

CULTURAS CELULARES: Aspectos gerais e técnica

João Andréa

(Prof. Adjunto de Histologia e Embriologia Geral)

A sobrevida dos tecidos fora do organismo, já havia sido objeto da curiosidade dos homens, muito antes que os estudos viessem precisar as condições necessárias e os fatores precisos, imprescindíveis, não só à própria sobrevida como, também e essencialmente, à vida indefinida de seus componentes elementares — as células.

Os olhos mais profanos, nos abatedores civilizados ou nas caatingas longínquas, vêem os movimentos das carnes, após a morte do animal, supressas, de conjunto, as funções chamadas vitais... Não mais circula o sangue, nem o oxigênio penetra nos pulmões, derramando-se nas artérias. A vida dos tecidos e das células, entretanto, não terminou ao paralizar o coração seus batimentos rítmicos, nem ao fechar seus alvéolos o pulmão. Continua uma vida vegetativa, onde, apesar de tudo, os estímulos são, muitas vezes, respondidos. Nuns tecidos mais que noutros. É o caso, por exemplo, conhecido por todos, das contrações do músculo cardíaco das tartarugas e dos cágados, resistentes à temperatura da ebulição.

Mas, em maior ou menor espaço de tempo, as sobrevivências de tecidos e células cessam. Só o método científico pode tornar as células imortais.

CONSIDERAÇÕES GERAIS — A sobrevivência das células tem um limite, condicionado, essencialmente, a três fatores principais: invasão microbiana, falta de nutrição e intoxicação pelos produtos catabólicos do metabolismo celular.

As pesquisas foram endereçadas no sentido de fazer desaparecer êstes três fatores negativos. O primeiro só foi possí-

vel evitar depois da era de Pasteur. A morte por desnutrição foi supressa com o emprêgo de meios artificiais ou naturais de alimentação. Finalmente, os produtos tóxicos da desassimilação podem ser contidos com uma renovação constante das substâncias alimentícias.

Já no século atual, Ross Granwille Harrison, trabalhando na Yale University, conseguiu cultivar, embora por tempo limitado, tecidos de animais de sangue frio, abrindo, portanto, caminho para um novo método experimental, valiosíssimo na elucidação de muitos problemas biológicos.

Burrows, assistente dos trabalhos de Harrison, aperfeiçoou sua técnica, alcançando o cultivo tecidular de animais de temperatura constante.

Não devemos esquecer os trabalhos anteriores de Jolly, de 1902, com o sangue dos batráquios, numa homenagem ao grande professor francês, homenagem preconizada por Verne.

Mas, realmente, o criador do método foi Alex Carrel, que, desde 1912, conservara células numa sobrevida ilimitada, determinando as condições necessárias, a técnica a seguir, a evolução dos elementos semeados, os efeitos dos vários fatores sobre o crescimento, etc.

Tôdas as condições necessárias à vida dos tecidos e células em cultura, quer sob a influência de fatores biológicos, físicos, hormonais, etc, resumem-se no estudo dos três elementos essenciais: infecção, desnutrição e intoxicação.

A supressão destes elementos é, relativamente, fácil, baseada nas pesquisas e estudos que se realizam em todos os centros científicos.

À assepsia mais rigorosa pode ser obtida, empregando todos os recursos da esterilização moderna. Não se deve esquecer que as bactérias têm maior resistência que as células e produzem, no meio de cultivo, a liquefação do plasma empregado, com a consecutiva descarga de toxinas.

A nutrição dos fragmentos é o segundo problema, já resolvido em toda linha, bastando cuidar de certas e determinadas condições, a começar pelo tamanho médio dos fragmentos a cultivar. Os fragmentos não podem ser muito pequenos, nem

muito grandes, porquanto, de um lado faltaria o estímulo para o desenvolvimento da colônia e do outro, o acúmulo de células, requereria uma dose muito maior de alimentos, renovados em tempo muito menor, tornando pouco prático o método. Pode-se estabelecer, como regra, que o volume de um fragmento tecidular é diretamente proporcional ao estímulo do crescimento e inversamente proporcional ao tempo de nutrição dos elementos celulares.

Policard determinou, assim, estudando o tecido epitelial do rim, um tamanho médio, de pêso, aproximado, de dois miligramas. Outros Autores, em número reduzido, é verdade, pensam que um pequeníssimo fragmento possa proliferar, como Olivo, afirmando que uma só célula é capaz de crescer ilimitadamente.

