

RC-IAL: Linhagem celular contínua de rim de coelho - características e substrato para replicação de vírus

RC-IAL: rabbit kidney cell line - Characteristics and substrate for viral multiplication.

Aurea Silveira Cruz*, Cristina Adelaide Figueiredo*, Maria Luisa Barbosa*, Clelia Helena de O. Martinez*, Luís Florêncio Salles-Gomes*

CRUZ, A. S. et al. RC-IAL: Linhagem celular contínua de rim de coelho - características e substrato para replicação de vírus. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 26: 392-9, 1992. Uma linhagem celular de rim de coelho (denominada RC-IAL), que foi isolada em 1976, e que atualmente está na 150ª passagem, teve suas características analisadas. As células apresentaram morfologia semelhante aos fibroblastos desde o início de seu cultivo. A proporção de crescimento celular não se alterou desde seu isolamento, com uma eficiência de clonagem ao redor de 9%. A linhagem mostrou crescimento dependente de ancoragem, e a análise cromossômica apresentou o número modal da espécie com pequenas variações para mais ou menos um cromossomo, resultando uma somatória de 50%. Sua espécie de origem foi comprovada através da reação de imunofluorescência indireta e a susceptibilidade da linhagem a alguns vírus, com demonstração do efeito citopático, foi verificada com os vírus da vacínia, cowpox, herpes simples tipo 1 e 2 e da rubéola. Esse substrato celular está livre de contaminantes, satisfazendo assim, as condições para seu uso em trabalhos científicos, principalmente os relacionadas à saúde pública.

Descritores: Células cultivadas. Separação celular. Efeito citopatogênico viral.

Introdução

Atualmente as culturas de células animais são utilizadas em várias áreas de pesquisa. Entre as principais aplicações, destacam-se o diagnóstico das infecções causadas pelos vírus, através do isolamento e identificação desses agentes, a produção de vacinas antivirais e de reagentes biológicos. Quanto ao diagnóstico virológico, a aplicação dos substratos celulares está diretamente correlacionada à susceptibilidade ao crescimento dos vírus e à capacidade do agente infectante de causar alteração celular denominada efeito citopático (ECP). Resulta ser necessário a existência de linhagens celulares contínuas que apresentem amplo espectro de susceptibilidade aos vírus e que demonstrem ECP facilmente evidenciados pela microscopia comum.

Com este propósito, e devido a existência de limitado número de linhagens celulares contínuas, originárias de rim de coelho, como: ERK₁, RK₁₃, RbK e LLC-RK₁, foram feitas tenta-

tivas para isolar uma linhagem celular desta origem na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz (IAL). Como resultado, uma linhagem contínua de células de rim de coelho vem sendo cultivada desde 1976.

O objetivo do presente trabalho é apresentar e divulgar as características desta nova linhagem celular isolada e estabelecida, a qual passamos a denominar RC-IAL (rim de coelho - Instituto Adolfo Lutz), e que oferece perspectivas de interesse para os pesquisadores na área da virologia, saúde pública e, eventualmente, em outras áreas da pesquisa científica.

Material e Método

Cultura Primária

De 5 coelhos albinos de 8 dias fornecido pelo biotério do IAL, foram colhidos assepticamente através de cirurgia a cortex renal e, em seguida, um "pool" desse material foi tripsinizado pelo método de Youngner⁹. As células após tripsinização foram suspensas em meio mínimo de Eagle (MME), em solução salina balanceada de Earle, suplementado com 10% de soro de vitelo inativado (SV) e semeadas em frascos próprios para cultura de células, com 5×10^5 céls/ml. Os frascos se-

* Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, SP - Brasil.

Separatas/Reprints: A. S. Cruz - Caixa Postal 7027 - 01246-000 - São Paulo, SP - Brasil.

Publicação financiada pela FAPESP. Processo Saúde Coletiva 91/4994-0.

meados foram incubados a 36°C para a formação da monocamada celular.

Cultura Secundária

O primeiro subcultivo foi feito após 72 h sendo usado para a dispersão da monocamada celular uma associação de tripsina 0,20% e versene 0,02% (ATV)⁹. As células foram suspensas em MME com 10% de SV e incubadas a 36°C. Os repiques subsequentes foram feitos em intervalos semanais na proporção de 1:3.

Congelamento Celular

As células RC-IAL foram preservadas tanto em congelador a -70°C como em nitrogênio líquido a -196°C. O meio de preservação foi constituído de MME com 10% SV, contendo 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO)⁹.

Curva de Crescimento

Durante o período de 7 dias consecutivos, em intervalos de 24 h foram feitas contagens de células de 3 tubos de ensaio, utilizando-se a câmara hemocitométrica (Neubauer). A partir do número de células contadas em cada tubo, calculou-se a média diária que foi utilizada para elaboração da curva de crescimento. Os tubos utilizados no presente estudo, foram semeados no mesmo dia na concentração de 2×10^5 céls/ml, sem troca de meio durante os dias de contagem.

