

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE SOROS DE BEZERROS UTILIZADOS NA MANUTENÇÃO DE CULTURAS CELULARES USADAS EM VIROLOGIA

Elisabeth Christina Nunes Tenório*
Francisco Liauw Woe Fang*
Olga Kikue Akimura*
Anatércia Ferreira Bonfim Yano*
Edda de Rizzo*
Bruno Strufaldi**
Mario Hirata**
Dulcinéia Saes Parra Abdalla**
Massaio Mizuno Ishizuka***

TENÓRIO, E.C.N. et al. Caracterização bioquímica de soros de bezerros utilizados na manutenção de culturas celulares usadas em virologia. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 23:162-9, 1989.

RESUMO: Oito lotes de soros de bezerros com idade maior ou menor de seis meses, usados para suplementar meios de cultivo de linhagens de células de uso difundido em virologia, foram testados quanto à sua capacidade promotora de crescimento (CPC) e classificados como bons promotores ou promotores pobres. Foram pesquisados parâmetros relacionados com macronutrientes para estabelecer o perfil bioquímico daqueles lotes. Os resultados obtidos podem ser considerados valores normais para animais aparentemente saudáveis. As variações que ocorreram para um mesmo parâmetro bioquímico, entre os resultados da pesquisa e os de alguns estudos existentes na literatura, podem ser atribuídas à metodologia utilizada, à raça e idade dos animais, ou mesmo à própria dieta regional. A análise estatística, realizada pela aplicação do teste "t" de Student aos valores das médias e dos desvios padrão, demonstrou que, com relação às frações séricas, não ocorreram diferenças significativas entre soros de CPC celular boa ou pobre, considerando-se $t_c=2,45$, enquanto que, para soros animais maiores ou menores de seis meses, apenas os resultados relativos às frações alfa e beta ($t=2,68$ e $2,61$, respectivamente) apresentaram significância, sendo superiores ao t crítico. Ficou evidenciado que a avaliação do conjunto de parâmetros bioquímicos pesquisados não permite diferenciar soros pertencentes aos dois grupos de animais, isto é, identificar soros de boa ou de pobre CPC, ou soros de bezerros maiores ou menores de seis meses de idade

DESCRIPTORIOS: Soro bovino. Células cultivadas. Substâncias de crescimento. Proteínas sanguíneas.

INTRODUÇÃO

O verdadeiro início da cultura celular coincidiu com a demonstração de que fragmentos de tecidos de rã mantinham sua função normal "in vitro" quando colocados sobre gotas de linfa homóloga (Harrison¹⁹, 1910). A descoberta da importância do plasma sanguíneo como meio de cultura, entretanto, deveu-se a Burrows⁶ (1910), ao adaptar para animais homeotermos, técnicas de cultura de tecidos usadas para anfíbios.

O aperfeiçoamento de métodos de cultura celular apresentou grande impulso com o advento dos meios de cultura elaborados por Earle¹⁵, Hanks¹⁸, Dulbecco e Vogt¹⁰, Eagle^{11,12,13}, dentre

outros. Apesar da qualidade apresentada pelos meios de cultura atuais, consequência de anos de melhoramento, poucas linhagens adaptam-se ao crescimento em meios quimicamente definidos. Para a maioria das células, o soro, seja de vitelas ou fetal, continua sendo um componente essencial do meio de cultura (Eagle¹¹, Eagle e Piez¹⁴, Parker³³, Paul³⁴). Discute-se o número e os tipos de fatores de crescimento presentes no soro, mas grande número deles é derivado do plasma, soro e plaquetas^{3,32,38,39}, com a função de estimular a multiplicação celular e a adesão das células ao substrato e seu posterior achatamento, protegê-las de danos mecânicos, promover sua sobrevivência em cultura, fornecer proteínas transportadoras de hormônios, minerais, lipídeos, neutrali-

* Seção de Cultura de Tecidos e Controle do Serviço de Virologia do Instituto Butantan - Av. Vital Brasil, 1500 - 05504 - São Paulo, SP - Brasil.

** Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - Cidade Universitária - 05508 - São Paulo, SP - Brasil.

*** Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - Av. Corifeu de Azevedo Marques, 2720 - 05340 - São Paulo, SP - Brasil.

zar enzimas proteolíticas 21, 23, 27, 29, 30, 33, 36, entre outros.

Pelo fato da capacidade promotora de crescimento celular apresentada pelos soros de origem bovina variar de lote para lote, o teste prévio desse desempenho, frente às células que se pretende utilizar, constitui procedimento de rotina, principalmente quando são adquiridos de casas comerciais ³⁶.

A presente pesquisa teve por objetivo a caracterização bioquímica e a comparação de alguns componentes em soros de bezeros considerados bons e/ou maus promotores de crescimento celular em soros de animais com idade inferior e/ou superior a seis meses.

MATERIAL E MÉTODO

Soro bovino

Oito lotes de soros de bezeros, apresentando volumes individuais de cerca de sete litros, foram obtidos de bezeros de raças diversas, de até seis meses de idade, em matadouro particular, e maiores de seis meses, na Fazenda São Joaquim, do Instituto Butantã. O sangue dos primeiros foi colhido na linha de abate por secção da veia jugular; o dos segundos, por punção jugular. Coletado em frascos de 500 ml, o sangue foi deixado coagular por 2h, teve seu coágulo cortado, foi resfriado a 2-8° C por 12-15 h e centrifugado (centrífuga International, modelo PR-2) a 700g por 30 min., sob refrigeração. Os "pools" de sobrenadantes, após inativação a 56° C durante 30 min., foram clarificados por filtração em placas Seitz tipo K-5, esterilizados em placas Seitz tipo EKS, distribuídos e congelados a -20° C ³⁶.

Meio de Cultura

Foi usado o meio Eagle MEM modificado ³⁶ nos testes dos soros, quando linhagens celulares foram cultivadas para a determinação da capacidade promotora de crescimento de cada lote.

Determinação da Capacidade Promotora de Crescimento (CPC)

Foi empregado o meio Eagle MEM, suplementado com 10% de cada um dos oito lotes de soro em teste na manutenção das linhagens celulares Vero ¹, HEp₂ ¹ e LLC-Mk₂ ¹, escolhidas para a determinação da CPC de cada um ³⁶, por serem de uso difundido em Virologia. Soros de boa CPC, para cada uma das linhagens celulares, foram empregados em paralelo como controles positivos.

Determinação dos Componentes Bioquímicos

Os lotes de soros de bezeros foram submetidos aos seguintes testes bioquímicos: Colesterol total, Leffler e McDougald ²⁸; Lipídeos totais, Frings e col. ¹⁶ e Zollner e Krisch ⁴¹; Creatinina, Lustgarten e Wenk ³¹ método cinético; ácido úrico, Henry e col ²⁰; Uréia, Wibenga e col. ⁴⁰; Glicose, Dubowski ⁹; Fósforo inorgânico, Taussky e Shorr ³⁷ modificado; Cálcio, Connerty e Briggs ⁷; Proteínas totais, Gornall e col. ¹⁷; Frações protéicas, Kohn ^{25,26}.

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos ao teste "t" de Student para diferença entre duas médias. Fixou-se em 0,05 o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na literatura pesquisada (1984-1987) não foram encontrados trabalhos semelhantes sobre características bioquímicas de soros de bezeros empregados para suplementar meios de cultura usados no cultivo de células animais "in vitro". Esses soros constituem "pools" preparados com o sangue de animais de várias raças e idades, e deles se exige, principalmente, que apresentem boa capacidade de promover o crescimento das células (CPC).

A qualidade de um soro, isto é, sua capacidade promotora de crescimento varia com o lote e, embora esteja condicionada, principalmente a fatores de crescimento nele contidos, depende também de outros componentes séricos. Variação também verifica-se com relação aos animais e, visando minimizar as diferenças individuais, preparam-se lotes de soros de volume razoável, pela mistura do sangue de número elevado de doadores.

