas tiveram um período em que o crescimento era mais lento; este fato também ocorreu com a cultura RV-IAL, por volta da 15.^a passagem, pois levava quase 15 dias para se formar a camada confluenta, com repiques de 1:1. Talvez tenha sido nesta fase de crescimento mais lento que a cultura se tenha estabelecido.

A nova linhagem é mantida sem antibióticos, e o exame pela microscopia eletrônica revelou que estas células são livres de partículas virais ou de qualquer outro contaminante.

A susceptibilidade frente aos vírus testados e a comparação com outras culturas indicam que a linhagem RV-IAL pode ser utilizada em virologia humana e animal e, possivelmente, apresenta outras potencialidades como na produção de interferon, vacinas etc.

Agradecimento

Ao Dr. Luís Florêncio de Salles Gomes, Diretor do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, por idéias e sugestões recebidas durante a realização deste trabalho, e ao Sr. José Ferreira Santana, pela colheita do rim no matadouro.

TABELA 1

Frequência do número de cromossomos em 40 células

N.º de células	N.º de cromossomos por célula
5	38
9	47
3	50
10	54
5	57
4	60
4	62

TABELA 2

Susceptibilidade das células RV-IAL aos vírus indicados

Vírus (100 DICT 50%)	Efeito citopático
Estomatite vesicular bovina	+
herpes simples tipo 1	+
varíola bovina	+
vacínia	+
Ilhéus	+
sarampo	-
rubéola	-
pólio tipo 1	-

(+) = susceptível

(-) = não susceptível

TABELA 3

Sensibilidade de linhagens celulares ao vírus da estomatite vesicular bovina

Linhagens celulares	Título do vírus (log ₁₀)
HEP ₂	2,00
Av ₃	2,50
RV-IAL	3,23
RC-IAL	3,50
BHK-21	4,77
Vero	5,33

RIALA6/573

CRUZ, A. S.; SAKUMA, M. E. & MARTINEZ, C. H. — RV-IAL, a new cell line of calf kidney. Characteristics and susceptibility to some virus. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(1):55-59, 1984.

ABSTRACT: A new cell line of calf kidney was isolated and has been cultivated for the last three years. The new line has fibroblast-like appearance with slight alterations since isolation. Cell multiplication index is higher between the 4th and 6th days of growth. Chromosomic analysis of passages ns. 50 to 55 indicated that the initially diploid cells became heteroploids. The new line showed itself to be capable of supporting the growth of the viruses tipe 1 herpes simplex, vaccinia, vesicular stomatitis, cow-pox and Ithéus virus. Comparison of these results with those obtained with cell lines such as AV₃, Vero, HEP₂, BHK-21 and RC-IAL disclosed that the new cell line is adequate for virus studies.

DESCRIPTORS: cell, isolation; cell line, calf kidney cell, susceptibility to virus; virus, cultivation in calf kidney cell culture.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUILAR-SETIÉN, A.; PASTORET, P. P.; BURTONBOY, G.; JETTEUR, P.; KAEC-KENBEECK, A. & SCHOENAERS, P. — Susceptibility of various cell lines to the cytopathic effect of a strain of bovine papular stomatitis virus. *Ann. Med. Vet.*, 123:333-8, 1979.
2. BRION, G. & GRUEST, J. — Isolement et amintien *in vitro* d'une souche essentiellement constitués de cellules épithéliales et obtenue a partir d'une rein de bovidé. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 92:426-9, 1957.
3. CORIA, M. P. — Cell cultures of bovine embryonic skin: growth and characterization. *Am. J. Vet. Res.*, 30:369-75, 1969.
4. EAGLE, H. — Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science (Wash.)*, 130:432-7, 1959.
5. FERRIS, R. D. & PLOWRIGHT, W. — The serial cultivation of calf kidney cells for use in virus research. *Res. Vet.-Sci.*, 2: 337-95, 1961.
6. KIMURA, S.; FUKUI, K.; YOSHIDA, N. & MATSUBARA, Y. — A new cell line of calf kidney and its susceptibility to viruses. *Jap. J. Microbiol.*, 12:293-8, 1968.
7. LENNETTE, E. H. & SCHMIDT, N. J., ed. — *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5.^a ed. Washington, D. C., APHA, c1979. 1138 p.
8. MADIN, S. H. & DARBY, N. B., Jr. — Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 98:574-6, 1958.
9. PAUL, J. R. — *Cell and tissue culture*. 5th ed. Edinburg, Churchill Livingstone, 1975. 484 p.
10. ROSSI, C. R. & KIESEL, G. K. — Establishment of the AU-BEK cell line and comparison with two other bovine cell lines. *In vitro (Rockville)*, 9:147-55, 1973.
11. TJIO, J. H. & PUCK, T. T. — Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J. exp. Med.*, 108:259-68, 1958.
12. WARREN, J. & CUTCHINS, E. C. — General characteristics and viral susceptibility of bovine embryonic tissue cultures. *Virology*, 4:297-304, 1957.

Recebido para publicação em 4 de janeiro de 1984.