Eficiência de Plaqueamento

As células RC-IAL foram semeadas em placas de Petri de 20 cm² de área, nas concentrações, de 25, 50, 125 e 250 céls/cm² e incubadas a 36°C em ambiente de 5% de CO₂ por 8 dias. Após este período, o meio de cultura foi desprezado e as células coradas com solução de violeta de genciana 0,1% em ácido cítrico 0,1M. As colônias de tamanho médio foram contadas e a percentagem calculada.

Crescimento Celular Dependente de Ancoragem

A capacidade das células RC-IAL crescerem dependente de ancoragem foi avaliada pela técnica de Macpherson e Montagnier¹¹. Placas de Petri com ágar semi-sólido foram semeadas com a concentração celular de 5×10^5 céls/ml em ambiente de 5% de CO₂ a 36°C e examinadas diariamente em microscópio invertido durante um período de 8 dias. Nesta verificação, foi utilizada a linhagem celular HeLa (ATCC-CCL-2)¹ como controle.

Comprovação da Espécie de Origem-Characterização Imunológica

Células RC-IAL na concentração de 1×10^6 céls/ml foram tratadas com antisoro de coelho, produzido em camundongo BALB/c, por 60 min à temperatura ambiente². Posteriormente, as células foram lavadas em solução salina balanceada de Hanks (SSB de Hanks) com 0,1% de azida sódica e o anticorpo fluoresceínado anti-IgG de camundongo (Cappel) foi adicionado por 60 min à temperatura ambiente. A seguir, as células foram lavadas em SSB de Hanks com 0,1% de azida e examinadas em microscópio (Olympus) sob iluminação de lâmpada de halogênio. A especificidade da ligação do anticorpo na reação foi comparada ao controle realizado com a linhagem celular HeLa¹.

Análise Cromossômica

As preparações cromossômicas foram feitas com células na fase exponencial de crescimento, tratadas com 0,00016 mg/ml de colchicina por 6 h a 36°C. Após este período, as células foram tratadas com solução hipotônica 0,075M de KCl por 30 min e então fixadas com ácido acético-metanol na proporção de 1:3. A coloração foi feita pelo método convencional de Giemsa e as metáfases foram fotografadas em objetiva de imersão do microscópio óptico comum.

Susceptibilidade a Alguns Vírus

Os seguintes vírus foram isolados e identificados no Serviço de Virologia do IAL, com exceção da amostra padrão do citomegalovírus (AD169) e da amostra do sarampo que foi a vacinal Edmonston adaptada à linhagem contínua denominada Vero:

- Orthopoxvírus- vacínia e cowpox (variola bovina)
- Herpesvírus- herpes simples (VHS) tipo 1 e 2, varicela- zoster (V-Z) e citomegalovírus (CMV)
- Enterovírus- poliovírus tipo III
- Flavivírus- dengue tipo I
- Rubivírus- vírus da rubéola (rubella)
- Paramyxovírus- vírus do sarampo

Estes vírus foram inoculados em tubos de células RC-IAL, utilizando-se em média de 4 a 6 tubos para cada amostra de vírus, o volume inoculado variou de 0,1 a 0,2 ml contendo 100 DICT_{50%}. As células inoculadas foram incubadas a 36°C e observadas ao microscópio comum invertido por 21 dias, com troca do meio de manutenção (MME

com 1% SV), a cada 4-5 dias. Da mesma maneira, procedeu-se com 4-5 tubos de RC-IAL não inoculado com vírus e que representaram os controles das células. Os tubos que apresentaram ECP com 3 a 4 cruces (+) foram congelados a -70°C para posterior passagem. Também foram congelados os tubos que não apresentaram ECP após os 21 dias de observação. Exceção aos tubos inoculados com os vírus V-Z em que a passagem foi realizada com as células em suspensão. Todos os tubos após descongelamento foram tratados pelo ultrassom, centrifugados a 2.000 rpm por 15 min e 0,5 ml do sobrenadante foram inoculados em garrafas plásticas de 30 ml (Descarplast).

Foram usadas 2 a 3 garrafas para cada amostra de vírus e também 2 a 3 garrafas não inoculadas serviram de controles das células RC-IAL. As garrafas foram incubadas a 36° , observadas por mais 21 dias com troca de meio a cada 6-7 dias. O uso da garrafa plástica visou unicamente a comprovação fotográfica.

Resultados

A linhagem celular RC-IAL, com a típica aparência fibroplástica (Fig. 1) vem sendo cultivada há 15 anos no mesmo meio de crescimento, sem nenhuma alteração na sua morfologia ou taxa de multiplicação celular, pois a monocamada desde sua cultura primária é formada em 72 horas na proporção de repique de 1:3, fato comprovado pelo estudo da curva de crescimento, indicando que o maior índice de multiplicação está em torno do 3^o e 4^o dias de cultivo, com a duplicação do número de células semeadas (Fig. 2).