As células necessitam de um suporte sólido, que lhes sirva de esqueleto, em cujos espaços desenvolvem-se, obedecendo a um tropismo especial — o estereotropismo, nagado por W. e M. Lewis. Vêm êstes Autores no fato, apenas, um fenômeno passivo, próprio da viscosidade citoplasmática. O meio sólido, entretanto, é indispensável, não podendo as células sofrer reproduções em meio líquido. Huzella demonstrou que as forças da cristalização orientam os elementos e robustecem o crescimento fibroblástico.

A observação de certos fatores físicos é indispensável nas culturas celulares. A temperatura depende, naturalmente, da natureza do tecido e da espécie animal. Nos animais de sangue quente, os cultivos podem permanecer, em nosso clima, durante dias, à temperatura ambiente do laboratório, sendo de regra, entretanto, conservá-los na estufa à 37° C. Resistem muito mais às baixas temperaturas, que às altas, morrendo no limiar dos 50° C.

Outro fator físico ponderável é o pH do meio de cultura. Lewis e Felton estabelecem como limites extremos o pH 5,5 e o pH 9, sendo os pontos ideais variáveis de pH 7,4 a pH 7,8. O mais justo parece ser o estudo prévio do tecido a cultivar para a determinação da alcalinidade ou da acidez do meio, como recomenda Verne.

Os meios de cultivos hipotônicos permitem melhor desenvolvimento e mais rápido, segundo os estudos de Ruth, de Eberling, etc. A hipertonia, ao contrário, é inibidora do processo. Gomirato e Olivo experimentaram a ação da água destilada, obtendo um mais alto coeficiente mitótico.

As condições químicas principais estão condicionadas à presença indispensável de certas substâncias, como o oxigênio, substâncias orgânicas, sais minerais, aminoácidos, substâncias próprias do crescimento, resíduos hormonais, etc.

O oxigênio é o elemento primacial e só pode ser fornecido a fragmentos de pequeno volume. G. Levi observou, nos fragmentos maiores, uma zona central com fenômenos asfíxicos e, secundariamente, necróticos.

Entre as substâncias orgânicas, não pode faltar ao meio de cultivo a glicose. As células das culturas, embora necessitando de um suporte sólido, devem viver mergulhadas num meio aquoso, rico de certos sais minerais, de que os essenciais são o ferro, o zinco, e o níquel. A dessecação pequena, ainda, permite a sobrevida, como mostrou Mosorow, estudando o coração de batráquios.

Os aminoácidos estimulam as reproduções celulares, mas, segundo Carrel e Eberling, são incapazes de produzirem material próprio à renovação dos citoplasmas exaustos. Ephrussi verificou, de outro lado, que as culturas em franca atividade possuem fortes doses de glutatión.

O desenvolvimento dos cultivos é mantido graças à presença de uma substância, que, ainda, não pôde ser isolada, quer empregando dialisadores, quer ultra-filtros ou análises químicas minuciosas. Esta substância havia sido ideada por Carnot, que a usava nos extratos embrionários por êle aconselhados para a cicatrização de soluções de continuidade no tegumento ou nas mucosas. Foi, porém, Carrel quem a determinou bem, denominando-a de "trefonas". Sem a presença das trefonas só podem subsistir, nos cultivos celulares, células e tecidos embrionários de animais jovens, que ainda guardam uma energia residual de desenvolvimento. Não se conhece o mecanismo de ação das trefonas, nem sua natureza, mas, no câncer, como

mostraram Policard e Bouchardat, o plasma sanguíneo dos doentes possui alta porcentagem.

Finalmente, há a considerar os hormônios, levados em quantidade mínima no plasma empregado. É interessante, também, relacionar uma substância especial, provavelmente de natureza hormonal, produzida pelo fermento das células das culturas, muito ativa como estimulante do desenvolvimento e que Haberlandt denominou de "necro-hormonas".

Na ordem das substâncias tóxicas, elaboradas pelos fenômenos metabólicos da desassimilação celular, estão enquadradas as seguintes:

anidrido carbônico, agente do aumento de densidade do citoplasma e do núcleo celulares;

ácido láctico, produzido na destruição da glicose do meio de cultura;

citotoxinas, substâncias existentes nos soros de animais velhos; lipídeos, extraídos de suco embrionário e lançados no meio de cultivo, etc.