No presente estudo pesquisou-se, além da capacidade promotora de crescimento (CPC) de oito lotes de soros ³⁶, as concentrações das frações séricas (albumina, alfa, beta, e gamaglobulina), que foram avaliadas tendo em vista o estabelecimento de uma possível correlação entre o aumento e a diminuição de proteínas que carregam antígenos (alfaglobulinas) ou hormônios e ferro (betaglobulinas).

Ligeiras flutuações referentes aos valores de algumas frações séricas observadas nos grupos de animais maiores e menores de seis meses (Tabela 1) não serviram, entretanto, de indicadores de soros portadores de boa ou de pobre CPC. A análise da Figura permite verificar a similaridade apresentada pelos perfis eletroforéticos dos soros analisados.

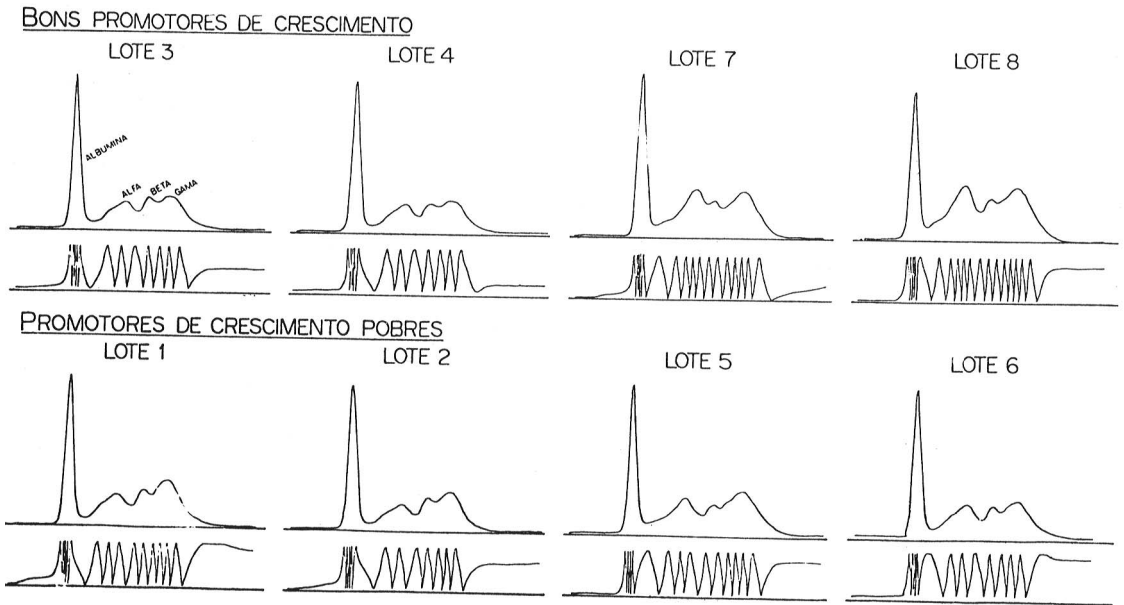


Fig. - Perfil eletroforético de soros de bezeros, usados em cultura celular, SP, 1986.

Dentre os outros parâmetros bioquímicos avaliados na pesquisa estão alguns cuja importância para o crescimento das células em cultura é reconhecida, como a do colesterol, que participa na biossíntese da membrana; de componentes nitrogenados não protéicos como o ácido úrico que, sendo produto de catabolismo e antioxidante, parece desempenhar função protetora de membrana; da creatinina e uréia que, em excesso, podem inibir o crescimento celular devido à sua ação tóxica; de íons cálcio, que têm função fundamental na adesão das células ao substrato; das proteínas totais, dentre as quais está a albumina, componente de elevado peso molecular que desempenha função física, protegendo as células em cultura de danos mecânicos ^{21,23}; da glicose, que é fator limitante

de crescimento quando em baixa concentração, assim como precursora comum em vários mecanismos bioquímicos realizados a nível celular; dos lipídeos totais, necessários à sobrevivência celular e, particularmente, ao seu crescimento.