De acordo com os estudos da eficiência de plaqueamento, onde o número de colônias de tamanho médio foi calculado em relação ao número de células semeadas, esta linhagem apresentou uma eficiência de clonagem ao redor de 9%, sugerindo que esta linhagem apesar de ser de fácil manutenção é muito sensível a pequenas alterações do meio durante seu cultivo.

Em relação ao crescimento dependente de ancoragem, a linhagem RC-IAL não formou colônias quando semeadas em ágar semi-sólido, em contraste com a linhagem celular HeLa, que nas mesmas condições permitiu a formação de colônias facilmente identificadas.

A análise cromossômica realizada na 150^a passagem mostrou que numa amostragem de 110 metáfases, 28 possuíam 44 cromossomos, o número modal da espécie ($2n=44$) (Fig. 3) e em 16 e 14 metáfases, respectivamente, possuíam uma variação de mais ou menos um cromossomo. A somatória destas variações está ao redor de 50%.

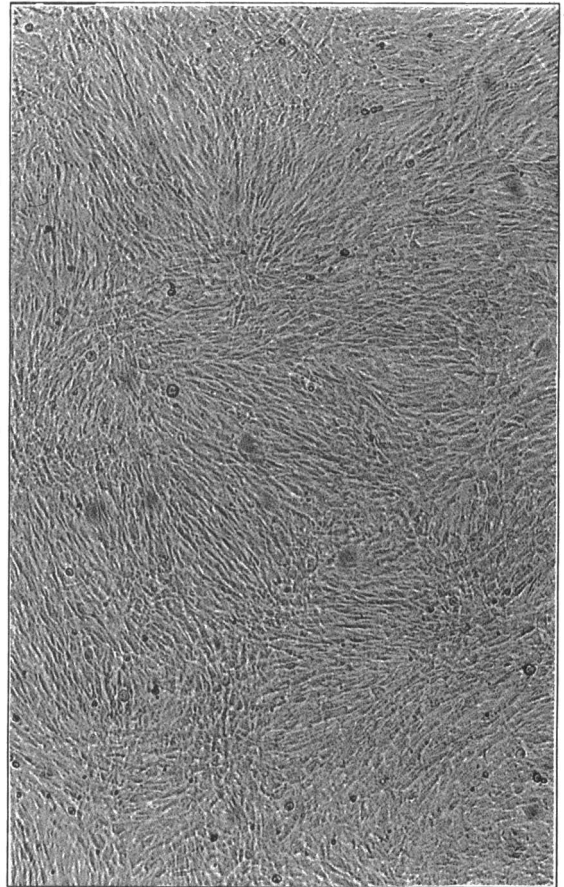


Figura 1. Monocamada normal da linhagem RC-IAL. Células alongadas com típica aparência fibroblástica, aumento 200x.

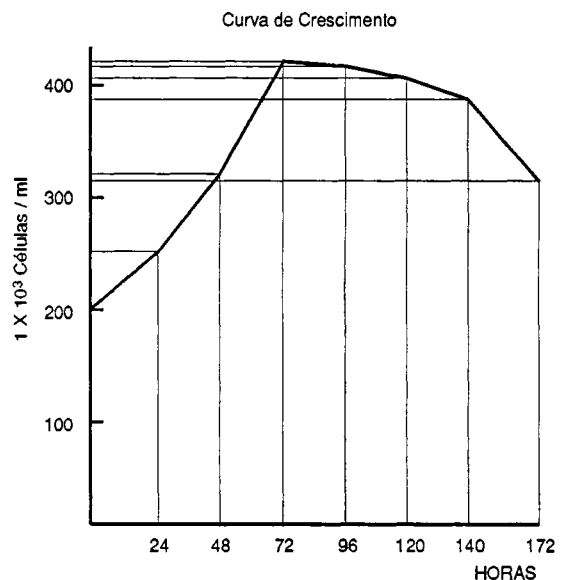


Figura 2. Curva de crescimento da linhagem RC-IAL.

Número de células	3	1	1	6	5	8	11	16	28	14	2	1	1	1	3	1	1	2	1	1	1	2
Número de cromossomos	35	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	52	78	81	82	83	84	86	87	88

Figura 3. Freqüência do número de cromossomos em 110 células da linhagem RC-IAL.*

* Espécie de origem: *Oryctolagus cuniculus* (2n = 44).

