HUGO AGUIRRE ARMELIN

**CONTROLE DO CRESCIMENTO CELULAR EM MAMÍFEROS.
CÉLULAS EM CULTURA COMO MODELO EXPERIMENTAL**

Tese de Livre-Docência apresentada ao
Departamento de Bioquímica do Instituto
de Química da Universidade de S. Paulo.

1974

Para Mari, Lia e Hugo

AGRADECIMENTOS

O trabalho descrito nesta tese foi realizado durante os últimos três anos na Universidade da California, em La Jolla, onde o autor foi um "visiting research associate", no laboratório do Dr. Gordon Sato, Department of Biology. Durante este período a Universidade de São Paulo proporcionou-lhe licença com vencimentos em 1971 e 1972 e sem vencimentos em 1973; além disso apoio financeiro foi obtido da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo em 1971 (bolsa de estágio no exterior), da Alfred Sloan Foundation, E.U.A., em 1972 (fellowship) e através de um contato com o Department of Biology, em 1973. O autor agradece as oportunidades oferecidas por estas Instituições.

É preciso abrir um parêntese nestes agradecimentos formais para expressar a gratidão pessoal do autor ao generoso apoio dado por Gordon Sato, de cujos "grants" o autor se beneficiou largamente (U.S. Public Health Service, GM 17019; National Science Foundation, 15788GB e National Cancer Institute, CA 15503). Fases críticas do trabalho experimental foram realizadas graças à ajuda desinteressada de Susan Wolbers, uma técnica de laboratório, com cuja colaboração o autor contou por mais de um ano e meio (1972 e 1973).

A forma final deste texto só foi atingida graças à ajuda de Mari Cleide (minha esposa), à qual o autor agradece.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
II. CONTROLE DO CRESCIMENTO E DIVISÃO CELULAR:	
FATOS EXPERIMENTAIS E CONCEITOS PROSPECTIVOS	4
a. Células de cultura como modelos experimentais para o estudo do controle do crescimento e <u>divisão</u> celular	4
b. Um modelo probabilístico de "ciclo celular"	8
c. Previsões do modelo proposto	13
d. Fatores de crescimento: natureza e conceito	14
e. Fatores de crescimento em cultura de células de mamífero: conceito operacional e significado fisiológico	17
f. Programa para divisão celular: conceito ilustrativo ou idéia com valor heurístico	21
III. MATERIAIS E MÉTODOS	25
a. Animais	25
b. Linhagem de tumor transplantável	25
c. Linhagens de células	26
d. Meios e condições de cultura	27
e. Soro	28
f. Fracionamento de soro e extração de esteróides	28
g. Contagens de células e medidas de "eficiência de plaqueamento"	30
h. Processos de dissociação de tecidos para cultura primária	31
i. Clonagem	32

j.	Processo de congelamento de células	32
l.	Incorporação de timidina- ³ H	33
m.	Autorradiografia	33
n.	Teste para micoplasma	33
o.	Preparações de hormônios	34
p.	Ensaio de lactose sintetase	35
q.	Determinação de cAMP e cGMP	35
r.	Determinação de radioatividade	36
IV.	ESTABELECIMENTO EM CULTURA DE LINHAGENS CLONADAS DE CÉLULAS DE UM CARCINOMA MAMÁRIO DE RATO, DEPENDENTE DE ESTRÓGENO: INTERESSE PRÁTICO E PROBLEMAS EXPERIMENTAIS	38
a.	Objetivos; bases do plano experimental	38
b.	Resultados	41
c.	Conclusões	46
V.	CONTROLE DO CRESCIMENTO E DIVISÃO CELULAR EM LINHAGENS DE FIBROBLASTOS MANTIDOS EM CULTURA	66
a.	Histórico	66
b.	Objetivos experimentais	74
c.	Resultados	75
d.	Conclusões	87
VI.	RESUMO	104
VII.	REFERÊNCIAS	106
VIII.	ABREVIATURAS	113

I. INTRODUÇÃO

A cultura de células de mamíferos tem, recentemente, exercido uma grande atração, motivada pela seguinte promessa: ser uma metodologia que permitiria a associação da análise genética ao ataque bioquímico no enfoque aos problemas biológicos básicos dos organismos superiores. Esta motivação é muito comum entre jovens investigadores, ou mesmo investigadores experientes criados dentro da tradição da biologia molecular. Entretanto, já os primeiros contatos com a cultura de tecido são suficientes para frustrar e, eventualmente afugentar a maior parte desta clientela. Simplesmente a cultura de células de mamífero tem ainda, muito de arte, e seu primitivismo está muito aquém daquela metodologia, que muitos acreditam ser o processo, o qual eficientemente dissecará os organismos superiores ao seu nível celular. Não obstante, a cultura de tecidos, apesar de prática muito antiga, oferece aquela atração de áreas novas, cuja utilidade prática e arcabouço doutrinário ainda não foram totalmente definidos.

Um problema básico da cultura de tecido é o fenômeno do estabelecimento de linhagens celulares. O equacionamento e definição deste problema não passou ainda do primeiro estágio de descrição fenomenológica. Fibroblastos de galinha, embora amplamente usados, nunca se estabelecem como linhagens estáveis em cultura; o estabelecimento não ocorre mesmo depois da transformação por vírus. No outro extremo estão os fibroblastos de roedores, os quais invariavelmente dão linhagens permanentes, as quais em geral são heteroploi-

des, mas exibem comportamento os mais variáveis (ilustrativos são os trabalhos de TODARO e GREEN, 1963 e AARONSON e TODARO, 1968). Intermediariamente estão os fibroblastos humanos os quais dão linhagens adaptadas a cultura, mas que tem vida, aparentemente, limitada a um número restrito de gerações e são estavelmente diplóides (HAYFLICK, 1965). Estas mesmas linhagens de fibroblastos humanos podem ser transformadas, em cultura, pelo pequeno vírus de DNA SV40 e tornarem-se linhagens de vida ilimitada em cultura. Atualmente, nada prova concretamente que estas diferenças não sejam devido a problemas triviais, talvez das condições de cultura. Enquanto, não se prova em contrário, entretanto, acredita-se que sob a "superfície fenomenológica" do estabelecimento das células de mamífero em cultura, encontram-se vias experimentalmente transitáveis, as quais dão acesso aos mecanismos básicos responsáveis por fenômenos biológicos fundamentais de organismos superiores como a estabilidade genética, a diferenciação e o envelhecimento. Dai o interesse na exploração da cultura de células como modelos experimentais.

Nós achamos que como o estabelecimento de células em cultura envolve basicamente a seleção clonal (fenômeno que certamente ocorre "in vivo", mas cuja importância é atualmente difícil de avaliar), talvez, o fulcro desse problema esteja no controle do crescimento e divisão. É óbvio que a cultura de células oferece vantagens metodológicas para o estudo do controle do crescimento. Nós partimos assumindo que células de mamíferos possuem mecanismos regulatórios de proliferação que não existem em microrganismos. Estes mecanismos regulatórios, se existem, devem ser herdados geneticamente e portanto, podem ser selecionados em cultura. Através da

seleção clonal deve ser possível selecionar as células portadoras dos "mecanismos regulatórios". Desta forma estamos abandonando como irrelevantes os problemas de "células diploides", "células normais", etc. que tanto tem complicado a literatura de cultura de tecido.

No Capítulo II nós fazemos uma análise de propósitos e apresentamos alguns conceitos preliminares, numa tentativa de fundamentação doutrinária; as idéias básicas são, então, reduzidas a experiências realizáveis, cuja interpretação possível é adiantada. O Capítulo III é uma descrição mínima de métodos. Os Capítulos IV e V reúnem material essencialmente experimental. Propositadamente, a estrutura foi planejada de tal maneira a permitir que os Capítulos II, IV e V subsistam, independentemente, um dos outros. Tal propósito, foi tomado, na intenção de separar matéria inevitavelmente comprometida com o viés das idéias elaboradas "a priori" (da qual o Capítulo II é abundante) de matéria experimental. Esta medida pareceu-nos adequada para preservar a validade empírica dos resultados independente das eventuais distorções de especulação.

Talvez nós pudessemos introduzir apropriadamente este trabalho, parodiando R. Pollack, o qual numa conversa de café em Cold Spring Harbor, o ano passado, me dizia mais ou menos isso:

If you take a yeast cell and you let it proliferate for a while, you get a bunch of yeast; on the other hand, if you take a mammalian cell and let it proliferate, you might get a man like you. If this fact does not convince you that a mammalian cell is different from a yeast cell you better go to work with yeast.

II. CONTROLE DO CRESCIMENTO E DIVISÃO CELULAR:
FATOS EXPERIMENTAIS E CONCEITOS PROSPECTIVOS

- a. Células de cultura como modelos experimentais para o estudo do controle do crescimento e divisão celular

Praticamente células de qualquer tipo de tecido de mamífero podem ser colocadas em cultura após sua dispersão por meio mecânico ou enzimático (tripsina, colagenase, hialuronidase, etc.). As culturas primárias oriundas destes processos podem exibir propriedades do tecido de origem por dias ou semanas e, em muitos casos, podem ser subcultivadas dando culturas secundárias viáveis. Estas culturas de curta duração têm sido metodologicamente fundamentais para descobertas básicas: por exemplo, a descoberta e isolamento dos "hypothalamic releasing factors" (BURGUS et al, 1969) e do "sulfation factor" ou somatomedina (SALMON e DAUGHADAY, 1957; HALL e Van WYK, 1973; UTHNE, 1973). Entretanto, para o estudo do controle de crescimento, culturas de curta duração têm valor limitado, e o futuro desta abordagem experimental depende do estabelecimento de linhagens de células permanentes, as quais, em cultura, exibem os "mecanismos regulatórios do crescimento" que operam "in vivo". Portanto, a definição precisa do que entendemos por "mecanismos regulatórios do crescimento" tem valor crítico; entretanto, como mostraremos a seguir, este não é um problema de simples solução.

Em culturas primárias e secundárias, seleção clonal ocorre porque somente alguns tipos de células se dividem.

Como regra geral, fibroblastos, do tecido conectivo, dividem-se em cultura e usualmente crescem mais que qualquer tipo de célula, dominando, desta maneira, a cultura (SATO et al, 1960). Não obstante, é possível isolar clones funcionais de outros tipos de células, desde que processos adequados de seleção sejam usados (BUONASSISI et al, 1962). Nos últimos dez anos tem sido possível isolar um grande número de clones diferenciados e estáveis em cultura: células hipofisárias secretoras de ACTH (BUONASSISI et al, 1962), células adrenocorticais sensíveis a ACTH (YASUMURA et al, 1966), células intersticiais de rato e camundongo secretoras de esteróis (YASUMURA et al, 1966a; SHIN et al, 1968), células gliais de rato (BENDA et al, 1968) células hipofisárias secretoras de hormônio de crescimento e prolactina (YASUMURA et al, 1966b; TASHJIAN et al, 1968), células de neuroblastoma (AUGUSTI-TOCCO e SATO, 1969) e mioblastos (YAFFE, 1968). O isolamento e subsequente investigação destas linhagens de células demonstraram que mecanismos de ação hormonal (e presumivelmente qualquer mecanismo ao nível molecular) podem ser estudados usando-se clones de células permanentemente estabelecidos em cultura como modelos experimentais.

Em princípio não há limitações teóricas ao isolamento de linhagens de células clonadas que retenham em cultura os "mecanismos regulatórios do crescimento". Na prática, entretanto, a questão se complica. Sob as condições usuais de cultura primária, fatores (fatores humorais desconhecidos, hormônios clássicos, etc.) que, presumivelmente, regulam o crescimento e a divisão celular, são limitantes o que leva ao aparecimento de uma forte seleção para células que escapam a regulação fisiológica do crescimento. O resultado

disto é que células estabelecidas em cultura são provavelmente independentes dos fatores fisiológicos de crescimento a menos que precauções sistemáticas sejam tomadas para minimizar a seleção clonal inerente ao processo de estabelecimento em cultura. A abordagem a esse problema precisa ser cuidadosa, pois estamos lidando com argumentos circulares e facilmente poderíamos montar uma armadilha falaciosa: primeiro, nós queremos isolar células que exibem, em cultura, os "mecanismos regulatórios de crescimento" operativos "in vivo" (para permitir o estudo destes mecanismos de regulação); segundo, sabemos que as condições de cultura levam a seleção de células, as quais escapam aos "mecanismos regulatórios de crescimento" (talvez todas linhagens de células estabelecidas, disponíveis atualmente, sejam deste tipo); e terceiro, nenhum dos "mecanismos regulatórios de crescimento" operantes "in vivo" pode ser concretamente definido no momento (nós simplesmente assumimos que eles devem existir, porque o crescimento dos tecidos é altamente regulado no animal). A conclusão inevitável a que se chega é, portanto, que qualquer manifestação, em cultura, dos "mecanismos regulatório de crescimento" pode ser definido apenas operacionalmente. E, como corolário: o isolamento de linhagens clonadas de células exibindo em cultura "mecanismos regulatórios de crescimento", tem que ser abordado empiricamente, tendo o bom senso como guia.

TODARO e GREEN (1963) foram os primeiros a usar um processo sistemático no isolamento de linhagens de células que mostram, em cultura, "mecanismos regulatórios de crescimento". Estes autores desenvolveram então as linhagens de fibroblastos de embrião de camundongo com "inibição de contato".

O fenômeno de "inibição de contato" foi tomado como uma manifestação dos "mecanismos regulatórios de crescimento" que normalmente operam "in vivo", e as células que o exibem em cultura não desenvolvem tumores em hospedeiros apropriados (AARONSON e TODARO, 1968 ver histórico no Capítulo V, desta tese). Este tipo de célula, entretanto, pode ser transformada por pequenos vírus de DNA, tal como SV40 ou poliomaxia, abolindo a "inibição de contato", passando a célula a se comportar como uma célula cancerosa. Dadas estas propriedades interessantes, estas linhagens de fibroblastos de camundongo têm sido um importante modelo experimental nos últimos dez anos. No Capítulo V desta tese nós analisaremos o comportamento deste sistema à luz dos resultados que temos obtido e dos conceitos e idéias, os quais introduziremos ainda neste Capítulo.

Além do desenvolvimento de linhagens de fibroblastos, uma outra alternativa para o estabelecimento de linhagens de células retendo "mecanismos regulatórios de crescimento" em cultura, tem sido tentada no laboratório do Dr. GORDON SATO. Neste caso a idéia tem sido tomar tumores dependentes de hormônio (ovarianos, mamários, prostáticos, etc.) para crescimento em animais de laboratório (BISKIND e BISKIND, 1944; FURTH, 1968; IGLESIAS, 1970), e usá-los como fonte de células, cujo crescimento é dependente de hormônios trópicos (gonadotrofinas, estrógenos, etc.), responsáveis pelo desenvolvimento dos tecidos parentais "in vivo". A meta final desta empreitada é obter linhagens clonadas e estáveis de células em cultura, as quais desenvolveriam "tumores dependentes de hormônio" em hospedeiros apropriados e presumivelmente exibiriam em cultura "mecanismos regulatórios de crescimento" (pelo menos aqueles que envolvem o hormônio trópico do qual

depende o tumor). No Capítulo IV nós apresentaremos os dados que obtivemos estudando o estabelecimento de uma linhagem de células a partir de um tumor mamário dependente de estrôgeno para crescer em ratos.

b. Um modelo probabilístico de "ciclo celular"

Tradicionalmente o "ciclo celular" tem sido representado da maneira esquematizada na Figura 1. Este esquema envolve a idéia básica de que a célula passa por uma sequência de eventos (metabólicos e citológicos) periódicos e determinísticos que caracterizam G1, S, G2 e M (BASERGA, 1968; MITCHISON, 1971; MAZIA, 1974). Tem sido indicado, frequentemente, por diversos autores, que o modelo formal de "ciclo celular" (sequência de eventos periódicos e determinísticos) não se ajusta aos dados experimentais conhecidos, principalmente os resultados cinéticos (NACHTWEY e CAMERON, 1968; STEEL, 1972; SMITH e MARTIN, 1973). SMITH e MARTIN (1973) mostraram as vantagens de modelos formais que envolvem pelo menos uma etapa ao acaso (não determinístico); nós também temos considerado a utilidade de um modelo deste tipo (ARMELIN, 1973; 1974, 1974b). O esquema da Figura 2 sumariza nossas idéias. Segundo nosso esquema, num caso geral, a população de células envolve três compartimentos: R, P e T. As células do compartimento R estão no "estado celular fundamental" e elas somente saem de R (transição 1 ou 2) por um processo ao acaso; este estado se caracteriza pelo bloqueio ("shut off") do "programa bioquímico para a divisão celular" ou em outras palavras, as células estão em repouso. O "programa para divisão celular" consiste da sequência de reações bioquímicas e eventos citológicos precisamente determinada, a qual termina

FIGURA 1 - Esquema geral do ciclo celular e dos compartimentos que compõe uma população de células. Os quadros representam os compartimentos das diversas fases celulares; as retas indicam o sentido das transições que as células podem tomar de um compartimento para outro. As transições que deixam os compartimentos do ciclo de proliferação (isto é, G1, S, G2 e M) podem ser reversíveis (para GO) ou irreversíveis (para citodiferenciação terminal ou morte celular). G1, S, G2 e M formam o "pool" de células em proliferação; GO forma o "pool" de células em repouso, as quais retêm a capacidade para divisão. GO é a fase originalmente introduzida por LAJTHA (1963) e largamente usada na literatura com sentido muitas vezes variável (BROWN, 1968; TEMIN, 1971; BASERGA, CASTLOW e RAVERA, 1973).

FIGURA 2 - Esquema geral dos compartimentos de uma população de células segundo o modelo probabilístico de ciclo celular proposto. Os quadros representam os compartimentos da população; G1, S, G2 e M são subcompartimentos do compartimento P. As setas 1, 2, 3a, 3b, 3c e 3d indicam as transições que são permitidas entre os compartimentos; somente as transições 1 e 2 são ao acaso.

com o evento final da divisão da célula em duas células filhas; isto é, trata-se da soma de todas as reações que caracterizam G₁, S, G₂ e mitose. Células em R podem sair e entrar em P (compartimento das células em proliferação ou células comprometidas com o "programa para divisão celular") iniciando o "programa para divisão celular". Como a saída de R é completamente ao acaso, uma dada célula permanece no estado R por um período indeterminado de tempo. Há somente uma entrada para o compartimento P: o início de G₁ (é preciso notar que G₁ aqui está redefinido; na literatura a definição é ambígua, não havendo consenso).