Estes produtos matam rapidamente as células, depois de provocarem a parada do crescimento da colônia, donde a imperiosa necessidade de retirá-los, reiteradamente, das células.

TÉCNICAS EMPREGADAS — As técnicas primitivas de Harrison e Burrows, falhas e imprecisas, foram substituídas por Alex Carrel, que elevou o método da cultura dos tecidos à perfeição de uma verdadeira intervenção cirúrgica, com seus cuidados de assepsia e esterilização, a delicadeza do manêjo dos instrumentos apropriados e especialmente desenhados e construídos para o caso, chegando a estabelecer salas de cultivo, munidas de um aparato completo, inclusive, ar acondicionado, etc.

As instituições menos bafejadas de patrimônio, naturalmente, ficavam, em muitos casos, privadas do auxílio experimental do método. Roffo idealizou sua caixa de cultura, substituindo a aparatosa instalação de Carrel pela simplicidade de seu pequeno aparelho.

A caixa de cultivos contém todo o material necessário, dispensando as inúmeras salas, os múltiplos técnicos ultra-especializados, etc. Dêste modo, Roffo forneceu aos centros menos favorecidos os meios precisos para o cultivo de tecidos e células.

A aplicação do método necessita de uma única sala, onde se processam tôdas as fases técnicas. O local dos cultivos, como é natural, deve estar provido de boa iluminação, evitada a penetração direta dos raios solares.

São elementos indispensáveis:

- 4 mesas pequenas;
 - 2 bancos giratórios;
 - 1 caixa de cultura, segundo o modelo de Roffo;
 - 1 incubadora, com capacidade para 50 ovos;
 - 1 estufa elétrica, regulável a 37° C;
 - 1 centrifugador, de 2 ou 4 tubos, de capacidade de 5.000 a 6.000 voltas por minuto;
 - 1 geladeira média, para conservação dos meios de cultura, plasma e suco embrionário;
 - 1 armário de vidro, para guarda da aparelhagem e da vidraria;
- Aparelhos, vidros e reativos, relacionados à medida da descrição. As mesas são destinadas à incubadora, à caixa de cultivos celulares, à estufa e ao preparo do plasma, suco embrionário, etc.

Para facilitar a compreensão da técnica seguida no Instituto de Medicina Experimental de Buenos-Aires, vamos procurar dar uma descrição completa da caixa de cultivos celulares, modelo do Professor Roffo.

Caixa de madeira, com 30 centímetros de altura, 45 centímetros de largura e 55 centímetros de comprimento, comportando: na face posterior, uma prateleira, onde ficam depositados os vidros de cultivo, que são pequenos saleiros, cobertos com uma tampa de vidro;

na face lateral esquerda, uma tomada para suporte de uma lâmpada de 40 watts e uma abertura, em continuação na

CULTURAS CELULARES

face anterior e por onde passa o braço esquerdo do operador; na face lateral direita, uma abertura semelhante à da face lateral esquerda, dando passagem ao braço direito do técnico e uma pequena janela, de corrediça, servindo para a passagem dos vidros de cultura, já semeados;

na face anterior, de cada lado, aberturas em continuação às aberturas laterais, direita e esquerda, que completam as passagens dos braços do técnico;

na face inferior, ou assoalho, encontra-se o material utilizado nos cultivos, composto, essencialmente, do seguinte:

20 caixas para cultivos, providos de suas respectivas coberturas;

4 pipetas, de pontas afiladas, de capacidade para 1 c. c. e 2 c. c.;

2 pipetas de capacidade de 20 c. c.;

2 caixas de Petri, para depósito de embriões;

2 blocos de madeira, servindo de mesas e para maior facilidade de sementeamento;

1 almofariz, de vidro, pequeno e sua mão;

2 pinças, de pontas afiladas;

2 tesouras pequenas, de pontas retas e finas;

1 pinça de Weber;

2 facas próprias para iridectomias;

4 tubos do centrifugador utilizado;

4 tubos de ensaio, pequenos;

na face superior ou teto, comportando quatro retângulos de vidro para facilitar a visão, notam-se 3 janelas corrediças e uma fixa do lado da lampada, além de uma pequena abertura circular, por onde podem passar pipetas.

As aberturas descritas nas faces laterais e continuando-se com as duas aberturas correspondentes da face anterior, formam um círculo, onde são presos dois manguitos de tecido resistente, com 60 centímetros, aproximadamente, de comprimen-

to e que serve para isolar os braços do operador do meio séptico ambiente. A caixa, com todo o material descrito, depois de esterilizada, está apta a servir.