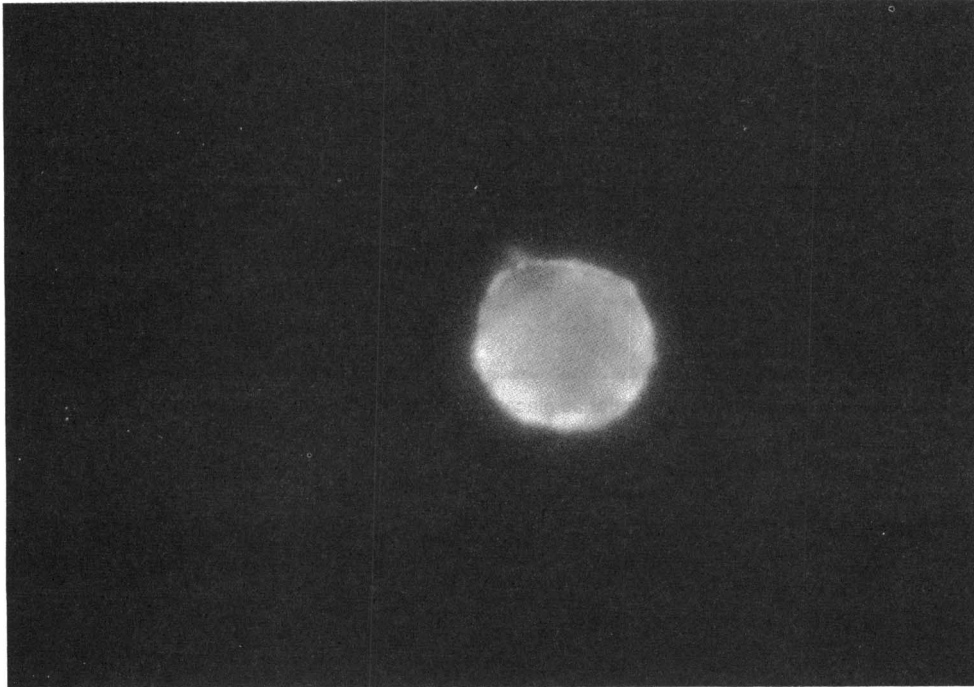


Figura 4. Comprovação da espécie de origem-imunofluorescência indireta da célula RC-IAL, aumento 400x.

A comprovação da espécie de origem foi realizada por imunofluorescência indireta, onde o anticorpo anti-coelho apresentou uma ligação específica com a linhagem celular RC-IAL, com alta intensidade de fluorescência (Fig. 4), em relação à linhagem celular HeLa, utilizada como controle, que resultou completamente negativa.

Em relação à susceptibilidade dos vírus usados, houve replicação dos vírus da vacínia, cowpox, herpesvírus tipo 1 e 2 e da rúbeola com apresentação do ECP evidente e característicos destes vírus (Fig. 5, 6, 7, 8 e 9).

Os demais vírus inoculados não apresentaram quaisquer alterações no aspecto morfológico da RC-IAL, isto é, as células permaneceram durante os períodos de observação iguais ou semelhantes aos controles.

Discussão

Novas linhagens celulares despertam interesse nas diferentes áreas de pesquisa, razão pela qual descrevemos esta nova linhagem celular estabelecida de rim de coelho (RC-IAL), que vem sendo cultivada neste laboratório desde 1976 sem jamais ter sido tratada com qualquer antibiótico ou fungicida. Esta linhagem tem sido utilizada para isolamento e identificação de vírus e, nos últimos 3 anos, para detectar "in vitro" citotoxicidade de materiais médico-hospitalares que entram em contato com o ser humano⁵.

Quando comparou-se o comportamento das células RC-IAL com outras linhagens estabelecidas de rim de coelho, verificou-se que esta foi a única linhagem de rim de coelho descrita na literatura