E depois da mitose as células só tem uma saída: retornar ao estado R. O tempo que uma dada célula permanece em P é um período de tempo t bem determinado, onde t é o tempo necessário para a célula atravessar G₁, S, G₂, M e finalmente retornar a R. As células do compartimento T são incapazes de dividir, pois tomaram irreversivelmente o caminho da citodiferenciação terminal ou morte.

O "estado R" descrito no modelo acima tem aplicação geral, por exemplo, aplica-se a: i) "stem cells" como aquelas da linhagem eritrocitária, as quais podem deixar R em direção a P (Figura 2, seta 1) para replicação, ou podem tomar o caminho da citodiferenciação terminal (Figura 2, seta 2) para atingir o estágio final do eritrócito; ii) hepatócitos, os quais retêm sua capacidade de replicar, embora sejam completamente funcionais, e deixam R para proliferar durante a regeneração do fígado; iii) células cancerosas não funcionais, em cultura ou animal, as quais saem de R para proliferar ou para morrer.

Para o investigador interessado nos "mecanismos regulatórios do crescimento", o modelo apresentado acima implica que o crescimento de uma população de células depende de três parâmetros: i) a probabilidade P_1 com que uma célula deixa R para replicação (transição para P); ii) a probabilidade de P_2 que determina a saída de células em R no sentido de citodiferenciação ou morte; e iii) o tempo t , isto é, o período de tempo necessário para uma dada célula atravessar G1, S, G2, M e retornar a R. Se considerarmos: primeiro, que os resultados experimentais conhecidos indicam que a duração de S e G2 não variam para um mesmo tipo de célula (NACHTWEY e CAMERON, 1968) e segundo, que a duração da mitose varia muito pouco, mesmo para tipos diferentes de células; necessariamente conclui-se que t provavelmente não varia para um tipo particular de célula e portanto o controle do crescimento da população desta célula será exercido exclusivamente através de variações de P_1 e P_2 . Agora se particularizarmos para o caso de uma linhagem estabelecida de células de mamífero em cultura, que não sofre citodiferenciação terminal e em condições tais que morte celular é negligenciável, o crescimento da população será função somente de P_1 , a probabilidade da transição do "estado R" para a "fase P".

Assumindo que a redução efetuada acima é realista podemos usar culturas de células como modelos experimentais e estudar como variações das condições ambientais afetam P_1 e como, portanto, controlam a proliferação celular. Neste ponto é importante reunir as previsões do modelo proposto que podem ser facilmente testadas por experiências simples.

c. Previsões do modelo proposto

A primeira previsão derivada do modelo é que nós devemos ser capazes, manipulando as condições ambientais, de levar a célula ao "repouso" (estado R). A caracterização mínima do "estado de repouso" inclui: i) a população não aumenta em número; ii) a viabilidade é mantida e iii) a síntese de DNA é ausente ou negligenciável. A segunda previsão implica que nós devemos ser capazes de induzir células em repouso a entrar na "fase proliferativa". O padrão desta transição deve se caracterizar por: i) a síntese de DNA se inicia após um "lag", isto é, G₁; ii) a duração de G₁ é independente do número de células que iniciam síntese de DNA; iii) a variação da frequência de células iniciando síntese de DNA (a qual mede a magnitude da resposta), depois de um período de tempo no mínimo igual a G₁, oscila entre 0 e 100% da população; iv) o compromisso bioquímico da célula para o processo replicativo, torna-se num certo ponto, independente do estímulo inicial; este "ponto sem retorno" deve ser experimentalmente definível.

É razoável considerar como as condições ambientais regulariam a transição entre o "estado R" e a "fase P", embora isto não venha trazer nenhuma alteração às previsões anteriores. De uma maneira geral, os fatores ambientais podem exercer controle negativo (ação inibitória) ou positivo (ação estimulatória) sobre a proliferação celular. Parece-nos mais atraente a idéia de controle positivo; este viés, entretanto, não exclui a possibilidade da existência de controle negativo. Não obstante não há motivos para preocupações pois ambas as possibilidades podem ser distinguidas experimentalmente. Fatores que estimulam a proliferação (controle positivo) incluiria

mos na classe geral de "fatores de crescimento". As previsões do modelo, descritas acima, fornecem uma base racional para a identificação experimental e ensaio quantitativo de "fatores de crescimento". Mas, antes de particularizarmos para o caso de células de mamífero em cultura, é interessante levarmos avante uma moderada especulação em torno da possível natureza dos fatores de crescimento.

d. Fatores de crescimento: natureza e conceito

É importante notar que o meio intracelular é extremamente complexo, e um controle fino da economia geral, ao nível bioquímico, é fundamental para manutenção da estabilidade do sistema. Por outro lado a replicação impõe uma alta demanda na economia celular, porque o sistema precisa duplicar a si mesmo para se dividir. Além disso a replicação é um processo de tal complexidade, que sua parada a meio caminho pode ameaçar a sobrevivência da célula. Assim, é provável que a célula não se comprometa com o processo replicativo, a menos que possua os "suprimentos" necessários para completá-lo. Em vista disso é razoável se esperar que da seleção natural tenha, muito cedo, resultado mecanismos de controle, pelos quais, níveis críticos de metabólitos chave servem como "reguladores intracelulares" da iniciação do processo replicativo. Mecanismos básicos e simples, dessa natureza, sem dúvida, aparecem tanto em organismos inferiores como superiores. Entretanto, o meio extracelular de organismos inferiores e superiores é muito diferente. Mecanismos de controle adicionais certamente apareceram, os quais foram superpostos à economia intracelular básica; estes controles são necessários para garantir regulação adequada da proliferação

celular de organismos tão diversos quanto levedura e mamíferos. Organismos unicelulares de vida livre, como bactéria ou levedura, proliferam em função da disponibilidade de nutrientes no meio ambiente. Eles crescem rapidamente em meio rico e lentamente em meio mínimo, pois nesta última situação, vias metabólicas, desnecessárias em meio rico, tem que ser ativadas. Por outro lado, para um mutante auxotrófico, crescendo em qualquer meio, a substância a qual ele é incapaz de sintetizar se torna fator limitante para proliferação e consequentemente, por definição, a substância é um "fator de crescimento". Concluimos disto que para microrganismos, fatores de crescimento são nutrientes. Este fato torna as células capazes de responder rapidamente as variações incontroláveis do suprimento nutricional do meio, otimizando tanto a sobrevivência como a velocidade de proliferação.

Em organismos superiores, a célula de mamífero por exemplo, enfrenta condições bem diferentes: o meio interno é altamente controlado física e quimicamente, para evitar variações fatais de pH, temperatura, glicose, etc., fora do estreito intervalo fisiológico. Neste sistema altamente regulado, a alocação e utilização de nutrientes são controladas por hormônios clássicos, tal como insulina, e talvez também por outros fatores de natureza hormonal mas ainda desconhecidos. Estes fatores desenvolvem suas funções (pelo menos parcialmente) regulando a atividade de sistemas de transportes, específicos para nutrientes, localizados na membrana celular externa; o papel destes sistemas de transporte da membrana é mediar a disponibilidade de nutrientes no meio intracelular. Some-se a isso o fato de que mamíferos exibem

um alto grau de controle da proliferação celular: por exemplo, células de fígado raramente dividem, mas todas são potencialmente capazes de dividir; eritrócitos maturam continuamente, limitados somente pela proliferação das células colunares ("stem cells"); a resposta imunológica envolve uma onda de divisão em linfócitos do tipo B. O modo de controle destes processos específicos para células é questão, ainda, totalmente aberta à especulação. Seguindo nossa linha de raciocínio poderíamos propor uma hipótese, segundo a qual cada tipo de célula tem um fator específico, cuja função é disparar (controle positivo) o "programa para divisão celular" (regulando a probabilidade da transição do "estado R" para a "fase P"). Este fator só é efetivo se os níveis intracelulares dos nutrientes forem adequados à replicação; por outro lado, os níveis intracelulares dos nutrientes são dependentes dos "reguladores extracelulares dos sistemas de transporte". Em suma a proliferação celular seria função exclusiva de "reguladores específicos de proliferação" ("fatores de crescimento": uma classe de reguladores endócrinos), cuja ação pode ser modulada por "reguladores dos sistemas de transporte". O teste direto das implicações desta hipótese com experiências "in vivo" é difícil, ou mesmo impossível atualmente, por dificuldades essencialmente metodológicas. Com cultura de células as condições experimentais são favoráveis, mas neste ponto nos esbarramos nos problemas levantados já no início deste capítulo: as condições atuais da cultura de células são ainda primitivos, assim como há falta de uma estrutura doutrinária adequada a interpretação dos resultados. Não obstante, continuando com a análise conceitual que estamos levando a cabo, vamos tentar propor um

critério prático para abordarmos com experiências simples e as questões elaboradas anteriormente.

e. Fatores de crescimento em cultura de células de mamífero: conceito operacional e significado fisiológico

O meio de cultura para células de mamífero contém: i) uma parte quimicamente definida que, teoricamente, deve fornecer os nutrientes essenciais de baixo peso molecular em quantidades adequadas; e ii) uma parte complexa que é soro. É errado acreditar que um apropriado enriquecimento nutricional do meio sem soro levaria ao crescimento de qualquer tipo de célula. Isto seria negar a existência de "reguladores extracelulares", os quais, é razoável admitir, são fornecidos pelo soro. A existência de algumas linhagens de células que crescem em meio quimicamente definido não refuta esta afirmação. Tais linhagens são, ou células que sintetizam reguladores como as células de fígado de rato de COON (DULAK e TEMIN, 1973), ou são células especificamente selecionadas para crescer independente de "reguladores".

Em bases puramente experimentais pode-se adotar a seguinte definição operacional de "fator de crescimento": uma substância que limita o crescimento quando presente em concentrações limitantes. Parece-nos razoável assumir que, normalmente, nutrientes extracelulares não são limitantes de crescimento na situação "in vivo", sendo a proliferação essencialmente dependente de "reguladores" seja qual for sua natureza e mecanismos ("reguladores dos sistemas de transporte da membrana", "reguladores específicos da prolifera-

ração celular", etc.). Nas condições de cultura, entretanto, a situação é bastante diferente: nutrientes extracelulares podem ser limitantes de crescimento, seja devido a deliberada manipulação da composição do meio ou a deficiências do meio, das quais ainda não se suspeita. A definição operacional de "fator de crescimento" sugerida acima, não distingue entre nutrientes extracelulares e "reguladores", mas de alguma maneira é preciso distingui-los experimentalmente. Mais uma vez, é razoável admitir que os efeitos fisiologicamente significantes são aqueles devido aos "reguladores" (tendo em vista a caracterização dos "mecanismos regulatórios do crescimento"), enquanto que os efeitos devido a baixos níveis de nutrientes extracelulares são essencialmente um fenômeno de cultura de célula. Dadas as considerações anteriores era fundamental que estabelecessemos um critério prático para a busca e caracterização dos "reguladores" de crescimento.

Estão implícitos na idéia de "reguladores" algumas propriedades que podem ser definidas "a priori". Os "reguladores" seriam transmissores de uma mensagem ou sinal e exerceriam sua ação interagindo com receptores específicos. Fisicamente a interação entre "regulador" e "receptor" seria do mesmo tipo enzima e substrato e o número de receptores deveria ser pequeno. Conclui-se que as células que "responderiam" a um dado "regulador" possuiriam por ele alta "afinidade" e baixa "capacidade", propriedade que pode ser medida quantitativamente ao nível celular ou subcelular, desde que o "regulador" seja isolado e purificado. Mas, inicialmente, estávamos num estágio anterior: os "reguladores" da proliferação celular eram postulados e portanto não tinham ainda sido identifi

cados e muito menos isolados. Neste estágio o mais importante era a determinação quantitativa de um regulador desse tipo, fase inicial absolutamente necessária na sua procura. O efeito final do regulador é a divisão celular, portanto o ensaio de atividade deve medir "quantidade" de divisão seja diretamente, contando células, ou indiretamente, medindo síntese de DNA, síntese de proteína, etc. Levando em conta que deve existir uma relação simples entre o efetuator (ou o "regulador") e a resposta e dadas as propriedades assumidas para o regulador, o resultado mais simples a ser esperado para a curva de resposta em função de concentração de regulador é uma curva do tipo da de Michaelis para enzima. A parte linear da curva determina o intervalo de concentração útil do "regulador", cujo intervalo deve ser "fisiológico". É razoável assumir que o "intervalo fisiológico" seja semelhante ao observado para os hormônios clássicos, isto é, o plateau da curva já deve ser atingido em concentrações de 10^{-11} a 10^{-10} M. Isto dá uma medida das atividades específicas a serem esperadas. Estas premissas serão muito úteis e de fácil aplicação para determinar se os hormônios clássicos (cujos isolamentos e purificações já foram feitos) tem atividade de "regulador de proliferação".

Na prática a identificação de "reguladores" e o desenvolvimento de ensaios de atividade é severamente limitado pelas dificuldades técnicas de fracionamento do soro. Em nossa experiência a abordagem prática a esse problema tem envolvido: i) uso de fracionamentos padrão que permitem o fracionamento parcial do soro (por exemplo, o fracionamento de Cohn); ii) uso de alguns tratamentos desenvolvidos por nós

(ver Materiais e Métodos); iii) uso de soro de animais com glândulas extirpadas (hipofisectomizados, ovariectomizados, a drenalectomizados e tireoidectomizados).

O ensaio é direto e simples quando é possível de senvolver condições nas quais as células entram em repouso ("estado R"), condição em que síntese de DNA é nula. Neste caso o ensaio pode ser feito pela medida da síntese de DNA através da incorporação de ^3H -timidina (ver Capítulo V, ensaio fibroblastos 3T3). Nos casos em que empiricamente não se consegue obter as células em repouso, o compromisso é medir a variação do tamanho da população com o tempo (ver Capítulo IV, ensaio para células de rato).

Independentemente das dificuldades de cada caso o procedimento padrão que adotamos envolve as seguintes etapas: i) manipulando-se o soro, (concentração, fracionamento, animais operados), desenvolve-se um meio no qual o crescimento é sub-ótimo, e ii) adicionam-se substâncias ou prepara-ções complexas a esse "meio mínimo" para ensaiar quantitativamente "atividade promotora de crescimento".

Hormônios puros (proteínas como insulina, FSH, LH e prolactina; esteróides como estradiol, testosterona, testosterona desidrogenada, hidrocortisona e progesterona), preparações de hormônios parcialmente purificadas (obtidas do programa de distribuição do N.I.H. ou comercialmente) e extratos diversos de vários tecidos tem sido testados para "atividade promotora de crescimento". Através de ensaios quantitativos adequados curvas de atividade em função de concentra-ção tem sido geradas. Os resultados experimentais tem sido julgados pelo seguinte critério: i) atividade de hormônios

puros é considerada fisiologicamente significativa somente se for observada nas concentrações fisiológicas do hormônio; ii) atividade observada a concentrações altas, não fisiológicas, é descartada como não significativa se a pureza da preparação está acima de qualquer suspeita; iii) atividade com concentrações altas de preparações impuras de hormônios conhecidos, é sujeita a estudos posteriores no sentido de verificar se a espécie ativa é um contaminante; iv) atividade devida a um contaminante é tomada como uma trilha interessante que pode indicar a existência de um fator fisiologicamente ativo e ainda desconhecido; v) atividade significativa observada em extratos de tecido e investigadas visando cair num dos casos anteriores. Com este exercício experimental nos foi possível demonstrar que "reguladores da proliferação celular" existem de fato, pelo menos em cultura de células de mamífero (ver ARMELIN, 1973 e Capítulos IV e V desta tese). Se tais reguladores são ativos "in vivo", da mesma maneira como o são em cultura, é uma questão ainda a ser respondida. Porém, independentemente disso, estes reguladores já estão sendo úteis para investigar os "mecanismos regulatórios do crescimento" em cultura de célula, testando algumas das hipóteses levantas nestes Capítulos.

f. Programa para divisão celular: conceito ilusório ou idéia com valor heurístico

Na secção b deste Capítulo foi introduzida a idéia de "programa para divisão celular"; programa este que não pode, atualmente, ser descrito na forma simples de um mapa metabólico, pois não há conhecimento bioquímico disponível para tanto. A idéia porém, parece intuitivamente correta e

talvez as evidências experimentais mais interessantes em seu favor não sejam bioquímicas, mas sim os resultados obtidos por HARTWEL e colaboradores (1973) na análise genética do ciclo celular de levedura.

A Figura 3 apresenta um quadro da distribuição de alguns eventos bioquímicos, ao longo do ciclo celular de células de mamífero. Não se trata de um levantamento extensivo da literatura, pelo contrário é uma composição de informações selecionadas para os propósitos deste texto; o quadro inclui tanto dados ainda a serem confirmados (eventualmente controvertidos), como dados solidamente estabelecidos pela experiência. Os pontos a serem destacados são: i) indiscutivelmente certos eventos estão circunscritos a partes restritas do ciclo; ii) no início de G1 há manifestações de alteração específica de transporte, variação dos níveis dos nucleotídeos cíclicos, rearranjo estrutural de membrana e ativação de novos genes; iii) os eventos do início de G1 são os mais interessantes, pois é neste período que, aparentemente, a parte crítica do controle do crescimento e divisão está operando; daí ser atraente a idéia de procurar os "mecanismos regulatórios do crescimento" entre as "reações de iniciação de G1".

