

AÇÃO DO CORANTE LARANJA DE ACRIDINA SOBRE OS VÍRUS HERPÉTICO E VACÍNICO EM CULTURAS CELULARES *

Marta Irena MALACHOWSKA **
Adela ROTH **

RIAL-A/393

MALACHOWSKA, M.I. & ROTH, A. — Ação do corante laranja de acridina sobre os vírus herpético e vacínico em culturas celulares. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 9-17, 1974.

RESUMO: Estudou-se a ação inibidora do corante foto-sensibilizante laranja de acridina (LA) sobre os vírus herpético e vacínico. A ação conjunta do corante e luz resultou em 100% de inibição do crescimento dos vírus, quando o LA esteve em contacto durante 1 hora com os vírus. Não se observou qualquer partícula viral nas micrografias eletrônicas, enquanto que nas células inoculadas com vírus expostos à luz, mas sem LA, observaram-se numerosas partículas de vírus. A microscopia fluorescente demonstrou diminuição de ADN em células inoculadas com mistura de LA e vírus (VLA) em comparação com os controles de células normais.

DESCRITORES: laranja de acridina, ação sobre o vírus; vírus, herpético e vacínico.

I N T R O D U Ç Ã O

Numerosos investigadores descreveram a ação inibidora dos metais pesados¹⁰ e dos corantes foto-sensibilizantes sobre o crescimento de alguns vírus, destacando que a exposição à luz é relevante nestas inibições. O mecanismo intrínseco da inibição dos vírus não está bem esclarecido. Uma das teorias sugere que os corantes fotodinâmicos inibem a síntese das proteínas citoplasmáticas⁵; outra teoria, mais frequentemente citada, admite que estes coran-

tes ligam-se aos ácidos nucléicos virais, transferindo a eles a energia da luz *** causando, desta maneira, o rompimento da sua estrutura 7, 8, 9, 13, 16, 21. Diversos trabalhos usando métodos bioquímicos sugerem a degradação ou destruição da guanina do ADN para explicarem este mecanismo^{3,6,12,14}. Há aproximadamente 40 anos vêm se realizando estudos da ação fotodinâmica dos corantes procurando, como resultado prático, a inibição de crescimento dos agentes infecciosos que poderia ser utilizada em terapêutica. Recentemente, apareceram trabalhos onde

* Realizado na Seção de Vírus Produtores de Exantemas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** ROTH, A. & MALACHOWSKA, M.I. — Ação dos corantes foto-sensíveis sobre *Herpesvirus hominis*. São Paulo, 1973. [Trabalho não publicado]

se relatam êxitos clínicos, utilizando o fotodinamismo do vermelho neutro e da proflavina em lesões herpéticas de pele⁴ e de queratite herpética¹².

Em vista destes resultados, resolveu-se estudar a ação fotodinâmica do corante laranja de acridina, *in vitro*, o qual tem sido utilizado por numerosos autores para o estudo da inibição do crescimento de agentes, como poliovírus^{11, 17}, vírus de mosaico das plantas, herpesvírus e colífago⁷. Na literatura, não foi encontrada qualquer referência ao efeito da laranja de acridina* sobre os vírus herpético e vacínico nos sistemas celulares usados neste trabalho.

Ainda, foi escolhido este corante pela sua notável propriedade de corar diferencialmente o ADN do ARN e de poder corar células vivas. Pelo fato de não encontramos qualquer citação na literatura referente às alterações morfológicas dos vírus após o tratamento com corante e luz, neste trabalho procurou-se investigar este assunto através da microscopia eletrônica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Vírus

Foram utilizados:

a) *Herpesvírus hominis* (HVH) tipo I, cepa McIntire, com passagens em culturas celulares SIRC e titulado nas mesmas células. Título do vírus 10⁶ por 0,1 ml.

b) *Poxvírus officinale*, cepa denominada Bt pela Seção de Vírus Produtores de Exantemas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S. P. (vírus contido na vacina anti-variólica produzida pelo Instituto Butantan, São Paulo, S. P.), cultivado e titulado em células Vero-Maru; título do vírus 10⁵ por 0,1ml.

Culturas celulares

Foram utilizadas:

a) Células SIRC** — linhagem contínua de córnea de coelho, com 53 passagens neste laboratório.

b) Células Vero-Maru*** — linhagem contínua de rim de macaco, com 50 passagens neste laboratório.

Meios de cultura

Como meios de manutenção foram usados: o meio 199 com 1% de soro de vitelo para células SIRC, e meio de Eagle com 2% de soro de vitelo para as células Vero-Maru.