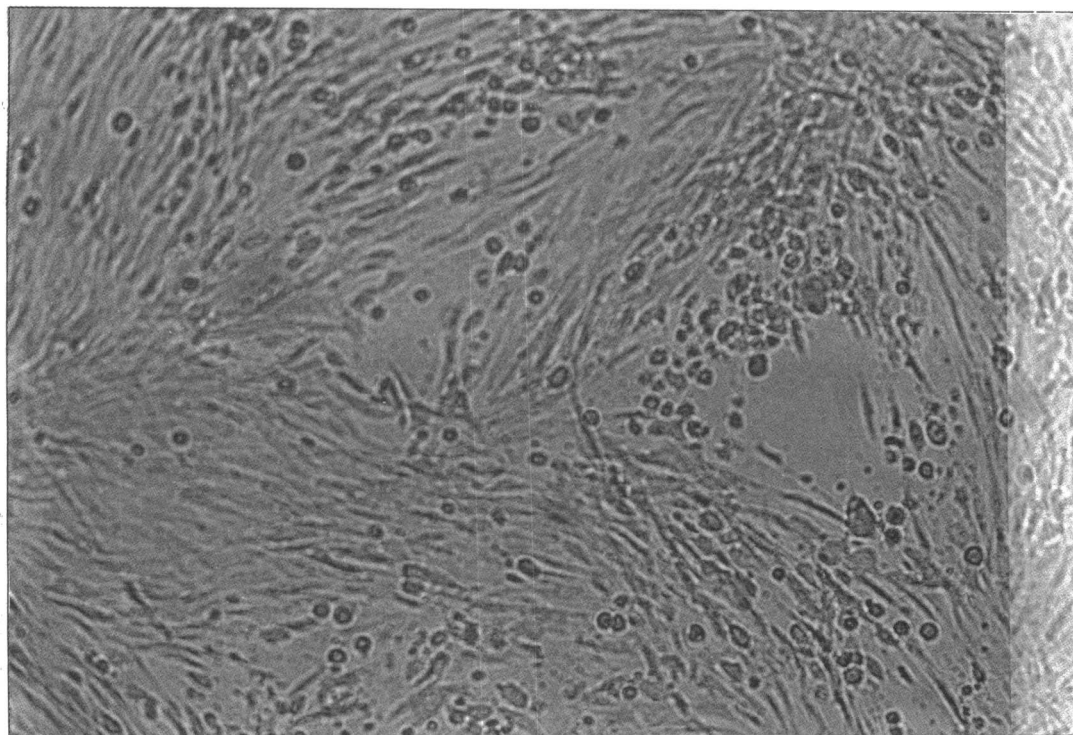


Figura 5. ECP com aparecimento de pequenas placas formadas pelos vírus cowpox, aumento 200x.

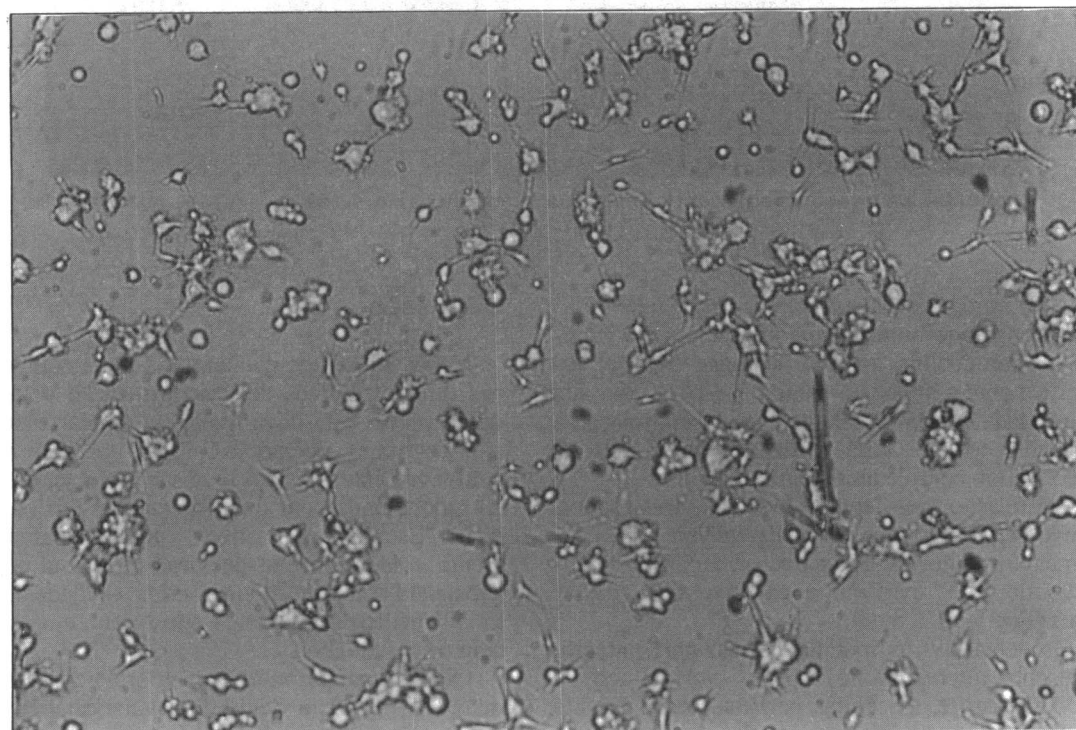


Figura 6. ECP causado pelo VHS do tipo 1, aumento 200x.

