

CULTURA DE TECIDOS "IN VITRO"

PELO

DR. ROBERT A. LAMBERT

**Professor contractado de Anatomia Pathologica da Faculdade de
Medicina e Cirurgia de S. Paulo e Director do Instituto de
Anatomia Pathologica da mesma Faculdade.**

O nome do Sr. Prof. Lambert é, como vêm os nossos leitores, o que a "Revista de Medicina" tem a honra d'ora inscrever entre os dos seus collaboradores, e apparece já sob o estudo que abaixo publicamos.

Na Faculdade de Medicina é o erudito successor do Prof. Oskar Klotz, actualmente na regencia da cadeira de "Anatomia Pathologica" da Faculdade de Toronto, no Canadá, como, em S. Paulo dirigiu, na Faculdade, o mesmo ramo da Medicina,

Apresentando o Prof. Lambert, nada mais fazemos que declinar-lhe o nome e o titulo que vem illustrando tão proficiente-mente no lugar que lhe confiou o Governo, entre nós.

Os seus preclaros collegas de magisterio e os nossos leitores scientistas, em geral, têm, no seu trabalho de hoje (como o terão nos que se seguirem, por certo) a expressão segura do seu saber de Anatomo-Pathologista.

*

* *

Aos biologistas do seculo passado, sem duvida ocorreu a idea de cultivar tecidos animaes fóra do corpo. Realmente, a questão ha muito discutida dos factores que governam o crescimento e a differenciação de tecidos deve ter guiado muitos embryologistas a ter esperanza de conseguir um methodo que pudes- se permittir a observação de cellulas isoladas da influencia do corpo.

Mas, como no caso de quasi todos os importantes problemas scientificos, a solução do problema de cultivar tecidos "in vitro"

não veiu á memoria daquelles que primeiro della sonharam, mas sim áquelles que pelos seus esforços venceram todas as difficuldades technicas, de cuja remoção depende o successo.

E' minha intenção esta noite discriminar em poucas palavras o methodo de cultivar tecidos e apontar alguns dos resultados que foram obtidos com a applicação do methodo aos problemas biologicos e pathologicos.

Espero que os Surs. me desculpem se me refiro frequentemente ás minhas proprias experiencias. Se assim procedo, é devido a achar-me mais familiar com ellas do que com os estudos de outros investigadores neste terreno.

A historia da cultura de tecidos "in vitro" é a seguinte:

Em 1907 o Professor Harrison, da Universidade de Yale, depois de numerosas experiencias, conseguiu cultivar os tecidos de embrião da rã. Seu methodo é muito simples. Uma gotta de lymphé é aparada por uma pipeta de um dos saccos de lymphá da rã. A gotta de lymphá é posta sobre uma laminula. Um pedaço de tecido embryonico é então posto na gotta que immediatamente coagula. A laminula é virada em cima de uma lamina para gotta pendente, e o preparado é lacrado com vaselina. O preparado conserva-se á temperatura ambiente (15-24 ° C). Depois de poucos dias um crescimento das cellulas se observa.

As cellulas entram radialmente no espaço de tecido atravez de rêde de fibrina, que serve como suporte ás cellulas. As cellulas espalham-se sobre e atravez deste suporte em forma de uma parreira.

Nas experiencia subsequentes, Harrison demonstrou que os fios finos de algodão podiam substituir a fibrina nas culturas, isto é, gottas de sôro contendo pedacinhos de algodão podem ser tambem usadas em lugar de gottas de plasma. Elle tambem achou que as teias de aranha podem servir de suporte ás cellulas em crescimento.

O Prof. Harrison estava especialmente interessado no crescimento de fibras nervosas. Devido á difficuldade de obter quantidade sufficiente de lymphá de rã, a applicação do methodo era limitada.