Corante fotodinâmico

O corante laranja de acridina (LA) foi dissolvido a 1% em salina tamponada com pH ajustado a 7,2 e mantido em geladeira a 4°C em frasco escuro.

Exposição à luz

Os sistemas celulares foram expostos durante 1 hora à luz da lâmpada de 60 W, de vidro transparente, a 60 cm de distância das células. A temperatura externa dos tubos durante a exposição não excedeu a 22°C.

Inoculações

Inicialmente várias quantidades de LA com TCD 50% de vírus foram experimentadas. Foi escolhida a dose de 4 microgramas que não alterou as células, mas inibiu a ação do vírus.

As inoculações foram feitas de três modos:

a) mistura de 0,1 ml de vírus (contendo 100 TCD 50%) com 4 microgramas de LA (VLA) no volume de 0,1 ml. Destas misturas foram inoculados 0,2 ml por tubo;

b) inoculações de 4 microgramas de LA e em seguida o vírus na mesma quantidade e volume como no item a;

c) inoculações de LA e, 24 horas depois, o vírus nas mesmas quantidades e volumes citados.

* Merck.

** Recebidas do Dr. Yorgen Leerhoy de Statens Seruminstitut, Copenhagen, Dinamarca.

*** Recebidas da American Type Culture Collection.

As inoculações foram executadas em duas séries: a 1.^a exposta uma hora à luz e a 2.^a feita em câmara escura com lâmpada vermelha de tipo usado em fotografia. Nesta série, os tubos foram protegidos com papel de alumínio. Para cada alternativa, usaram-se 4-6 tubos de células. Os sistemas foram observados ao microscópio diariamente e a leitura final foi feita no 7.^o dia após a inoculação.

Teste de vírus com LA

Células inoculadas com VLA e que não mostraram efeito citopático eram congeladas e descongeladas três vezes, centrifugadas, e o sobrenadante era inoculado em novas células.

Microscopia fluorescente

Para observação direta em microscopia fluorescente, foram preparadas lâminas com células normais, células inoculadas apenas com vírus e células inoculadas com VLA. Todas as amostras desta experiência foram expostas à ação da luz. Foram experimentadas três variações de preparações destas lâminas:

1. Fixação com acetona, tratamento com tampão fosfato pH 6,4, coloração com LA a 0,01% e montagem em tampão fosfato pH 6,4.

2. Fixação com acetona, tratamento com tampão Mc Ilvain pH 4,0; coloração com LA a 0,01% e montagem em tampão Mc Ilvain pH 4,0.

3. Fixação com acetona, tratamento com tampão fosfato pH 8,0; coloração com LA a 0,01% e montagem em glicerina¹, pH 9,0.

Microscopia eletrônica

As células inoculadas com vírus e as inoculadas com VLA foram observadas ao microscópio eletrônico. Estas amostras foram coradas pelo acetato de uranila a 2%, embebidas em resina Polylyte T-208 e cortadas no ultramicrotomo Porter-Blum. As seções coradas pelo método de Reynolds foram examinadas ao microscópio eletrônico Philips EM-200 operando a 60 KV.

R E S U L T A D O S

Nas experiências constantes da figura 1, verificou-se que, quando os vírus foram inoculados isoladamente (controle dos vírus), na presença ou na ausência de luz, houve crescimento representado por 100% de efeito citopático (letra A da figura 1).

Quando a mistura vírus e corante (VLA) foi exposta à luz por 1 hora e inoculada no sistema celular, verificou-se após 7 dias de observação, que houve inibição do crescimento do vírus, fato demonstrado por passagens posteriores. Por outro lado, houve crescimento do vírus representado por 100% de efeito citopático quando as inoculações foram feitas na ausência da luz (letra B da figura 1).

Quando o corante LA foi adicionado 24 horas antes do vírus, verificou-se que nos tubos expostos à ação da luz houve discreto crescimento do vírus representado por aproximadamente 20-30% de efeito citopático. Nos tubos não expostos à ação da luz houve crescimento do vírus igual aos dos controles, isto é, 100% de efeito citopático (letra C da figura 1).

Quando a adição do corante LA foi feita imediatamente após a inoculação do vírus, verificou-se que, nos tubos expostos ou não à ação da luz, houve crescimento igual ao dos controles dos vírus (letra D da figura 1).