Suponhamos que vamos cultivar tecido de coração de embrião de galinha. A técnica pode ser resumida no seguinte esquema:

- 1) ovos incubados, contendo embriões de 10 dias, são lavados com álcool, e quebrados com um choque no sentido do maior diâmetro;
- 2) deixa-se correr o excedente da albumina e da gema, colhendo-se, com pinça esterilizada, o embrião, que vai, diretamente, para a caixa dos cultivos por uma das aberturas de vidro da face superior;
- 3) abre-se o embrião com uma tesoura de ponta bem fina, extraíndo-se o coração, reconhecível pela forma e pelos batimentos, colocando-o em um dos vidros de cultura, mergulhado num pouco de solução de Ringer;
- 4) o restante do embrião é posto no almofariz para completa trituração, procurando-se homogenizar bem a pasta resultante com adição de soluto de Ringer, atingindo cêrca de 30 c. c.;
- 5) aspira-se com uma pipeta de 20 c. c., passando-se para os tubos do centrifugador, onde vai sofrer intensa centrifugação de 5.000 a 6.000 voltas por minuto, durante, aproximadamente, 5 minutos, quando é obtido um líquido amarelo-esbranquiçado, que é o suco embrionário;
- 6) o suco é passado, por aspiração, usando o mesmo caminho que para o embrião, para o interior da caixa de cultura, onde fica num dos tubos de ensaio;
- 7) para o interior da caixa vai também o plasma sanguíneo;
- 8) o embrião é cortado em fragmentos pequenos, utilizando-se para depósito de cada grupo de 3 fragmentos a tampa dos vidros de cultura;
- 9) com uma pipeta, aspira-se 4 partes de plasma sanguíneo

CULTURAS CELULARES

e 1 parte de suco embrionário, fazendo-se a mistura na própria pipeta e com a maior rapidez possível para evitar a coagulação;

- 10) coloca-se uma (ou duas) gôta desta mistura sôbre os fragmentos, obtendo-se logo a coagulação;
- 11) invertem-se as coberturas dos vidros de cultivos sôbre os respectivos vidros, onde já se encontra uma gota de solução de Ringer, que evitará a dessecação da própria cultura;
- 12) retiram-se os vidros da caixa de cultura pela janela, para-rafina-se as bordas e levam-se todos para a estufa a 37° C, marcando-se, a nanquim, as indicações precisas.

Convém lembrar que o operador deve fazer a mais rigorosa assepsia das mãos e dos braços, vestindo blusa e calçando luvas esterilizadas, antes de introduzi-los, pelas aberturas próprias, na caixa de cultivos.

Esta é a técnica mais simples, embora rigorosa em seus resultados. Praticamo-lo, repetidas vêzes, no Instituto Experimental e no Laboratório de Histologia de nossa Faculdade, com o maior sucesso e proveito. Alguns Autores usam a técnica de Carrel, mais susceptível de contaminação, parece-nos.

É necessário, agora, descrever a obtenção da solução de Ringer e do plasma sanguíneo. A solução de Ringer aconselhada por Verne para o cultivo de tecidos de Aves e Mamíferos é a seguinte:

Cloreto de sódio (Na Cl)	9 gr,00
Cloreto de cálcio (Ca Cl ²)	0 gr,25
Cloreto de potássio (K Cl)	0 gr,42
Água (H ² O)	1000 c.c.

Esta fórmula tem um pH aproximado de 6,5, logo, ligeiramente alcalina e pode ir ao autoclave para esterilização.

Roffo utiliza a mesma fórmula juntando 0gr,30 de bicarbonato de sódio, que abaixa, um pouco mais, o pH.

Outra solução também muito empregada e com bons resultados é a de Tyrode cuja fórmula é a seguinte:

Cloreto de sódio (Na Cl)	8 gr,00
Bicarbonato de sódio (Na HCO ³)	1 gr,00
Glucose	1 gr,00
Cloreto de potássio (Ca Cl)	0 gr,20
Cloreto de cálcio (Ca Cl ²	0 gr,20
Cloreto de magnésio (Mg Cl ²)	1 gr,10
Mono-fosfato de sódio (NaH ² PO ⁴	0 gr,05
Água (H ² O)	q.b.p. 1000 c.c.

