

AÇÃO DO FERRO SOBRE O GRUPO DOS POXVIRUS IN VITRO (1)

ACTION OF IRON ON THE POX VIRUS GROUP IN VITRO

MARTA IRENA MALACHOWSKA (2)
ADELA ROTH (2)

SUMMARY

In experiments with embryonated hen eggs and continuous line of human kidneys cells was demonstrated a inhibitory action of iron-glycerophosphate on the pox virus group.

INTRODUÇÃO

Últimamente foram publicados vários trabalhos sobre substâncias antivirais ^{4, 5, 7, 13, 15, 16} e realizadas pesquisas sobre a ação de metais leves na membrana celular ^{8, 18}. Por outro lado, os cations de ferro são conhecidos como inibidores de produção de toxinas de várias bactérias como *Clostridium perfringens* e *Corynebacteriae diphtheriae* ^{1, 3, 6, 11, 14, 19}.

Também foi demonstrado que o vírus da influenza foi quantitativamente absorvido pelo óxido de ferro ¹⁷, e é conhecida a ação inibidora dos cations de ferro sobre os vírus de plantas e animais ^{2, 10, 12}.

Neste trabalho apresentamos os resultados da ação dos cations do ferro sobre os poxvírus em culturas celulares e em ovos embrionados de galinha.

MATERIAIS E MÉTODOS

Vírus

Usamos o vírus da *Variola major*, cepa Harvey, *Variola minor*, cepa Butler e o vírus vacínico usado no Instituto Butantã para produção de vacinas, todos adaptados a membranas coriolantóides com passagens em nosso laboratório em ovos e em culturas celulares. Os títulos de *V. major* e *V. minor* foram

iguais, isto é, em ovos 10^6 e em culturas celulares 10^5 ; o título do vírus vacínico, em ovos, foi de 10^5 e, em culturas celulares, 10^4 , todos em 0,1 ml.

Culturas celulares

Usamos linhagem contínua de células de rim humano (RH) originárias de Ness Zion, Israel, mantidas pelo laboratório de culturas celulares de nosso Serviço.

Meios

Como meio de manutenção usamos o de Hanks com 2% de soro de vitelo (HNV 2%).

Ovos

Foram usados ovos embrionados de galinha de 10-11 dias de incubação e a inoculação foi feita na membrana coriolantóide, pela técnica usual.

Ferro

Dos diversos sais de ferro, escolhemos o glicerosfosfato de ferro (GFF) que é facilmente solúvel. Como solvente, usamos salina tamponada estéril (PBS), ajustando-se com bicarbonato de sódio o pH da solução para 7,2-7,4. Em experiências preliminares verificamos a quantidade de sal de ferro a

(1) Trabalho realizado no Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz.
(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

ser usada na inoculação. Com doses variáveis, observamos que a dose máxima não nociva para ôvo embrionado de galinha foi de 500 γ ; para culturas celulares, foi de 100 γ por tubo e de 300 γ por frasco de 60 ml.

Teste de ação do ferro

Em ovos — Uma mistura de 40-80 partículas de vírus em 0,1 ml, com 500 γ de glicerosfato de ferro em 0,1 ml, inoculava-se numa série de 12-15 ovos para cada vírus, em quantidade de 0,2 ml por ôvo. Após 3 dias de incubação a 36°C, abriam-se os ovos para contagem das lesões nas membranas corioalantóides. Simultaneamente abriam-se os ovos controle inoculados só com vírus.

Em cultura de tecidos — De frascos de 60 ml com culturas de células RH retirava-se o meio e inoculava-se com 0,3 ml de vírus previamente titulado. Em seguida, adicionavam-se 300 γ de GFF dissolvido em PBS na concentração de 100 γ /0,1 ml. Após 1 hora, de contacto em temperatura ambiente, adicionavam-se 10 ml do meio nutritivo e incubavam-se as culturas em estufa a 37°C, durante 6 dias. Para cada vírus usava-se uma série de 10-12 frascos. O mesmo número de culturas foi inoculado só com vírus para controle. As culturas eram observadas diariamente. No 6.º dia, após a retirada do meio, as culturas foram coradas pelo método de LINDENMANN⁹ e contaram-se as lesões. Os experimentos foram realizados também em tubos com células RH, usando uma série de 10 tubos para cada vírus. O procedimento foi o mesmo usado para os frascos, inoculando-se 0,1 ml de vírus previamente titulado e 100 γ de GFF/tubo.