Os resultados dos testes bioquímicos, a que foram submetidos os oitos soros, foram agrupados de acordo com dois critérios: a) reunião dos lotes de soros de bezeros com menos de seis meses aos lotes de soros de animais com mais de seis meses, sendo os dados obtidos apresentados nas Tabelas 2 e 3; b) reunião dos lotes de soros considerados bons ou pobres, com relação à capacidade promotora de crescimento celular, com resultados constando nas Tabelas 4 e 5.

TABELA 1

Capacidade promotora de crescimento de soros bovinos

Frações	Pobre				Boa			
	< 6 Meses		> 6 Meses		< 6 Meses		> 6 Meses	
Protéicas	Lote 01	Lote 02	Lote 05	Lote 06	Lote 03	Lote 04	Lote 07	Lote 08
Albumina	2,85	3,32	3,49	3,05	3,10	3,52	2,90	2,29
Alfa	1,50	1,28	1,75	1,45	1,41	1,24	2,34	2,26
Beta	1,14	1,07	0,49	1,04	0,96	1,11	0,71	0,77
Gama	2,24	1,84	1,86	1,87	1,67	1,17	1,68	2,22
Total	7,73	7,51	7,59	7,41	7,14	7,04	7,63	7,54

TABELA 2

Soros de bezerros com menos de seis meses, segundo lote e componentes sanguíneos, SP, 1986.

Componentes	Lotes				Média (\bar{X})	Desvio Padrão (s)
	1	2	3	4		
Colesterol ^a	106,65	68,52	64,70	63,19	75,76	20,71
Lípídeos						
Totais ^a	281,21	229,11	196,30	181,21	221,96	44,27
Creatinina ^a	1,69	1,55	1,66	1,58	1,62	0,07
Ácido Úrico ^a	0,68	2,18	1,96	2,00	1,70	0,69
Uréia ^a	36,00	24,00	31,00	40,00	32,75	6,90
Glicose ^a	49,63	54,91	49,86	37,79	48,05	7,26
Fósforo						
Inorgânico ^a	7,16	7,92	9,36	9,61	8,51	1,17
Cálcio ^a	9,65	8,09	9,04	9,92	9,18	0,81
Proteínas						
Totais ^b	7,73	7,51	7,14	7,04	7,36	0,32
Albumina ^b	2,85	3,32	3,10	3,52	3,20	0,29
Alfa ^b	1,50	1,28	1,41	1,24	1,36	0,12
Beta ^b	1,14	1,07	0,96	1,11	1,07	0,08
Gama ^b	2,24	1,84	1,67	1,17	1,73	0,44

a= mg%

b= g%

Os valores dos doseamentos realizados neste estudo podem ser considerados normais, tendo em vista que os animais doadores eram aparentemente saudáveis. Com relação aos valores obtidos por Kaneko²², em 1980, verifica-se que, para proteínas totais, albumina, beta e gamaglobulina, assim como para a glicose, os resultados foram comparáveis; para as alfaboglobulinas, uréia, ácido úrico e colesterol, ocorreram concentrações superiores às descritas e, para a creatinina e o cálcio, foram registrados valores inferiores aos relatados pelo referido autor.

Resultados relativos a proteínas totais, obtidos por D'Angelino e col.⁸ e por Perk e Lobl³⁵, inferiores aos de Kaneko²², concordaram com os dados resultantes desta pesquisa, enquanto que estudos de Kennedy e col.²⁴ apresentaram valores de fósforo inorgânicos bem inferiores, porém, níveis comparáveis de glicose. Valores de lipídeos totais constatados por Araujo e col.² e por Birgel e col.^{4,5}, foram comparáveis aos desta pesquisa, porém, os níveis de fósforo inorgânico foram inferiores, e os de cálcio, bem mais elevados.