O pH desta solução oscila de 7,0 a 7,5.

Para a obtenção do plasma sanguíneo seria um problema a escolha do animal doador, mas, Villanueva, fazendo um estudo comparativo, chegou à conclusão que o melhor plasma é o de galinha, para cuja obtenção seguiremos a seguinte marcha:

- 1) escolhe-se um galo jovem, submetido a dieta hídrica por 24 horas;
- 2) faz-se a perfeita contensão do animal, fixando-o numa tábua apropriada, de modo que fiquem prêsas as asas e uma das pernas;
- 3) retiram-se as penas da região correspondente ao encontro da coxa com o tronco, fazendo a assepsia local com solução alcoólica de iodo, fraca;
- 4) com material esterilizado, incisar a pele, pondo a descoberto os músculos coxais internos;
- 5) separar os músculos, de modo a perceber a grossa veia femural, que é pinçada do lado oposto à corrente circulatória;
- 6) munido de um balão de dosagens, de 100 cc, contendo um terço de solução de Ringer, ambos completamente resfriados no gelo, introduzir a ponta em bisel na veia, colhendo,

por aspiração, o mais rápido possível, o sangue, que fica separado do ar pela própria solução de Ringer (aproximadamente em dois minutos);

- 7) colocar o sangue obtido em tubos de centrifugação, também gelados e centrifugar intensamente;
- 8) o líquido amarelo-claro obtido é misturado, meio a meio, com solução de Ringer gelada e guardado na geladeira, constituindo a reserva de plasma sanguíneo.

Alguns pesquisadores preferem colhêr o sangue nas carótidas, com o fim de poupar o animal para outras sangrias.

Drew, ao envés de usar sempre o plasma de galinha, aconselha os plasmas homólogos, isto é, de animal da mesma espécie do tecido ou da célula a cultivar.

RESULTADOS — As culturas são observadas, geralmente, depois de 48 horas e podem ser examinadas ao microscópio, vivas, em estado natural ou após coloração vital, ou mortas e fixadas, depois da coloração adequada.

O exame dos cultivos em estado vivo requer alguma prática, mormente de certos tecidos, em que os elementos celulares apresentam, entre si, pequeníssimas diferenças do índice de refração. O estudo do conjunto é facilitado, principalmente, com a cultura do músculo cardíaco desde que se percebem os ritmados batimentos.

Após a coloração vital, obtida com corantes, que não prejudicam a vida dos elementos celulares, como o azul de tripan, o azul de pirrol, etc, o exame é facilitado, porquanto o núcleo, o citoplasma, as granulações, etc recebem doses diferentes e se mostram, uns, mais intensamente corados, outros, menos e, finalmente, alguns, sem coloração. Alguns corantes, como o verde janus, o vermelho neutro, mesmo em diluições fraquíssimas, interferem na vida celular, levando-a ao desaparecimento, donde seu emprêgo limitado.

As culturas fixadas foram mortas com substâncias ativas, capazes de paralizar a vida no menor espaço possível de tempo,

dando uma imagem dos elementos celulares do momento, como se num filme cinematográfico, de repente, a movimentação das figuras desaparecesse. Podem ser empregadas substâncias isoladas, como o formol a 10% ou compondo soluções especiais, como o fixador de Bouin, de Zenker, etc. Verne utiliza, com sucesso, o soluto de Ringer formulado a 15% e o Zenker-formol. Depois de devidamente fixados, são os fragmentos tecidulares cultivados, tratados com substâncias corantes, recomendada, especialmente, a coloração pela hematoxilina férrica de Weigert, composta de duas soluções:

Solução A:

Hematoxilina (Geigy)	1 gr.
Alcool a 95°	100 c.c.

Solução B:

Ácido clorídrico	1 c.c.
Solução de percloreto de ferro a 26%	4 c.c.
Água destilada	95 c.c.

No momento do uso, juntar a mesma quantidade A e B ($A + B = \tilde{a}$) e corar durante 2 minutos, lavando n'água corrente. Os resultados são magníficos, mostrando a cromatina nuclear belíssima imagem azul-escuro límpido.

Os fragmentos dos cultivos podem também, ser tratados como peças histológicas, sendo incluídos e cortados, à maneira do praticado, por exemplo, por Calabrese, cultivando tecido hepático.