As inoculações foram realizadas da seguinte maneira:

1. Inoculava-se o vírus simultaneamente com o GFF.
2. Colocava-se o GFF 24 horas antes da inoculação.
3. Deixava-se o GFF 24 horas em contacto com culturas, em seguida retirava-se

o meio de manutenção, inoculava-se o vírus e, após 1 hora de contacto, adicionava-se novo meio de manutenção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas experiências em ovos, observamos nítida diminuição do número das lesões nas membranas corioalantóides inoculadas com vírus mais GFF quando comparadas com controles inoculados só com vírus.

O quadro I ilustra os resultados de um dos experimentos escolhidos ao acaso.

QUADRO I

Número de lesões nas membranas corioalantóides inoculadas com vírus vacínico

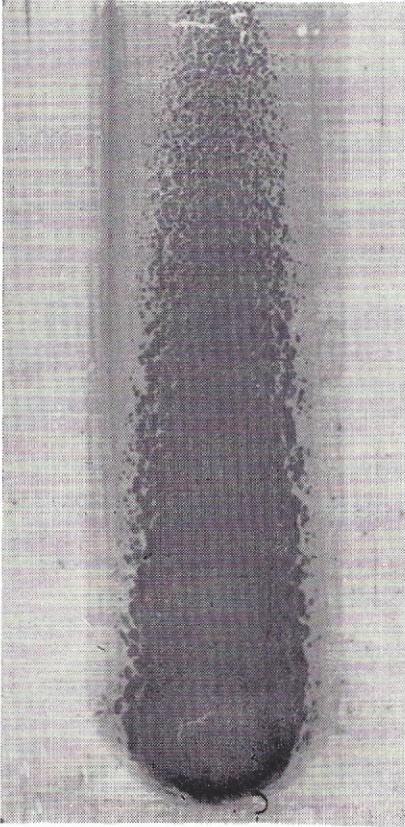
Ovos n.º	Vírus 0,1 ml	Vírus 0,1 ml + 500 γ GFF
1	30	10
2	80	10
3	32	10
4	42	0
5	64	5
6	20	7
7	72	10
8	51	4
9	33	0
10	54	0
11	60	2
12	30	0
13	22	0
14	42	3
Total	635	61
Média	45,35	4,35

"t" calculado = 8,939

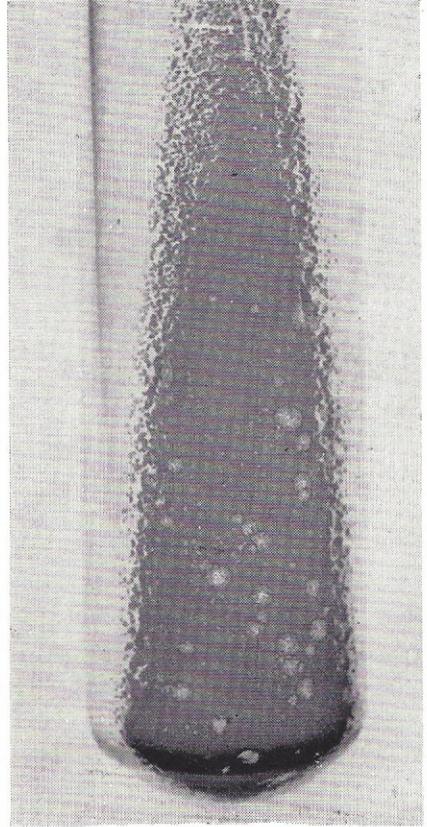
"t" tabelado = 2,779

P = 0,01

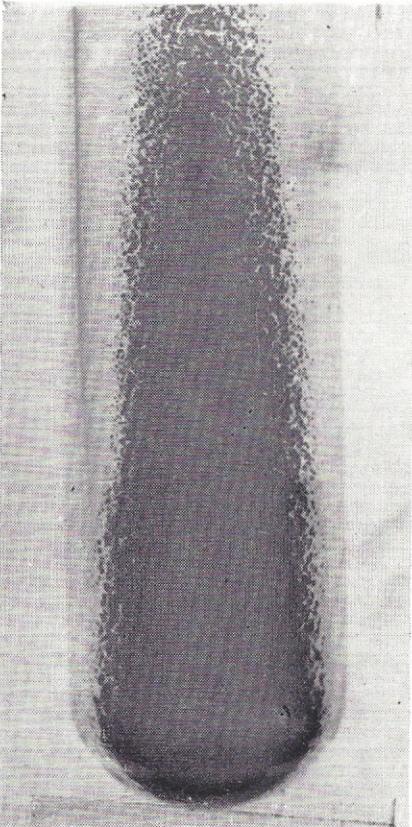
Embora obtivéssemos resultados significantes, deixamos de trabalhar com ovos por causa da variação dos números obtidos nos experimentos, e pelas grandes diferenças entre êsses números. Dos frascos com culturas celulares, onde foi inoculado o vírus e GFF, simultaneamente, obtivemos os resultados expostos nos quadros II e III.