Por subgestão do Prof. Mac Callum visitei, em 1910, o Prof. Harrison e discuti com elle a possibilidade de applicar este methodo á cultura dos tecidos de animaes que têm o sangue quente. Eu tenti cultivar-os no sôro de sangue, porém, sem resultados, porque o sôro não fornecia suporte para as cellulas. Ao mesmo tempo o meu amigo Dr. Burrows, do Instituto Rockefeller, assistente do Dr. Alexis Carrel, que trabalhava em relação ao mesmo problema, obtinha successo. Elle empregou como meio de cultura,

o plasma do sangue, que obtive de gallinhas por um processo simples. A cannula coberta de paraffina é introduzida na veia jugular. O sangue entra no tubo de prova que é também coberto com paraffina. O tubo é collocado immediatamente numa vasilha centrifugadora, cheia de gelo. A vasilha é então centrifugada durante poucos minutos e o plasma é tirado com uma pipetta e é posto em outro tubo de prova que é então conservado permanentemente no gelo. Burrows mostrou que por este methodo, o plasma de gallinha não coagula durante muitos dias, lesando este meio de cultura, e empregou o mesmo methodo de Harrison na preparação das culturas. Sub-culturas foram feitas dividindo a cultura primaria em diversos pedaços e transferindo os mesmos ás novas gottas de plasma.

Descobri que a technica de obter plasma de gallinha pode ser ainda mais simples, pelo seguinte modo:

Depois de depennar debaixo de uma aza e esterelizar bem a pelle, a veia é cortada, fazendo-se uma pequena incisão na pelle para evitar a contaminação do sangue com os fluidos dos tecidos. A aza é extendida para que o sangue caia directamente no tubo coberto de paraffina. O sangue obtido desta forma, pode ser conservada em estado fluido, tão bem como o sangue obtido por meio da cannula.

Esta descoberta de Borrowes abriu o caminho á extensa applicação do methodo de Harrison e, pouco depois, diversos outros investigadores succederam em cultivar os tecidos de varios animaes que têm sangue quente.

O Prof. Lewis e senhora, da Universidade de John Hopkins, acharam que as cellulas do embrião da gallinha cresceriam em solução de sães, de composição especial. Este meio não contém fibrina para o suporte das cellulas, porém, usando-se finas gottas da solução, os pedaços de tecido ligam-se ás laminulas e as cellulas espalham-se sobre a superficie inferior da laminula, isto é, o vidro toma o lugar da fibrina, como suporte das cellulas.

O meu collega, Dr. Frederick Hanes, e eu, applicamos o methodo ao estudo dos tecidos de animaes de sangue quente, especialmente ratos, camondongos e cobaias. Estavamos particularmente interessados no estudo de tumores malignos destes animaes. Demonstramos primeiramente que não era necessario, como se suppunha empregar o plasma homogenetico, isto é, plasmas mais ou menos bem no plasma de outras especies. Por exemplo: em outras palavras, que as cellulas de uma especie cresceriam mais ou menos bem no plasma de outras especies. Por exemplo, os tecidos do rato crescem no plasma do coelho, da gallinha, da

cobaia ou no de muitos outros animaes. Esta observação é em si de consideravel interesse biológico.

Tivemos algumas difficuldades nestas experiencias, especialmente na conservação do plasma; pois, enquanto os plasmas da gallinha, do homem e do cavallo podem ser conservados sem coagular durante dias, semanas, ou mezes, o plasma dos roedores pode ser conservado em estado liquido somente durante poucos minutos. Ainda mais, havia certas difficuldades technicas na obtenção de sangue, em sufficiente quantidade e condição, de animaes tão pequenos como ratos, etc.

O methodo especial da obtenção de sangue applicado, será apresentado mais adiante por meio de depositivos.

Mais tarde eu demonstrei que os tecidos do homem podiam ser cultivados pelo mesmo methodo, com pouca modificação. Descobri que o plasma puro do homem não é um sactisfatorio meio de cultura, porque a fibrina derrete-se rapidamente depois da incubação com tecidos, e as cellulas não tendo suporte, não crescem. Achei que esta difficuldade podia ser supprimida applicando uma mistura do plasma do homem com o da gallinha, o qual não derretia nestas condições.

