



Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão

Brenna de Sousa Barbosa^{*1}; Fernanda Araujo dos Santos¹; Muriel Magda Lustosa Pimentel¹; Denilsa Pires Fernandes¹; Erika Almeida Prexedes¹; Marcelo Barbosa Bezerra¹

¹*Laboratório de Transplante Gonadais e Produção *in vitro* de embriões (LTG-PIVE) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Autor para correspondência: * brennasayuri_bs@hotmail.com

RESUMO: O cultivo de células animais existe há cerca de 100 anos. Os estudos pioneiros de pesquisadores como Harrison, Carel e Roux, contribuíram para o desenvolvimento da técnica e para encorajamento de outros trabalhos relacionados ao cultivo de células. Cultivo pode ser definido como um conjunto de práticas que permitem a manutenção de células em um sistema *in vitro* independente do tecido de origem sob condições controladas. Os primeiros cultivos resumiam-se a tecidos fragmentados submersos em plasma sanguíneo (ou soro do animal de origem) contidos em frascos. Atualmente, o cultivo de células apresenta inúmeras aplicações, desde a produção biotecnológica de moléculas recombinantes, anticorpos monoclonais, vacinas veterinárias e humanas, à produção de enxertos para transplantes. Muitos desses avanços só foram possíveis graças ao estabelecimento de linhagens celulares estáveis e a descoberta de sistemas de cultivo específicos para cada tipo celular. Portanto, o presente artigo tem como finalidade apresentar um apanhado histórico do cultivo de células animais, além de expor as linhagens celulares de referência mundial.

Palavras-chave: cultivo, linhagem, bioengenharia, biotecnologia.

History of development of the cultivation animal cells.

ABSTRACT: The cultivation of animal cells has been around for 100 years. The pioneering studies by researchers such as Harrison, Carel and Roux, contributed to the development of the technique and encouragement to other works related to cell culture. Cultivation can be defined as a set of practices that allow the maintenance of cells in an *in vitro* system independent of the original tissue under controlled conditions. The first cultures are summarized to fragmented tissue submerged in blood plasma (or serum of animal origin) contained in flasks. Currently, the cell culture has numerous applications from biotechnological production of recombinant molecules, monoclonal antibodies, human and veterinary vaccines, to the production of grafts for transplantation. Many of these advances have been possible only through establishing stable cell lines and the discovery of specific culture systems for each cell type. Therefore, this article aims to present a historical overview of animal cell culture, showing the future expectations of this technology, and expose worldwide reference cell lines.

Keyword: cultivate, lines, bioengineering, biotechnology.

Autor para correspondência: * brennasayuri_bs@hotmail.com

Recebido em 10/03/2015; Aceito em 15/06/2015

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20150032>

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de tecidos existe há cerca de 100 anos (CURI & PERES, 2005). O desenvolvimento dessa biotécnica foi fundamental na elaboração de procedimentos experimentais e nas primeiras elucidações da interação célula-célula. O cultivo de células consiste nos processos de isolamento e manutenção da viabilidade e da proliferação das células de um determinado tecido (animal ou vegetal) em um sistema *in vitro* constituído de nutrientes e fatores essenciais à sobrevivência, sob condições de temperatura, pH e osmolaridade controladas (AMARAL & MACHADO-SANTELLI, 2011).

O cultivo celular se iniciou diante da curiosidade de se saber sobre o desenvolvimento do tecido nervoso. Claude Bernard foi um dos primeiros a compreender a necessidade de se isolar células em sistemas artificiais para estudo do metabolismo celular sem influência do organismo (ASSIS et al., 2007). A primeira tentativa de cultivar tecidos ocorreu no século XIX, quando Roux provou que células embrionárias de pinto poderiam ser mantidas vivas fora do organismo em solução salina (BACELLAR & SOUSA, 2004). Em seguida, vários pesquisadores se dedicaram ao estudo de culturas de diferentes tipos celulares.

O cultivo de células tem aberto possibilidades de regeneração de tecidos e órgãos com algum tipo de dano biológico. A

biotecnologia para produção de tecidos *in vitro*, bem como a elaboração de procedimentos que envolvam o reparo e regeneração tecidual *in vivo* apresenta um notável crescimento ao longo dos séculos (COSTA, 2010).

O presente artigo apresenta um apanhado histórico do cultivo de células animais, desde o desenvolvimento da biotécnica até os dias atuais, com o advento da bioengenharia tecidual. Além disso, o trabalho teve como objetivo expor as linhagens celulares de referência mundial, visto a deficiência de revisões literárias apresentando informações sobre o cultivo dos diferentes tipos celulares, bem como as características dessas linhagens.

2. HISTÓRICO DO CULTIVO DE CÉLULAS ANIMAIS

Vários eventos determinaram a evolução da tecnologia do cultivo de células *in vitro*. Em 1897, Loeb isolou células do sangue e do tecido conectivo de anfíbios, cultivando-os em soro e plasma. Wilhelm Roux, em 1885, cultivou fragmentos obtidos da placa neural de embriões de anfíbios, e, em 1903 Jolly, descreveu o processo de divisão de leucócitos de salamandra (ASSIS et al., 2007).