A dificuldade séria no trabalho com as reações iniciais de G1 está em que elas ocorrem num intervalo restrito de tempo (10 a 20 minutos). Não tem sido possível, ainda, estabelecer relação de causa e efeito (ou outra qualquer) entre estas reações. Além disso a falta de conceitos gerais, métodos e modelos celulares padronizados, frequentemente impedem a comparação de resultados. Parece-nos que a orientação que temos dado ao nosso trabalho, seja do ponto de vista

-23-

conceitual ou metodológico, oferece promessas de progresso ness
sa área.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

a. Animais

Foram usados ratos de linhagem AxC (linhagem cruzada entre irmãos há muitos anos, ver IGLESIAS, 1970), adquiridos comercialmente ainda jovens e mantidos em gaiolas isoladas. Animais hipofisectomizados eram comprados já operados; ovariectomias e adrenalectomias eram feitas no próprio laboratório.

b. Linhagem de tumor transplantável

Obteve-se do Dr. R. Iglesias, Chile (ver IGLESIAS, 1970), uma linhagem de carcinoma mamário transplantável de ratos AxC, o qual só se desenvolvia em animais com altos níveis de estrógeno; machos ou fêmeas normais não desenvolviam tumores. O tumor era branco-amarelado, sólido, mole e raramente necrosado; não apresentava indicações de metástase quando injetado sob a pele, alcançando grande tamanho antes de causar a morte do animal (tumores de 50 a 60 gramas foram comuns em animais ainda vivos); exibia (principalmente quando picado) um "suco" ou secreção leitosa, o que alguns oncologistas experimentais interpretam como indicação de tumor mamário funcional (síntese de leite). Transplantes eram efetuados, injetando-se sob a pele 0,2 ml de uma suspensão obtida por picagem do tecido com tesoura, numa solução salina-fosfato. Níveis altos de estrógeno eram conseguidos pelo implante de pastilhas de 10 mg de estradiol sob a pele do animal, o qual era aplicado ao mesmo tempo que se fazia

transplante de tumor. Animais que recebiam estradiol (se transplante de tumor) apresentavam diversas anomalias: acentuada perda de peso; decréscimo do crescimento em jovens; atrofia de gônadas em machos; desenvolvimento de glândulas mamárias e sobrevivência de 4 a 6 meses após o implante. Acrescenta-se a isso que o estradiol também leva a hiperplasia da hipófise (IGLESIAS, comunicação pessoal), embora nossos animais não tenham sido examinados para isso. Animais hipofisectomizados sobreviviam muito menos ao implante, de uma semana a um mês de sobrevivência; durante este período de sobrevivência dos hipofisectomizados crescimento do tumor nunca foi observado. Trata-se portanto, provavelmente de tumor cujo crescimento depende de secreção hipofisária.

c. Linhagens de células

Diversas sublinhagens de fibroblastos 3T3, os quais são provenientes de embriões de camundongos suíços e estabelecidos por TODARO e GREEN (1963), foram usados: 1) obtida do laboratório do Dr. G. Sato (University of California, La Jolla); 2) obtida do laboratório do Dr. R.W. Holley (Salk Institute); 3) obtida da American Type Culture Collection; 4) obtida do laboratório do Dr. D. Cunningham (University of California, Irvine), todas estas sublinhagens foram mantidas isoladas. Uma linhagem de 3T3 transformada por vírus (SV40) foi obtida do laboratório do Dr. R. Dulbecco (Salk Institute), sendo designada SV3T3. Uma amostra da linhagem WI38 de fibroblastos humanos (originalmente desenvolvida por HAYFLICK e MOORHEAD (1961)) foi obtida do laboratório do Dr. P. Price (University of California, La Jolla); esta linhagem foi usada entre a 25.^a e 40.^a passagem ou subculti

vo. Estas células, que crescem em monocamadas aderidas a superfície de vidro ou plástico, foram rotineiramente subcultivadas antes de chegar a confluência. O meio de cultura para manutenção dos estoques foi CFB (ver meios de cultura) e normalmente estoques reserva de cada linhagem foram mantidos em nitrogênio líquido.

d. Meios e condições de cultura

Os meios de cultura normalmente possuem uma parte quimicamente definida e uma parte complexa, que é soro; eventualmente adiciona-se também um tampão orgânico para ajudar a estabilização do pH. Neste trabalho a parte quimicamente definida foi sempre o meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DME), mas com apenas 1,2 g de bicarbonato de sódio por litro; o meio era comprado em mistura pronta, em pó, de Grand Island Biological Co. (GIBCO), Nova York. Meio dito 10% em soro significa 90% de DME mais 10% em soro, volume a volume. O meio padrão (CFB) para crescimento de estoque teve a seguinte composição: 85% de DME, 12,5% de soro de cavalo (C) e 2,5% de soro de feto bovino (FB), o qual foi o meio mais rico usado aqui. Um soro muito usado neste trabalho foi soro de vitelo (V) e 10% V ou 1% V significa 10% soro de vitelo mais 90% DME ou 1% de soro de vitelo mais 99% DME, respectivamente. Frequentemente o tampão HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico) foi usado no meio na concentração de 15 mM.

As células eram cultivadas em placas de petri ou frascos de plástico, especialmente tratados para cultura de tecido, fornecidos por Falcon Plastics, California. As cultu

ras eram mantidas a 37°C, em câmara úmida e atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar.

Para subcultivo as células eram destacadas da placa por tripsinização através da seguinte solução: NaCl 8,2 g, KCl 0,2 g, Na₂HPO₄.7H₂O 2,16 g, KH₂PO₄ 0,2 g, Na₂EDTA.2H₂O 0,29 g, fenol vermelho 15 mg, 1 g de Tripsina (1-300, Nutritional Biochemicals) dissolvidos em 1 litro de água bidestilada.

e. Soro

Soro era adquirido comercialmente de GIBCO, Nova York ou Flow Laboratories, Colorado; diferentes partidas podem variar consideravelmente entre si e não existe ainda um processo padrão para caracterizá-las. Como rotina o soro era inativado a 55°C por 30 minutos, com agitação moderada; sendo em seguida misturado ao DME e esterilizado por filtração em filtros Millipore ou velas de porcelana (filtros Pasteur). O soro era normalmente guardado congelado a -15°C, passando, eventualmente, por diversas descongelações. Meios prontos (com ou sem soro), no entanto, nunca eram congelados, permanecendo em geladeira e evitando-se estocar por mais de dois meses.

f. Fracionamento de soro e extração de esteróides

Além de processos tradicionais para fracionamento de soro dois tratamentos foram particularmente úteis: 1) passagem por coluna de carboximetilcelulose (CMC) e 2) extração com carvão ativado. O primeiro está descrito em detalhes em NISHIKAWA, ARMELIN e SATO (1974) e sumariamente envolve as seguintes etapas: soro, inativado por calor, é dialisado

contra água (24 horas; duas trocas; aproximadamente 30 volumes) até condutividade menor que 0,8 mMOH; em seguida o pH é ajustado para 6,5 com HCl 1 N; o pequeno precipitado que forma nestas condições é eliminado por centrifugação a 10.000 xg por 10 minutos (representa menos que 1% da proteína total); o soro resultante é agora passado em coluna de CMC (previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,5); nestas condições 1 a 2% da proteína total é adsorvida e pode ser eluída com o mesmo tampão fosfato mas contendo NaCl 0,2 M. A fração retida em CMC contém diversos fatores que promovem o crescimento de células em cultura e para efeito de descrição vamos chamá-la CMC-F. O soro depois de passado pela coluna torna-se pobre em fatores de crescimento para determinados tipos de célula.

O segundo tratamento, isto é, a extração com carvão, foi desenvolvido para se obter soro isento de esteróis. O protocolo estabelecido foi: soro (não inativado) era extraído com 10 mg/ml de Norit A (Sigma Co.) e 1 mg/ml de Dextran T40 (Pharmacia) por 30 minutos, a 55°C com agitação vigorosa; as partículas de dextran cobertas de carvão, são em seguida eliminadas por centrifugação e filtração. A eficiência de extração de esteróis foi determinada usando-se diversos hormônios esteróis radioativos como marcadores; um sumário dos dados obtidos é apresentado na Tabela I. Como os dados indicam, o nível de esteróis é reduzido de aproximadamente 100 vezes; tiroxina, no entanto, é ineficientemente extraída. Evidentemente esta extração não é específica para esteróis, muitas outras substâncias podem se adsorver ao carvão, certamente ácidos graxos adsorvem-se de maneira eficiente (CHEN, 1967). Este processo, no entanto, mostrou-se mais

adequado que a extração com solventes orgânicos e cromatografia em sephadex. Embora o carvão não extraia proteínas (pelo menos de maneira quantitativamente significativa), o soro depois da extração torna-se pobre em alguns fatores de crescimento, cuja atividade não é reconstituída pela adição de esteróides, mas sim pela adição de certos fatores proteicos (conforme será indicado em outras partes desta tese).

g. Contagens de células e medidas de "eficiência de plaqueamento"

Células foram rotineiramente contadas em "Coulter Counter": depois de tripsinizadas, as células eram suspensas em salina fosfato (livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}) e contadas no intervalo de 500 a 15.000 células/ml. As contagens do "Coulter" neste intervalo eram lineares e comparáveis com contagens diretas feitas em hemocitômetro e microscópio. Medidas de eficiência de plaqueamento (ensaio de frequência de células capazes de formar colônia e que é usado neste trabalho como ensaio de viabilidade) foram feitas de acordo com o seguinte protocolo: células (numa suspensão de células isoladas), eram contadas em hemocitômetro (eventualmente em "Coulter") e plaqueadas ("single cell plating") na concentração de 200 a 400 células por placa (placa de 10 cm de diâmetro); crescimento era permitido por 7 ou 8 dias e então as placas eram recolhidas, as colônias fixadas com formol (10%) e coradas com "crystal violet" (0,1%); colônias com pelo menos cinquenta células eram contadas. Nestas experiências o meio CFB dá os maiores níveis de eficiência de plaqueamento, para algumas linhagens praticamente 100% de células desenvolvem colônias. Por esse motivo este meio tem sido usado em nossas experiências

como meio rico de referência em relação ao qual outros são a-
feridos.

h. Processos de dissociação de tecidos para cultu-
ra primária

Células de tecidos podem ser dissociadas por meios físicos (picagem com tesoura, passagem por malhas de uma rede, etc.) e ou tratamento enzimático (tripsina, colagenase, hialuronidase, etc.). Em nossa experiência tripsina foi usada na mesma concentração usada para subcultivos; colagena se dissolvida em solução salina ou em meio de cultura (proteínas de soro "inibem" proteases contaminantes da preparação). Para o caso do tumor mamário de rato, em foco nesta tese, o tratamento enzimático revelou-se desaconselhável, pois levava a alto rendimento em fibroblastos (critério morfológico). O processo adotado para plaqueamento foi o seguinte : pedaços de tecido umedecidos em meio (CFB) eram picados extensivamente com tesoura e depois suspensos em meio CFB e passados diversas vezes por pipeta de ponta fina. Nesse processo o tecido conectivo (estroma) mais resistente permanecia em pedaços relativamente grandes e o tecido mamário tinha a tendência a se desmembrar em células isoladas ou grupo com pequeno número de células. Os pedaços relativamente grandes, rapidamente sedimentavam por gravidade eo sobrenadante enriquecido em células mamárias era recolhido; estas células eram plaqueadas com densidade moderada para se obter pequenas colônias aderidas a placa e isoladas umas das outras.

i. Clonagem

Células eram clonadas pelo seguinte método: efetuava-se um plaqueamento a baixa densidade (50 a 100 células por placa de 10 cm) a partir de uma suspensão de células isoladas ("single cell plating"); permitia-se o crescimento de colônias; colônias que se desenvolviam a partir de uma única célula eram então isoladas por tripsinização, com a ajuda de um pequeno cilindro de aço inoxidável com graxa de silicone de um lado ("cloning ring"), o qual permitia o isolamento da colônia das demais colônias presentes na placa. O processo era repetido mais uma vez antes de admitir com rigor que uma população era realmente um clone.

j. Processo de congelamento de células

Células eram rotineiramente congeladas em CFB com 5% de glicerol (eventualmente 5% de DMSO). Para tanto, células eram tripsinizadas imediatamente antes do congelamento, suspensas no meio com glicerol, numa concentração em torno de 10^6 células por ml e colocadas em ampolas (vidro ou plástico) em alíquotas de 1 ml. As ampolas seladas eram colocadas em geladeira por 30 minutos e depois no reservatório de nitrogênio líquido, a alturas progressivamente mais próximas da superfície do nitrogênio (o que propicia congelamento lento), sendo finalmente imersas no líquido. Um outro processo relativamente mais simples envolve a passagem da geladeira diretamente para um congelador de -70°C (Revco), por pelo menos 24 horas e depois imersão em nitrogênio líquido. O descongelamento era efetuado simplesmente por retirada das ampolas do nitrogênio e imersão imediata em água a 37°C (desconge

lamente rápido); após equilíbrio a ampola era aberta e a suspensão de células era plaqueada com 10 ml de CFB, sendo o meio trocado 12 a 24 horas depois. Para as linhagens de células usadas neste trabalho congelamento e descongelamento eram efetuados mantendo-se viabilidade alta (80% ou mais).

1. Incorporação de timidina-³H

Timidina-³H era adicionada ao meio em concentrações de 1×10^{-8} a 1×10^{-6} M e 0,2 a 1 μ C/ml; depois da incorporação as células eram tratadas com ácido tricloroacético 10% a frio (três lavagens; este tratamento acarreta ao mesmo tempo fixação e extração dos "pools" solúveis em ácido), dissolvidas em NaOH 0,5 N (12 horas a 37°C) e precipitadas com TCA. Os precipitados, coletados em filtros de nitrocelulose eram contados em cintilador com tolueno-POPOP-PPO.

m. Autorradiografia

Depois da incorporação do precursor radioativo as células eram fixadas e os "pools" solúveis eram extraídos com TCA 10% a frio (três lavagens, 30 minutos cada); após o tratamento com TCA as placas eram lavadas com etanol (70% e 95%) e secadas ao ar. As placas secas eram cobertas com "stripping film" (Kodak AR10) e expostas por tempo adequado.

n. Teste para micoplasma

Micoplasma é um contaminante comum de células de mamífero em cultura sendo um dos problemas mais sérios que afligem os investigadores neste campo de trabalho. A detecção destes contaminantes exige cultura em meios e condições

apropriadas, sendo processos tediosos e pouco práticos como rotina. Felizmente há um processo eficiente e simples de detecção indireta através de autorradiografia após a incorporação de timidina-³H (NARDONE et al, 1965; STUDZINSKI, GIERTHY e CHOLON, 1973). Neste trabalho o processo autorradiográfico foi usado como rotina: as culturas eram submetidas à incorporação de timidina-³H por 12 horas (pulsos tornam difícil a detecção de pequenas contaminações) e em seguida eram processadas para autorradiografia. Em caso de contaminação o autorradiograma apresenta grãos sobre o citoplasma da célula; se a infecção for pequena os núcleos celulares aparecem normalmente marcados, mas em contaminações acentuadas os núcleos aparecem com pouca marcação ou não são marcados, apesar das células estarem crescendo e se dividindo.

o. Preparações de hormônios

Preparações impuras de hormônio luteinizante (LH), estimulador do folículo (FSH), de crescimento (GH), estimulador de tiróide (TSH) e prolactina foram fornecidos gratuitamente pelos U.S. National Institutes of Health (NIAMD, Hormone Distribution Program). Amostras de LH altamente purificadas foram obtidas do NIH e também como presente do Dr. D. Gospodarowicz (Salk Institute). O fator de crescimento epidérmico ou epitelial (EGF) foi um presente do laboratório do Dr. H. Herschman (University of California, Los Angeles). Estas preparações eram dissolvidas em salina fosfato (pH 7,0) a 100 µg/ml e mantidas congeladas. Insulina de porco cristalina (Sigma Co.) era mantida em solução estoque, salina, pH 3,5, 100 µg/ml, congelada. Hormônios esteróides puros eram mantidos em solução estoque de etanol 95%, a 500 µg/ml, na geladeira.

p. Ensaio de lactose sintetase

A lactose sintetase (UDP-galactose; glicose 81+4 galactosiltransferase) é uma transferase de grupos galactosídicos, que são encontrados nas células secretoras das glândulas mamárias, a qual catalisa a seguinte reação:

Nesta tese esta enzima foi tomada simplesmente como indicadora da função das células secretoras das glândulas mamárias. Seu ensaio foi efetuado seguindo protocolo de BABAD e HASSID (1966). Como substrato foi usado UDP-D-galactose-¹⁴C (marcado apenas em galactose); a atividade foi seguida pela passagem da mistura de reação em resina aniônica (Bio-Rad Ag, 200 a 400 mesh, forma cloreto, previamente lavada com lactose). Se a reação se processa ¹⁴C passa pela coluna na forma de lactose e UDP-gal é retida; a presença de hidrolases que podem levar a liberação de gal-¹⁴C era controlada. Mistura de reação: 20 µl de MnCl₂ 0,3 M, 10 µl de D-glicose 0,3 M, 30 µl de UDP-gal-¹⁴C 2 x 10⁻⁵ M (250.000 cpm) e 90 µl de Tris-HCl 0,02 M, pH 7,5; após a reação adicionava-se à mistura 850 µl de Tris-HCl e passava-se por uma coluna de 0,5 x 1,2 cm; a radioatividade retida pela coluna era quantitativamente eluída com 2 ml de HCl 1 N.

q. Determinação de cAMP e cGMP

O método usado foi o radioimunoensaio de STEINER, PARKER e KIPNIS (1972). Anticorpos e derivados iodados (¹²⁵I) foram adquiridos da Collaborative Res. Inc.; cAMP, dibutiril cAMP e cGMP foram obtidos da Sigma ou Calbiochem; 3',5'-nucleotídeo cíclico fosfodiesterase de coração de boi

(BUTCHER e SUTHERLAND, 1962) foi comprada da Sigma. A fixação das células e extração dos nucleotídeos foram efetuados com TCA 10%; TCA foi posteriormente eliminado através de extração com éter; seguia-se, normalmente, liofilização do extrato, o qual era então dissolvido em pequena quantidade de acetato de sódio, pH 6,2, 0,05 M, e guardado congelado a -15°C . Nos casos em que os nucleotídeos foram purificados, usou-se troca iônica como processo, segundo o protocolo de MURAD, MANGANIELLO e VAUGHAN (1971). Os níveis de nucleotídeos foram expressos em termos de picomoles por número de células (determinado em placas paralelas) ou proteína total (determinada pelo método de LOWRY et al, 1951, após a extração com TCA) e ou RNA total (determinado pelo método de FLECK e MUNRO, 1962).

r. Determinação de radioatividade

Neste trabalho os compostos marcados radioativamente continham ^{125}I , ^3H ou ^{14}C . ^{125}I foi medido num contador Nuclear Chicago para raios γ . ^3H e ^{14}C foram determinados num espectrômetro de cintilação líquida. A solução cintiladora normalmente usada foi tolueno-POPOP-PPO; mas em casos em que a amostra estava em solução aquosa usamos a mistura solução tolueno-POPOP-PPO (duas partes) mais triton X-100 (uma parte).