O methodo de cultura dos tecidos tem-se empregado no estudo de varios problemas biologicos: — Os phenomenos de mitose, o crescimento das cellulas, o metabolismo de tecidos especiaes, particularmente o metabolismo da gordura, a origem de certos typos de cellulas, a relação entre cellulas de differentes formas, phagocytose, etc.

E' summamente interessante observar directamente as mudanças de uma cellula durante o processo de divisão. E' possivel vêr o agrupamento dos fios de chromatina, a separação dos dois grupos das chromosomas, e a divisão do cytaplasma da cellula. O tempo requerido para o inteiro processo varia conforme a temperatura; quanto mais alta a temperatura, tanto mais rapido o processo, dentro de certos limites naturalmente. Por exemplo: a 30° C. uma cellula divide-se em (40) quarenta minutos; a 38° C., somente 15-20 minutos são requeridos. A observação de que alguns typos de cellulas dividem-se numa temperatura comparativamente baixa (25-30°C) é extremamente interessante.

A velocidade de divisão varia tambem, como esperavamos nas differente especies de animaes. A velocidade de divisão de tecidos humanos é menos rapida, por exemplo, que a dos tecidos das gallinhas.

Um factio biologico muito interessante tem sido estabelecido, eu creio, pela cultura de tecidos, a saber: que as cellulas do corpo animal são immortaes, isto é, que sob condições proprias de nu-

trição ellas se multiplicarão infinitamente. Carrel logrou cultivar o tecido conjunctivo da gallinha durante um periodo de quasi oito annos, tempo mais longo do que ordinariamente a vida de uma gallinha, e não observou nenhuma diminuição na actividade das cellulas. Em outras palavras, mesmo depois de um longo periodo de cultura, as cellulas não mostram evidencia de velhice. Ha muito que os biologistas já suspeitavam que as cellulas somaticas fossem immortaes, porém, antes deste methodo ser desenvolvido, não podia ser provado.

Applicando o methodo aos problemas pathologicos, Hanes e eu investigamos a natureza do cancro transmissivel, como observado nos ratos e camondongos.

Descobriu-se, como os Snrs. provavelmente sabem, que uma certa porcentagem de ratos e camondongos são naturalmente immunes á inoculação destes tumores, e que outros podem ser immunizados pela injecção sub-cutanea de tecido normaes. A natureza desta immuidade tem sido objecto de muito estudo nos varios laboratorios de cancro.

Demonstramos que as cellulas do rato cresceriam tão bem no plasma dos ratos immunizados como no plasma dos ratos susceptiveis. Por isto chegamos á conclusão de que a immuidade do cancro não é uma immuidade do sôro, mas provavelmente uma immuidade dos tecidos. Deveria mencionar-se a este respeito que uma verdadeira immuidade cyto-toxica pode ser facilmente demonstrada por culturas de tecidos.

Por exemplo, as cellulas do rato crescerão bem no plasma da cobaia normal, mas não crescerão no plasma de uma cobaia immunizada contra os tecidos de rato por meio de injecções de sangue de rato.

Esta foi a primeira applicação do methodo da cultura de tecidos aos problemas pathologicos. Desde esse tempo, diversas outras questões pathologicas se têm investigado por este methodo.

Por exemplo, os effeitos comparativos de antisepticos sobre tecidos e bacterias se tem estudado. Este problema tem uma grande importancia pratica. Como os Snrs. sabem, não é possivel determinar o verdadeiro valor de antisepticos por methodos comuns, porque um antiseptico que produz um grande effeito "in vitro", pode produzir um pequeno effeito "in vivo"

Com a cultura de tecidos podemos simular "in vitro" as condições do corpo. Um antiseptico pefeito é um que mata a bacteria pathogenica e ao mesmo tempo não prejudica os tecidos. Ainda nenhuma substancia chimica mostrando esta qualidade tem-se descoberto.