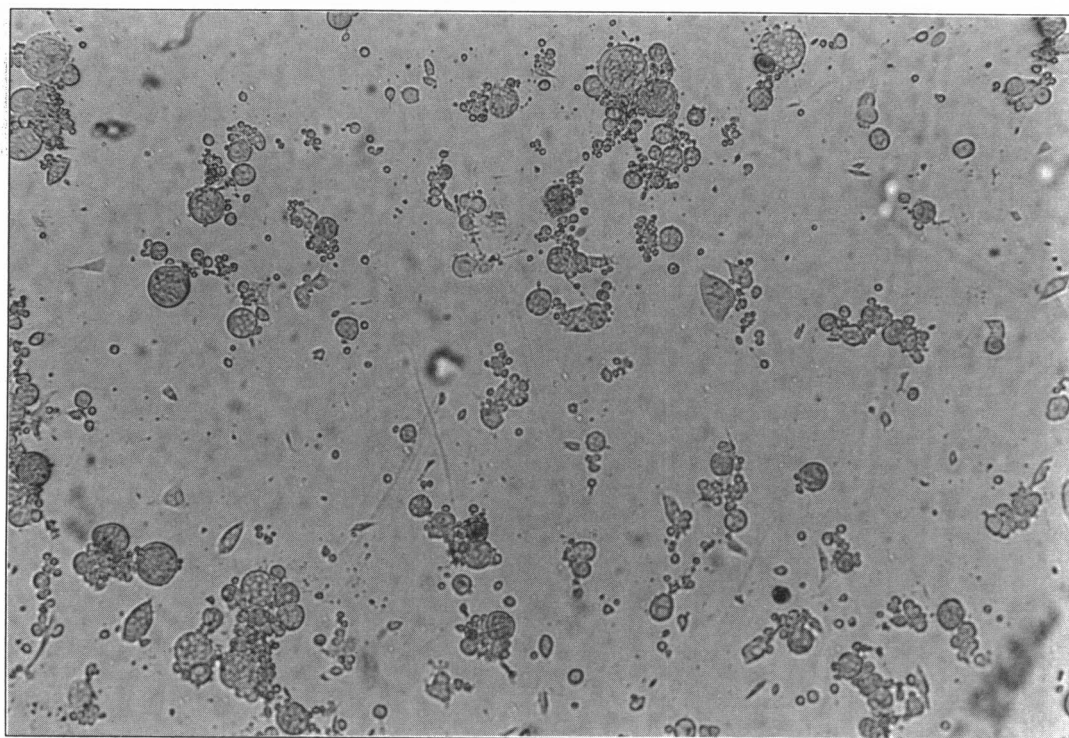


Figura 7. ECP causado pelo VHS tipo 2, aumento 200x.

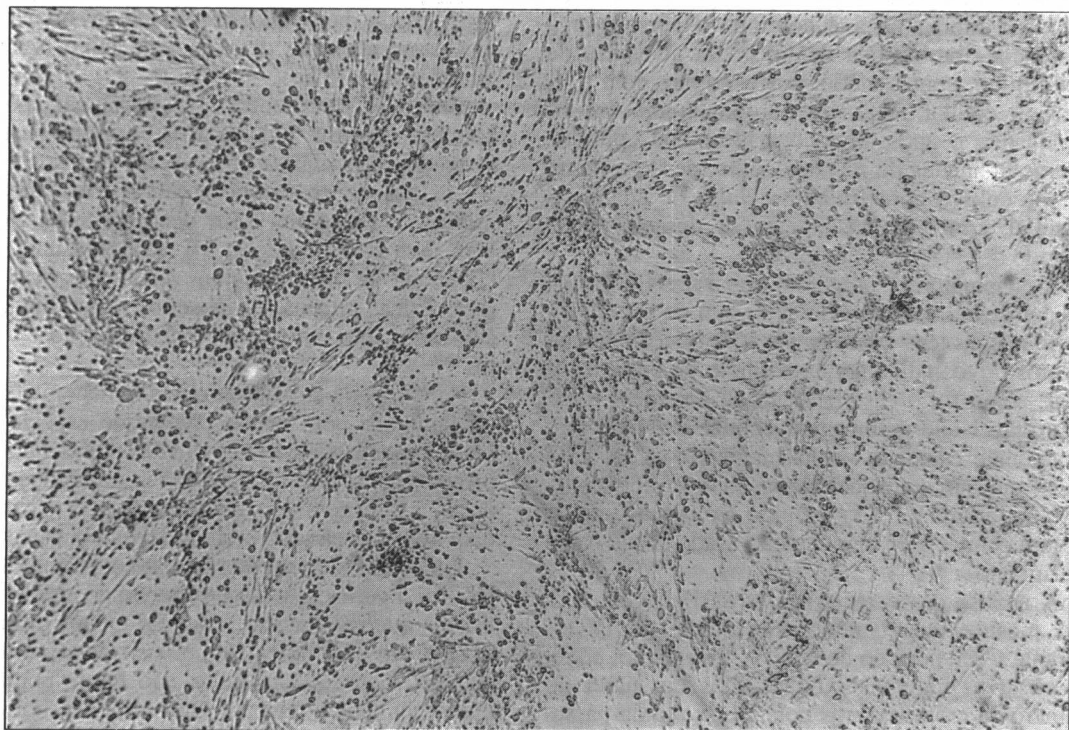


Figura 8. ECP causado pelo vírus da rubéola (rubella), aumento 200x.