O exame dos cultivos celulares, sob quaisquer dos métodos citados, mostra que o pequeno fragmento semeado tem sua vida autônoma. Nas culturas de miocárdio embrionário, por exemplo, nota-se, de logo, que as células emigram no meio de cultura; emitem, sob o aspecto de células filiformes, pseudópodos; dão contrações espontâneas e se espalham, à maneira de uma

coroa, em derredor do fragmento. As células formam uma zona central, fértil, seguida, logo, da zona média ou de invasão, ficando, por fora, a zona externa ou de degenerescência.

Para evitar a morte das células há necessidade de praticar repiques. Nos cultivos de coração embrionário de galinha, os repiques levam à transformação dos mioblastos em fibroblastos. As células, em cultivo, têm a capacidade de fagocitar, de emitir calor, de deslocar-se, etc, sofrendo a ação de muitos agentes físicos, químicos ou biológicos e reagindo, a cada um deles, como respondendo a estímulos próprios,

O tecido lançado à cultura, em geral, está associado a outros tecidos, formando, portanto, colônias mistas, que, pouco tempo depois, vão isolando os vários elementos, dominando uns sobre os outros, até se tornarem colônias verdadeiramente puras. Alguns Autores têm cultivado fragmentos de tecidos diferentes lado a lado, constituindo o que se chama de colônia afrontada. Fischer cultivou, assim, fibroblastos e elementos epiteliais. Rofo comparou as influências exercidas, reciprocamente, entre os tecidos normais e os cancerosos, não tendo, porém, observado diferenças nem num, nem noutro tecido.

TECIDOS CANCEROSOS — O cultivo de tecidos normais é possível em várias condições, como vimos, principalmente de Aves e Mamíferos. Nos tecidos cancerosos, obtêm-se os mesmos resultados, valendo o método como um meio ideal de verificar as reações celulares sem a interferência do organismo, quer as reações da própria célula cancerosa, quer sob o efeito de substâncias conhecidas como cancerígenas.

O cultivo celular só não foi possível, em caráter efetivo, nos Invertebrados, porquanto não se pode obter uma perfeita assepsia ou um meio nutritivo conveniente. M. A. Murray, em 1927, usou, como meio de assepsia, os raios ultra-violetas, obtendo, em certos casos, resultados positivos nos Planários. Em 1929, Fischer e Piette, utilizando os mesmos raios ultra-violetas, puderam cultivar, em parte, um fragmento ganglionar de um crustáceo.

As culturas de células cancerosas obedecem, em traços gerais, aos mesmos processos das culturas das células normais.

Carrel estudou bem os dois tipos essenciais de células nas culturas normais e cancerosas, a transformação de um dos tipos normais em elementos cancerosos, etc. Há o tipo celular amiboide, de elementos móveis, denominados, segundo as preferências dos Autores, de monócitos, histiócitos ou fagócitos e o tipo fibroblasto, fixo, que, nas culturas cancerosas, pode fagocitar, o que não sucede nos cultivos normais.

Não se tem a certeza científica absoluta de qual dos dois tipos representa a célula maligna numa cultura cancerosa. A cultura de um sarcoma, por exemplo, o sarcoma fusocelular de Roffo, produz, depois de algumas repicagens, células amibóides e células fibroblásticas. A inoculação da cultura provoca o desenvolvimento, no animal da experiência, de um tumor com os mesmos característicos dos tumores sarcomatosos fuso-celulares. Qual dos dois elementos — macrófagos ou fibroblastos — é o agente da malignidade? A resposta de Carrel e Fischer é pela responsabilidade do elemento móvel, ameboideo, tendo o último dos Autores verificado que o desaparecimento dos macrófagos nas culturas celulares inibe o desenvolvimento do enxerto, além da observação corrente da localização do vírus do sarcoma de Peyton-Rous, que se faz nos mesmos macrófagos.

O crescimento do tecido canceroso é mais lento, embora mais regular e rítmico, que o do tecido normal, mas possui o poder de predominância, de tal sorte que, semeados em culturas afrontadas, o tecido canceroso domina o normal, roubando as proteínas em seu próprio proveito. As pesquisas de Roffo, todavia, não confirmam o fato.

Outra face interessante do problema é a cancerização "in vitro" dos elementos celulares. Vários Autores têm-se ocupado do assunto, trazendo uma série de observações muito elucidativas. Assim, Fischer ajuntou, ao meio de cultivo de tecido embrionário da galinha; alcatrão e arsênico, em quantidades mínimas, tendo obtido, depois de uma série de repiques, o enxerto positivo de um tumor metastático. O controle da enxertia da cultura pura não deu desenvolvimento neoplásico algum.