Em 1907, Harrison dissecou o tubo medular de um embrião de anfíbio e cultivou-o em coágulo linfático para demonstrar que axônios são produzidos como extensão de células nervosas únicas (UNCHERN, 1999). As considerações de Harrison foram um marco para

o cultivo de células, sendo considerado como o início do desenvolvimento da técnica de cultivo de tecidos (ASSIS et al., 2007). Em seu experimento, Harrison observou que as fibras nervosas emergiam das células a uma velocidade de 25 µm em um período de 25 minutos (HARRISON, 1907). O pioneirismo de Harrison estimulou o desenvolvimento de novas metodologias para manutenção *in vitro* das células.

Montrose T. Burrows propôs a expressão “cultura de células”, durante a realização de seus estudos. Em 1910, Burrows desenvolveu experiências com tecidos provenientes de embrião de galinha mergulhando-os em plasma sanguíneo, o que possibilitou o cultivo de tecidos do sistema nervoso e do tecido cardíaco do embrião. Segundo Burrows, o plasma de galinha seria um fator importante, pois possuía alta concentração de fibrina e quantidades reduzidas de enzimas proteolíticas, além de facilitar a visualização da cultura ao microscópio (REBELLO, 2014).

O clínico francês Alexis Carrel, descobriu em seus experimentos, a necessidade de substituir a fonte de nutrientes contidos nos frascos de cultura, bem como a necessidade do controle rígido da assepsia para manutenção do cultivo, usando como modelo células cardíacas de embriões de galinha. Carrel desenvolveu uma garrafa de cultura com uma entrada inclinada (frasco de Carrel), a qual permitia a adição e substituição do meio com maior facilidade. A divulgação de seus trabalhos permitiu o cultivo

de células por períodos de tempo maiores e a realização de diversos estudos subsequentes (AMARAL & MACHADO-SANTELLI, 2011).

Eberling realizou modificações na técnica desenvolvida por Carrel permitindo o subcultivo de células derivadas de corações de galinha já cultivadas. Eberling afirmou que continuou fazendo divisões do explante original por 34 anos, e só descartou as últimas células restantes em 1946, dois anos após a morte de Carrel; a partir desse experimento nasceu a lenda do coração imortal de galinha (RAMALHO, 2007). Peyton Rous e Fred Jones, em 1916, desenvolveram o método de subcultivo para explantes empregando tripsina no cultivo de células aderentes (ROUS & JONES, 1916).

Em 1947, Holtfreter propôs um método de formação de culturas 3D a partir de um aparato que permitisse o movimento das placas de Petri, reduzindo a interação das células com o substrato (AMARAL & MACHADO-SANTELLI, 2011). Entre a década de 50 e 70, Moscona descreveu sobre o reconhecimento célula-célula. A partir de suas análises, de como as células embrionárias se organizavam originando tecidos e órgãos, observou-se que células de órgãos diferentes não se misturavam, enquanto células derivadas de mesmo tecido permaneciam unidas com suas congêneres (MOSCONA, 1961; SHEFFIELD & MOSCONA, 1970; GARBER & MOSCONA, 1972).

HAYFLICK & MOORHEAD (1961) foram os pioneiros na utilização de antibióticos

para prevenir a contaminação de cultivos de fibroblastos. A adoção de antibióticos nos meios de cultivo permitiu que a técnica se tornasse ampla e continuamente utilizada; sendo atualmente empregada em laboratórios de biotecnologia animal.

Em 1986, Martin e Evans isolaram e cultivaram células-tronco pluripotentes de embrião de camundongo. Dez anos mais tarde, James Thomson isolou e cultivou células-tronco embrionárias humanas provenientes da fase de blastocisto, doadas de clínicas de fertilização *in vitro*. John Gearhart, por sua vez, conseguiu derivar células-troncos embrionárias humanas de uma população de células-tronco fetais, oriundas de fetos abortados (ROCHA, 2008).

3. LINHAGENS CELULARES

Um dos grandes avanços no cultivo de células se deu com o estabelecimento de linhagens celulares. Linhagem celular é uma população de células específicas originadas pelo subcultivo sequencial de uma população celular primária, na qual pode ser usada para estabelecer um banco, com conteúdo uniforme e estocado em um contêiner apropriado, sob condições definidas de armazenamento. A caracterização de uma linhagem resulta de um conjunto de dados referentes ao crescimento populacional, citogenética, suscetibilidade celular a amostras virais, identificação da espécie e tecido de origem (BRETAS, 2011).