As variações para um mesmo parâmetro bioquímico, encontradas nos estudos existentes na literatura sobre o assunto, podem ser atribuídas à metodologia utilizada, à raça e idade dos animais, assim como à própria dieta regional. Na pesquisa que ora se relata, foram estudados bovinos de idade inferior à daqueles investigados na literatura, pertencentes a várias raças, dos quais se obtiveram lotes de soros que foram submetidos a caracterização, pois, este tipo

de informação dificilmente é encontrada por aqueles que se dedicam ao cultivo de células, ou que se utilizam de culturas celulares para uma variada gama de experimentos em virologia.

A análise estatística dos resultados foi realizada pela aplicação do teste "t" de Student, aos valores das médias (\bar{X}) e dos desvios padrão (s). Os valores calculados para "t", considerando-se seis graus de liberdade, $\alpha=5\%$ e "t" crítico = 2,45, são apresentados na Tabela 6. Com relação às frações séricas, a análise evidenciou que não ocorreram diferenças significativas entre soros de capacidade promotora de crescimento celular boa ou pobre, considerando-se o "t" crítico mencionado, e que, para os soros de animais maiores ou menores de seis meses, os resultados referentes às frações alfa e beta, superiores ao "t" crítico (2,68 e 2,61, respectivamente), foram significantes. Para os demais parâmetros bioquímicos avaliados, os resultados obtidos não diferiram significativamente, de modo a permitir diferenciar soros de boa ou de pobre CPC, assim como soros de bezerros menores ou maiores de seis meses de idade.

Os parâmetros pesquisados no presente artigo apenas avaliaram macroconstituintes e os resultados obtidos revelaram não haver diferenças significantes entre aqueles soros considerados bons ou maus promotores de crescimento. Assim, seria oportuno prosseguir o estudo de outros fatores que estão relacionados com os micronutrientes e com peptídeos biologicamente ativos (somatomedina e outros) e, também, de hormônios relacionados com o crescimento.

TABELA 3

Soros de bezerros com mais de seis meses, segundo lote e componentes sanguíneos, SP, 1986.

Componentes	Lotes				Média (\bar{X})	Desvio Padrão (s)
	1	2	3	4		
Colesterol ^a	140,19	79,30	132,01	72,65	106,04	34,98
Lipídeos						
Totais ^a	346,01	234,36	343,52	244,91	292,20	60,86
Creatinina ^a	1,58	1,59	1,79	1,79	1,69	0,12
Ácido Úrico ^a	0,72	1,74	0,77	2,60	1,46	0,89
Uréia ^a	34,00	33,00	29,00	31,00	31,75	2,22
Glicose ^a	30,92	79,97	32,86	77,67	55,36	27,12
Fósforo						
Inorgânico ^a	6,15	8,56	8,34	8,43	7,87	1,15
Cálcio ^a	8,78	9,83	9,65	9,22	9,37	0,47
Proteínas						
Totais ^b	7,59	7,41	7,63	7,54	7,54	0,10
Albumina ^b	3,49	3,05	2,90	2,29	2,93	0,50
Alfa ^b	1,75	1,45	2,34	2,26	1,95	0,42
Beta ^b	0,49	1,04	0,71	0,77	0,75	0,23
Gama ^b	1,86	1,87	1,68	2,22	1,91	0,22

a= mg%

b= g%

TABELA 4

Soros de bezerros com boa capacidade promotora de crescimento celular, segundo lote e componentes sanguíneos SP, 1986.

Componentes	Soros com capacidade promo- tora de crescimento boa				Média (\bar{X})	Desvio Padrão (s)
	Lotes					
	3	4	7	8		
Colesterol ^a	106,65	68,52	64,70	63,19	75,76	20,71
Lipídeos						
Totais ^a	281,21	229,11	196,30	181,21	221,96	44,27
Creatinina ^a	1,69	1,55	1,66	1,58	1,62	0,07
Ácido Úrico ^a	0,68	2,18	1,96	2,00	1,70	0,69
Uréia ^a	36,00	24,00	31,00	40,00	32,75	6,90
Glicose ^a	49,63	54,91	49,86	37,79	48,05	7,26
Fósforo						
Inorgânico ^a	7,16	7,92	9,36	9,61	8,51	1,17
Cálcio ^a	9,65	8,09	9,04	9,92	9,18	0,81
Proteínas						
Totais ^b	7,73	7,51	7,14	7,04	7,36	0,32
Albumina ^b	2,85	3,32	3,10	3,52	3,20	0,29
Alfa ^b	1,50	1,28	1,41	1,24	1,36	0,12
Beta ^b	1,14	1,07	0,96	1,11	1,07	0,08
Gama ^b	2,24	1,84	1,67	1,17	1,73	0,44