Eu demonstrei com este methodo a notavel resistencia ao frio de certos tecidos. Por exemplo, se um pedaço de coração de embrião de gallinha fôr congelado pelo oxygenio de carvão (Co₂) comprimido durante meio minuto a uma temperatura aproximadamente de 60° C, as cellulas não são destruidas, como pode ser facilmente mostrado. Na cultura do pedaço de coração sujeito a este tratamento, as cellulas fibroblasticas crescem e as cellulas do musculo batem rhytmicamente.

Se eu tivesse tempo apresentaria muitos interessantes detalhes sobre estas experiencias.

Comquanto os tecidos em geral sejam resistentes ao frio, achei que elles são muito susceptiveis ao calor. Basta apenas uma temperatura de poucos graus acima da do corpo para matar as cellulas. A duração da exposição a tal temperatura é, naturalmente, um factor importante. Na maior parte dos casos a exposição á temperatura de tres graus acima da do corpo durante duas horas, destroe todas as cellulas.

No estudo comparativo de cellulas do cancro (sarcoma) do rato e cellulas fibroblasticas do mesmo animal, eu fiz uma observação significante, a saber: Que as cellulas de sarcoma são menos resistentes ao calor do que as cellulas normaes. Esta differença, porém, é pequena. Este principio tem sido applicado no tratamento do cancro, com algum exito.

Ha um outro importante terreno em que o methodo tem sido empregado, a saber: Na cultura de especies de micro-organismos que não crescem por meios de methodos ordinarios de cultura de bacteria ou protozoario. Na collaboração com os bacteriologistas do departamento de Sanidade da cidade de Nova York, a cultura do "virus" da variola e da raiva era experimentada.

Recentemente Wolbach tem relatado a cultura da "Rickettazia" ou "virus" da doença de Ricketts, por este methodo.

Estas breves notas sobre o assumpto são sufficientes, creio, para mostrar os resultados já obtidos pelo methodo de cultura de tecidos, e as possibilidades do mesmo.

CONCLUSÃO:

Dos factos apresentados é evidente que no methodo de cultura de tecidos "in vitro", temos um novo e valoroso meio de estudar muitos problemas biologicos. Pelo seu uso, muitos factos de importancia têm sido descobertos. Mas deve-se admittir que os resultados, depois de mais de dez annos de uso, não têm sido tão grandes como era de esperar.

Temos duas razões para este facto:

1) *Tecido conjuntivo* — É' o unico que pode ser facilmente e continuamente cultivado. Na verdade, Carrel, recentemente annunciou a cultura, com successo, do epithelio cutaneo.

Mas o facto é que em geral a cultura "in vitro" do epithelio, especialmente aquelle dos órgãos parenchymatosos, é transitoria, não se podendo conseguir resultados sactisfactorios.

2) O methodo não tem sido empregado largamente, devido á idéa erronea de que a tchnica é difficil. A technica, como tenho demonstrado, é ralmente bastante simples, e não ha razão porque o methodo não deva ser usado em qualquer laboratorio.

No entanto, alimento a esperança de que as primeiras anticipações ainda sejam realizadas.

(1) Este trabalho foi lido pelo Prof. Lambert em sessão da Sociedade de Biologia, realisada a 8 deste mez.

FOSFORMOL IMBERT

Base: glycero phosphatos, formiatos, arrhenal

**SIMPLES, MARCIAL (com ferro) IODADO - por via
oral e hypodermica com e sem estrichinina**

PREPARAÇÃO ESPECIAL E SCIENTIFICAMENTE
RIGOROSA SOB O CONTROLE DO DR. IMBERT

Amostras e literaturas aos srs. Medicos

Agente Geral: Pharmaceutico G. GUGLIELMO

39-A - RUA CONSELHEIRO RAMALHO - 39-A

— São Paulo —