

# PRODUÇÃO DE "INTERFERON" E SUA AÇÃO NAS CULTURAS DE TECIDOS

MARTHA IRENA MALACHOWSKA \*

ADELA ROTH \*\*

LUÍS FLORÊNCIO DE SALLES GOMES \*\*\*

## *Introdução*

O fenômeno da interferência, já observado há anos, despertou, novamente, a atenção dos pesquisadores, com o trabalho de ISAACS & LINDENMANN (1957) sobre o "interferon". Segundo os autores, o "interferon" é uma substância protéica elaborada pelas células, quando previamente submetidas à ação do vírus da gripe, inativado pelo calor ou raios ultravioleta. Protegendo as células contra o ataque dos vírus, o "interferon", proteína de peso molecular semelhante ao da hemoglobina, impede o desenvolvimento do vírus que lhe deu origem ou de vírus heterólogos, possuindo, portanto, um largo espectro de ação.

Não se estabeleceu ainda o modo de ação do "interferon", mas presume-se que altere o metabolismo celular, não agindo diretamente sobre o vírus (BURKE & ISAACS, 1958). Uma das suas características originais é a de ser uma proteína do tipo universal, isto é, quando produzida em determinada espécie animal e, posteriormente, inoculada em outra, não produz o aparecimento de anticorpos.

---

\* Bolsista do Fundo de Pesquisas do Instituto Adolfo Lutz.

\*\* Biologista do I.A.L.

\*\*\* Médico-chefe do Laboratório de Vírus Dermotrópicos do Instituto Adolfo Lutz.

Trabalho realizado na Seção de Virulogia (Chefe de Seção: Dr. Luiz Augusto Ribeiro do Valle), da Diretoria de Microbiologia e Diagnóstico (Diretor: Dr. Luis de Salles Gomes) do I.A.L., em parte auxiliado pelo Fundo de Pesquisas do I.A.L.

Recebido para publicação em 20 de setembro de 1961.

Há divergência quanto à especificidade tecidual do "interferon" (HENLE *et alii*, 1959; TYRREL, 1959). Parece que, produzido em determinada espécie animal, protegeria mais efetivamente esta espécie. O trabalho de Isaacs abriu novo campo a pesquisas; fizeram-se experiências com vírus inativado (HENLE *et alii*, 1959), ou não (TYRRELL, 1959; SUTTON & TYRRELL, 1961), e com os de reduzida infectividade (HERRMANN, *et alii*, 1955), para o estudo e produção do "interferon".

Em revisão feita na literatura, não encontramos dados sobre a concentração do "interferon" usada nas experiências. Neste trabalho, apresentamos modificações à técnica de produção do "interferon", como obtê-lo em forma sólida, bem como estudos da sua ação sobre determinados vírus.

### MATERIAIS E MÉTODOS

As estirpes de vírus por nós selecionadas para a produção do "interferon" foram: A1/Denver/1/57 e A2/Japan/305/57 da gripe, e o vírus vacínico usado pelo Instituto Butantã para a vacinação antivariólica, que em nosso laboratório recebeu a denominação de "Bt".

Os vírus da gripe em fluido alantóico de ovos embrionados foram purificados por adsorção em hemácias de galinha e por diluição em solução fisiológica tamponada (pH = 7,2), a 37°C. Posteriormente, titularam-se estes vírus através de hemaglutinação pela técnica de Salk.

Obteve-se o vírus vacínico de macerado de membranas cório-alantóides, altamente infetadas com este vírus. O macerado foi suspenso em solução fisiológica tamponada, centrifugado a 2.500 r.p.m., 20', e o sobrenadante, posteriormente, ultracentrifugado a 10.000 r.p.m., 60'. O sedimento foi novamente suspenso em solução fisiológica tamponada (pH = 7,2) e titulado em membranas cório-alantóides pelo método de contagem de lesões ou placas.

Inativaram-se os vírus, em banho-maria a 56°C, durante 1 hora. Para cada 6,0 ml de suspensão de vírus, adicionaram-se 2,0 ml de citrato de sódio a 2% e 1,0 ml de tampão de borato pH = 8,5.