a= mg%

b= g%

TABELA 5

Soros de bezerros com capacidade promotora de crescimento celular pobre, segundo lote e componentes sanguíneos. SP, 1986.

Componentes	Soros com capacidade de promotora crescimento pobre				Média (\bar{X})	Desvio Padrão (s)
	Lotes					
	1	2	5	6		
Colesterol ^a	106,65	68,52	140,19	79,30	98,66	32,00
Lípídeos						
Totais ^a	281,21	229,11	346,01	234,36	272,67	54,21
Creatinina ^a	1,69	1,55	1,58	1,59	1,60	0,06
Ácido Úrico ^a	0,68	2,18	0,72	1,74	1,33	0,75
Uréia ^a	36,00	24,00	34,00	33,00	31,75	5,32
Glicose ^a	49,63	54,91	30,92	79,97	53,86	20,22
Fósforo						
Inorgânico ^a	7,16	7,92	6,15	8,56	7,45	1,04
Cálcio ^a	9,65	8,09	8,78	9,83	9,09	0,81
Proteínas						
Totais ^b	7,73	7,51	7,59	7,41	7,56	0,14
Albumina ^b	2,85	3,32	3,49	3,05	3,18	0,28
Alfa ^b	1,50	1,28	1,75	1,45	1,50	0,19
Beta ^b	1,14	1,07	0,49	1,04	0,93	0,30
Gama ^b	2,24	1,84	1,86	1,87	1,95	0,19

a= mg% b= g%

TABELA 6

Valores de "t" para soros de bezerros menores e maiores de seis meses e para soros com boa e pobre capacidade promotora de crescimento celular (CPC). SP, 1986.

Componentes	Soros de Bezerros	
	< 6 meses versus > 6 meses	Boa CPC versus CPC Pobre
Colesterol ^a	1,49	0,68
Lípídeos		
Totais ^a	1,87	0,68
Creatinina ^a	1,00	1,67
Ácido Úrico ^a	0,43	0,92
Uréia ^a	0,98	0,28
Glicose ^a	0,52	0,30
Fósforo		
Inorgânico ^a	0,72	2,44
Cálcio ^a	0,40	0,82
Proteínas		
Totais ^b	1,06	1,38
Albumina ^b	1,00	0,76
Alfa ^b	2,68	1,03
Beta ^b	2,61 *	0,29
Gama ^b	0,75	1,17

a = mg% b = g%

t α = 2,45

* teste significante

TENÓRIO, E.C.N. et al. [Biochemical characterization of calf sera used for the growth of cell cultures used in virology]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 23:162-9, 1989.

ABSTRACT: Eight lots of the calf sera employed to supplement culture media for the cultivation of animal cells, of widespread use in virology obtained from calves above and below six months of age were rated as good or as poor cell growth promoters according to their growth promoting capacity (GPC). Parameters related to macronutrients contained in these serum lots were then evaluated with the purpose of establishing their biochemical profiles. The results obtained can be considered as normal values for apparently healthy animal donors. Fluctuations found between the data of this investigation and those mentioned in the literature for certain biochemical parameters are probably due to the methodology employed, the breed and age of the animals, or even to regional diet. Student's "t" test was applied for the statistical analysis of the results and demonstrated that, as far as serum fractions were concerned, no significant differences occurred between sera rated as good and poor cell growth promoters, taking $t_c = 2.45$. For calf sera from animals above and below six months of age, two tests relating to alfa and beta fractions were significant ($t = 2.68$ and 2.61 respectively). It was demonstrated that the evaluation of the biochemical parameters mentioned "per se" neither leads to the identification of calf sera presentig good or poor GPC, nor of sera harvested from calves younger or older than six months.