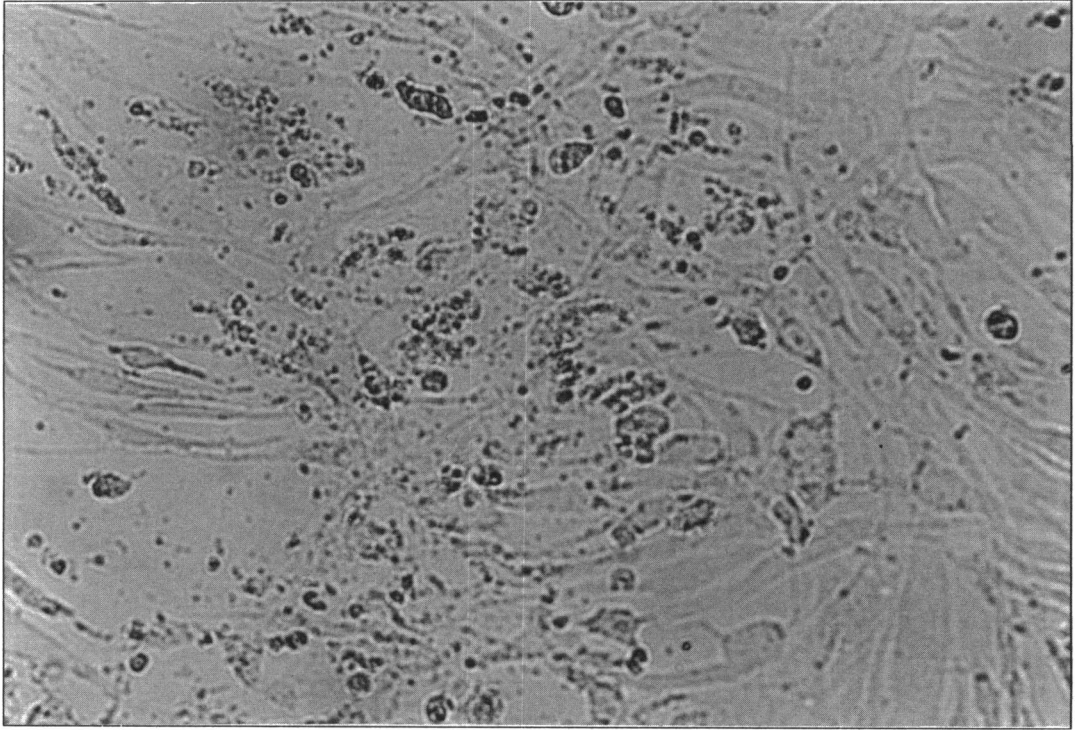


Figura 9. ECP causado pelo vírus da rubéola (rubella) em maior aumento, (200x).

especializada que até a 150ª passagem não sofreu alteração morfológica e continua a apresentar a aparência fibroblástica demonstrada no início de seu cultivo, contrastando, por exemplo, com a linhagem celular RbK, que originalmente era fibroblástica e após alterações tornou-se epitelial. Outras linhagens de rim de coelho, desde o início de seu cultivo apresentaram células de aparência epitelial, com algumas alterações durante o seu período de estabelecimento^{4,8,13}.

Alguns autores^{6,9} sugerem que a transformação celular de culturas de células de rim de coelho recém-isoladas teve como causa a introdução de elementos novos adicionados ao meio de cultura celular, como foi o caso descrito da linhagem RbK. É provável que a linhagem celular RC-IAL recentemente estudada venha mantendo-se até 150ª passagem sem quaisquer alteração morfológica devido ao fato de ter sido mantido o mesmo meio de cultura celular e de manutenção usado desde o seu isolamento.

A análise das características da linhagem RC-IAL mostrou que ela não sofreu alterações visíveis durante o seu período de cultivo. Entretanto, pôde-se observar algumas modificações em nível do número de cromossomos pois, por volta da passagem 150ª, o seu cariótipo apresentou-se 50% alterado significando que esta linhagem não pode ser

considerada diplóide, mas, também, não pode ser considerada heteroplóide porque o número de metáfases alteradas deveria, para tanto, ser igual ou maior que 75%.

Em relação às outras características, pode-se concluir que esta linhagem não apresentou transformação espontânea apreciável "in vitro", pois: 1ª) a taxa de crescimento celular permaneceu a mesma; 2ª) continua a ser dependente de ancoragem para se multiplicar; 3ª) apresenta uma baixa eficiência de plaqueamento. Alterações destas características citadas são observadas nas linhagens celulares que sofreram transformação "in vitro"^{3,7,10,12}.

Ainda, pode-se afirmar que a linhagem não está contaminada com outras células de espécie diferente, e que é originária de rim de coelho, fato comprovado pela sua caracterização imunológica. Além disso, a linhagem tem sido testada periodicamente para identificação da ausência de micoplasmas.