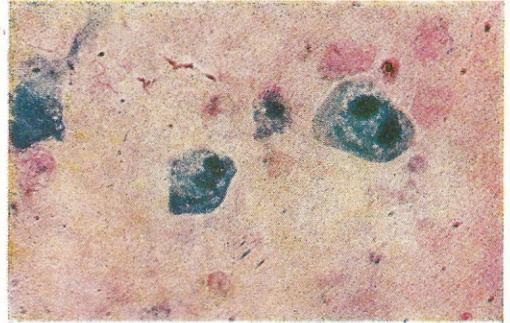
Células normais



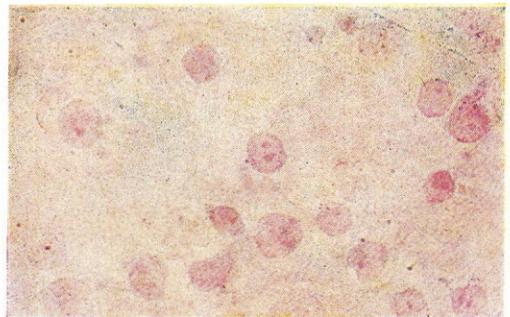
Contrôle do vírus



Vírus com ferro



Vírus com ferro



Contrôle

QUADRO II

Número de lesões em culturas celulares inoculadas com vírus vacínico

Frascos n.º	Vírus 0,1 ml	Vírus 0,1 ml + 300 γ GFF
1	45	6
2	49	4
3	41	5
4	21	5
5	42	2
6	45	4
7	48	3
8	49	1
9	36	5
10	56	1
Total	432	36
Média	43,2	3,6

"t" calculado = 5,380

"t" tabelado = 2,878

P = 0,01

QUADRO III

Número de lesões em culturas celulares inoculadas com vírus variola (Harvey)

Frascos n.º	Vírus 0,1 ml	Vírus 0,1 ml + 300 γ GFF
1	42	8
2	88	7
3	60	12
4	40	11
5	58	10
6	66	12
7	39	7
8	60	7
9	44	5
10	30	6
11	61	6
12	60	5
Total	648	96
Média	54	8

"t" calculado = 9,8

"t" tabelado = 2,51

P = 0,01

QUADRO IV

Resultado dos experimentos feitos com 10 tubos nos quais foi colocado o GFF, 24 horas antes da inoculação do vírus vacínico

Vírus vacínico ml	GFF γ	Média das lesões
0,1	—	43,2
0,1	100	5,3

Outros resultados obtivemos em experimentos nos quais deixávamos o GFF nas células, 24 horas, retirávamos o meio, e inoculávamos o vírus. O quadro V ilustra o resultado:

QUADRO V

Resultado dos experimentos feitos com 10 tubos nos quais foi colocado o GFF e, após 24 horas, retirado o meio e inoculado o vírus vacínico.

Vírus vacínico ml	GFF γ	Média das lesões
0,1	—	43,2
0,1	100	23,3

Nossas observações demonstram que o cation de ferro na forma de glicerofosfato de ferro exerce ação inibidora de crescimento nos vírus usados, tanto nos ovos embrionados de galinha como nas culturas celulares, conforme demonstram os resultados altamente significativos obtidos pela aplicação do teste Student "t".

Foi observada nítida inibição dos vírus nos experimentos em que o vírus e ferro foram inoculados simultaneamente. Uma inibição em grau menor, porém também significativa, foi observada quando o GFF foi deixado durante 24 horas em contacto com as células, antes da inoculação do vírus. Nos experimentos onde após 24 horas da inoculação de GFF retirávamos o meio e inoculávamos o vírus, observamos diminuída inibição do número de lesões produzidas pelo vírus. Poderíamos supor que somente parte do ferro foi aproveitada pelas células, enquanto que a maior parte ficou no meio. Posteriormente, foi verificada a presença de ferro nas

células, pelo método histoquímico específico de Gomori. Nas células tratadas com ferro e simultaneamente inoculadas com vírus, verificou-se coloração azul intensa nos núcleos e leve cor azulada no citoplasma, indicando localização preferencial do metal.