Para que o cultivo se desenvolva, o meio deve fornecer as células todos os nutrientes, vitaminas, íons inorgânicos, matérias-primas

necessárias à síntese de novas células e um ambiente semelhante àquele que elas dispunham *in vivo* (TAVEIRA, 2007). Harry Eagle, em 1955, fez a primeira investigação sistemática dos requerimentos nutricionais essenciais para o crescimento das células *in vitro* (KRETZMER, 2002). Eagle, com ajuda de colaboradores definiu um meio mínimo essencial para o cultivo, denominado meio EMEM, constituído de aminoácidos, vitaminas, cofatores, carboidratos, sais e soro animal (BRETAS, 2011).

Em 1965, Ham introduziu o meio de cultivo sem a presença de soro, capaz de crescer algumas células clonadas provinda de mamíferos (TAVEIRA, 2007). ORR et al. (1973) estudaram o cultivo de diversos tipos celulares na presença e ausência de soro no meio de cultivo, concluindo que a adição de soro ou de suas proteínas permite o desenvolvimento do cultivo de células em monocamadas.

Condições específicas do sistema de cultivo são necessárias para que cada tipo celular se multiplique. Em 1976, Sato publicou o primeiro de uma série de trabalhos mostrando que diferentes linhagens celulares necessitam de diferentes misturas de hormônios e fatores de crescimento em um meio sem soro (TAVEIRA, 2007).

A necessidade de desenvolver vacinas virais, particularmente contra a poliomielite, durante a Segunda Guerra Mundial, foi o propulsor do desenvolvimento do cultivo de células animais (ALVES et al., 2008). Nas

indústrias, o cultivo de tecidos foi alvo, principalmente, na produção de anticorpos monoclonais. O desenvolvimento da primeira linhagem de hibridoma capaz de secretar anticorpos ocorreu em 1975, graças aos estudos de Köhler e Milstein (KÖHLER & MILSTEIN, 1975).

Outro avanço relevante para a tecnologia do cultivo de células animais foi a obtenção das linhagens celulares WI-38 (1961) e MRC-5 (1966), que promoveram um aumento considerável do número de vacinas licenciadas para uso humano (KRETZMER, 2002). A aquisição e o uso de linhagens autenticadas se tornou uma ferramenta essencial para desenvolvimento de novos farmacoterápicos, análises de citotoxicidade de extratos vegetais, de biopolímeros empregados em próteses ortopédicas e, recentemente, com o desenvolvimento da engenharia tecidual, o cultivo de agrupamentos celulares permite a produção de enxertos para transplante.

3.1 LINHAGEM CHO

A linhagem CHO é derivada de células do ovário de hamster Chinês adulto (*Cricetulus griseus*), produzida por tecnologia de DNA recombinante. As células CHO, por serem derivadas de um sistema mamífero, possuem a capacidade de realizar modificações pós-traducionais de proteínas, de forma semelhante ao padrão humano. Além disso, a fácil adaptação às condições regulamentadas de crescimento, a classificação como hospedeira segura e a fácil aprovação por agências reguladoras torna essa

linhagem responsável por 70% da produção de proteínas ou glicoproteínas recombinantes com fins terapêuticos ou diagnósticos (BRETAS, 2011; KIM et al., 2012).

As células CHO são diploides, caracterizam-se pelo número pequeno de cromossomos, mantêm sua linhagem celular estável até 10 passagens com ciclo de divisão de, aproximadamente, 14 horas (LEMONS, 2005; BRETAS, 2011). Células CHO crescem aderidas a um substrato, mas também são cultiváveis em suspensão se não houver substrato disponível, quando cultivadas em suspensão, estas células perdem sua morfologia alongada e tornam-se esféricas (AUGUSTO & OLIVEIRA, 2001; LÉO et al., 2008).

Há inúmeras linhagens derivadas de CHO disponíveis nos bancos de células. Atualmente, a tecnologia do cultivo de células busca, através da amplificação e/ou integração de genes de interesse, a otimização da produção e desenvolvimento de novas proteínas terapêuticas a partir da criação de plataformas constituídas de clones de CHO apropriados (KIM et al., 2012). Recentemente, diversas pesquisas na área da engenharia celular visam entender a via secretora de células CHO (OMASA et al., 2010).

3.2 LINHAGEM MDCK

A linhagem MDCK (*Madin-Darby Caninespaniel Kidney*) é derivada do rim de cadelas adultas da raça Cocker Spaniel, estabelecida em 1958, por Madin e Darby. Células MDCK são usadas como modelo na produção de vacinas veterinárias; no diagnóstico

para influenza A e influenza B; em estudos mecânicos de transporte de íons, proteína, lipídio e drogas; bem como em estudos fisiológicos da função de camadas epiteliais (LÚCIO, 2003). Células MDCK podem ser cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com Soro Fetal Bovino a 35°C ou em meio DMEM-F12 à 37°C (ROSA, 2012).