Dois experimentos visaram verificar, nas culturas celulares inoculadas com VLA e nas quais não houve efeito citopático, se os vírus ainda estavam presentes, mas inativados, ou se estavam presentes em forma incompleta. Destes experimentos resultou o seguinte:

- a) células inoculadas com o resultante da inoculação anterior de VLA expostas à luz foram observadas durante 7 dias, sem apresentarem indício de efeito citopático, permanecendo com a morfologia usual.

- b) micrografias eletrônicas demonstraram numerosas partículas virais nas amostras inoculadas somente com vírus, enquanto que em vários cortes de células inoculadas com VLA não se observou nenhuma partícula viral (fig. 2 a e b).

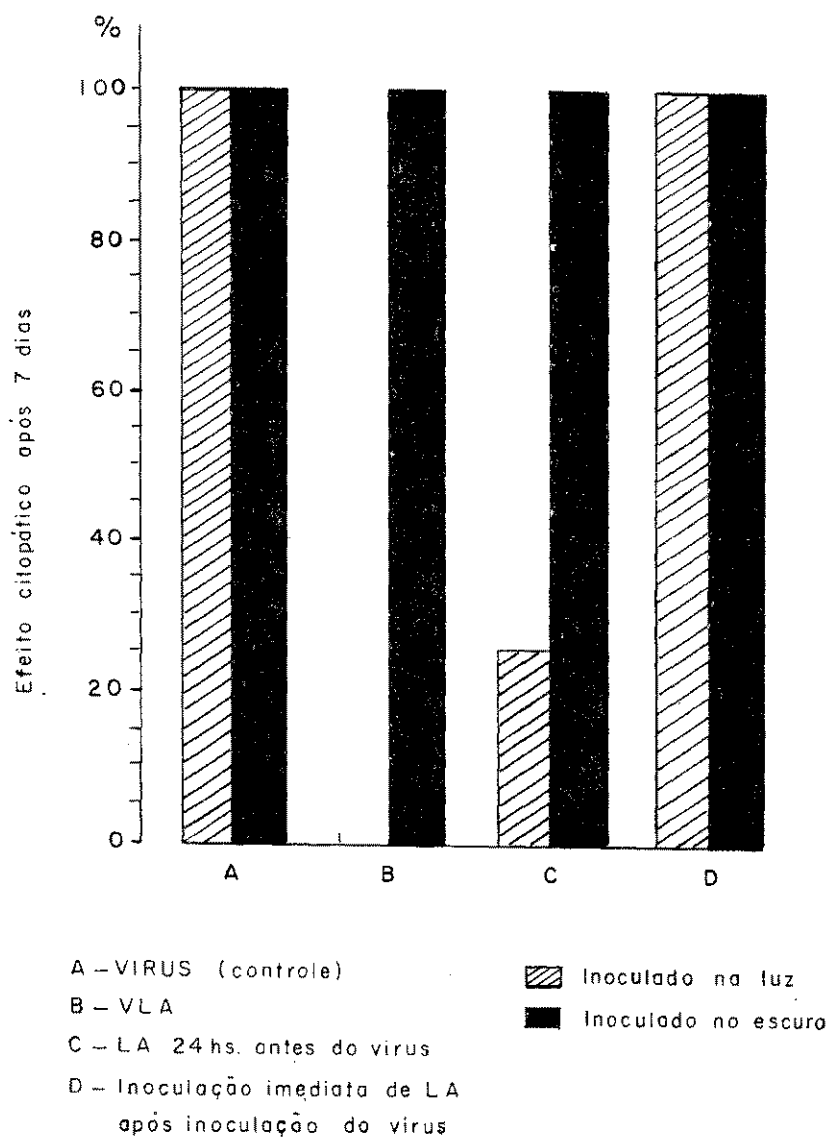


Fig. 1 — Resultados das inoculações com os vírus e corante em culturas de tecidos.