TABELA I

Eficiências de extração de alguns hormônios por carvão ativo

Esteróides	Concentração do composto radioativo acidificado (M)	% da radioatividade inicial extraída às temperaturas:	
		4°C	55°C
Estradiol	$2,5 \times 10^{-8}$	90;90*	97
Estradiol	$2,5 \times 10^{-10}$		97
Testosterona	4×10^{-8}	62;83*	99
Estrona	$2,5 \times 10^{-8}$		99
Progesterona	2×10^{-8}		98
Hidro cortisona	$2,3 \times 10^{-8}$	30;95*	99
<u>Conjugados-³H</u>			
Estradiol-glicuronideo	$3,3 \times 10^{-8}$		98
Testosterona-glicuronideo	$2,5 \times 10^{-8}$		92
Estrona-sulfato	$2,5 \times 10^{-8}$		95
Tiroxina- ¹⁴ C	$5,5 \times 10^{-6}$		71
Salina + estradiol- ³ H	$2,5 \times 10^{-8}$	99,8	99,8

Protocolo: os compostos radioativos foram adicionados a amostras de soro, as quais foram incubadas a 4°C para equilíbrio com o "pool" endógeno, por pelo menos 2 horas (15 minutos é suficiente). Amostras de 2 ml de soro foram tomadas, misturadas a 0,2 ml da suspensão de carvão, extraída a temperatura indicada e imediatamente filtradas em filtros Millipore de nitrocelulose. O filtrado foi usado para medir radioatividade em mistura tolueno-triton.

* Soro aquecido a 55°C por 30 minutos antes da adição do composto radioativo. As extrações a 4°C dão uma indicação da ligação de alta afinidade do composto radioativo a proteínas carregadas específicas de esteróides presentes no soro (ver WESTPHAL, 1967 e MILGRAM e BAULIEU, 1969). Os dados da tabela são médias de duas determinações independentes. As absorvâncias do soro a 280 mμ antes e depois da extração foram $0,580 \pm 0,005$ e $0,580 \pm 0,040$ (diluído 100 vezes, diversas extrações) respectivamente, o que indica não haver extração significativa de proteínas.

IV. ESTABELECIMENTO EM CULTURA DE LINHAGENS CLONADAS DE CÉLULAS DE UM CARCINOMA MAMÁRIO DE RATO, DEPENDENTE DE ESTRÓGENO: INTERESSE PRÁTICO E PROBLEMAS EXPERIMENTAIS

a. Objetivos; bases do plano experimental

Experiências endocrinológicas clássicas de extirpação de órgãos em animais experimentais, mostraram que o desenvolvimento das glândulas mamárias é dependente de secreções da hipófise, ovário e cortex adrenal. Por outro lado a terapia de administração de hormônios a ratos triplamente operados (hipofisectomizados, ovariectomizados e adrenalectomizados), mostraram que os hormônios prolactina, estrógenos e glucocorticoides são necessários para o completo desenvolvimento do tecido mamário (LYONS, LI e JOHNSON, 1958). Além disso neoplasias de mama, tanto no homem como em roedores, são frequentemente dependentes de hormônio para crescer; daí a extirpação de glândulas endócrinas, em mulheres portadoras de câncer mamário, levar a parada do crescimento ou regressão do tumor. Diversas linhagens de tumores mamários, dependentes de hormônios e transplantáveis em ratos existem há algum tempo (FURTH, 1970; IGLESIAS, 1970) e alguns estão à disposição de investigadores interessados. Tais tumores representam fontes convenientes de células, a serem usados como material inicial para desenvolvimento em cultura de linhagens celulares, cujo crescimento seria dependente de hormônio. A meta final deste projeto era a obtenção de linhagens, clonadas e estáveis em culturas, as quais desenvolvem "tumores

dependentes de hormônio" em hospedeiros apropriados. As facilidades metodológicas da cultura permitiriam o uso de linhagens deste tipo como modelos experimentais de utilidade para estudos de interesse prático imediato, como a terapia do câncer mamário, ou de interesse básico, tanto para a endocrinologia (estudos do mecanismo de ação de hormônios específicos) como para a biologia celular geral (estudos dos mecanismos regulatórios de crescimento celular).

Este Capítulo descreve os resultados obtidos no estudo do estabelecimento em cultura de células mamárias, a partir de tumor dependente de altos níveis de estrógeno em animais com hipófise, transplantável em ratos AxC e desenvolvido por R. IGLESIAS (1970). A abordagem experimental planejada envolvia o uso do processo de "passagens alternadas de células em cultura e em animal", desenvolvido por BUONASSISI, SATO e COHEN (1962) e aplicável ao estabelecimento de linhagens de células diferenciadas em cultura a partir de tumores funcionais. A base racional deste processo é simples: i) a norma geral é fibroblastos proliferarem rapidamente em cultura suplantando outros tipos de células (que se dividem lentamente ou não se dividem), eliminando-as; ii) na primeira passagem de um tumor em cultura as células neoplásticas são selecionadas para as que melhor sobrevivem e proliferam em cultura; estas representam em geral uma parcela pequena da população; iii) durante o mesmo período os fibroblastos normais proliferam, mas antes que estes "sufoquem" as células neoplásticas sobreviventes, a cultura é reinoculada no animal hospedeiro; iv) no animal as células neoplásticas são favorecidas, pois os fibroblastos, sendo normais, estão sob o controle endógeno do crescimento,

enquanto as células neoplásticas desenvolvem um novo tumor; o qual está agora enriquecido nas células neoplásticas que melhor sobrevivem nas condições de cultura; v) diversas passagens cultura-animal podem ser feitas para efetuar seleção progressiva e na etapa final as células neoplásticas selecionadas tem que ser clonadas;finalizando-se assim o processo de isolamento e estabelecimento das células em cultura.É importante lembrar que uma vez isoladas e clonadas as células precisam ter a sua identidade provada bioquimicamente através da expressão, em cultura, de uma função bioquímica específica do tecido de origem; a morfologia e estrutura em cultura é um critério pobre de identificação, embora, as vezes, seja o único disponível.

No caso do tumor mamário em estudo as culturas primárias eram feitas em meio CFB suplementado com os hormônios: prolactina, insulina, hidrocortisona, progesterona e estradiol (desde que pretendia-se favorecer o crescimento de células dependentes de hormônio). As culturas primárias eram inoculadas em animais machos normais e machos com implante de pastilhas de estradiol, para testar o eventual aparecimento de tumores autônomos, um evento relativamente comum nestes tipos de tumores. Como meios mínimos (meios carentes nos hormônios estimulantes) foram adotados meios preparados com soro de cachorro ou rato hipofisectomizado ou com soro de vitelo extraído com carvão ativo (ver Métodos). As culturas eram examinadas diariamente ao microscópio de fase, usando-se critério morfológico como guia de rotina: classificando-se as células como epiteliais (prováveis células mamárias) e fibroblásticas; o critério bioquímico adotado para identificação das células foi

a procura de atividade de lactose sintetase, uma enzima específica das células acinosas do tecido mamário. É importante lembrar que o ponto indeterminado do protocolo adotado é o nível dos hormônios adicionados ao meio das culturas primárias; é provável que o crescimento das células dependa de concentrações e combinações críticas dos hormônios, esta questão, entretanto, não tinha solução "a priori", devendo ser enfrentada empiricamente por tentativa e erro.

b. Resultados

1. Seleção por passagens alternadas em cultura e animal

Culturas primárias, mantidas por até 25 dias, quando injetadas em animais (1 a 2×10^7 células por animal) deram "tumores dependentes de hormônio", cujo crescimento foi imediato, conforme as curvas da Figura 4a e b indicam. Nestas culturas o fato mais relevante foi a necessária presença de células epiteliais típicas para se observarem os tumores dependentes em animais. Uma observação não antecipada foi o aparecimento de tumores de desenvolvimento tardio (Figura 4a: 7 a 8 meses; 4b: 3 a 4 meses) em animais controle. Estes tumores autônomos eram transplantáveis, desenvolvendo-se sem período de latência mesmo em animais hipofisectomizados, conforme a Figura 4f e g mostram. Eram tumores esbranquiçados, sólidos, duros e fibrosos; histologicamente (cortes corados com hematoxilina e eosina) mostraram tecido fibroso, claramente distinto do adenocarcinoma de tumor original; a explicação adotada foi que se tratava de um fibrosarcoma oriundo da

transformação de fibroblastos normais, a qual ocorreu provavelmente em cultura. Tal evento é de ocorrência conhecida e até provável, levando em conta que nas culturas primárias fibroblastos foram mantidos crescendo em alta densidade (ver AARONSON e TODARO, 1968 e SANFORD, 1968). Embora o aparecimento do fibrosarcoma tenha tornado o método de passagens alternadas cultura-animal ineficiente, o tumor dependente pode ser mantido estável através de transplantes sucessivos animal-animal (ver Figura 4c, d e e), mesmo depois da terceira passagem em cultura. Após a quarta passagem em cultura o tumor autônomo mostrou menor período de latência e maior velocidade de crescimento (Figura 5a e b). Na quarta passagem em cultura foi testado se BUDR adicionado ao meio de cultura primária influenciaria a capacidade tumorigênica das células (fato relatado por SILAGI, 1971, para melanomas): conforme a Figura 5a e b indicam nenhum efeito foi observado.

2. Seleção de células epiteliais em cultura

As células epiteliais presentes nas culturas primárias eram, provavelmente, as células mamárias. Era de se esperar que tais células não crescessem nos meios deficientes em hormônio (soro de animal hipofisectomizado ou soro extraído com carvão); portanto era razoável tentar a seleção destas células epiteliais em meios deficientes, através de agentes como FUDR (POLLACK, TODARO e GREEN, 1968) ou BUDR (PUCK e KAO, 1967) que matam especificamente células que sintetizam DNA. Entretanto, diversas tentativas por este processo levaram, invariavelmente, a seleção de fibroblastos. A explicação para este insucesso parece ser dupla: primeiro fibroblastos tem sua replicação diminuída em soro hipofisectomizado ou extraído com

carvão (ARMELIN, 1973) e segundo células cancerosas na ausência de "reguladores" não entram em repouso ("estado R"), mesmo que a população não cresça (ver secções seguintes). Em vista disso a seleção das células epiteliais em cultura de via seguir outro processo.

Foi possível notar que em presença da solução de tripsina, normalmente usada para subcultivo, fibroblastos se descolavam da placa mais rapidamente (5 a 10 minutos) que as células epiteliais (10 a 20 minutos). Esta velocidade diferencial de descolamento foi usada para enriquecer a população em células epiteliais; posteriormente colônias encontradas (inspeção microscópica) "puras" em células epiteliais eram isoladas e as populações oriundas do cultivo destas células eram submetidas a clonagem.

Culturas primárias do 3º ciclo de passagem por cultura foram tratadas com tripsina e deram populações altamente enriquecidas em células epiteliais. Estas culturas selecionadas, mostraram-se altamente "responsivas" a prolactina (impura) para crescer em meio com soro de cachorro-hipofisectomizado, conforme a Figura 6 indica. Entretanto, não foi possível clonar estas células e culturas clonadas e estáveis nunca foram obtidas.

No 4º ciclo de passagem do tumor em cultura, as culturas primárias obtidas resultaram, pelo método de tripsina, em excelentes culturas de células epiteliais, as quais foram clonáveis, dando culturas clonadas e estáveis indefinidamente.

3. Comportamento das linhagens clonadas: efeito de hidrocortisona

O crescimento das células clonadas em meio com soro extraído com carvão (Figura 7, Tabelas II e III) e com soro de animal hipofisectomizado é altamente dependente da adição de esteróis a cultura. O requerimento é específico para glucocorticoides (hidrocortisona), os quais são ativos em concentrações perfeitamente fisiológicas conforme as curvas de dose da Figura 8 indicam. Os hormônios proteicos insulina e prolactina não tiveram efeitos significantes seja no crescimento (Tabelas III e IV) seja na eficiência de plaqueamento (Tabela III) destas células. O soro, entretanto, contém fatores absolutamente necessários a sobrevivência das células, fatores esses que não podem ser substituídos por hormônio; conforme a Tabela II indica 2% de soro de vitelo mesmo com hidrocortisona dá eficiência de plaqueamento essencialmente nula. A população das células clonadas em meio com soro extraído com carvão pode ter crescimento nulo, enquanto a adição de hidrocortisona ao mesmo meio dá crescimento rápido, como a Figura 7b indica. Apesar do crescimento nulo da população as células não entram em repouso ("estado R"), conforme a alta incorporação de ^3H -timidina em DNA mostra (Figura 7b). O crescimento lento ou nulo da população é devido a morte de células, conforme é mostrado diretamente pelas medidas de eficiência de plaqueamento (Tabelas II e III); notar que fibroblastos (3T3) também crescem pouco em soro extraído (ARMELIN, 1973), mas a eficiência de plaqueamento não é afetada (ver Tabela II). Estes resultados mostram que hidrocortisona tem, operacionalmente, dupla função: é fator de "sobrevivência" (meio 10% VC; eficiência de plaqueamento) e é fator de

"crescimento" (acelera crescimento em 10% V, onde EP é alto).

As linhagens de células clonadas foram testadas para a atividade de lactose sintetase, seja na presença ou na ausência de prolactina e em diversos meios, os resultados foram sistematicamente negativos. Para a série de clones estudada o número médio de cromossomos por célula foi 69. As mesmas células quando inoculadas em animais (10^7 células/animal), desenvolvem tumores em animais normais, machos ou fêmeas, mas tem a tendência a não dar tumores em animais hipofisectomizados e adrenalectomizados (tempo de observação limitado pela curta sobrevivência dos animais operados, em torno de 1 mês).

4. AMP e GMP cíclicos: efeitos da adição ao meio de cultura e níveis intracelulares

A adição de dibutiril cAMP ao meio de cultura antagoniza a ação estimulatória de hidrocortisona e esta ação antagonizante é potenciada pela adição conjunta de teofilina (um inibidor de fosfodiesterase), conforme a Figura 9 mostra; o efeito do nucleotídeo cíclico e ou teofilina é aumentar a incidência de morte e não o bloqueio do crescimento e divisão celular. Os níveis intracelulares de cAMP e cGMP foram medidos para células em 10% VC com ou sem hidrocortisona (Tabela V); na presença do hormônio o nível de cAMP é baixo (o que concorda com a regra para células cancerosas), mas na sua ausência os níveis podem ser altíssimos; cGMP não varia significativamente. Evidentemente, estas correlações não mostram que os altos níveis de cAMP sejam a causa da morte da célula, mas são sugestivas; assim como os resultados não implicam que o

decrêscimo do nível de cAMP seja necessariamente consequência direta da ação de hidrocortisona.

A adição de cGMP ao meio com 10% VC provocou um incipiente aumento da população, efeito cuja significância é difícil de considerar, mas se comparado ao efeito da hidrocortisona fica sem dúvida negligenciável (Tabela VI).

c. Conclusões

1. O estudo descrito aqui dá uma dimensão das limitações do processo de estabelecimento de linhagens de células em cultura, dado o empirismo ao qual esta tarefa está sujeita. Uma tentativa de esgotar as possibilidades racionais de ataque do problema foi feita; os resultados mostraram que i) o processo de passagens alternadas de células da cultura para o animal, de BUONASSISI e colegas, embora aparentemente útil, tem limitações sérias e ii) os processos de seleção com agentes como BUdR e FUdR, dependem de conseguir que as células desejadas entrem em repouso e é possível que células cancerosas não entrem em repouso quando privadas de reguladores. O processo de seleção com tripsina uma observação que não podia ser antecipada, acabou fornecendo elementos experimentais para seleção de células epiteliais. Embora este processo tenha sido interessante nada diz "a priori" qual a sua utilidade em outros casos.

2. Dentre as implicações do estudo do comportamento dos clones, um dos mais interessantes é que a dificuldade encontrada em conseguir que estas células entrem em repouso ("estado R"), talvez venha do fato de que células

neoplásticas não entram em repouso quando privadas de "regula-
dores" do crescimento. É interessante comparar estes resulta-
dos e esta sugestão com o que descrevemos para fibroblas-
tos transformados por vírus, no Capítulo seguinte (o mesmo
problema é abordado com um pouco mais de minúcia em ARMELIN,
1974).

3. Parece válido concluir que este estudo mostra
que é possível desenvolver clones estabelecidos em cultura, a
partir de tumores dependentes de hormônio em animal. Clo-
nes deste tipo prometem ser úteis para o estudo de mecanis-
mos hormonais e suas implicações nas neoplasias.

TABELAS E FIGURAS

TABELA II

MEIO	Células mamárias (clone 102S-1A)			Fibroblastos (3T3)		
	Colônias* desenvolvidas por placa	EP em %	Inóculo: 100 células/placa	Colônias** desenvolvidas por placa	Inóculo: 110 células/placa	EP em %
10% VC	15 ± 4	15	2,8	79 ± 10	72	
10% VC + H	42 ± 4	42		-	-	
10% V	41 ± 4	41	1,1	78 ± 5	71	
10% V + H	47 ± 2	47		-	-	
2% V	zero	zero	-	-	-	
2% V + H	1 ± 1	1	-	-	-	
CFB	43 ± 3	43	1,0	76 ± 5	69	

Sobrevivência (medida por eficiência de plaqueamento) de células mamárias e fibroblastos em meio rico (CFB) e meios relativamente mais pobres (V e VC) em fatores de soro; efeito de hidro cortisona. O valor de número de colônias/placa é média aritmética ± desvio médio correspondente a cinco placas independentes. Símbolos: VC, soro de vitelo extraído com carvão ativo; H, hidro cortisona a 100 ng/ml; EP_H e EP_O, eficiência de plaqueamento respectivamente na presença e na ausência de hidro cortisona.

* Para todos os meios as colônias foram relativamente maiores na presença de hidro cortisona.

** Microcolônias em 10% VC; colônias de tamanho intermediário em 10% V e colônias grandes em CFB.

TABELA III

MEIO	Hormônio Adicionado	Inóculo 5 x 10 ⁴ 3 dias de crescimento células/placa x 10 ⁻⁴	células/placa crescimento relativo N ₃ /N ₀	Inóculo 200 células/placa EP em %
	-	6,6 ± 0,6	1,3	zero
	Hidrocortisona (H) (100 ng/ml)	53,0 ± 1,0	10,6	15 ± 0,5
	Prolactina (P) (5000 ng/ml)	7,1 ± 0,9	1,4	5 ± 2
10% VC	Insulina (I) (2000 ng/ml)	5,4 ± 0,2	1,1	4 ± 1
	H + P + I	51,0 ± 1,0	10,2	11 ± 1
CFB	-	-	-	45 ± 2

Crescimento e eficiência de plaqueamento (EP) para o clone 102S-1A1 de células mamárias, em meio com soro de vitelo extraído com carvão ativo (VC) e suplementado por hormônios. Os valores são médias de duas placas independentes e os desvios são os desvios médios. N₃, número de células/placa no dia 3; N₀ inóculo. Prolactina: preparação impura fornecida pelo NIH. Insulina: cristalina (Sigma).