Durante décadas, institutos científicos e laboratórios vêm trabalhando com células MDCK como um meio de isolamento e replicação do vírus da influenza humana para diagnósticos e estudos epidemiológicos (GREGERSEN et al., 2011). Estudos com células MDCK visam criar plataformas seguras e competentes para produção de vacinas da influenza atenuada com vírus vivo (LAIV) como alternativa aos ovos de galinha fertilizados (GEORGE et al., 2010, HUSSAIN et al., 2010). Entretanto, alegações médicas de que vacinas produzidas a partir desta linhagem são ontogênicas e tumorigênicas vem gerando descrença do produto final. Pesquisas realizadas visam garantir a segurança da aplicação de vacinas derivadas de células MDCK em humanos (LIU et al., 2010; GREGERSEN et al., 2011).

3.3 LINHAGEM RAJI

A linhagem Raji é constituída de células B linfoblásticas derivadas do linfoma de Burkitt (EPSTEIN et al., 1965). O linfoma de Burkitt nasce a partir de uma célula do centro germinativo que perde o controle da proliferação

devido à ativação do gene c-myc (MAGLUTA & KLUMB, 2008).

A Raji foi a primeira linhagem de células humanas contínuas de origem hematopoiética. Células Raji crescem em suspensão, apresentam diâmetro por volta de 10 a 13 µm e morfologia arredondada, capaz de formar agrupamentos em forma de cachos (grumos). A replicação das células Raji ocorre a cada 24 a 36 horas; na fase estacionária as células formam grumos menores, e podem apresentar-se soltas e mais escuras, com irregularidades na superfície, adquirindo tamanhos menos homogêneos (MARTINS et al., 2005).

A linhagem Raji é amplamente usada como ferramentas nas pesquisas relacionadas a compreensão de células hematopoiéticas e outras doenças malignas, servindo como modelo para estudos futuros sobre linfoma de Burkitt e auxiliando na interpretação dos dados sobre anomalia genética. Além disso, as células Raji são utilizadas na detecção de complexo imune, visto que expressam lotes de receptores para determinados componentes do complemento, bem como receptores para porção Fc da imunoglobulina G (KARPOVA et al., 2005).

3.4 LINHAGEM VERO

Em 1962, Nakamura e colaboradores estabeleceram a linhagem Vero a partir de células epiteliais extraídas dos rins de macacos-verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*), após passagens seriadas (BRETAS, 2010). As células Vero são usadas como modelo de pesquisa pela Organização Mundial da Saúde para a produção

de imunobiológicos de uso humano (YOKOMIZO, 2001).

A linhagem Vero foi usada na produção de vacinas virais anti-rábica, e na década de 80, para sarampo e poliomielite; além da produção comercial de novos anticorpos monoclonais. As células Vero são usadas na avaliação da citotoxicidade de biomateriais, detecção de toxinas, teste de eficácia, teste de meios e micoplasma (UNCHERN, 1999; TAKATA et al., 1994; ALVES et al., 2008).

As células Vero são amplamente aplicadas na produção de vacinas humanas devido sua tolerância e imunogenicidade. Atualmente, estudos com células Vero como plataforma de produção visam a criação de vacinas para encefalite japonesa (LOBIGS et al., 2010); contra a influenza H5N1, bem como preparações de vírus recombinantes da vacina para outros subtipos de influenza A (TSENG et al., 2011).

3.5 LINHAGEM HELA

Em 1951, George Gey estabeleceu a linhagem HeLa. A HeLa foi a primeira linhagem imortal de células humana, extraídas de Henrietta Lacks, uma mulher negra diagnosticada com câncer cervical. Henrietta sofreu remoção de dois pequenos pedaços do colo do útero, e, as células do fragmento tecidual foram propagadas em condições especiais para cultivo no laboratório do hospital Johns Hopkins. O cultivo das células do tecido canceroso despertou interesses e possibilitou o uso dessa linhagem em variados estudos e testes

farmacêuticos na produção da vacina contra poliomielite (CALDAS, 2010).

A linhagem HeLa foi amplamente usada nas pesquisas como organismo modelo para caracterização de processos biológicos importantes, como a descoberta e classificação funcional de genes envolvidos na mitose, citocinese e a endocitose. Uma das primeiras aplicações das células HeLa foi o desenvolvimento dos testes de vacinas contra poliomielite, em 1952. As células HeLa também já foram utilizadas em estudos de clonagem, quimioterapia, mapeamento genético e fertilização, dentre outros (BRETAS, 2011; LANDRY et al., 2013).

A linhagem celular HeLa é o modelo mais amplamente utilizada para estudar a biologia celular e molecular em humanos. Recentemente, pesquisas de caracterização das variantes do genoma HeLa foram realizadas, visto a necessidade de padronizar a expressão genética, a função celular e as características de células aberrantes (LANDRY et al., 2013). Estudos realizados com a linhagem HeLa permitiram relacionar os mecanismos moleculares de ativação do vírus papilomas humano (HPV) e a indução de câncer cervical (RAMPIAS et al., 2010).