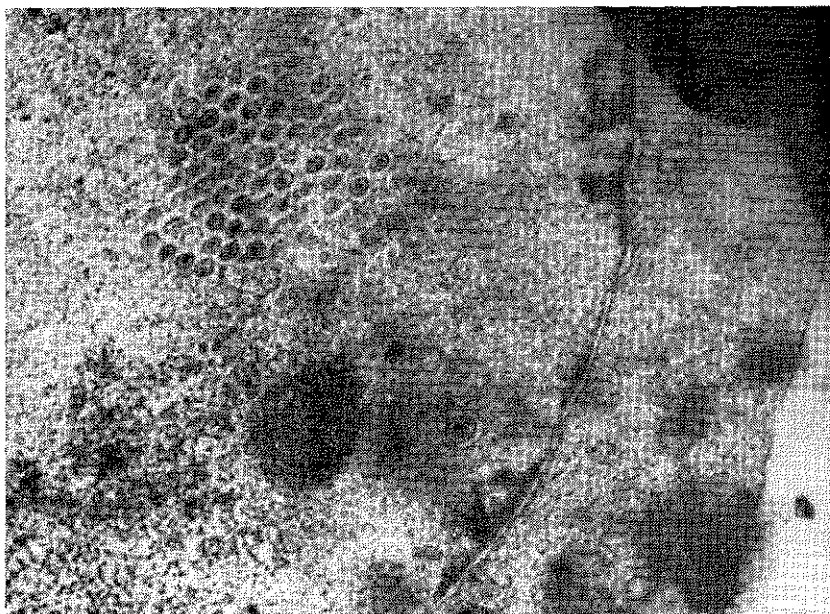


Fig. 2 a) Micrografia eletrônica da célula inoculada somente com vírus, onde se observam várias partículas virais.

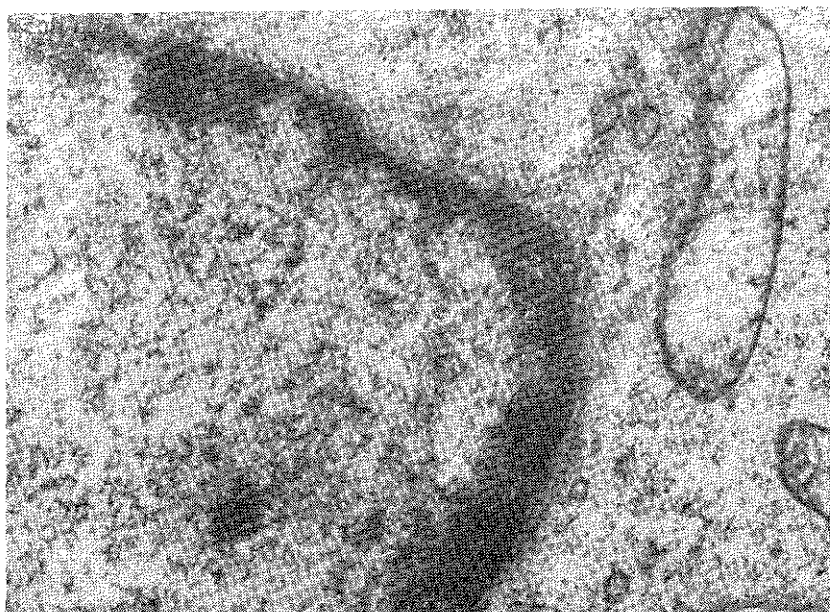


Fig. 2 b) Micrografia eletrônica da célula inoculada com vírus e corante, onde não se observa nenhuma partícula viral.

Para o exame pela microscopia fluorescente, foram preparadas lâminas das células normais e das células submetidas ao tratamento com vírus e corante LA.

Ao exame, as células normais não apresentavam alterações visíveis e os núcleos demonstravam cor amarelo-esverdeada com pontos avermelhados correspondendo aos nucléolos, e o citoplasma detinha cor vermelha intensa (fig. 3a).

Nas lâminas com células inoculadas somente com vírus observaram-se alterações morfológicas das células caracterizadas por aumento e granulação do núcleo que se corava de amarelo-esverdeado intenso correspondendo ao ADN, e pouco restava do citoplasma corado em vermelho, correspondendo ao ARN (fig. 3b).

As lâminas com as células inoculadas com VLA expostas à luz mostraram, na sua grande maioria, células coradas em seu citoplasma de cor vermelha intensa (ARN) e discreta diminuição de cor amarela correspondente ao ADN no núcleo. Em geral estas células são comparáveis às células-controle normais (fig. 3c).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Constatou-se que a ação conjunta de laranja de acridina e da luz inibe o crescimento dos vírus herpético e vacínico nas culturas celulares usadas. Estes vírus, isoladamente, expostos à luz sem a presença do corante, não demonstraram qualquer sensibilidade à luz. A ação do corante LA sobre os vírus não foi instantânea. Com efeito, quando o LA foi adicionado às células simultaneamente com os vírus não houve inibição do crescimento dos vírus, isto é, houve crescimento evidenciado por efeito citopático em todas as células. A inibição do crescimento dos vírus foi obtida quando o sistema VLA foi exposto por 1 hora à luz. O mesmo fenômeno foi observado por

BOOTH ², com o vírus da rubéola tratado com proflavina, e por WALLIS ¹⁹, que tratou o poliovírus com vários corantes como o vermelho neutro, azul de toluidina ou proflavina.