TABELA IV

MEIO	Hormônio Adicionado	3º dia de crescimento células/placa x 10 ⁻⁴	Crescimento relativo N ₃ /N ₀
Soro de rato hipofisec- tomizado (4%)	-	1,0 ± 0,1	2,0
	H	6,7 ± 0,2	13,4
Inóculo 5000 células	H + P	5,3 ± 0,4	10,6
10% VC	-	5,3 ± 0,2	1,0
Inóculo 50000 células	H	35,8 ± 0,2	7,2

-51-

Crescimento do clone 102S-1AIII de células mamárias em meio com soro de rato hipofisectomizado e de vitelo extraído com carvão (VC). H: hidrocortisona a 50 ng/ml; P: prolactina a 2000 ng/ml. Os valores são médias de duas placas.

TABELA V

MEIO	Níveis intracelulares em pmoles/mg proteína	
	cAMP	cGMP
10% VC	17,0 - 100	0,22 $\pm$ 0,06
10% VC + hidrocortisona 50 ng/ml	9,0 $\pm$ 0,2	0,20 $\pm$ 0,01

Níveis intracelulares dos nucleotídeos cíclicos no clone 102S 1A de células mamárias, em meio com soro de vitelo extraído com carvão ativo, 24 horas depois do plaqueamento. Culturas esparsas: 10^4 /células 1 cm^2 . Proteínas 1350-1600 μg e RNA 33-40 μg por 10^6 /células em presença de hidrocortisona; Proteínas 1600-1800 μg e RNA 46-47 μg por 10^6 /células na ausência do hormônio. O meio foi retirado das placas por sucção, as células foram lavadas por sucção com salina fosfato e TCA 10%, frio foi adicionado imediatamente (a lavagem e adição de TCA tomou 30 segundos por placa). As placas com TCA foram incubadas a 2°C , por 30 minutos; em seguida o TCA foi recolhido e nova extração com TCA foi feita, sendo as duas extrações combinadas. Proteína e RNA foram determinados após a extração com ácido nas células fixadas que permaneceram aderidas a placa.

TABELA VI

Meio 10% VC Suplementado com:	Células/placa x 10 ⁻⁴ (Inóculo 10 ⁴ células)	
	48 horas	96 horas
-	15	16
Hidro cortisona 50 ng/ml	42	88
cGMP 10 ⁻⁵ M	24	20
cGMP 10 ⁻⁴ M	30	24
cGMP 10 ⁻³ M	26	20

Efeito da adição de cGMP sobre o crescimento do clone 102S
1A de células mamárias. O nucleotídeo foi adicionado ao
meio no momento do plaqueamento nas concentrações indicadas.

FIGURA 4 - Crescimento de tumores em animais inoculados com células "passadas" em cultura. As células foram inoculadas sob a pele e na altura da cintura escapular do animal à direita; as pastilhas de estradiol foram implantadas também sob a pele mas na altura da cintura pélvica. O desenvolvimento dos tumores foram seguidos por apalpação do animal semanalmente; o tamanho do tumor era estimado medindo-se dois diâmetros do tumor (por apalpação) em centímetros; tumores transplantados ou de animais que morriam eram dissecados e pesados. Tamanhos de tumor lançados em unidades arbitrárias, mas tamanho 4 corresponde a um tumor pesando de 40 a 50 g. □—□ animal macho com estradiol; ○—○ macho normal; △—△ hipofisectomizado; M significa animal que morreu naturalmente; C animal sacrificado tumor colocado em cultura; T animal sacrificado tumor transplantado para outro hospedeiro.

FIGURA 4a: células inoculadas depois da segunda passagem em cultura (15 dias); 4b: células inoculadas após a 3ª passagem em cultura (25 dias); 4c, d e e: são uma série de três transplantes seguidos de um dos tumores dependentes de estradiol, cujo crescimento está indicado em 4b; 4f e 4g uma série de dois transplantes seguidos do tumor independente indicado em 4b.

figura 4

FIGURA 5 - Crescimento de tumores em animais após a quarta passagem em cultura. 5a: células inoculadas após 6 dias em cultura; 5b: o mesmo que 5a, apenas que dois dias antes da inoculação as células foram mantidas em meio contendo 30 µg/ml de BUDR e no escuro; o crescimento em cultura não foi afetado por BUDR. Demais informações na Figura 4.

FIGURA 6 - Crescimento de células epiteliais não clonadas em meio com 10% de soro de cachorro hipofisectomizado. Células epiteliais não clonadas (89S), selecionadas pelo método da tripsina três dias antes, foram tripsinadas e plaqueadas em meio com 10% de soro hipofisectomizado suplementado com 5000 ng/ml de prolactina impura (ovina, Sigma) ●—●; suplementado com 5000 ng/ml prolactina, 1000 ng/ml insulina e 1000 ng/ml estradiol O---O; e sem suplementação nenhuma Δ--Δ (neste caso contagens significantes só foram obtidas nos dias 9 e 11).

figura 6

FIGURA 7 - Crescimento de células clonadas em meio com 10% de soro de vitelo extraído com carvão. 7a: células do clone 102S-1AIII foram plaqueadas em meio com 10% VC suplementado com 100 ng/ml hidrocortisona, 100 ng/ml progesterona e 100 ng/ml estradiol ●—● ou em meio 10% VC sem suplementação ○—○. 7b: clone 102S-1A plaqueado em meio 10% VC mais 50 ng/ml hidrocortisona □—□ e em 10% VC não suplementado ○—○. As atividades específicas indicadas no gráfico referem-se a incorporações de ^3H -timidina (10^{-5} M, 1 $\mu\text{C}/\text{ml}$) por 12 horas entre os dias 2 e 3.

figura 7

FIGURA 8 - Efeito de diferentes esteróides sobre o crescimento de células clonadas em meio com 10% de soro de vitelo extraído com carvão; curvas de dose. Células do clone 102S-1A foram plaqueadas em meio 10% VC suplementado com um dos esteróides indicados no gráfico; depois de cinco dias de incubação as células foram contadas e valores de células por placa foram lançados contra a concentração de hormônios em ng/ml.

figura 8

FIGURA 9 - Efeito de hidrocortisona, dibutiril-cAMP e teofilina no crescimento de células clonadas. Células do clone 102S-1A foram plaqueadas em meio 10% VC suplementados conforme indicado nos gráficos. H: 50 ng/ml de hidrocortisona; Di: dibutiril cAMP 10^{-3} M; T⁻³ e T⁻⁴: teofilina a 10^{-3} e 10^{-4} M, respectivamente.

figura 9

V. CONTROLE DO CRESCIMENTO E DIVISÃO CELULAR EM LINHAGENS DE FIBROBLASTOS MANTIDOS EM CULTURA

a. Histórico

1. Fibroblastos 3T3

TODARO E GREEN (1963) estabeleceram em cultura por um protocolo empírico e sistemático, a linhagem de fibroblastos 3T3, proveniente de embriões de camundongos suíços. O nome 3T3 originou-se do protocolo: inóculo de 3×10^5 células transferidos a cada 3 dias. Estas células crescem em monocamadas e em meio contendo 10% de soro de vitelo o crescimento pára quando a camada de células se torna confluyente e as células entram em "repouso" parando o "ciclo celular" no início de G1 (TODARO, LAZAR e GREEN, 1965). Este fenômeno foi chamado "inibição de contato", nome por sinal cunhado antes do desenvolvimento da linhagem de células 3T3 (na verdade este nome foi inicialmente usado no sentido de "inibição de movimento por contato" e não "inibição de crescimento", ABERCROMBIE e HEAYSMAN, 1954), e implicando que o contato entre as células de alguma maneira levava a inibição do crescimento. É importante ressaltar que já nesta época tinha se observado que células cancerosas não apresentavam "inibição de contato" em cultura. Posteriormente, AARONSON e TODARO (1968) desenvolveram novas linhagens de 3T3 mas a partir de embriões de camundongos Balb/c. Sendo estes animais de uma linhagem geneticamente pura, foi possível testar a capacidade tumorigênica das linhagens de fibroblastos, verificando-se que as linhagens com "inibição de contato" (Balb/c 3T3) não desenvolvem tumores em

animais. Enquanto isso linhagens sem "inibição de contato", por exemplo Balb/c 6T6, causam tumores quando injetados nos animais. Estas verificações experimentais sugeriram que a "inibição de contato" é uma manifestação em cultura do controle normal do crescimento e as células que o exibem são normais. Convém lembrar, no entanto, que 3T3 não é uma célula normal pois tem um cariótipo aberrante, é quase tetraploide contendo cromossomos anormais. Não obstante 3T3 passou a ser um modelo celular dos mais estudados como exemplo do fibroblasto "normal".

2. "Inibição de contato" e fatores do soro

Praticamente todo o esforço experimental devotado nos últimos 15 anos ao estudo do controle do crescimento celular, estava de alguma maneira comprometido com a tentativa de compreensão do fenômeno de "inibição de contato". Antes de levar em conta o fenômeno em si é bom lembrar que um dos seus aspectos é altamente persuasivo, trata-se do observado na experiência de ferimento e cicatrização ("wound-healing") em cultura (DULBECCO, 1970). Nesta experiência uma monocamada confluenta de células "inibida por contato" é ferida, isto é, uma faixa de células de aproximadamente 1 mm de largura é raspada, rompendo assim a camada contínua de células; nesta operação o meio de cultura não é mudado. Segue-se a isso um fenômeno fascinante: as células do bordo do "corte" feito na monocamada começam a se dividir até que a monocamada seja refeita (cicatrização); entretanto, nas partes intatas da monocamada nenhuma célula entra em divisão. Não obstante o interesse gerado em torno da "inibição de contato",

o seu estudo deu regularmente resultados muito decepcionantes. Em 1968 HOLLEY e KIERNAN mostraram que células 3T3 podem continuar a crescer depois de confluentes, formando multicamadas em pilhadas se a concentração do soro for aumentada além de 10%; eles mostraram, na verdade, que o tamanho da população quando o crescimento estaciona é função da concentração do soro no meio. Estas observações mostram: primeiro que o contato por si mesmo não leva a nenhuma inibição; segundo que o fato reproduzível de que as células paravam de crescer quando chegavam à confluência era consequência fortuita do hábito de cultivá-las sempre em 10% de soro; e terceiro sugere que o crescimento é função da concentração de algum fator presente no soro. A outra contribuição a mostrar quão enganoso é o "conceito de inibição de contato" veio de CECCARINI e EAGLE (1971a; 1971b): estes autores mostraram que o tamanho da população, quando o crescimento estaciona, é também função do pH do meio; em pH apropriado as células "normais" ficam superconfluentes mesmo em 10% de soro. Em face desses desenvolvimentos experimentais a hipótese que parecia mais útil é a que propõe estarem as células "normais", em cultura, sob estrito controle de fatores do soro. Para testar esta hipótese, a purificação e isolamento dos fatores postulados tornou-se absolutamente necessário. Embora algum progresso tenha sido feito (JANCHILL e TODARO, 1970; PAUL et al, 1971; LIPTON et al, 1971), de maneira geral esta tarefa foi, até o momento, totalmente insuperável, dadas as dificuldades práticas da análise bioquímica do soro (HOLLEY e KIERNAN, 1971). A consequência disto foi que os fatores de crescimento do soro continuaram como entidades de existência duvidosa e a função do soro no crescimento das células em cultura continuou nebulosa.

3. Transformação a vírus

Um fato importante que contribuiu para aumentar a atração de 3T3 como modelo experimental, foi a possibilidade de transformação destas células pelo pequeno vírus de DNA SV40 ("simian virus 40"); ver SAMBROOK, 1972. 3T3 "normal" quando transformada por SV40 em cultura passa a exibir o comportamento de uma célula cancerosa; em outras palavras, de alguma maneira o controle do crescimento é subvertido (TODARO e GREEN, 1964; TODARO, GREEN e GOLDBERG, 1964). A transformação envolve a integração do genoma do vírus no genoma da célula e o fenótipo da célula transformada depende da expressão de algumas "early messages" do vírus integrado (SAMBROOK, SHARP e KELLER, 1972). Dado que o vírus tem genoma muito pequeno ($3,4 \times 10^6$ daltons de DNA), suficiente para codificar apenas 7 ou 8 proteínas de tamanho médio, supunha-se que ele poderia ser uma ferramenta "simples" e eficiente para explorar as funções celulares ao nível molecular (DULBECCO, 1971). Esta, sem dúvida, parecia uma alternativa inteligente à opção custosa da análise bioquímica de sistemas tão complexos como o sorro ou a célula. Entretanto, esta esperança parece, a luz dos resultados atuais, que foi excessivamente otimista, não obstante continua como abordagem válida e promissora, apenas não tão auto suficiente como se pensava de início.

4. Proteases e controle da divisão celular

M. BURGER (1971) observou que se células 3T3 "normais", confluentes e em repouso eram tratadas por um período breve com tripsina, a baixas concentrações, seu crescimento era iniciado e a duplicação da população ocorria depois de um

período definido de tempo. O efeito imediato do tratamento triptico é tornar as células aglutináveis pela aglutinina do germe de trigo (ou, também, por concanavalina A), propriedade não exibida pela célula "normal" em repouso, mas sempre exibida pela célula transformada. Baseado nestas observações BURGER propôs que proteases digerem proteínas que, nas células em repouso, "cobrem" receptores (indicado pelo efeito da aglutinina ou da concanavalina A) expondo-os; tais receptores uma vez expostos podem entrar em contato com fatores do meio e desta maneira o crescimento e divisão celulares são desencadeados. As células transformadas teriam seus receptores permanentemente expostos daí o crescimento "descontrolado"; por outro lado quando as células chegam a confluência os receptores são recobertos. Esta teoria e seu autor gozaram por algum tempo de grande popularidade, entretanto, parece, agora, tratar-se de hipótese completamente errada. Primeiro, diversos laboratórios tem sido incapazes de repetiros resultados de BURGER, isto é, desencadear crescimento em 3T3 com tripsina (CUNNINGHAM e TRASH, 1974; HOLLEY e KIERNAN, 1974; ARMELIN, resultados não publicados); apesar do tratamento triptico tornar 3T3 "normal" e em repouso aglutinável pela aglutinina ou por concanavalina A como nas experiências de BURGER. Segundo, a quantificação dos receptores para concanavalina A mostrou que o seu número não varia com o tratamento proteolítico, fato que deveria ser esperado se os receptores fossem expostos pela ação da protease. Ao que tudo indica os receptores apenas se rearranjam formando aglomerados em consequência da ação da tripsina (NICOLSON, 1971; 1973). O ponto importante, entretanto, é que o rearranjo dos receptores para concanavalina A, presentes na membrana, "per se" não é suficiente para desencadear o crescimento e, portanto, este

provavelmente, não é o evento iniciador do crescimento e divisão celular.

5. Fator de crescimento de origem hipofisária

Em julho de 1971 nós começamos a estudar as exigências de 3T3 para crescer em cultura. A razão da escolha de 3T3 fora porque estas células mostram uma transição muito nítida entre o estado de "repouso" e a fase de "proliferação". Um ensaio quantitativo para esta transição foi elaborado e uma análise sistemática dos fatores que influenciam nessa transição foi iniciada. Dessa investigação resultou um desenvolvimento experimental oportuno e significativo: o tecido hipofisário possui um fator proteico que desencadeia crescimento em 3T3, comportando-se como uma proteína reguladora do crescimento, a qual é diferente de todos os hormônios proteicos clássicos da hipófise e é fácil de purificar; além disso glucorticoides, em concentrações fisiológicas, agem como potenciadores da atividade dessa proteína (ARMELIN, 1973). Estas observações tinham, pelo menos, duas implicações de natureza fundamental: primeiro, do ponto de vista prático ofereciam um caminho mais simples e realizável a curto prazo, para o isolamento e purificação de um fator regulatório do crescimento, do que o fracionamento do soro; e, segundo, do ponto de vista conceitual sugeria uma natureza definida para os fatores de crescimento de células de mamífero, ou seja, reguladores de natureza hormonal, talvez uma nova classe de fatores endócrinos; hipótese excitante e de interesse básico, a qual merecia estudos cuidadosos. Os resultados nossos já foram completamente confirmados em outros laboratório (GOSPODAROWICZ, 1974, HOLLEY e KIERNAN, 1974) e ao que tudo indica parecem ser fatos experimentais incontestáveis. Sua significância para a fisiologia

"in vivo" é, evidentemente, questão ainda a ser respondida.

6. Mecanismos intracelulares de controle de crescimento

É razoável assumir que sejam quais forem os fatores extracelulares que interfiram com o crescimento celular, eles necessariamente terão o seu efeito mediado por algum mecanismo intracelular. É comum admitir que tal mecanismo seja muito simples e talvez envolva apenas um mediador cujo nível intracelular determinaria a velocidade de proliferação. Tem-se encontrado evidências experimentais em favor de dois tipos de mediadores: nutrientes e nucleotídeos cíclicos. CUNNINGHAM e PARDEE (1969) mostraram, que um dos primeiros efeitos observáveis na estimulação com soro de 3T3 "normal" e em repouso é a ativação do transporte de nutrientes básicos como fosfato inorgânico, glicose e uridina; ao mesmo tempo os mesmos autores notaram que a atividade de transporte em 3T3 transformada por vírus permanece constantemente alta. Estes resultados e outros semelhantes (SEFTON e RUBIN, 1971; WEBER, 1973) tem sido interpretados como indicando que o crescimento celular é simplesmente determinado pelos níveis intracelulares de alguns nutrientes fundamentais e o controle do crescimento é exercido através dos sistemas de transporte; um autor que levou esta hipótese ao seu extremo foi HOLLEY (1972). Um problema com esta hipótese é que é muito difícil de testá-la na prática de maneira simples e não ambígua. Uma discussão mais ampla desta hipótese e opções alternativas já foram apresentadas em outras secções desta tese (ver Capítulo II.d).