As culturas de tecido usadas foram as de rim de coelho, e as de embrião de galinha com 9 a 10 dias de incubação, feitas pelo método de tripsinização (YOUNGNER, 1954).

Os meios de cultivo usados foram o de Hanks com sôro de vitelo a 20%, e, para a manutenção das células, o mesmo meio com sôro de vitelo a 10%, adicionado de hidrolisado de lactalbumina a 2,5% e Yestolate a 0,3%.

Para a produção do "interferon" nas membranas cório-alantóides, usamos o meio de Earle e para as experiências com o "interferon", em culturas de tecido, usamos o meio 199 simplificado (ENDO & HAYASHIDA, 1960).

## PARTE EXPERIMENTAL

### *Produção do "interferon"*

Inicialmente seguimos o método descrito por Isaacs, preparando o "interferon" com amostras dos vírus da gripe, em culturas de rim de coelho (ISAACS & WESTWOOD, 1959) em meio 199 simplificado. Concentramos 10 vezes o "interferon" assim obtido, dialisando o meio com "carbowax 1.500". Este "interferon" concentrado demonstrou, em experiências preliminares, a propriedade de proteger as culturas de rim de coelho inoculadas com os vírus homólogos e também com o vírus vacínico.

Por estas experiências, foi-nos possível avaliar somente a concentração do "interferon" através do grau de proteção evidenciado pelo volume líquido usado. Acresce que o líquido dialisado e deixado a 4°C, mesmo após repetidas centrifugações, apresentava sempre depósito. E por idênticas falhas se repetirem também na preparação do "interferon" a partir de membranas cório-alantóides de ovos embrionados de galinha, resolvemos modificar o método de sua obtenção.

Assim é que, para êsse fim, tomamos membranas cório-alantóides de ovos embrionados de galinha, com 9-10 dias de incubação, as quais, depois de excisadas, foram colocadas em garrafas de Roux, com meio de Earle. Nesse meio foram inoculados, separadamente, os vírus inativados da gripe (aproximadamente 2.560 DH por membrana) e o vírus vacínico (0,5 ml de uma suspensão a 20% em salina tamponada, pH = 7,2, também por membrana). Depois de passarem meio, vírus inativado e membranas por suave agitação durante 3 horas, a 37°C, foram as últimas lavadas 3 vezes em solução de Earle e a seguir postas em outra porção de meio de cultura, agora porém na proporção de 5 ml por membrana cório-alantóide. Nova agitação durante 24 horas, a 37°C, seguida de filtração do meio em 2 camadas de gaze estéril e de precipitação com sulfato de amônio, na proporção de 55,0 g por 100 ml do meio. Este precipi-

tado permaneceu em geladeira a 4°C até o dia seguinte, sendo depois centrifugado em centrífuga "Servall" refrigerada, a 6.000 r.p.m., durante 1 hora e, após perfeita dissolução em solução fisiológica tamponada, dialisado em sacos semipermeáveis, com água de torneira, durante 24 horas. O concentrado foi então novamente dialisado com água destilada, até o desaparecimento dos ânions  $SO_4$ . O líquido dialisado foi tratado (em câmara fria) com 10 volumes de acetona, sendo conservado em geladeira até o dia seguinte, a 4°C. Após nova centrifugação, o depósito foi levado à estufa a 37°C, para secagem. Desta maneira, obtivemos um pó de côr acastanhada, em quantidade aproximada de 20-30 mg por 10 membranas cório-alantóides usadas. Esse pó — substância protéica sêca, ou "interferon" — é solúvel em cêrca de 75% do seu pêso e o soluto com êle obtido, conservado em geladeira a 4°C, foi que serviu de base às nossas experiências. Desta maneira, foi possível a produção de "interferon" das amostras dos vírus da gripe (A1/Denver/1/57 e A2/Japan/305/57) e do vírus vacínico (amostra "Bt"). De posse dessas diversas amostras de "interferon", tratamos de pesquisar-lhes o comportamento em face da ação citopática, homóloga e heteróloga dos vírus utilizados na sua produção. Nestas experiências usamos culturas de embrião de galinha em meio 199 simplificado, ao qual, 24 horas antes da inoculação do vírus, era sempre adicionado o "interferon".