3.6 LINHAGEM WI-38

A linhagem celular WI-38 foi estabelecida em 1961, por Leonard Hayflick e Paul Moorhead, através do cultivo do tecido pulmonar de feto humano feminino (CALDERÓN, 2008). Células WI-38 são

adotadas como base para produção de vacinas virais de uso humano para raiva, rubéola, pólio e caxumba (ALVES et al., 2008). Células WI-38 duplicam-se por cerca de 50 gerações antes de entrar em estado de senescência (LÉO et al., 2008).

As células WI possuem diversas linhagens permanentes, todas derivadas de tecidos embrionários de fetos abortados durante a nona semana de gestação: células de pulmão (WI-1, WI-3, WI-11, WI-16, WI-18, WI-19, WI-23, WI-24, WI-25, WI-26, WI-27, WI-38 e WI-44); pele e músculo (WI-2, WI-12 e WI-20); músculo (WI-5), pele (WI-8 e WI-14); rim (WI-4 WI-9, WI-10, WI-13 e WI-15); coração (WI-6, WI-21 e WI-22); timo e tireoide (WI-7) e; fígado (WI-17) (CALDERÓN, 2008).

Atualmente, estudos empregam a linhagem WI-38 em análises quantitativas de expressão proteica de células sob estresses físicos (CMIELOVA et al., 2011); senescência celular (AHMED et al., 2010; NGO et al., 2011); e em pesquisas de diversos cânceres (JEONG et al., 2011; MELO et al., 2011).

3.7 LINHAGEM MRC-9

Células MRC-9 foram estabelecidas em 1974 a partir dos pulmões de um feto humano do sexo feminino de 15 semanas de idade gestacional (CALDERÓN, 2008). Recentemente, trabalhos acadêmicos usam a linhagem MRC-9 em teste citotóxico de produtos biológicos com potenciais efeitos antitumorais e anti-proliferativo contra diversas linhagens de células; e como modelo para pesquisas de

subtipos de cânceres de pulmão humano (WATANABE et al., 2010; LEE et al., 2012; MUSA et al., 2015). Além disso, estudos de isolamento de anticorpos neutralizadores de citomegalovírus humano (HCMV) estão sendo realizados em linhagem MRC-9, visto sua possível potencialidade em imunoterapia (MACAGNO et al., 2010).

4. BIOENGENHARIA DE TECIDOS

O desenvolvimento do cultivo de células associado a medicina regenerativa tornou-se crucial diante o aumento da expectativa de vida da população e, conseqüentemente, aumento de casos de neoplasia, lesões traumáticas e falência de órgãos (BOROJEVIC, 2008). Segundo KAIGLER & MOONEY (2001), as aplicações da bioengenharia de tecidos à medicina regenerativa tornaram possíveis a correção de defeitos de tecidos duros e moles, secundários a trauma congênitos e doenças adquiridas.

A bioengenharia tecidual foi conceituada em 1988 na primeira reunião da *National Science Foundation* (CARVALHO et al., 2010). É uma área multidisciplinar que associa a tecnologia à engenharia genética e aos conhecimentos de cultivo celular, visando o desenvolvimento e manipulação de implantes artificiais de tecidos, células ou moléculas capazes de substituir ou estimular a funcionalidade fisiológica de partes lesadas de um organismo (OLIVEIRA et al., 2010).

A bioengenharia fornece métodos alternativos associados a terapia gênica no desenvolvimento de biomateriais, a partir de

construções moleculares necessárias para a expressão de proteínas em bioprocessos industriais e produção de vetores (RAMSEIER et al., 2006).

Um marco na história da bioengenharia tecidual foi a criação da impressora de órgão em 3D pelas empresas Organovo, Invetech e Autodesk. O funcionamento da impressora 3D baseia-se no uso de células retiradas do próprio paciente que são submetidas a processos de clonagem e, em seguida, depositadas em uma cuba contendo biogel, que simulará as condições fisiológicas do órgão ou tecido desejado. As bioimpressoras são uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novas terapias celulares e para o transplante de órgãos (BICOV et al., 2014).

A produção de tecidos e órgãos mais complexos, como coração, fígado e sistema nervoso, ainda estão em fase experimental, mas os atuais avanços no conhecimento da biologia básica e no cultivo de células-tronco tornam real esta possibilidade. Além disso, novos estudos aplicados ao comportamento e diferenciação celular induzidos pela estrutura, composição e elementos biológicos presentes nos suportes, otimizam a técnica de cultura e a reprodução de tecidos e órgãos em laboratório (CARVALHO et al., 2010).