KEYWORDS: Serum, bovine. Cells, cultured. Growth substances. Blood proteins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas. 5th ed. Rockville, Md, 1985.
2. ARAUJO, L.M.; D'ANGELINO, J.L. ; BIRGEL, E.H.; ARAUJO, W.P.; REICHMANN, C.E. Influência da gestação e do puerpério sobre alguns constituintes do sangue de bovinos da raça holandesa branca e preta. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S.Paulo*, 14: 37-43, 1977.
3. BARNES D.; WOLFE, R.; SERRERO, G.; McCLURE, D.; SATO, G. Effects of serum spreading factor on growth and morphology of cells in serum-free medium. *J. Supramol. Struct.*, 14: 47, 1980.
4. BIRGEL, E.H.; PEREIRA, P.C.; AMARAL V.; BARROS, H.M. Diferença observada entre a taxa de lipídeos totais do plasma e do soro de bovinos. *Arq. Inst. Biol.*, S.Paulo, 31(4): 17-20, 1964.
5. BIRGEL, E.H.; BOTTINO, J.A.; AMARAL, V. Considerações sobre o teor de gamaglobulina no plasma de três lotes de bovinos da raça Hereford. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S.Paulo*, 7: 475-9, 1965.
6. BURROWS, M.T. The cultivation of tissue of the chick embryo outside the body. *J. Amer. med. Ass.*, 55:2507-8, 1910.
7. CONNERTY, H.V. & BRIGGS, A.R. Determination of serum calcium by means of sodium alizarinsulfonate. *Clin. Chem.*, 11: 716-28, 1965.
8. D'ANGELINO, J.L.; ARAUJO, L.M.; BIRGEL, E.H.; REICHMANN, C.E.; ARAUJO, W.P. Influência da gestação e do puerpério sobre o protcinograma sanguíneo de bovinos da raça holandesa branca e preta. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 12:197-204, 1975.
9. DUBOWSKI, K.M. An o-Toluidine method for body-fluid glucose determination. *Clin. Chem.*, 8: 215-35, 1962.
10. DULBECCO, R. & VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J.exp.Med.*, 99:167-82, 1954.
11. EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122:501-4, 1955.
12. EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130 : 432-7, 1959.
13. EAGLE, H. The sustained growth of human and animal cells in protein-free environment. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 46: 427-32, 1960.
14. EAGLE, H & PIEZ, K.A. The utilization of proteins by cultured human cells. *J. biol. Chem.*, 235: 1095-7, 1960.
15. EARLE, W.R. A technique for the adjustment of oxygen and carbon dioxide tensions and hydrogen ion concentration in tissue cultures planted in Carrel flasks. *Arch. Exp. Zl.*, 16: 116, 1934.
16. FRINGS, C.S.; FENDLEY, T.W.; DUNN, R.T.; QUEEN, C.A. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phosphovanillin reaction. *Clin. Chem.*, 18: 673-4, 1972.
17. GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. biol. Chem.*, 177: 751-66, 1949.
18. HANKS, J.II. The longevity of chick tissue cultures without renewal medium. *J.cell. Comp. Physiol.*, 31:235-60, 1948.
19. HARRISON, R.G. Observations on living developing nerve fibers. *Proc. Soc. exp. Biol. Med*, 140: 1905-7, 1910.