Outro tipo de raciocínio admite que a variação dos níveis intracelulares dos nutrientes é fenômeno

secundário, embora obrigatório. A hipótese aqui assume que existe um mediador central e os candidatos a essa função, que recentemente ganharam mais popularidade, são os nucleotídeos cíclicos; cAMP e cGMP. As evidências experimentais em favor disso são, por ordem cronológica: i) a adição de cAMP e teofilina ao meio de cultura de fibroblastos transformados por vírus primeiro, induz a morfologia de fibroblastos "normal" e segundo inibe o crescimento da população (JOHNSON, FRIEDMAN e PASTAN, 1971; SHEPPARD, 1971; HSIE e PUCK, 1971); ii) as linhas celulares cujas velocidades de crescimento em cultura são mais altas correspondem os níveis intracelulares de cAMP mais baixos, assim como a transformação por vírus leva a diminuição do nível de cAMP (OTTEN JOHNSON e PASTAN (1971); OTTEN et al (1972); iii) nos primeiros minutos depois da ativação do crescimento em linfócitos com hemaglutinina o nível intracelular de cGMP eleva-se abruptamente (HADDEN et al, 1972), o mesmo sendo observado para 3T3 ativada com reguladores de crescimento (ARMELIN, NISHIKAWA e SATO, 1974) ou com ésteres de forbol (ESTENSEN et al, 1974).

Quanto a observação de que cAMP e teofilina inibem o crescimento de fibroblastos transformados em cultura parece ser uma interpretação apressada: realmente o nucleotídeo inibe o aumento de população, mas em grande parte a inibição se deve a indução de morte das células (ver resultados no Capítulo anterior e neste). Isto tornaria a primeira evidência experimental citada acima invalidada. Já as correlações observadas entre as variações dos níveis intracelulares de cAMP e cGMP e o crescimento, são ainda evidências circunstanciais.

b. Objetivos experimentais

Dados os antecedentes que o histórico anterior indica tornou-se oportuno e importante levar avante a caracterização do fator proteico de origem hipofisária, o qual pode se mostrar como um protótipo de proteína reguladora do crescimento de fibroblastos. Levando em conta as vantagens que sistema 3T3 oferece como modelo experimental este poderia levar a informações básicas de interesse geral na regulação do crescimento e divisão celular em mamíferos.

Especificamente os seguintes pontos foram colocados para investigação: i) determinação da atividade do fator na ausência de soro; ii) verificar se há sinergismo com hormônios clássicos, principalmente insulina; iii) medir tempo de duração de G1 e o tempo de crescimento e duplicação da célula em diferentes condições; iv) verificar se o fator "induz" a célula a ficar "bioquimicamente comprometida" com a síntese de DNA e v) medir o efeito do fator no nível intracelular de cAMP e cGMP, assim como verificar o efeito de adição do fator e os nucleotídeos ao meio de cultura. Supunha-se que os pontos i e iv deveriam fornecer elementos para a caracterização experimental de um protótipo de "regulador extracelular do crescimento"; ao mesmo tempo as informações a serem obtidas serviriam para testar algumas das previsões do modelo de "ciclo celular" proposto nas seções b e c do Capítulo II. As experiências referentes ao ponto v poderiam trazer alguma informação interessante para a definição dos mecanismos intracelulares de controle do crescimento. A seção seguinte relata os resultados obtidos na tentativa de execução deste plano experimental.

c. Resultados

1. Efeito da ausência de soro na síntese de DNA de células "normais" e transformadas

Tanto células 3T3 "normais" como as transformadas por vírus (SV3T3) necessitam de soro para sobreviver e crescer em cultura. Mas, o efeito da retirada do soro do meio de células que crescem ativamente, tem uma diferença fundamental entre os dois tipos de célula: nas primeiras 6 a 8 horas depois da retirada do soro a síntese de DNA em 3T3 permanece alta, mas cai em seguida e é nula depois de 12 horas; em SV3T3, entretanto, a síntese de DNA não mostra tendência a diminuição. A ausência de síntese em células "normais" não é devido à morte mais rápida destas células na falta de soro, pois a síntese de DNA pode ser reiniciada, depois de 12 horas, se um "regulador de iniciação", apropriado, for adicionado ao meio de cultura; por outro lado, o mesmo "regulador" não tem efeito sobre a síntese de DNA em célula transformada, conforme os resultados da Tabela VII indicam. Estes resultados podem ser, inicialmente, interpretados da seguinte maneira: células 3T3 "normais" levam avante replicação de DNA já iniciada, mesmo na ausência de soro, mas para a iniciação de síntese dependem de "reguladores" fornecidos pelo soro: já células transformadas são independentes de "reguladores de iniciação" para iniciar síntese de DNA.

2. Fatores extraídos da hipófise: natureza e especificidade

Como nós descrevemos anteriormente (ARMELIN, 1973) extratos do tecido hipofisário possuem um fator ou

fatores proteicos, os quais estimulam a iniciação de síntese de DNA em fibroblastos e constituem espécies químicas diferentes dos hormônios hipofisários clássicos. Preparações impuras de LH bovino fornecidas pelos National Institutes of Health (NIH-LH-B8 e B9 são, particularmente, ricas em espécies ativas). NIH-LH-B8, aparentemente, contém diversas espécies ativas com pI de neutro (6,6) a básico (8,7), como "electrofocusing analysis" indicou (K. NISHIKAWA e H.A. ARMELIN, resultados não publicados). Resultados ainda mais claro em favor de diversas espécies ativas foram obtidos pela extração direta do tecido pituitário fresco. As extrações foram feitas segundo um processo baseado no método estabelecido para separação das gonadotropinas (ver Tabela VIII). Este processo permite a obtenção de uma fração (fração 5 da Tabela VIII) 10 a 20 vezes mais ativa que NIH-LH-B8; esta fração, quando cromatografada em carboximetilcelulose, dá atividades que se separam claramente (ver Tabela VIII), indicando a presença de diversas espécies químicas independentes. Portanto, o tecido da pituitária fornece atividades, as quais aparentemente envolvem diversos fatores independentes. Esta mistura de diversas entidades químicas mostra atividade, a qual não é específica para as espécies animais: extrações de origem bovina e ovina estimulam células de camundongo, rato, coelho e homem; elas também estimulam diversos tipos de células: fibroblastos (ARMELIN, 1973; GOSPODAROWICZ, 1974; HOLLEY e KIERNAN, 1974), condrócitos (CORVOL et al, 1972; R.L. JONES, comunicação pessoal), células gliais (GOSPODAROWICZ, 1974; NISHIKAWA, ARMELIN e SATO, 1974) ovarianas (ARMELIN e SATO, 1973) e adrenais (H. MASUI, comunicação pessoal); resultados que sugerem ausência de especificidade por tipo de célula. Não obstante

a mistura de fatores hipofisários poderia constituir uma população de fatores, os quais isoladamente seriam específicos para cada tipo de célula, entretanto, os dados nossos e os de outros investigadores, que nos foi dado saber não são suficientes para decidir esta importante questão.

GOSPODAROWICZ (1974), por um processo ainda não totalmente divulgado, purificou uma proteína a partir das frações básicas obtidas de CMC pelo método indicado na Tabela VIII; esta é uma proteína básica de peso molecular 13.000, a qual o autor descreve como um fator de crescimento para fibroblastos. Para simplificar a descrição de resultados neste Capítulo, NIH-LH-B8, NIH-LH-B9 ou qualquer outra fração hipofisária serão chamados FI (significando fração impura); o fator de GOSPODAROWICZ para fibroblastos será chamado FP (significando fração pura).

3. Iniciação de síntese de DNA em células "normais" na ausência de soro

Conforme os resultados descritos na seção 1 indicaram as células "normais" tendem a entrar em repouso quando privadas de soro. Para obter células em repouso ("estado R") em meio com baixa concentração de soro (MBCS) ou na completa ausência de soro, para fins de ensaio de "reguladores" da iniciação da síntese de DNA, o seguinte protocolo foi elaborado;

Plaqueamento $\rightarrow$ lavagens $\rightarrow$ DME ou $\rightarrow$ adição de $\rightarrow$ contagens de células;
 10% V; $\rightarrow$ com DME; $\rightarrow$ MBCS $\rightarrow$ hormônios $\rightarrow$ incorporação de ^3H -
 4000 células/cm² DME fresco fresco ou fatores timidina; ensaio de
 ou MBCS viabilidade; etc.

-78-

A mistura de fatores da hipófise (FI), insulina e hidrocortisona estimulam a iniciação da síntese de DNA em células 3T3 em repouso, mesmo na completa ausência de soro. A Figura 10 mostra a estimulação da incorporação de ^3H -timidina em DNA por diferentes combinações destes fatores. Todos os fatores foram adicionados juntos no tempo zero. Insulina e hidrocortisona não tem atividade isoladamente ou juntas, mas ambos aumentam a atividade de FI (Figura 10b e c); enquanto FI tem atividade quando adicionado sozinho. Se antes da adição de FI, as células forem incubadas com insulina e hidrocortisona (12 ou 24 horas), a resposta é a mesma que quando todos os fatores são colocados juntos como na Figura 10a. A Figura 11 reúne os resultados obtidos com o uso de FP (fator hipofisário purificado). O fato importante nestes resultados é que FP, insulina e hidrocortisona estão funcionando em concentrações fisiológicas e na completa ausência de soro. É interessante comparar estes resultados com efeito do fator epidérmico ou epitelial de crescimento (EGF); este fator é uma proteína encontrada em glândulas salivares de roedores, a qual foi purificada até homogeneidade e foi descrita como um fator que promove crescimento de células epiteliais, principalmente epidérmicas (COHEN, 1962). Entretanto, foi possível verificar que EGF estimula a síntese de DNA em fibroblastos de camundongo (ARMELIN, 1973) e humanos (HOLLENBERG e CUATRECASAS, 1973), em concentrações fisiológicas; esta atividade, no entanto, era muito baixa, sendo discutível e sua significância. Tentando verificar o significado do efeito de EGF em fibroblastos nós investigamos se insulina e hidrocortisona tinham, também, algum efeito sinérgico com este fator. Os resultados foram sistematicamente negativos sugerindo que

não há nenhum sinergismo entre EGF, insulina e hidrocortisona na estimulação da síntese de DNA em fibroblastos.

É importante lembrar que já há algum tempo tinha sido observado que a atividade estimulante do soro podia ser parcialmente substituída por insulina (TEMIN, 1967; CLARKE et al, 1970; HERSHKO et al, 1971; ASUA et al, 1973). Em todos estes casos, entretanto, insulina só era ativa em concentrações muito altas, algumas ordens de magnitude maior que os níveis fisiológicos; fato que coloca dúvidas no significado deste efeito. Dúvidas deste tipo não existem no caso do efeito sinérgico de insulina descrito aqui.

4. Medidas de G₁ e do tempo de crescimento e duplicação da célula

Dado que FI, insulina e hidrocortisona estimulam as células a iniciarem síntese de DNA a pergunta que se colocou foi: a duração de G₁ e o tempo de crescimento e duplicação da célula variam com a presença ou a concentração do soro? Medidas destes parâmetros foram efetuadas e os dados obtidos aparecem na Tabela IX. Como se pode notar a duração de G₁ é completamente independente da presença de soro. Já o tempo de duplicação é independente da concentração do soro por um grande intervalo de concentração, mas em meio inteiramente isento de soro a divisão não se completa; este ponto vai ser retomado abaixo na secção 6.

Deve-se acrescentar que foi também verificado que a duração de G₁ é também independente da concentração de "reguladores", como indicaram experiências efetuadas com concentrações de FI inferiores à concentração "saturante".

5. Frequência de células estimuladas a iniciar síntese de DNA

Desde que a duração de G1 não varia, era razoável esperar que as diferenças na magnitude de resposta verificadas nos resultados das Figuras 10 e 11, fossem devidas a variações da frequência de células estimuladas. As frequências de células estimuladas em diversas condições foram medidas por autorradiografia; os resultados obtidos aparecem na Tabela X (ver também Figura 12a). Os resultados mostram que os efeitos sinérgicos de insulina, hidrocortisona e 0,25% de soro são devidos a um número maior de células que iniciam síntese de DNA. Estes resultados são claramente opostos à sugestão de GOSPODAROWICZ (1974).

6. "Terminação" e divisão celular

Os dados da Tabela IX mostraram que a síntese de DNA é iniciada na ausência de soro, mas a população não aumenta nestas condições; restava saber se o bloqueio do crescimento ocorria num ponto definido de S, G2 ou M. Para verificar isso experiências cinéticas foram feitas seguindo-se a síntese de DNA (Figura 12a), o crescimento da população de células (Figura 12b) e a viabilidade celular (Figura 12c). 95% das células que receberam hormônios mais soro no tempo zero, iniciaram síntese de DNA (Figura 12a) e começaram a se dividir a 23 horas (Figura 12b), a 26 horas a população já tinha dobrado. 41% das células tratadas somente como hormônios no tempo zero estavam sintetizando DNA a 16 horas (Figura 12a); nestas condições o número de células aumentou muito pouco, mas um surto de divisão ocorreu menos de duas horas depois da

adição de soro; tendo o resultado sido o mesmo para soro adicionado a 24 ou a 30 horas (Figura 12b). Os incrementos em número de células foram os máximos esperados considerando a quantidade de células que iniciaram síntese de DNA (41% - Figura 12a). A viabilidade celular durante este tipo de experiência foi medida pela capacidade de desenvolver colônia (Figura 12c). Na ausência de soro a viabilidade cai progressivamente; os hormônios diminuem a velocidade da morte celular mas eles não são suficientes, para garantir a sobrevivência o aumento em viabilidade para as células, as quais receberam soro a 24 e 30 horas, indica que a descendência das células que se dividiram era viável. Estes resultados mostram que as células que iniciam crescimento (começo de G1) progridem até o fim de G2 ou começo de mitose, mas a eficiente "terminação" do processo depende de um fator do soro.

7. Desencadeamento do crescimento celular e "comprometimento bioquímico" para iniciar síntese de DNA

Os resultados apresentados nas secções anteriores, sugerem que existem reações iniciais as quais determinam o desencadeamento do crescimento celular e ou o "comprometimento bioquímico" para iniciar síntese de DNA; sugestão esta que coloca a interessante possibilidade de que os "reguladores extracelulares de iniciação" sejam necessários apenas para desencadear as reações iniciais, podendo ser eliminados em seguida. Para um teste inicial desta hipótese fizemos tratamentos curtos das células com FI, lavando-as extensivamente em seguida e acompanhamos a iniciação da síntese de DNA pela incorporação de ^3H -timidina. Verificamos que para células em repouso, em meio com 0,5% de soro, FI é eficiente num

tratamento tão curto quanto 10 minutos; além disso tratamentos mais longos como 30 e 60 minutos dão resultados iguais, conforme a Figura 13 claramente mostra. Estes resultados sugeriram que o "desencadeamento" ou "comprometimento bioquímico", como aventado acima, talvez exista e ocorre nos primeiros minutos de ação dos "reguladores". Entretanto, quando a mesma experiência foi feita com células em repouso em meio isento de soro nenhuma estimulação da síntese de DNA foi observada: FI sozinho ou em combinação com insulina e hidrocortisona foram tentados em tratamentos que variavam de 10 a 60 minutos; insulina e hidrocortisona foram testados antes, durante e ou após o tratamento com FI, mas em nenhum caso houve estimulação significativa da síntese de DNA. Não vemos nenhuma explicação simples para esse comportamento e certamente mais experiências são necessárias para entendermos esse problema.

8. Nucleotídeos cíclicos e o mecanismo de ação dos reguladores

A adição de dibutiril-cAMP (10^{-3} M) ou teofilina (10^{-3} M) ou ambos ao meio de cultura de 3T3 e SV3T3, esparsos e crescendo em 10% V, levou à inibição do crescimento da população; observação que concorda com o descrito por SHEPPARD (1971) e pelo laboratório de PASTAN (JOHNSON et al, 1971). Foi possível notar, entretanto, que no caso dos fibroblastos transformados, parte considerável do efeito inibitório deve-se à morte celular, enquanto que os fibroblastos "normais" tiveram inibição de crescimento sem apreciável perda da viabilidade. Isto mostra que, primeiro, SV3T3 se comporta de maneira semelhante as células neoplásticas de origem mamária, objeto do estudo descrito no Capítulo IV, e, segundo, SV3T3 não

"readquire" o comportamento de células "normais" quando tratado com cAMP, conforme anteriormente sugerido (SHEPPARD, 1971; JOHNSON et al, 1971).

Os níveis intracelulares de cAMP e cGMP de células 3T3 em repouso (meio 0,5% V), foram medidos nos primeiros 30 minutos depois da adição de FI e hidrocortisona ao meio de cultura; resultados são apresentados na Tabela XI. Os resultados indicam que os níveis de cAMP caem enquanto os de cGMP aumentam; hidrocortisona não tem nenhum efeito sozinha, mas tem o efeito de aumentar a atividade de FI, o que acompanha o observado para a estimulação de síntese de DNA. Os resultados encontrados para cAMP estavam dentro das expectativas, visto que os dados da literatura recente eram equivalentes. Por outro lado, o aumento de cGMP não era necessariamente esperado; quando nós estávamos obtendo nossos primeiros resultados, o laboratório de Goldberg (HADDEN et al, 1972) publicou o primeiro resultado deste tipo na literatura: estes investigadores verificaram que quando linfócitos são ativados para crescer com fitohemaglutinina, o nível de cGMP tem um aumento brusco logo nos primeiros minutos de tratamento. Nossos resultados com fibroblastos concordaram com os obtidos para linfócitos e foram os primeiros observados com "regulador" de crescimento de características fisiológicas. É interessante mencionar que os níveis de cGMP foram baixos (2 a 3 vezes o nível das células em repouso) no fim de G1 (10 horas), e no meio de S (15 horas), tendo sido estes os únicos tempos medidos além do início de G1. É desnecessário dizer que isto não prova que cGMP é o intermediário intracelular dos "reguladores" de iniciação do crescimento; estes resultados, entretanto, mostraram que o aumento de cGMP é um dos primeiros

eventos bioquímicos do início de G1, pelo menos para linfócitos e fibroblastos.