Como o vírus inoculado após 24 horas da adição do corante foi parcialmente inibido, supõe-se que restos do corante foram suficientes, quando expostos à luz, para inibir, em parte, o crescimento do vírus.

Nas experiências com culturas celulares cultivadas conjuntamente com o corante e posteriormente inoculadas com vírus herpético ou vacínico na ausência e presença da luz não se obteve inibição do vírus. Entretanto, WILSON ²², constatou inibição do poliovírus, realizando este tipo de experimentos com o corante vermelho neutro. No presente estudo, jamais se observou qualquer inibição do crescimento dos vírus na ausência de luz. A única menção de inibição de crescimento na ausência de luz encontrada na literatura foi no trabalho de WALLIS ²⁰, que inativou adenovírus com azul de toluidina.

A teoria sobre as alterações causadas no DNA viral pela transferência da energia da luz pelos corantes foto-sensibilizantes parece concordar com os achados na microscopia eletrônica que revelaram nas células com VLA ausência completa dos vírus. Isto sugere que a luz e o corante destroem não somente os ácidos nucléicos, mas também, as proteínas citoplasmáticas, em outras palavras, o vírus completo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Luís Florêncio de Salles Gomes e ao D. Juan J. Angulo pelas sugestões na redação do trabalho. Ao Dr. Dalton R. Weigl, pelas micrografias eletrônicas e ao Sr. Justino da Silva, pelas fotografias da microscopia fluorescente.

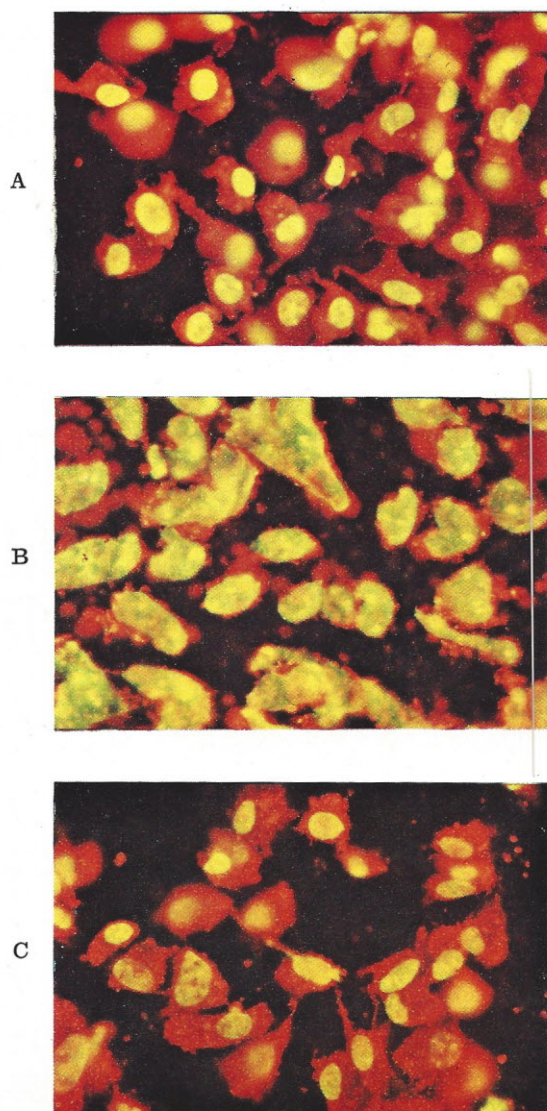


Fig. 3 a) Células SIRC normais.
b) Células SIRC inoculadas com vírus
c) Células SIRC inoculadas com vírus e com corante.

MALACHOWSKA, M.I. & ROTH, A. — Effect of the acridine orange dye on herpetic and vaccinic virus in cell cultures. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 9-17, 1974.

SUMMARY: The inhibiting action of the photosensitizing acridine orange dye (AO) on herpetic and vaccinic viruses was studied.

The combined effect of both the dye and the light on these viruses caused a 100% inhibition of growth after an one hour period of contact with the dye; no virus particle could be observed on the electron micrographs of these cells. In those cells which were inoculated with the virus under light but without having been put in contact with AO, several virus particles were observed. Fluorescent microscopy evidenced a decrease of DNA in those cells inoculated with AO and virus, as compared with the amount of DNA in normal cells.