20. HENRY, R.J.; SOBEL, C.; KIM, J. A modified carbonat-ephosphptungstate method for the determination of uric acid and comparison with the spectrophotometric uricase method. *Amer. J. clin. Path.*, 28:152-9, 1957.
21. HOLMES, R. & WOLFE, S.W. Serum fractionation and the effects of bovine serum fractions on human cells grown in a chemically defined medium. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 10: 389-401, 1961.
22. KANEKO, J.J. Normal concentrations of blood constituents in domestic animals. In: Kaneko, J.J. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 3rd ed. New York, Academic Press, 1980. p. 792-7.
23. KATSUTA, H.; TAKAOKA, T.; HOSAKA, S.; HIBINO, M.; OTSUKI, I.; HATTORI, K.; SUZUKI, S.; MITAMURA, K. Protein requirements of rat ascites hepatoma cells in tissue culture. *Jap. J. exp. Med.*, 29: 45-70, 1959.
24. KENNEDY, W.L.; ANDERSON, A.K.; BECHDEL, S.I.; SHIGLEY, J.F. Factors affecting plasma calcium and inorganic phosphorus concentrations in the cow with particular reference to pregnancy, lactation and age. *Brit. vet. J.*, 120: 385-8, 1964.
25. KOHN, J. A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis. *Clin. Chim. Acta*, 2: 297-303, 1957.
26. KOHN, J. Small-scale membrane filter electrophoresis and immunoelectrophoresis. *Clin. Chim. Acta*, 3 : 450-4 , 1958.
27. LEFFERT, H.L.; MORAN, T.; BOORSTEIN, R.; KOCH, K.S. Procarcinogen activation and hormonal control of cell proliferation in differentiated primary adult rat liver cell cultures. *Nature*, 267: 58-63, 1977.
28. LEFFLER, H.H. & McDOUGALD, C.H. Estimation of cholesterol in serum. *Amer. J. clin. Path.*, 39: 311-5, 1963.
29. LIEBERMAN, I & OVE, P. Purification of a serum protein required by a mammalian cell in tissue culture. *Biochem. Biophys. Acta*, 25: 449-50, 1957.
30. LIEBERMAN, I. & OVE, P. A protein growth factor for mammalian cells in culture. *J. biol. Chem.*, 233: 637-42, 1958.
31. LUSTGARDEN, J.A. & WENK, R.E. Simple, rapid kinetic method for serum creatinine measurement. *Clin. Chem.*, 18: 1417-22, 1972.
32. NEVO, Z. & LARON, Z. Growth factors. *Amer. J. Dis. Child.*, 133: 419-29, 1979.
33. PARKER, R.C. *Methods of tissue culture*. New York, Harper & Brothers, 1961.
34. PAUL, J. *Cell and tissue culture*. 4th ed., New York, Edinburg E. & S. Livingstone, 1970.
35. PERK, K. & LOBL, K. A comparative study on the sera proteins and lipids in two breeds of cattle. *Brit. vet. J.* 115: 411-5, 1959.
36. RIZZO, E. de; TUCHIYA, H.N.; MARTINEZ, C.H. *Técnicas básicas de cultura celular*. 4a. ed. São Paulo, Instituto Butantan, 1983.
37. TAUSKY, H.H. & SHORR, E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. biol. Chem.*, 202: 675- 85, 1953
38. TEMIN, H.M.; PIERSON Jr., R.W.; DULAK, N.C. The role of serum in the control of multiplication of avian and mammalian cells in culture. In: Rothblat, G.H. & Cristofalo, V.J., eds. *Growth, nutrition and metabolism of cells in culture*. New York, Academic Press, 1972. v. 1, p. 49-81.
39. VOGEL, A.; ROSS, R.; RAINES, E. Role of serum components in density-dependent inhibition of growth of cells in culture. *J. cell Biol.*, 85: 377-85, 1980.
40. WIBENGA, D.R.; DI GIORGI, J.; PILEGGI, V.J. Manual and automated methods for urea nitrogen stressful under water demolition training. *Arch. intern. Med.*, Philadelphia, 132: 808- 12, 1973.
41. ZÖLLNER, N. & KRISCH, K. Über die quantitative Bestimmung Lipoiden (mickromethode) mittels der vielen naturlischen Lipoiden (cellen Bekannten Plasma Lipoiden) gemeinsamen sulfophosphovanilin reaktion. *Z. Gesamte Exp. Med.*, Berlin, 135: 545-61, 1962.

Recebido para publicação em 16/3/1988

Reapresentado em 19/11/1989

Aprovado para publicação em 16/2/1989