CONCLUSÕES

Os primeiros procedimentos de cultivo celular permitiram elucidar uma gama de processos fisiológicos, regulação, sinalização e interação célula-célula. Nos dias atuais, o cultivo

de células representa o estopim para desenvolvimento de novas terapias gênicas bem como para a construção de enxertos transplantáveis, visando proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes com lesões e/ou degenerações teciduais crônicas. O cultivo interligado às aplicações biotecnológicas proporciona a síntese de biomoléculas como potenciais fármacos, vacinas e cosméticos, além de permitir o desenvolvimento de bioprocessos em escala industrial. Todas as aplicações, ensaios e produção de proteínas são fundamentados nas linhagens celulares estáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, E.K.; WRZESINSKA, A.R.; ROEPSTORFF, P.; BULTEAU, A.L.; FRIGUET, B. Protein modification and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts. **Aging cell**, Malden, v. 9, n. 2, p. 252-272, 2010
- ALVES, P.M.M; CARRONDO, M.J.T; CRUZ, P.E. Introdução à tecnologia de cultivo de células animais. In: MORAIS, A.M; AUGUSTO, E.F.P; CASTILHO, L.R. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica. 1 ed. São Paulo: Roca, 2008. cap 1, p. 2-14.
- AMARAL, J.B.; MACHADO-SANTELLI, G.M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, Rio Claro, v. 34, p.1-20, 2011.

- ASSIS, M.F.L.; SANTO, E.C.O.; JESUS, I.M.; JESUS, M.I.; 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. **Cad. saúde colet.**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 425-432, 2007.
- AUGUSTO, E.F.P; OLIVEIRA, M.S. Processos com células animais. In: LIMA, U.A; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDEL, W.; Biotecnologia industrial. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda; 2001, p.547-69.
- BACELLAR, F.; DE SOUSA, R. A importância do isolamento por cultivo celular e identificação de *ric-kettsias* através de técnicas de biologia molecular para o conhecimento das rickettsioses. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, Ouro Preto, v. 13, n. suplemento 1, p. 190, 2004.
- BICOV, A.M.P.; PEREIRA, C.C.; CARNEIRO, K.P.M. Impressoras de Órgãos. Instituto Nacional de Telecomunicações (Inatel). Disponível em: < www.inatel.br/ic/index.php > Acesso: 20 dez. 2014.
- BOROJEVIC, R. Terapias Celulares e Bioengenharia. **Gazeta Médica da Bahia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 1, p. 42-46, 2008.
- BRETAS, R.M. Avaliação da capacidade instalada para a produção e certificação de células animais, 2011. 170p. (Dissertação de Mestrado) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. RJ, 2011.
- CALDAS, Cristina. Vida, morte e imortalidade: desvendando a história das células HeLa. **Cienc. Cult. [online]**, São Paulo, vol.62, n.2, p. 17-18, 2010.
- CALDERÓN, J.L.R. Vacunas, biotecnología y su relación con el aborto provocado. **Cuadernos de bioética**, Madrid, v. 19, n. 66, p. 321-353, 2008.
- CARVALHO, A.C.A.; PEREIRA, E.SC.; COSTA, C.; BARRETO, I.C.; MADUREIRA, L.C.; PAIM, F.R. Estratégias regenerativas da bioengenharia tecidual e aspectos éticos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 9, n. 1, p. 20-27, 2010.
- CMIELOVA, J.; HAVELEK, R.; JIROUTOVÁ, A.; KOHLEROVÁ, R.; SEIFRTOVÁ, M.; MUTHNÁ, D.; VÁVROVÁ, J.; REZÁCOVÁ, M. DNA damage caused by ionizing radiation in embryonic diploid fibroblasts WI-38 induces both apoptosis and senescence. **Physiol Res**, Canadá, v. 60, n. 4, p. 667-77, 2011.
- COSTA, R.C.C.; MIGUEL, F.B.; ROSA, F.P. Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 4, n. 1, p.70-76, 2010.
- CURI, R.; PERES, C. M. Como cultivar células. 1th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. v.1. 283p.
- EPSTEIN, M.A.; BARR, Y.M. Characteristics and mode growth of a tissue culture strain (EB1) of human lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 34, n. 2, p. 231-240, 1965.
- GARBER, B.B.; MOSCONA, A. A. Reconstruction of brain tissue from cell suspensions: I. Aggregation patterns of cells dissociated from different regions of the

developing brain. **Developmental biology**, v. 27, n. 2, p. 217-234, 1972.

GEORGE, M.; FAROOQ, M.; DANG, T.; CORTES, B.; LIU, J.; MARANGA, L. Production of cell culture (MDCK) derived live attenuated influenza vaccine (LAIV) in a fully disposable platform process. **Biotechnology and bioengineering**, Malden, v. 106, n. 6, p. 906-917, 2010.

GREGERSEN, J.; SCHMITT, H.; TRUSHEIM, H.; BROKER, M. Safety of MDCK cell culture-based influenza vaccines. **Future microbiology**, London, v. 6, n. 2, p. 143-152, 2011.

HARRISON, R.G. Observations on the living developing nerve fiber. **Experimental Biology and Medicine**, v. 4, n. 1, p. 140-143, 1907.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental cell research**, v. 25, n. 3, p. 585-621, 1961.