A tabela na página seguinte ilustra o estudo feito e apresenta os resultados obtidos quatro dias após a inoculação dos vírus.

Os resultados constantes da tabela demonstram que houve produção de "interferon" pelas células (membrana cório-alantóide), quando tratadas pelos vírus de gripe (A1/Denver/1/57 e A2/Japan/305/57), e vírus vacínico (amostra "Bt"). A propriedade do "interferon" de proteger as células, isto é, de diminuir ou inibir o efeito citopático dos vírus, foi evidente. Estas provas foram testemunhadas, de um lado, por uma substância também protéica, obtida pelo mesmo método, de membranas cório-alantóides normais, porém não submetidas previamente à ação dos vírus inativados, substância esta que foi incapaz de proteger as células inoculadas com vírus; e de outro lado, pela verificação de eventual ação tóxica do próprio "interferon" sobre as células. As experiências, apresentadas na tabela, foram acompanhadas até o 7.º dia após a inoculação dos vírus, não se verificando qualquer alteração nos resultados. É óbvio que tôdas as fases do experimento foram também controladas com relação à esterilidade bacteriana.

TABELA

Nº TUB.	VIRUS ml			INTERFERONS ml @				CITOP.
	DENVER *	JAPAN +	BT X	DENVER	JAPAN	BT	CONTROL. MEMB.	
6	0,1	—	—	—	—	—	—	+++
6	—	0,1	—	—	—	—	—	++++
6	—	—	0,1	—	—	—	—	+++
6	0,1	—	—	0,1	—	—	—	+
6	0,1	—	—	—	0,1	—	—	0
6	0,1	—	—	—	—	0,1	—	+
6	0,1	—	—	—	—	—	0,1	+++
6	—	0,1	—	0,1	—	—	—	0
6	—	0,1	—	—	0,1	—	—	0
6	—	0,1	—	—	—	0,1	—	0
6	—	0,1	—	—	—	—	0,1	+++
6	—	—	0,1	0,1	—	—	—	+
6	—	—	0,1	—	0,1	—	—	+
6	—	—	0,1	—	—	0,1	—	±
6	—	—	0,1	—	—	—	0,1	+++

\* 64 DH / tubo

+ 64 DH / tubo

x  $1,2 \times 10^6$  / ml

@ 5 mg de substância seca dissolvida em 5 ml de meio 199 simplificado

(0,1 = 75 de interferon)

.. ++++ 100% de tecido destruido

+++ 75 % " " "

+ 25 % " " "

0 = ausência do efeito citopático

## COMENTÁRIOS

Existem referências sôbre a produção do "interferon" a partir de inúmeras amostras de vírus da gripe, como a "Melbourne", "Sendai" (Para-influenza), "Lee" e outras. De um modo geral, os autores referem que os Mixovírus são capazes de provocar a produção do "interferon". Isaacs indica a amostra "Melbourne" como boa provocadora, enquanto que outras amostras, como a "PR8" e "Lee" são más provocadoras. Em face dos resultados obtidos em nosso laboratório, podemos afirmar que as amostras de vírus por nós utilizadas apresentaram resultados satisfatórios. Em relação às amostras usadas, a A2/Japan/305/57 demonstrou maior susceptibilidade aos "interferons" produzidos; por outro lado, o "interferon" induzido por êste vírus foi o mais eficiente na proteção das células contra os vírus usados.

Outro fato interessante a ser destacado é que obtivemos "interferon" a partir do vírus vacínico (*Poxvirus officinale*).

O fato de não encontrarmos na literatura dados sôbre dosagem precisa do "interferon" levou-nos à tentativa de obtê-lo sob forma sólida (pó), através dos processos já descritos, tornando destarte possível a pesagem do produto, ainda que o mesmo não represente o "interferon puro", pois outras proteínas celulares podem, também, ser precipitadas pelo processo usado. Assim, utilizamos, neste trabalho preliminar, 75  $\gamma$  de "interferon" dissolvidos em meio 199 simplificado, com os resultados já descritos.

A reprecipitação, segundo princípios químicos, concorre para purificar ainda mais o produto obtido e a vantagem de obtê-lo sob forma sólida possibilita dissolvê-lo em quantidade ou volumes desejados.