CULTURAS CELULARES

Laser, com oito dias de intervalo de uma injeção venosa para outra, aplicou, na galinha, quatro doses, de duas gôtas cada, de alcatrão da hulha e duas doses subcutâneas da mesma substância, aproveitando o plasma do mesmo animal para a cultura de baço de embrião de galinha. Enxertada a cultura, assim realizada, obteve o desenvolvimento de um sarcoma metastásico em outra galinha.

Doljanski e Habberstaedter, em 1936, obtiveram células malignas, em culturas puras, de um sarcoma provocado, pelo benzopireno, no rato.

Bisceglie expôs culturas de tecido embrionário de galinha aos efeitos dos raios X, enxertando, após, a jovens animais da mesma espécie, estas culturas, para obter sarcomas. O Autor julga que o tumor se desenvolveu por modificações metabólicas dos tecidos.

AÇÃO DE FATORES VÁRIOS — Agentes de natureza variada influem no crescimento dos cultivos celulares. Ora, são fatores físicos, ora, químicos e biológicos.

A luz e sua influência nas culturas foi objeto de muitas pesquisas. Goodrich e Scott, em 1923, experimentaram várias intensidades luminosas, determinando que as células começam a reagir na intensidade de 270 velas, não considerando, entretanto, os Autores, a influência marcada do calor despendido pelas fontes luminosas.

Kier, em 1925, observou a paralização do desenvolvimento dos fibroblastos após a exposição, por 8 a 10 minutos, a uma lâmpada de quartzo. A ação do som foi, engenhosamente, estudada por Angel Roffo Junior, semeando fragmentos de Ogr,001 e expondo-os à irradiação contínua de determinados sons musicais, não tendo observado qualquer modificação, tanto nos tecidos normais como nos cancerosos.

Os raios de Roentgen não produzem "in-vitro", efeito, tanto como "in-vivo". A resistência das células cultivadas é muito maior, como demonstraram as experiências de Strangeways e Hapwood.

Roffo fez várias pesquisas, determinando a influência dos raios X nos tecidos semeados e logo irradiados, nos tecidos embrionários antes de semeados, etc, usando coração e tecido conjuntivo de embrião de galinha, de 9 a 10 dias de incubação. No primeiro caso, isto é, com a irradiação imediata de tecidos semeados, nenhuma diferença notou, mesmo aplicando altas doses de raios X. No caso das irradiações prévias do tecido a cultivar, fazendo a derivativa de irradiar o embrião, ainda, no ovo e o embrião fora do ovo, observou que os tecidos se desenvolviam bem se semeados até uma e meia hora depois da irradiação e davam culturas raquíticas se passadas 24 horas.

Levi e Sturmi verificaram que os animais irradiados fornecem um serum estimulado, da primeira até a segunda hora.

Doljanski, suprimindo o período de latência da ação dos raios X e utilizando um tubo de Coolidge, de anti-catodos cúpricos, com as seguintes indicações:

tensão: 2.800 volts
 corrente: 30 miliampères
 distância: 4 centímetros,

obteve, em um minuto, lesões e, em cinco minutos, a morte da cultura, empregando, como dose letal, a fabulosa cifra de 120.000 unidades r.

A ação do rádio foi pesquisada por F. G. Spear, que, usando:

sulfato de rádio: 0 gr, 100
 distância: 0 m, 005
 filtro: 0 m, 0005 de platina,

verificou:

tecido: coróide e esclerótica

1½ minutos: nenhum efeito.

2½ minutos: diminuíam as reproduções celulares.

80 minutos: diminuição de 40% das divisões celulares.

CULTURAS CELULARES

- 165 minutos: a volta da média de reproduções celulares.
240 minutos: as mitoses se elevavam a 160% das médias normais
360 minutos: restabeleciam-se as médias normais das reproduções dos elementos celulares.

As substâncias químicas foram estudadas por muitos pesquisadores, quer as substâncias minerais, quer as orgânicas.