Os esclarecimentos do mecanismo da função inibidora de cation de ferro exige estudos bioquímicos que já foram iniciados.

RESUMO

Em experiências com ovos embrionados de galinha e em linhagem contínua de sistema celular de rim humano, foi demonstrada a ação inibidora de glicerofosfato de ferro sobre amostras de poxvirus.

Agradecimentos — As autoras agradecem ao Dr. Luís Florêncio de Salles Gomes pelas críticas e sugestões formuladas durante o trabalho; à Sra. Adriana Manginelli Massignani, pelo ótimo trabalho de coloração das culturas e aos Srs. José Olavo de Freitas Júnior e José Vitor Jankevicius pela ajuda no cálculo estatístico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARKSDALE, L. — *Corynebacteriae diphtheriae* and its relatives. *Bact. Rev.* 34 (4):368-422, 1970. [Iron and *C. diphtheriae*, p. 398.]
2. BAWDEN, F. C. & PIRIE, N. W. — The infectivity and inactivation of nucleic acid preparations from tobacco mosaic virus. *J. Gen. Microbiol.*, 21:438-53, 1959.
3. CHRISTENSEN, P. E. — Studies on toxigenicity in *C. diphtheriae*. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 41:56-66, 1957.
4. EATON, M. D. & SCALA, A. R. — Inhibitory effect of glutamine and ammonia on replication of influenza virus in ascitis tumor cells. *Virology*, 13:300-307, 1961.
5. HERRMANN JR., E. C. & ROSSELET, J. P. — Method for detecting antiviral agents on paper chromatograms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 104:304-9, 1960.
6. JANOFF, A. & ZWEIFACH, B. W. — Inactivation of bacterial exotoxins and endotoxin by iron. *J. Exp. Med.*, 112:23-34, 1960.
7. KAUFMAN, H. E. & MALONEY, E. D. — Therapeutic anti-viral activity in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112:4-7, 1963.
8. LABORIT, H. & LABORIT, G. — Excitabilité neuro-musculaire et équilibre Ionique. Paris, Masson, 1955.
9. LINDENMANN, J. & GIFFORD, G. E. — Studies on vaccinia virus plaque formation and its inhibition by interferon. I. Dynamics of plaque formation by vaccinia virus. *Virology*, 19:283-93, 1963.
10. NORTH, C. P.; WALLACE, A.; RYAN, G. F. & MUELLER, R. T. — Amelioration of virus symptoms in *Camellia* with iron. *Virology*, 8:131-7, 1959.
11. PAPPENHEIMER JUN., A. M.; MILLER, P. A. & MASAHICO, Y. — Kinetics of diphtheria toxin formation. *J. Gen. Microbiol.*, 28:531-9, 1962.
12. PUCK, T. T.; GAREN, A. & CLINE, J. — The mechanism of virus attachment to host cells. I. The role of ions in the primary reaction. *J. Exp. Med.*, 93:65-88, 1951.
13. RIBEIRO DO VALLE, L. A.; MELO, P. R.; GOMES, L. F. S. & PROENÇA, L. M. — Methisazone in prevention of variola minor among contacts. *Lancet*, 2:976, 9, 1965.
14. SINGER, B. & FRAENKEL-CONRAT, H. — Effects of light in the presence of iron salts on ribonucleic acid and model compounds. *Biochemistry*, 4:226, 1965.
15. TAKEMOTO, K. K. & FABISCH, P. — Inhibition of herpes virus by natural and synthetic acid polysaccharides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 116:140-4, 1964.
16. VAHERI, A. & CANTELL, C. — The effect of heparin on herpes simplex virus. *Virology*, 21:661-2, 1963.
17. WARREN, J.; NEAL, A. & RENNELS, D. — Adsorption of myxoviruses on magnetic iron oxides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121:1250-3, 1966.
18. WEINBERG, E. D. — Roles of metallic ions in host-parasite interactions. *Bact. Rev.*, 30:136-51, 1966.
19. YONEDA, M. — A new culture method designed for kinetic studies on diphtheria toxin production. *Brit. J. Exp. Path.*, 38:190-3, 1957.