Em prosseguimento a êstes estudos, estamos trabalhando na produção de maior quantidade de "interferon" para realizar uma série de experiências sôbre a especificidade, a ação em animais de laboratório, e também sôbre a estrutura química dessa substância.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Décio P. de Castro, encarregado do Lab. de Vírus Pneumotrópicos, pelo fornecimento das amostras dos Mixovírus, às técnicas D. Izelda Perissinotto, D. Yara D. Galluzzi e D. Eunice Gonçalves, do Lab. de Vírus Dermotrópicos e a D. Maria Nydia de Castro pela cooperação inestimável.

## RESUMO

Os autores descrevem detalhadamente a produção de "interferon" a partir de membranas cório-alantóides infetadas com as estirpes A1/Denver/1/57, A2/Japan/305/57 do vírus de influenza e com o vírus vacínico. Cada partida de "interferon" foi precipitada com sulfato de amônio e reprecipitada com acetona. O pó obtido foi dissolvido em meio de Earle de tal forma que 0,1 ml continha 75 gamas de "interferon". Em culturas de embrião de galinha, foi observada inibição do efeito citopático pelos vírus homólogos e heterólogos.

## SUMMARY

The production of "interferon" from chorioallantoic membranes infected with two influenza strains, A1/Denver/1/57, A2/Japan/305/57, and with vaccinia virus is described in detail. Each batch of "interferon" was precipitated with ammonium sulphate and reprecipitated with acetone. The dried precipitates were redissolved in Earle's solution so that 0.1 ml contained 75 gamma of powder. The materials were tested in chick embryo tissue cultures; in each case inhibition of the cytopathic effect produced by the homologous and the two heterologous viruses was observed.

## BIBLIOGRAFIA

BURKE, D. C. & A. ISAACS — 1958 — Further studies on interferon. *Brit. J. Exp. Path.* 39: 78-84.

BURKE, D. C. & A. ISAACS — 1958 — Some factors affecting the production of interferon. *Brit. J. Exp. Path.* 39: 452-458.

ENDO, M. & J. HAYASHIDA — 1960 — Sur le développement du virus poliomyélique dans un milieu simplifié du milieu synthétique n.º 199. *Japan J. Exp. Med.* 30: 89-93.

HENLE, W. *et alii* — 1959 — Studies on persistent infections of tissue cultures. *J. Exp. Med.* 110: 525-541.

HERMANN JUNIOR, E. C., O. F. ANDERSEN & A. HARKINS — 1955 — Tonic convulsions induced in mice by vaccinia virus and their prevention by heated influenza virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 89: 536-543.

ISAACS, A., D. C. BURKE & L. FADEEVA — 1958 — Effect of interferon on the growth of viruses on the chick chorion. *Brit. J. Exp. Path.* 39: 447-451.

ISAACS, A. & J. LINDENMANN — 1957 — Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. (Ser. B.)* 147: 258-267.

ISAACS, A., J. LINDENMANN & R. C. VALENTINE — 1957 — Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc. R. Soc. (Ser. B.)* 147: 268-273.

ISAACS, A. & M. A. WESTWOOD — 1959 — Inhibition by interferon of the growth of vaccinia virus in the rabbit skin. *Lancet* (7098): 324-5.

MALACHOWSKA, M. I. — The colicin producing strains of *E. coli* in children and their action on the strains of genus *Shigella* (Kolicynotwórcze szczepy *E. coli* u dzieci i ich działanie na szczepy rodzaju *Shigella*). Tese de doutoramento. Varsóvia, Inst. de Higiene, 1957.

SUTTON, R. N. P. & D. A. J. TYRRELL — 1961 — Some observations on interferon prepared in tissue cultures. *Brit. J. Exp. Path.* 42: 99-105.

TYRRELL, D. A. — 1959 — Interferon produced by cultures of calf kidney cells. *Nature* 184 (Suppl.): 452-453.

WAGNER, R. R. — 1960 — Viral interference. Some considerations of basic mechanisms and their potential relationship to host resistance. *Bact. Rev.* 24: 151-166.

YOUNGNER, J. S. — 1954 — Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 85: 202-205.