Assim, por exemplo, Sannié e Jean Verne estudaram, de conjunto, a ação dos sais metálicos, empregando os cloretos e concluindo com a seguinte tabela de grau de toxidez:

- 1) sem toxidez: cálcio (Ca) e magnésio (Mg);
- 2) fracamente tóxicos (ativos em concentrações de n/120 a .. n/150;
amônio (NH⁴) estrôncio (Sr), bário (Ba) e manganês (Mg);
- 3) pouco tóxicos (ativos em concentrações de n/200 a n/1000):
ferro (Fe), chumbo (Pb), alumínio (Al), praseodímio (Pr), ítrio (Y), lantano (La), disprósio (Dy), tório (Th), bismuto (Bi);
- 4) tóxicos (ativos em concentrações de n/1000 a n/5000): cério (Ce), tálio (Tl), níquel (Ni), cobalto (Co), ouro (Au), platina (Pt), cobre (Cu), zinco (Zn);
- 5) muito tóxicos (ativos em concentrações acima de n/10.000):
cádmio (Cd), mercúrio (Hg).

Lambert, em 1916, aplicou o cloreto de mercúrio em diluição de 1: 120.000 e pôde observar um desenvolvimento normal.

Wilson, em 1922, mostrou que, mesmo em diluições de 1: 25.000 e 1: 50.000, respectivamente, o sulfato de cobre e o arsenito de sódio são tóxicos para os cultivos celulares.

Fischer observou que as células neoplásicas são muito mais sensíveis às diminuições das pressões de oxigênio que as células normais, mostrando, também, que as células neoplási-

cas suportam uma alcalinidade muito grande, não podendo o meio ser muito ácido para o seu desenvolvimento.

Ménégaux, Odiette e Moyses, em 1933, iniciaram pesquisas no sentido de determinar a toxidez dos metais, concluindo como se vê:

- 1) metais sem toxidez: ouro (Au), alumínio (Al) e chumbo (Pb)
- 2) metais pouco tóxicos: zinco (Zn), prata (Ag), estanho (Sn), níquel (Ni), volfrâmio (W) e tantálio (Ta)
- 3) metais muito tóxicos: cobre (Cu), ferro (Fe) e magnésio (Mg).

Burrows e Neymann, em 1917, procuraram determinar as doses tóxicas dos amino-ácidos nas culturas celulares, concluindo que as doses fracas atuam como inibidoras do desenvolvimento.

Odiette, em 1930, estudando a gênese das fibras elásticas, determinou a ação das seguintes substâncias orgânicas:

- 1) favoráveis ao desenvolvimento: ácido glutamínico, creatinina, fenil — B — alanina, prolina e triptofano.

O coeficiente cariocinético, com a glicocola, de 8 passa a 12, em média.

- 2) sem ação: alanina, cisteína, glutatiôn, leucina, serina e valina.
- 3) ação inibidora: cistina, fenil — A — alanina, histidina e lisina.

As substâncias farmacológicas e as vitaminas exercem ação sobre os cultivos celulares.

A adrenalina, por exemplo, foi estudada por Cervello e Levi, em 1917, que observaram a diminuição da atividade de crescimento das colônias das culturas celulares.

Roffo verificou que pequenas quantidades de insulina, acrescentadas ao meio de culturas celulares, inibiam o crescimento. Aumentando um pouco, em frações de 0,5 % a proporção insulínica, todo o desenvolvimento paralisava, tanto nos tecidos normais, como nos cancerosos.

Em 1931, Varga mostrou a ação inibidora de soluções diluí-

das de digitalina, que, em maiores concentrações, não têm tanta influência.

Carrel e Weïss estudaram, respectivamente, a ação estimulante sobre os cultivos celulares, da tireóide e da foliculina. O mesmo verificou Semura com respeito à antituitrina.

Os dados fornecidos pelo Prof. Roffo sobre a influência da colessterina vêm corroborar sua teoria étio-patogênica do câncer. A dosagem da colessterina existente nos cultivos celulares mostra a diminuição progressiva depois de 24, 48 e 72 horas. Os elementos em cultivo vão gastando, em proporções relativamente grandes, a colessterina existente de início.

Sáto e Semura mostraram que a tiroxina, em soluções a 1: 10.000, inibe o desenvolvimento, enquanto, em soluções a 1:1.000.000, favorece-n'o.

A vitamina A parece favorecer, o mesmo podendo se dizer da vitamina B, conforme as conclusões, para o primeiro elemento, de Bisceglie.

O estudo, de conjunto, do vasto capítulo das culturas celulares, òtimamente cuidado por Stern, Ephrussi, Craciun, etc, mostra bem sua importância nas experimentações biológicas, mormente, nas cancerológicas.