DESCRIPTORS: acridine orange, effect on the virus; virus, herpetic and vaccinic.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERTALANFFY, L. von & BICKIS, I. — Identification of cytoplasmic basophilia (Ribonucleic acid) by fluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 4: 481-93, 1956.
2. BOOTH, J.C. & STERN, H. — Photodynamic inactivation of rubella virus. *J. med. Microbiol.*, 5: 515-28, 1972.
3. DRAKE, J.W. & McGUIRE, J. — Properties of *r* mutants of bacteriophage T4 photodynamically induced in the presence of thiopyronin and psoralen. *J. Virol.*, 1: 260-7, 1967.
4. FELBER, T.D.; SMITH, E.B.; KNOX, J. M.; WALLIS, C. & MELNICK, J.L. — Photodynamic inactivation of herpes simplex. *J. am. med. Ass.*, 223: 289-92, 1973.
5. FRANKLIN, R.M. — The synthesis of fowl plague virus products in a proflavine-inhibited tissue culture system. *Virology*, 6: 525-39, 1958.
6. FREIFELDER, D. & URETZ, R.B. — Mechanism of photoinactivation of coliphage T7 sensitized by acridine orange. *Virology*, 30: 97-103, 1966.
7. HIATT, C.W.; KAUFMAN, E.; HELPRIN, J.J. & BARON, S. — Inactivation of viruses by the photodynamic action of toluidine blue. *J. Immun.* 84s 480-4, 1960.
8. HILL JR., R.B.; BENSCH, K.G. & KING, D.W. — Photosensitization of nucleic acids and proteins. The photodynamic action of acridine orange on living cells in culture. *Expl Cell Res.*, 21: 106-17, 1960.
9. LEI, J.C. — Der intravirale charakter der proflavinsensibilisierten Photoinaktivierung des Maul-und-Klauenseuche-Virus. *Arch.exp. VetMed.*, 24: 125-39, 1970.
10. MALACHOWSKA, M.I. & ROTH, A. — Ação do ferro sobre o grupo dos poxvirus in vitro. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31: 57-61, 1971.
11. MAYOR, H.D. — Cytochemical and fluorescent antibody studies on the growth of poliovirus in tissue culture. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 19: 106-22, 1961.
12. MOORE, C.; WALLIS, C.; MELNICK, J. L. & KUNS, M.D. — Photodynamic treatment of herpes keratitis. *Infection & Immunity*, 5: 169-71, 1972.
13. ORLOB, G.B. — Some effects of photosensitizing dyes on three plant viruses. *Virology*, 21: 291-9, 1963.

14. ROMANOWSKAJA, L.N. *et alii* — K Woprosu o mehanizmie zwiazywania akridinowych Krasitielej z nukleinowymi kisletemi. *Biofizika*, **17**: 313-36, 1972.
15. ROSS, R.W. & ORLANS, E. — The redistribution of nucleic acid and the appearance of specific antigen in HeLa cells infected with herpes virus. *J. Path. Bact.*, **76**: 393-402, 1958.
16. SASTRY, K.S. & GORDON, M.P. — The photodynamic inactivation of tobacco mosaic virus and its ribonucleic acid by acridine orange. *Biochim. Biophys. Acta*, **129**: 32-41, 1966.
17. SCHAFFER, F.L. & HACKETT, A.J. — Early events in poliovirus-HeLa cell interaction: acridine orange photosensitization and detergent extraction. *Virology*, **21**: 124-6, 1963.
18. SHORTT, H.E. & BROOKS, A.G. — Photodynamic action of methylene blue on fixed rabies virus. *Indian J. med. Res.*, **21**: 581-5, 1934.
19. WALLIS, C. & MELNICK, J.L. — Photodynamic inactivation of poliovirus. *Virology*, **21**: 332-41, 1963.
20. WALLIS, C. & MELNICK, J.L. — Irreversible photosensitization of viruses. *Virology*, **23**: 520-7, 1964.
21. WALLIS, C.; SCHEIRIS, C. & MELNICK, J.L. — Photodynamically inactivated vaccines prepared by growing viruses in cells containing neutral red. *J. Immun.*, **99**: 1134-9, 1967.
22. WILSON, J.N. & COOPER, P.D. — Aspects of the growth of poliovirus as revealed by the photodynamic effects of neutral red and acridine orange. *Virology*, **21**: 135-45, 1963.

Recebido para publicação em 6 de novembro de 1973.