Se cGMP fosse o iniciador intracelular primário do crescimento (sendo o aumento de cGMP o evento que torna a célula "bioquimicamente comprometida" com a síntese de DNA) era de se esperar que a adição deste nucleotídeo ao meio de cultura, levaria à estimulação de síntese de DNA em células "normais", em repouso. Pudemos observar que cGMP, a 10^{-6} M no meio de cultura, aumenta de 3 a 4 vezes o nível basal de síntese de DNA em 3T3, mantida em meio 0,5% V, mas este efeito não aumenta com a concentração de cGMP (até 10^{-3} M) e na mesma experiência FI (500 ng/ml) causou uma estimulação de 19 vezes o nível basal da síntese de DNA. Neste tipo de experiência os resultados mostraram claramente que, quantitativamente, cGMP não mimetiza os "reguladores" extracelulares, resta saber qual o significado do pequeno efeito estimulatório de cGMP; infelizmente não temos resposta clara para isso. Deve-se levar em conta que dibutiril-cAMP usado nas mesmas condições (10^{-3} M no meio de cultura), também tem pequeno efeito estimulatório, e a adição de DicAMP (10^{-3} M) mais cGMP (10^{-6} M) dá o mesmo resultado de cGMP sozinho, isto é, pequenos efeitos estimulatórios são observados com ambos nucleotídeos, mas quando colocados juntos os efeitos não se somam.

Finalmente, como nota de rodapé a esta seção de resultados trazemos os dados reunidos na Tabela XII. Estes dados foram obtidos através de experiências, nas quais nos valemos do fato de que tratamentos curtos com FI (como descrito acima em 7), estimulam síntese de DNA em 3T3, em meio 0,5% V. Resposta a duas perguntas foram visadas nestas

experiências: primeiro, tratamentos curtos com cGMP, seguindo o mesmo protocolo usado para FI, tem algum efeito?; segundo, qual a consequência da adição de DicAMP, durante ou depois do tratamento com FI, para a estimulação da síntese de DNA causada por FI? Quanto à primeira questão a resposta é clara: cGMP não tem nenhum efeito na síntese de DNA e portanto não mimetiza FI em tratamentos curtos. Já a resposta à segunda questão não foi tão clara. Se tomarmos os dados normalizados estes sugerem que: i) DicAMP junto com FI por 10 minutos causa pequena inibição, a qual aumenta se o tratamento for por 180 minutos; ii) já a adição de DicAMP ao meio após o tratamento com FI, leva a completa inibição se o tratamento for por 10 minutos, mas causa o aumento do efeito estimulatório de FI se o tratamento for por 180 minutos. Evidentemente, neste estágio, qualquer interpretação destes resultados será preliminar, não obstante, os dados e o tipo de experiência são interessantes e merecem ser explorados. Se assumirmos que o efeito de DicAMP se deve exclusivamente ao aumento do nível intracelular de cAMP (premissa não necessariamente verdadeira), podemos dizer que entre as implicações novas que os dados acima sugerem, estão: i) a queda do nível de cAMP não está entre os eventos mais iniciais de G1, mas a queda é um evento necessário que ocorre nos primeiros 30 minutos; ii) parece que entre os efeitos diretos de FI está a queda do nível de cAMP, pois a adição de DicAMP após 10 minutos causa 100% de inibição mas a adição junto com FI por 180 minutos causa apenas 50% de inibição. Certamente estas implicações podem e devem ser testadas na prática.

d. Conclusões

1. Um dos objetivos práticos deste trabalho era a caracterização experimental de "regulador de crescimento", cuja existência, embora provável, era essencialmente postulada. Parece-nos justo dizer que os resultados apresentados formam um substrato experimental sólido, qualificando o fator proteico de origem hipofisária como um protótipo de proteína reguladora do crescimento de fibroblastos em cultura. Muito interessante foi a demonstração de que insulina e hidrocortisona agem sinergisticamente com este fator em concentrações fisiológicas; dentro do que nós sabemos, resultados claros indicando o efeito de insulina ou hidrocortisona no crescimento celular, em concentrações fisiológicas, nunca foram descritos.

2. Os resultados mostraram que: i) o crescimento de células "normais" é primariamente dependente de fatores que regulam a iniciação do crescimento por "controle positivo"; ii) a duração de G1 e o tempo de crescimento e duplicação, parecem ser parâmetros intrínsecos da célula e independentes dos reguladores extracelulares do crescimento; iii) o conceito de "comprometimento bioquímico" (embora não tenha sido experimentalmente demonstrado no início de G1) pode ter significado real e certamente é uma ferramenta útil na elaboração racional do ataque prático. Estes fatos sem dúvida estão de acordo com algumas das previsões do modelo do ciclo celular sugerido no Capítulo II.

3. A descoberta de que cGMP tem seu nível grandemente elevado no início do crescimento celular tem duplo interesse: i) contribui para a caracterização das reações do

início de G1, caracterização essa necessária para elucidar os mecanismos intracelulares que regulam o crescimento, e ii) é interessante para o estudo da função geral de cGMP no metabolismo, pois este nucleotídeo, embora descoberto a mais de 10 anos e ser de ocorrência geral, contrariamente a cAMP ainda não tem função metabólica conhecida (ver ROBISON, BUTCHER e SUTHERLAND, 1971).

4. Os resultados mostraram que células transformadas por vírus não tem a tendência de entrar em repouso, quando privadas de soro, parecendo terem a iniciação da síntese de DNA independente de reguladores extracelulares. Estas observações tem interesse imediato para a compreensão do comportamento das células cancerosas.

TABELA VII

Célula	Regulador adicionado ao DME	³ H-timidina incorporada entre 12 e 24 horas depois da transferência para meio sem soro, em cpm/10 ⁵ células
SV3T3	nenhum	11.000
	FI	10.000
3T3	nenhum	250
	FI	9.200

Efeito da ausência de soro no meio de cultura sobre a síntese de DNA em fibroblastos "normais" (3T3) e em fibroblastos transformados por vírus (SV3T3). As células foram plaqueadas em 10% V, 24 horas depois foram lavadas extensivamente com meio sem soro (DME) e incubadas com DME ou DME + FI (1000 ng/ml). ³H-timidina (1×10^{-5} M, 1 μ C/ml) foi adicionada ao meio 12 horas depois da passagem para DME e incorporação foi permitida pelas 12 horas seguintes.

TABELA VIII

Número da fração	Frações	Atividades especí- ficas (unidade/ μ g)
1	Sobrenadante pH 4,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,15 M	0,08
2	Sobrenadante pH 7,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,15 M	0,18
3	Precipitado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,2 M	0,11
4	Precipitado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4,9 M	0,70
-	NIH-LH-B8	1,00
5	Fração colocada na coluna de CMC	13,00
6	CMC-F ₁	20,0
7	CMC-F ₂	1,0
8	CMC-F ₃	3,5
9	CMC-F ₄	1,0
10	CMC-F ₅	6,0

Veja legenda à página seguinte.

LEGENDA DA TABELA VIII

Atividade estimulatória da iniciação de síntese de DNA em frações extraídas do tecido hipofisário. As frações foram obtidas segundo o processo de D. GOSPODAROWICZ, o qual é baseado em métodos estabelecidos para purificação de LH e FSH (PAPKOFF et al, 1965; GOSPODAROWICZ e PAPKOFF, 1966; PAPKOFF, GOSPODAROWICZ e LI, 1967). Sumariamente, o processo envolveu as seguintes etapas: homogeneização do tecido hipofisário bovino congelado em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,15 M, pH 4,5 (fração 1); resíduo removido e sobrenadante feito pH 3,0 com HPO_3 0,5 M; precipitado eliminado e sobrenadante ajustado a pH 6,5 - 7,0 com NaOH 1 N (fração 2); adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para 2,2 M, precipitado recolhido (fração 3); sobrenadante feito $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4,9 M, precipitado recolhido (fração 4) e sobrenadante eliminado; precipitados dissolvidos em água, dialisados contra água e liofilizados; liofilizado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4,9 M, dissolvido em água, feita pH 3,5 com HPO_3 0,1 M, sobrenadante eliminado, precipitado recolhido, dissolvido em água, ajustada para pH 7,0 com NaOH 0,1 M, dialisada contra água e liofilizada; liofilizado anterior dissolvido em fosfato de sódio 0,005 M pH 6,0, material insolúvel eliminado (fração 5), e cromatografado em carboximetilcelulose (CMC); eluição: F_1 , não adsorvida (fração 6); F_2 , fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0 (fração 7); F_3 , fosfato 0,1 M, pH 6,0 (fração 8); F_4 , fosfato 0,1, pH 6,0, NaCl 0,1 M (fração 9); F_5 fosfato 0,1, pH 6,0 NaCl 1 M (fração 10). Atividades medidas pela incorporação ^3H -timidina de acordo com o protocolo das Figuras 10 e 11. Atividades específicas em unidades arbitrárias por micrograma; NIH-LH-B8 tomada como referência, tendo atividade específica igual a um por definição. Se o ensaio é efetuado em meio com 0,5% de soro em vez de 0%, os resultados são essencialmente os mesmos.

TABELA IX

% de soro de vitelo no meio	Reguladores adicionados	G1 em horas	Tempo de crescimento e duplicação em ho- ras (G1 + S + G2 + M)
10	FI + hidrocortisona	11 (1)	25 (2)
1	FI + hidrocortisona	13; 9 (2)	26 (1)
0,2	FI + hidrocortisona	11 (1)	24; 25 (2)
0	Insulina FI + hidrocortisona + Insulina	11 (1)	∞ (4)

Estimativas do tempo de duração de G1 e do tempo de crescimento e duplicação das células (G1 + S + G2 + M). Na experiência com 10% de soro de vitelo, as células foram plaqueadas e incubadas por 8 dias (sem mudança de meio); depois deste tempo o crescimento era nulo e neste ponto as células foram reestimuladas com FI e hidrocortisona. Nas experiências com 1%, 0,2% de soro as células foram plaqueadas inicialmente em 10% de soro, algumas horas depois transferida a 1%, 0,2% ou 0% de soro e incubadas por 24 horas para as células entrearem em repouso, neste ponto os hormônios foram adicionados. Processo para estimar G1: a cinética de incorporação de ³H-timidina em DNA foi seguida depois da adição dos hormônios (tempo zero); as medidas de incorporação em cpm foram colocadas em gráfico em função do tempo; os pontos entre os tempos 12 e 18 horas foram usados, tirando-se a reta média entre eles, a qual foi extrapolada ao eixo dos X, o ponto de intersecção deu a estimativa de G1. Processo para estimar o tempo de duplicação: o tamanho da população em número de células por placa, foi seguido em função do tempo após a adição dos hormônios; nas placas que não receberam hormônio o tamanho da população não variou; nas placas com hormônio a população permanece constante até 23 a 25 horas e então aumenta bruscamente; o tempo correspondente ao aumento de 50% foi tomado como a estimativa do tempo de duplicação. Concentração dos hormônios: FI 1000 ng/ml; hidrocortisona 100 ng/ml e insulina 50 ng/ml. Os números entre parênteses indicam número de experiências feitas.

TABELA X

Adições ao DME (no tempo zero)	% de núcleos marcados
Nenhuma	zero
Hidrocortisona (H)	zero
Insulina (I)	3
Fator hipofisário impuro (FI)	9
I + H	0,4
FI + H	31
FI + I	26
FI + I + H	49
FI + I + H + 0,25% soro de vitelo	98
0,25% soro de vitelo	8
10% soro de vitelo	98

Frequências das células estimuladas a iniciar síntese de DNA medida por autorradiografia. ³H-timidina foi incorporada entre 12 e 24 horas depois da adição dos fatores às células em repouso no meio em soro (DME); após incorporação as placas foram processadas para autorradiografia. Os núcleos foram contados num microscópio de fase; duas placas por ponto; 200 a 300 núcleos contados por placa; FI: 1000 ng/ml; hidrocortisona: 100 ng/ml; insulina: 50 ng/ml.

TABELA XI

Regulador adicionado ao meio 0,5% V	Níveis intracelulares em pmoles/mg proteína	
	cAMP	cGMP
Nenhum	28,8 $\pm$ 0,5	0,98 $\pm$ 0,01
Hidrocortisona	29,0 $\pm$ 1,1	1,02 $\pm$ 0,10
FI	25,0 $\pm$ 0,5	2,72 $\pm$ 0,01
FI + hidrocortisona	19,0 $\pm$ 1,6	11,2 - 32,8

Medidas dos níveis intracelulares de cAMP e cGMP em células em repouso ("estado R"), estimuladas pelo fator hipofisário (FI) e hidrocortisona. Células esparsas em repouso, em meio 0,5% V foram estimuladas com FI (1000 ng/ml) e ou hidrocortisona (100 ng/ml), os quais foram adicionados à cultura no tempo zero; 30 minutos depois as células foram fixadas e extraídas com TCA 10%, a 2°C. Os dados da Tabela são médias de duas medidas experimentais totalmente independentes. A eficiência da extração foi estimada pela recuperação de ^3H -cAMP adicionado ao TCA no momento de fixação das células; a medida de eficiência foi feita num grupo de placas paralelas, dando 68 $\pm$ 2%, esta estimativa foi assumida como válida para todas as extrações da mesma experiência e usada para a correção de todos os valores finais. Na experiência, cujos dados aparecem na Tabela, os nucleotídeos não foram separados antes do imunoensaio. No imunoensaio as "atividades" de cAMP e de cGMP aumentavam linearmente com o volume do extrato. Na experiência da Tabela as "atividades" de cAMP e cGMP foram 90 a 95% eliminadas com a fosfodiesterase de coração bovino, mas apenas dois extratos foram testados e o resultado considerado válido para os demais.

TABELA XII

Adição inicial (tempo zero)	Protocolo Tempo de lavagem	Adição após lavagem	Nível de ³ H-timidina incorporada em DNA	
			Valores absolutos em cpm	Valores relativos: experimental-controle normalizados
Controle (nada)	10 minutos	nada	780	0
	180 minutos	nada	4500	0
FI	10 minutos	nada	2080	100
	180 minutos	nada	13650	100
FI +	10 minutos	nada	1780	77
	180 minutos	nada	8950	49
DicAMP	10 minutos	DicAMP	780	0
	180 minutos	DicAMP	16400	130
cGMP	180 minutos	nada	4200	0

Efeitos de tratamentos curtos com FI, DicAMP e cGMP na síntese de DNA de células em repouso em meio 0,5% V. A ³H-timidina foi incorporada entre 10 e 18 horas depois da adição inicial. FI: 1000 ng/ml; DicAMP: 10^{-3} M, cGMP 10^{-4} M.

FIGURA 10 - Ensaio de atividade estimuladora da iniciação de síntese de DNA para FI, hidrocortisona e insulina em meio isento de soro. Experiência efetuada segundo o protocolo descrito no texto (Resultados 3). ^3H -timidina: 10^{-8} M; 1 $\mu\text{C}/\text{ml}$; incorporação por 12 horas (do tempo 12 as 24 horas). 10a: meio com hidrocortisona 100 ng/ml, insulina 50 ng/ml e quantidades crescentes de FI; 10b: meio com FI 1000 ng/ml e quantidades crescentes de hidrocortisona; 10c: meio com FI 1000 ng/ml, hidrocortisona 100 ng/ml e quantidades crescentes de insulina.

figura 10

FIGURA 11 - Comparação das atividades de FI e PF em meio i-
sento de soro. Protocolo: conforme Figura 10. ^3H -timidina:
 10^{-8} M, 0,5 $\mu\text{C}/\text{ml}$. $\triangle\text{---}\triangle$ PF (fator hipofisário puro, ge-
nerosamente fornecido por D. Gospodarowicz); $\circ\text{---}\circ$ mais hi-
drocortisona 100 ng/ml e insulina 50 ng/ml; $\blacktriangle\text{---}\blacktriangle$ CF;
 $\bullet\text{---}\bullet$ CF mais hidrocortisona 100 ng/ml e insulina 50 ng/ml.

figura 11

FIGURA 12 - Iniciação de síntese de DNA, "terminação" da divisão celular e sobrevivência em meio isento de soro. As células foram plaqueadas e transferidas para meio sem soro de acordo com o protocolo descrito em Resultados 3. 12a: pulsos de 20 minutos de ^3H -timidina; (95%), (41%) e (0%) indicados na figura representam % de núcleos marcados, medidos por autorradiografias para o pulso de ^3H -timidina efetuado no tempo 16 horas. 12b: Contagens de células em "Coulter Counter". 5c: Sobrevivência celular medida pela capacidade de desenvolvimento de colônia (eficiência de plaqueamento); nos tempos indicados as células foram tripsinizadas e alíquotas de cada placa foram retiradas em condições estéreis; as suspensões de células foram imediatamente contadas em "Coulter Counter"; após as contagens foram efetuadas diluições apropriadas das alíquotas (recolhidas antes das contagens) e as células foram plaqueadas em meio rico (CFB), em densidades de 250 a 400 células/placa; depois de 8 dias de crescimento as colônias foram contadas. O número de colônias desenvolvido por placa foi determinado e a razão de colônias por placa sobre o número de células plaqueadas por placa foram lançadas no gráfico em função do tempo. O—O Controle, sem adições; O—O FI e hormônios adicionados no tempo zero; Δ -- Δ 0,2% de soro, FI e hormônios adicionados no tempo zero; $\blacktriangle$ -- $\blacktriangle$ FI e hormônios no tempo zero e 0,2% de soro a 24 horas; $\square$ -- $\square$ FI e hormônios no tempo zero e 0,2% de soro a 30 horas. As setas, nos gráficos, indicam o tempo de adição de 0,2% de soro de vitelo.

figura 12

FIGURA 13 - Estimulação da síntese de DNA em células em repouso em 0,5% V, através de tratamentos curtos com FI. As células foram plaqueadas para repouso em 0,5% V segundo o protocolo indicado em Resultados 3. FI foi adicionado a 1000 ng/ml, no tempo zero; em algumas placas FI foi mantido por todo o tempo da experiência (●—●); em outras placas FI foi retirado através de sucção do meio, lavagem das células por sucção com 0,5% V por quatro vezes, e finalmente adicionando-se meio fresco 0,5% V. Tempos de tratamento com FI: ○---○ 10 minutos, △--△ 30 minutos e ◇---◇ 60 minutos. Controles: ○—○ sem FI e sem lavagens; □—□ sem FI, mas com lavagens a 60 minutos. A síntese de DNA foi seguida pela incorporação de ^3H -timidina (10^{-6} M, 1 $\mu\text{C}/\text{ml}$), a qual foi adicionada quatro horas depois da adição de FI e foi mantida durante toda experiência.

VI. RESUMO

A finalidade básica deste trabalho foi o estudo do controle de crescimento e divisão celular em organismos superiores, utilizando células de mamífero em cultura como modelo experimental. Como os fundamentos conceituais para este tipo de trabalho não tinham, ainda, sido estabelecidos, foi feito um esforço para criar bases doutrinárias sólidas que, adequadamente, fundamentassem este tipo de investigação.