HUSSAIN, A.I.; CORDEIRO, M.; SEVILLA, E.; LIU, J. Comparison of egg and high yielding MDCK cell-derived live attenuated influenza virus for commercial production of trivalent influenza vaccine: in vitro cell susceptibility and influenza virus replication kinetics in permissive and semi-permissive cells. **Vaccine**, v. 28, n. 22, p. 3848-3855, 2010.

JEONG, H.C.; KIM, E.K.; LEE, J.H.; LEE, J.M.; YOO, H.N.; KIM, K.J. Aberrant expression of let-7a miRNA in the blood of non-smallcell lung cancer patients. **Molecular medicine reports**, v. 4, n. 2, p. 383-387, 2011.

KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. **Journal of Dental Education**, Michigan, v.65, n.5, p.456 - 462, 2001.

KARPOVA, M. B.; SCHOUMANS, J.; ERNBERG, I.; HENTER, J-I.; NORDENSKJOLD, M.; FADELL, B. Raji revisited: cytogenetics of the original Burkitt's lymphoma cell line. **Leukemia**, Stockholm, v.19, n.1, p.159 - 161, 2005.

KIM, J. Y.; KIM, Y.; LEE, G.M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. **Applied microbiology and biotechnology**, Daejeon, v.93, n.3, p.917 - 930, 2012.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, Cambridge, v.256, p.495 - 497, 1975.

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells – mini-review - **Applied Microbiology and Biotechnology**, Hannover, v.59, p.135 – 142, 2002.

LANDRY, J. M.; PYL, P. T.; RAUSH, T.; ZICHER, T. TEKEDIL, M.M.; STUTZ, A. M.; JAUCH, A.; AIYAR, R. S.; PAU, G.; DELHOMME, N.; GAGNEUR, J.; KORBEL, J. O.; HUBER, W.; STEINMETZ, L. M. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. G3: **Genes| Genomes| Genetics**, Heidelberg, v.3, n.8, p.1213 - 1224, 2013.

- LEE, Y.J.; KIM, J.; YI, J.; OH, S.; KIM, N.S.; KIM, H.; OH, D.; BANG, O.; LEE, J. Anti-proliferative neolignans from *Saururus chinensis* against human cancer cell lines. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 8, p. 1361-1366, 2012.
- LEMOS, N. G.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Avaliação do efeito genotóxico do Prozac (fluoxetina), sem e com adição de vitaminas A e C, através do teste do cometa em cultura de células CHO-K1. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.26, n.2, p.95 - 100, 2005.
- LÉO, P.; GALES, A.L.L.; SUAZO C.A.T.; MORAES, A.M. Células animais: conceitos básicos. In: MORAES, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO L.R. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica. 1 ed. São Paulo: Roca; 2008. p. 15-41.
- LIU, J.; MANI, S.; SCHWARTZ, R.; RICHMAN, L.; TABOR, D. E. Cloning and assessment of tumorigenicity and oncogenicity of a Madin–Darby canine kidney (MDCK) cell line for influenza vaccine production. **Vaccine**, Bethesda, v.28, n.5, p.1285 - 1293, 2010.
- LOBIGS, M.; PAVY, M.; HALL, R. A.; LOBIGS, P.; COOPER, P.; KOMIYA, T.; TORINIWA. H.; PETROVSKY. N. An inactivated Vero cell-grown Japanese encephalitis vaccine formulated with Advax, a novel inulin-based adjuvant, induces protective neutralizing antibody against homologous and heterologous flaviviruses. **Journal of General Virology**, Canberra, v.91, n.6, p.1407 - 1417, 2010.
- LÚCIO, A. D. Medidas e modelagem do transporte de água e osmorregulação em células renais individuais usando pinça óptica e videomicroscopia. Minas Gerais, 2003. 65p. Tese (Doutorado em ciências/física)- Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2003.
- MACAGNO, A.; BERNASCONI, N.L.; VANZETTA, F.; DANDER, E.; SARASINI, A.; REVELLO, M.G.; GERNA, G.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. **Journal of virology**, v. 84, n. 2, p. 1005-1013, 2010.
- MAGLUTA, E. P. S.; KLUMB, C. E. Resistência ao tratamento no linfoma de Burkitt: Associação com mutações específicas no gene TP53?. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v.30, n.1, p.41 - 46, 2008.
- MARTINS, A. K. A.; BOAVENTURA, M. F. C.; LIMA, M. M. R. Cultivo de linhagens permanentes. In: PERES, C. M.; CURI, R. Como Cultivar Células. 1 ed. São Paulo: Guanabara, 2005. cap 9, p. 46.
- MELO, S.; VILLANUEVA, A.; MOUTINHO, C.; DAVALOS, V.; SPIZZO, R.; IVAN, C.; ROSSI, S.; SETIEN, F.; CASANOVAS, O.; SIMO-RIUDALBAS, L.; CARMONA, J.; VIDAL, A.; AYTÉS, A.; PUERTAS, S.;

ROPERO, S.; KALLURI, R.; CROCE, C.M.; CALIN, G.A.; ESTELLER, M. Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 11, p. 4394-4399, 2011.