Uma das metas projetadas para o presente trabalho, foi a verificação da replicação de alguns vírus usados que resultassem, em pelo menos duas passagens, em ECP apreciável através da microscopia comum. Conseqüentemente, não foram realizadas quaisquer tentativas para verificação se houve ou não replicação dos vírus na linhagem contínua RC-IAL inoculadas e que não manifestaram CPE.

Quanto ao emprego desta linhagem em diagnóstico virológico além da susceptibilidade aos vírus da vacínia e cowpox, aos herpesvírus tipos I e II e ao vírus da rubéola, vem sendo realizado, há algum tempo, como já foi referido anteriormente, seu uso na área de citotoxicidade "in vitro", onde a RC-IAL demonstrou ser altamente sensível para detectar pequenos níveis tóxicos de vários materiais médico-hospitalares quando comparados a outras linhagens celulares já citadas na literatura⁵.

Não foi encontrada na literatura nacional especializada, nenhuma linhagem celular de origem animal, isolada em nosso meio, que tenha sido tão extensivamente caracterizada.

Com estas informações pode-se utilizar um substrato celular sem contaminantes e com história e características bem definidas, que são condições essenciais para o desenvolvimento de trabalhos científicos.

CRUZ, A.S. et al. [RC-IAL: rabbit kidney cell line - Characteristics and substrate for viral multiplication]. *Rev. Saúde públ.*, S.Paulo, 26: 392-9, 1992. A rabbit kidney cell line RC-IAL, isolated in 1976 and at present at 150^a passage, has had its characteristics analysed. The cells presented morphology similar to fibroblasts throughout their culture. The cellular growth proportion remained unaltered from its isolation, with a cloning efficiency of around 9%. The line showed growth dependent on anchorage and chromosomic analysis presented the modal number of the species with small variations to about one chromosome, to a total of about 50%. The line's species of origin was confirmed through indirect immunofluorescence reaction and susceptibility to some viruses with cytopathic effect was verified with vaccinia, cowpox, herpes simplex types 1 and 2 and rubella viruses. This cellular substrate is free from contaminating agents, thus satisfying the conditions for its use in scientific work, especially that relating to public health.

Keywords: Cells, cultured. Cell separation. Cytopathogenic effect, viral.

Referências Bibliográficas

1. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. *Catalogue of cell lines & hybridomas*. 5th ed. Rockville, Md., 1985.
2. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. *Quality control methods for cell lines*. Rockville, Md., 1985.
3. AYRES, K.N. High cloning efficiency of human lymphoid cells in agarose without feeder layer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 68: 919-23, 1982.
4. BEALE, A.J.; CHRISTOFINIS, G.C.; FURMINGER, I.G.S. Rabbit cells susceptible to rubella virus. *Lancet*, 2: 640, 1963.
5. CRUZ, A.S.; CUPPOLINI, K.M.; MARTINEZ, C.H.O.; SALLES-GOMES, L.F. Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, S.Paulo, 47: 51-7, 1987.
6. DREW, R.M. Isolation and propagation of rabbit kidney epithelial like cells. *Science*, 126: 747-8, 1957.
7. FRESHNEY, R.I. *Culture of animal cells: a manual of basic techniques*. 2th ed. New York, Alan, R. Liss Inc, 1987.
8. HULL, R.N.; DWYER, A.C.; CHERRY W.R.; TRITCH, O.J. Development and characteristics of the rabbit kidney cell strain, LLC-RK₁₃. *Proc. soc. exp. biol. Med.*, 118: 1054-9, 1965.
9. LENNETTE, E.H. & SCCHIMIDT, N. J. *Diagnostic Procedures for viral rickettsiae and chlamydia infections*. 5th ed. Washington, American Public Health Association, 1979.
10. MUKHERJI, B.; MACALISTER, T.J.; GREHA, A.; GILLES, C.G.; JEFFERS, D.C.; SLOCUM, S.K. Spontaneous in vitro transformation fibroblasts. *J. Natl. Cancer Inst.*, 73: 583-93, 1984.
11. PAUL, J.R. *Cell and tissue culture*. 5th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1985.
12. SAMFOR, K.K. & EVANS, V.J. A quest for the mechanism of "spontaneous" malignant transformation in culture with associated advances in culture technology. *J. Natl. Cancer Inst.*, 68: 895-913, 1982.
13. WESTWOOD, J.C.N.; MACPHERSON, I.A.; TITMUS, D.H.J. Transformation of normal cells in tissues culture its significances relative to malignancy and virus vaccine production. *Brit. J. exp. Path.*, 38: 138-54, 1957.

Recebido para publicação em 18.5.1992

Reapresentado em 25.8.1992

Aprovado para publicação em 28.8.1992