Do ponto de vista teórico, alguns conceitos preliminares foram sugeridos; os pontos principais sendo: i) o estabelecimento de linhagens de células em cultura envolve a seleção clonal de células capazes de crescer nas condições de cultura; o crescimento depende dos "mecanismos regulatórios do crescimento", os quais controlam o crescimento da célula quando acionados pelos "reguladores extracelulares do crescimento"; os "mecanismos regulatórios" e os "reguladores" são de existência postulada; a seleção de células que exibem os "mecanismos regulatórios" e que respondem aos "reguladores" deve ser atacada empiricamente, mas alguns princípios racionais podem ser adiantados "a priori". ii) um modelo probabilístico de "ciclo celular" foi sugerido; os "reguladores de crescimento" foram definidos no contexto deste modelo; os "mecanismos regulatórios de crescimento" são hipoteticamente colocados entre as reações iniciais de G₁; uma condu-
ta para iniciar o teste experimental das hipóteses propostas foi estabelecida.

Do ponto de vista experimental, dois problemas foram estudados: i) estabelecimento de linhagens clonadas

de células mamárias, a partir de um carcinoma transplantável de ratos AxC, o qual era dependente de estrôgeno para crescer em animais; as limitações práticas do processo de estabelecimento de linhagens foram estudadas e exemplificadas experimentalmente; linhagens clonadas de células foram estabelecidas, as quais necessitam glucocorticoides, em concentrações fisiológicas, para crescer em cultura; os efeitos de cAMP e cGMP sobre o crescimento das células clonadas foram estudados. ii) fibroblastos de camundongo de linhagem 3T3 foram tomados como modelo experimental para estudar o controle do crescimento; proteínas de origem hipofisária, descobertas anteriormente (ARMELIN, 1973), foram experimentalmente caracterizadas como "reguladores" do crescimento de fibroblastos em cultura; foi verificado que a atividade destas proteínas é potenciada por hidrocortisona e insulina, em concentrações fisiológicas; as previsões do modelo de "ciclo celular" proposto concordam com os resultados obtidos, indicando aderência do modelo à prática; foi descoberto que o nível intracelular de cGMP eleva-se abruptamente no início de G1; experiências com diversos protocolos foram tentadas visando esclarecer o papel de cAMP e cGMP no início de G1.

O relato apresentado, aparentemente, justifica dizer que uma etapa crítica do trabalho proposto foi vencida; os conceitos preliminares sugeridos e os resultados apresentados tem implicações básicas para a fundamentação bioquímica da fisiologia celular de mamíferos.

VII. REFERÊNCIAS

- AARONSON, S.A. e TODARO, G. (1968) - Science, 162: 1024.
- ABERCROMBIE, M. e HEAYSMAN, J. (1954) - Exp. Cell Res., 6: 293.
- ARMELIN, H.A. (1973) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 70: 2702.
- ARMELIN, H.A. (1974) - In: Biochemical Actions of Hormones, Vol. III: Ed. G. Litwak (em impressão).
- ARMELIN, H.A. e ARMELIN, M.C.S. (1974) - Nature (submetido).
- ARMELIN, H.A. e SATO, G. (1973) - In: World Symposium on "Model Studies in Chemical Carcinogenesis"; Ed. E. Farber chapter 24, pág. 483; Marcel Dekker Inc., Nova York.
- ARMELIN, H.A.; NISHIKAWA, K. e SATO, G. (1974) - In: Control of Proliferation in Animal Cells; Ed. B. Clarkson and R. Baserga, Vol. I, pág. 97, Cold Spring Harbor Press, Nova York.
- ASUA, L.J.; SURIAN, E.; FLAWIA, M. e TORRES, H.N. (1973) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 70: 1388
- AUGUSTI-TOCCO, G. e SATO, G. (1969) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 64: 311.
- BABAD, H. e HASSID, W.Z. (1966) - J. Biol. Chem., 241: 2672.
- BASERGA, R. (1968) - Cell Tissue Kinet., 1: 167.
- BASERGA, R.; COSTLOW, M. e ROVERA, G. (1973) - Fed. Proc., 32: 2115.
- BENDA, P.V.; LIGHTBODY, J.; SATO, G.; LEVINE, L. e SWEET, V. (1968) - Science, 161: 370.
- BISKIND, M.S. e BISKIND, G.R. (1944) - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 55: 176.
- BROWN, J. (1968) - Exp. Cell Res., 52: 565.

- BUONASSISI, V.; SATO, G. e COHEN, A. (1962) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 48: 1184.
- BURGER, M. (1971) - In: "Ciba Fdn. Symp. Growth Control in Cell Cultures"; Eds. G. Wolstenholme and J. Knight, Churchill Livingstone, London.
- BURGER, M.; BOMBIK, B.; BRECKENRIDGE, B. e SHEPPARD, J. (1973) - Nature New Biol., 239: 161.
- BURGUS, R.; DUNN, T.; DESIDERIO, D.; VALE, W. e GULLEMIN, R. (1969) - C.R. Acad. Sci. Ser. D, 269: 1870.
- BUTCHER, R.W. e SUTHERLAND, E.W. (1962) - J. Biol. Chem., 237: 1244.
- CECCARINI, C. e EAGLE, H. (1971a) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 68: 229.
- CECCARINI, C. e EAGLE, H. (1971b) - Nature New Biology, 233: 271.
- CLARKE, G.; STOKER, M.G.P.; LUDLOW, A. e THORNTON, M. (1970) - Nature, 227: 798.
- CHEN, R.F. (1967) - J. Biol. Chem., 242: 173.
- COHEN, S. (1962) - J. Biol. Chem., 237: 1555.
- CORVOL, M.; MALEMUD, C.J. e SOKOLOFF, L. (1972) - Endocrinology, 90: 262.
- CUNNINGHAM, D. e PARDEE, A. (1969) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 64: 1049.
- CUNNINGHAM, D. e REMO, R. (1973) - J. Biol. Chem., 248: 6282.
- CUNNINGHAM, D.; THRASH, C. e GLYNN, R.D. (1974) - In: "Control of Proliferation in Animal Cells"; Eds. B. Clarkson and R. Baserga, Vol. I, Cold Spring Harbor Press, Nova York.
- DULBECCO, R. (1970) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 67: 1214.
- DULBECCO, R. (1971) - In: "Ciba Fdn. Symp. Growth Control in Cell Cultures"; Eds. G. Wolstenholme and J. Knight, Churchill Livingstone, London.

- DULAK, N.C. e TEMIN, H.M. (1973) - J. Cell Physiol., 81: 153.
- ESTENSEN, R.D.; HADDEN, J.; HADDOX, M.K. e GOLDBERG, N.D. (1974) - In: "Control of Proliferation in Animal Cells"; Eds. B. Clarkson and R. Baserga, Vol. I, Cold Spring Harbor Press, Nova York.
- FLECK, A. e MUNRO, H. (1962) - Biochim. Biophys. Acta, 55: 571.
- FURTH, J. (1968) - In: "Thule International Symposia"; Eds. A. Engel e T. Larsson; Nordiska Bokhandelns Förlag, Estocolmo, vol. 2, pág. 131.
- FURTH, J. (1970) - In: "Proc. 10th Int. Cancer Congress"; Eds. R. Clark, R. Cumley, J. McCay e M. Copeland, Vol. I, pág. 272.
- GOSPODAROWICZ, D. (1974) - Nature, 249: 123.
- GOSPODAROWICZ, D. e PAPKOFF, H. (1966) - Endocrinology, 80: 699.
- GREEN, H. (1974) - In: "Control of Proliferation in Animal Cells"; Eds. B. Clarkson and R. Baserga, Vol. I, Cold Spring Harbor Press, Nova York.
- HADDEN, J.W.; HADDEN, E.M.; HADDOX, M. e GOLDBERG, N.D. (1972) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 69: 3024.
- HALL, K. e VAN WYK, J. (1973) - In: "Current Topics in Experimental Endocrinology" Ed. Martini and James, Academic Press, Nova York.
- HARTWELL, L.H. (1971) - J. Mol. Biol., 59: 183.
- HAYFLICK, L. (1965) - Exp. Cell Res., 37: 614.
- HAYFLICK, L. e MOORHEAD, P.S. (1961) - Exp. Cell Res., 25: 585.
- HERSHKO, A.; MAMONT, P.; SHIELDS, R. e TOMKINS, G.M. (1971) - Nature New Biol., 232: 206.
- HOLLENBERG, M. e CUATRECASAS, P. (1973) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 70: 2964.

- HOLLEY, R.W. (1972) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 69: 2840.
- HOLLEY, R.W. e KIERNAN, J. (1968) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.,
60: 300.
- HOLLEY, R.W. e KIERNAN, J. (1971) - In: "Ciba Fdn. Symp.
Growth Control in Cell Cultures"; Eds. G. Wolstenholme and
J. Knight, Churchill Livingstone, London.
- HOLLEY, R.W. e KIERNAN, J. (1974) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.,
(in press).
- HOWARD, A. e PELC, S.R. (1952) - Heredity. Suppl. 6: 261.
- HSIE, A. e PUCK, T.T. (1971) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 68:
358.
- IGLESIAS, R. (1970) - In: "Proc. 10th Int. Cancer Congress";
Eds. R. Clark, R. Cumley, J. McCay and M. Copeland, Vol. I,
pág. 300.
- JAINCHILL, J.L. e TODARO, G. (1970) - Exp. Cell Res., 59: 137.
- JOHNSON, G.; FRIEDMAN, R. e PASTAN, I. (1971) - Proc. Nat.
Acad. Sc. U.S., 68: 425.
- KLEVECZ, R.R. (1969) - J. Cell Biol., 43: 207.
- KLEVECZ, R. e RUDDLE, F. (1968) - Science, 159: 634.
- KLEVECZ, R.; KAPP, L. e REMINGTON, J.A. (1974) - In: "Control
in Proliferation of Animal Cells"; Eds. B. Clarkson and R.
Baserga, Vol. I, Cold Spring Harbor Press, Nova York.
- LAJTHA, L.G. (1963) - J. Cell Physiol., 62: 143.
- LIPTON, A.; KLINGER, I.; PAUL, D. e HOLLEY, R.W. (1971) - Proc.
Nat. Acad. Sc. U.S., 68: 2799.
- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, J.; FARR, A.; RANDALL, R. (1951) - J.
Biol. Chem., 193: 265.
- LYONS, W.R.; LI, C.H. e JOHNSON, R.E. (1958) - Rec. Progr.
Hormone Res., 14: 219.
- MAZIA, D. (1974) - Sci. Amer., 230: 54.
- MILGRAM, E. e BAULIEU, E. (1969) - Biochim Biophys. Acta, 194: 602.

- MITCHISON, J.M. (1971) - The Biology of the Cell Cycle, Cambridge University Press, Cambridge.
- MURAD, F.; MANGANIELLO, V. e VAUGHN, M. (1971) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 68: 736.
- NACHTWEY, D. e CAMERON, I. (1968) - In: "Methods in Cell Physiology"; Ed. D.M. Prescott, Vol. 3, pág. 213, Academic Press, Nova York.
- NARDONE, R.M.; TODD, J.; GONZALEZ, P. e GAFFNEY, E. (1965) - Science, 149: 1100.
- NICOLSON, G.L. (1971) - Nature New Biol., 233: 244.
- NICOLSON, G.L. (1973) - Nature New Biol., 243: 218.
- NISHIKAWA, K.; ARMELIN, H.A. e SATO, G. (1974) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., (in press).
- OTTEN, J.; JOHNSON, G. e PASTAN, I. (1971) - Biochem. Biophys. Res. Comm., 44: 1192.
- OTTEN, J.; BADER, J.; JOHNSON, G. e PASTAN, I. (1972) - J. Biol. Chem., 247: 1632.
- PAPKOFF, H.; GOSPODAROWICZ, D.; CANDIOTTI, A. e LI, C.H. (1965) - Arch. Biochem. Biophys., 111: 431.
- PAPKOFF, H.; GOSPODAROWICZ, D. e LI, C.H. (1967) - Arch. Biochem. Biophys., 120: 434.
- PAUL, D.; LIPTON, A. e KLINGER, I. (1971) - Proc. Nat. Acad. Sc., U.S., 68: 2799.
- POLLACK, R.E.; GREEN, H. e TODARO, G. (1968) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 60: 126.
- PUCK, T.T. e KAO, F. (1967) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 58: 1227.
- ROBISON, G.A.; BUTCHER, R. e SUTHERLAND, E.W. (1971) - Cyclic AMP, Academic Press, Nova York.

- SALMON, W.D. e DAUGHADAY, W. (1957) - J. Lab. and Clin. Med.,
49: 825.
- SAMBROOK, J. (1972) - Adv. Cancer Res., 16: 141.
- SAMBROOK, J.; SHARP, P. e KELLER, W. (1972) - J. Mol. Biol.,
70: 57.
- SANFORD, K.K. (1968) - Nat. Cancer Inst. Monograph, 26: 387.
- SATO, G.; ZAROFF, L. e MILLS, S.E. (1960) - Proc. Nat. Acad.
Sc. U.S., 46: 963.
- SEFTON, B.M. e RUBIN, H. (1971) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.,
68: 3154.
- SHEPPARD, J. (1971) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 68: 1316.
- SHIN, S.; YASUMURA, Y. e SATO, G. (1968) - Endocrinology, 82:
614.
- SILAGI, S. (1971) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 68: 1402.
- SMITH, J.A. e MARTIN, L. (1973) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.,
70: 1263.
- STEEL, G.G. (1972) - Cell Tissue Kinet., 5: 87.
- STEINER, A.; PARKER, C. e KIPNIS, D. (1972) - J. Biol. Chem., 247: 1106.
- STUDZINSKI, G.; GIERTHY, J.F. e CHOLON, J. (1973) - In Vitro,
8: 466.
- TASHJIAN, A.; YASUMURA, Y.; LEVINE, L.; SATO, G. e PARKER, M.
(1968) - Endocrinology, 82: 342.
- TEMIN, H.M. (1967) - J. Cell Physiol., 69: 377.
- TEMIN, H.M. (1971) - J. Cell Physiol., 78: 161.
- TOBEY, R.; GURLEY, L.; HILDEBRAND, C.; RATLIFF, R. e WALTERS,
R. (1974) - In: "Control of Proliferation in Animal Cells";
Ed. B. Clarkson and R. Baserga, Vol. I, Cold Spring Harbor
Press, Nova York.
- TODARO, G. e GREEN, H. (1963) - J. Cell Biol., 17: 199.
- TODARO, G. e GREEN, H. (1964) - Virology, 23: 117.

- TODARO, G.; GREEN, H. e GOLDBERG, B. (1964) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 51: 66.
- TODARO, G.; LAZAR, G. e GREEN, H. (1965) - J. Cell Comp. Physiol., 66: 325.
- UTHNE, K. (1973) - Acta Endocrinologica Suppl. 175: 1.
- WALTERS, R.; TOBEY, R. e RATLIFF, R. (1973) - Biochim. Biophys. Acta, 319: 336.
- WEBER, M.J. (1973) - J. Biol. Chem., 248: 2978.
- WESTPHAL, U. (1967) - Arch. Biochem. Biophys., 118: 556.
- WILLIAMS-ASHMAN, H.G.; PEGG, A.E. e LOCKWOOD, D.H. (1969) - Adv. Enz. Regul., 7: 291.
- WILLINGHAM, M.C.; JOHNSON, G.S. e PASTAN, I. (1972) - Biochem. Biophys. Res. Comm., 48: 743.
- YAFFE, D. (1968) - Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 61: 477.
- YASUMURA, Y.; BUONASSISI, V. e SATO, G. (1966a) - Cancer Res., 26: 529.
- YASUMURA, Y.; TASHJIAN, A. e SATO, G. (1966b) - Science, 154: 1186.

VIII. ABREVIATURAS

Fases do ciclo celular

G1: "gap" ou intervalo existente entre o fim da mitose e o início da síntese de DNA

S: intervalo da síntese de DNA

G2: "gap" ou intervalo existente entre o fim da síntese de DNA e o começo da mitose

M: mitose

Hormônios e outros fatores

ACTH: hormônio estimulador da cortex adrenal

FI: mistura de proteínas hipofisárias diferentes dos hormônios proteicos conhecidos, que estimulam crescimento de diversos tipos de células em cultura

FP: proteína pura que estimula o crescimento de fibroblastos em cultura

FSH: hormônio estimulador do folículo

GH: hormônio de crescimento

LH: hormônio luteinizante

NIH-LH-B8: preparação impura de LH bovino, fornecida pelos National Institutes of Health, EUA; partida nº 8

TSH: hormônio estimulador da tireóide

Linhagens de animais

Balb/c: camundongos "geneticamente puros"

AxC: ratos "geneticamente puros"

Linhagens de células e vírus

3T3 - fibroblastos de camundongo suíço "normais" (TODARO e GREEN, 1963)

6T6: fibroblastos de camundongo suíço "expontaneamente trans-
formados" (TODARO e GREEN, 1963)

SV3T3: fibroblastos 3T3 transformados pelo vírus SV40

Balb/c 3T3: fibroblastos de camundongo Balb/c, "normais"
(AARONSON e TODARO, 1968)

SV40: "simian virus 40", vírus oncogênico que crescem permis-
sivamente em células de macaco

Meios de cultura

DME: meio quimicamente definido, cuja composição é a do meio
mínimo de EAGLE e segundo modificação de DULBECCO

CFB: meio composto por 85% de DME, 12,5% de soro de cavalo e
2,5% de soro de feto bovino; medidos em volume

10%V: meio composto por 90% de DME e 10% de soro de vitelo

10%VC: meio composto por 90% de DME e 10% de soro de vitelo
extraído com carvão ativo

MBCS: meio com baixa concentração de soro (menos que 1%)

Nucleosídeos e nucleotídeos

UDP: uridina-5'-difosfato

FUDR: 5-fluor-2'-desoxiuridina

BUDR: 5-bromo-2'-desoxiuridina

cCMP: adenosina cíclica-3',5'-monofosfato

cGMP: guanosina cíclica-3',5'-monofosfato

DicAMP: N⁶O^{2'}-dibutiril adenosina cíclica-3',5'-monofosfato

Diversos

DMSO: dimetil sulfóxido

TCA: ácido tricloro acético

EP: eficiência de plaqueamento

CMC: carboximetil celulose