MOSCONA, A. Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells: a quantifiable approach to cell interactions in vitro. **Experimental cell research**, v. 22, p. 455-475, 1961.

MUSA, M.A.; LATINWO, L.M.; VIRGILE, C.; BADISA, V.L.D.; GBADEBO, A.L. Synthesis and in vitro evaluation of 3-(4-nitrophenyl) coumarin derivatives in tumor cell lines. **Bioorganic chemistry**, London, v. 58, p. 96-103, 2015.

NGO, J.K.; POMATTO, L.C.D.; BOTA, D.A.; KOOP, A.L.; DAVIES, K.J.A. Impairment of lon-induced protection against the accumulation of oxidized proteins in senescent wi-38 fibroblasts. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, Oxford, v. 66, n. 11, p. 1178-1185, 2011.

OLIVEIRA, C. S.; NASCIMENTO, M.; ALMEIDA, E. J.; CRUSOÉ, M.; BAHIA, P.; ROSA, F. P. Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.9, n.1, p.28 - 36, 2010.

OMASA, T.; ONITSUKA, M.; KIM, W-D. Cell engineering and cultivation of Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Current pharmaceutical biotechnology**, Osaka, v.11, n.3, p.233 - 240, 2010.

ORR, H. C.; BAKER, J.; CHEESMAN, J. Survival of animal tissue cells in primary culture in the absence of serum. **Applied Microbiology**, Beteshda, v.25, n.1, p.49 - 54, 1973.

RAMALHO, B. R. Terapia com células-tronco mesenquimais de medula óssea e ácido hialurônico em calvária de coelhos. Bauru, 2007. 140p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade do Sagrado Coração, SP, 2007.

RAMPIAS, T.; BOUTATI, E.; PECTASIDES, E.; SASAKI, C.; KOUNTOURAKIS, P.; WEINBERGER, P.; PSYRRI, A. Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells. **Molecular Cancer Research**, Philadelphia, v.8, n.3, p.433-443, 2010.

RAMSEIER, C.A.; ABRAMSON, Z.R.; JIN, Q.; GIANNOBILE, W.V. Gene Therapeutics for periodontal regenerative medicine. **Dental Clinics of North America**, Maryland Heights, v.50, n.2, p.245-263, 2006.

REBELLO, M. A. Fundamentos da Cultura de Cultura de Tecido e das células Animais. 1th ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2014. 208p.

ROCHA R. O direito à vida e a pesquisa com células tronco: limites éticos e jurídicos. 1th ed. Rio de Janeiro: Campus jurídico; 2008. 141p.

ROSA, G. N.; DOMINGUES, H. G.; SANTOS, M. M. B.; FELIPPE, P. A. N.; SPILKI, F. R.; ARNS, C. W. Detecção molecular e análise filogenética do gene H de amostras do vírus da cinomose canina em circulação no município de Campinas, São Paulo. **Pesquisa veterinária brasileira**, Rio de Janeiro, v.32, n.1, p.72-77, 2012.

ROUS, P.; JONES, F.S. A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 23, n. 4, p. 549-555, 1916.

SHEFFIELD, J.B.; MOSCONA, A.A. Electron microscopic analysis of aggregation of embryonic cells: the structure and differentiation of aggregates of neural retina cells. **Developmental biology**, v. 23, n. 1, p. 36-61, 1970.

TAKATA, C. S.; KUBRUSLY, F. S.; MIYAKI, C.; MENDES, I. F.; RIZZO, E. D. Susceptibility of Vero cell line to vaccine strains of the measles virus. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.28, n.3, p.209-212, 1994.

TSENG, Y. F.; HU, A. Y. C.; HUANG, M. L.; YEH, W. Z.; WENG, T. C.; CHEN, Y. S.; LEE, M. S. Adaptation of high-growth influenza H5N1 vaccine virus in Vero cells: implications for pandemic preparedness. **PloS one**, San Francisco v.6, n.10, p.e24057, 2011.

UNCHERN, S. Basic techniques in animal cell culture. In: Drug Delivery System Workshop. 1999. **Bangkok**, Thailand. p.19-20.

WATANABE, T.; MIURA, T.; DEGAWA, Y.; FUJITA, Y.; INOUE, M.; KAWAGUCHI, M.; FURIHATA, C. Comparison of lung cancer cell lines representing four histopathological subtypes with gene expression profiling using quantitative real-time PCR. **Cancer Cell Int**, London, v. 10, n. 2, p. 553-559, 2010.

YOKOMIZO, A. Y. Obtenção de antígeno viral a partir de culturas de células vero em microcarregadores porosos. São Paulo, 2001. 99p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade de São Paulo, SP, 2001.