

PRODUÇÃO DE INTERFERON OU SUBSTÂNCIA SEMELHANTE EM CULTURAS EB3 INOCULADAS COM SOROS HUMANOS CONTENDO ANTÍGENO AUSTRÁLIA *

J. A. N. Candeias **

RSPU-B/280

CANDEIAS, J. A. N. — *Produção de interferon ou substância semelhante em culturas EB3 inoculadas com soros humanos contendo antígeno Austrália.* Rev. Saúde públ., S. Paulo, 9:409-15, 1975.

RESUMO: *Culturas de células EB3, quando inoculadas com soros humanos contendo antígeno Austrália, produzem interferon ou substância semelhante em títulos significativamente mais elevados do que as culturas controle, não inoculadas. As culturas de células EB3 inoculadas com soros humanos negativos para o antígeno Austrália comportam-se de modo idêntico às culturas controle, no que respeita aos títulos de interferon, ou substância semelhante. Sugere-se a possibilidade daquele efeito poder servir de indicador de uma possível interação entre as células EB3 e o antígeno Austrália.*

UNITERMOS: *Antígeno Austrália (HBs Ag). Interferon. Atividade biológica.*

INTRODUÇÃO

No líquido sobrenadante de culturas celulares preparadas com as linhagens EB1, EB2, EB3, AL1 e AL2, obtidas de linfomas de Burkitt, tem-se observado a presença de interferon, em títulos variáveis^{12, 22, 25}. As culturas de EB3, com elevada percentagem de células infectadas com vírus EB, são as que apresentam títulos mais baixos de interferon, observação já feita por Swart e Young²⁵. Também em culturas de leucócitos humanos, infectadas por diferentes vírus, tem sido possível evidenciar a produção de interferon^{1, 3, 6, 8, 11, 12, 17, 18, 19, 21, 23, 24, 26}.

O trabalho de Carver e Seto⁵ mostra que culturas de fibroblastos humanos, depois de submetidas a estimulação com so-

ros humanos contendo antígeno Austrália, tornam-se refretárias à multiplicação do vírus da doença de Newcastle. Este estado refratário era inibido pelo soro anti-antígeno Austrália. Idêntica observação foi feita por Berthold e col.³.

O presente trabalho descreve a aparente modificação no padrão de produção de interferon, ou substância semelhante, em culturas de células EB3 estimuladas com soros humanos positivos para o antígeno Austrália.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros humanos — Foram testados 20 soros humanos com a seguinte distribui-

* Trabalho realizado com auxílio da Bolsa de Estudo 3.730/71, concedida pela Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

** Do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo — Cidade Universitária — São Paulo, SP — Brasil.

ção relativa dos títulos fixadores do complemento para o antígeno Austrália: 10 soros negativos; 2 soros com título 8 e 32; 2 soros com título 256; 5 soros com título 1.024 e 1 soro com título 2.048.

Culturas celulares — Utilizou-se a linhagem L645 de células embrionárias de pulmão humano cultivadas em meio de crescimento de Eagle, preparado em solução de Earle, com concentração dupla de vitaminas e aminoácidos, suplementado com glutamina a 3% e 10% de soro fetal bovino; este meio foi ainda adicionado de bicarbonato de sódio a 8,8% e antibióticos. A linhagem EB3 foi cultivada em meio basal de Eagle, também preparado em solução de Earle e adicionado dos mesmos suplementos referidos para a cultura de células L645, com exceção do soro fetal bovino, utilizado na concentração final de 25%. As culturas de EB3, a serem estimuladas com soros humanos, foram incubadas a 37°C, durante 24 horas, em atmosfera de 5% de CO₂, com uma concentração celular de 1 — 3 x 10⁶ células por ml de meio; o meio de Eagle usado para esta finalidade era pré-incubado durante 7 dias a 37°C, antes de usado, para se conseguir a depleção de arginina¹³⁻¹⁵.

Vírus — Utilizou-se como “challenge vírus” a cepa Indiana de vírus da estomatite vesicular, cuja titulação, segundo técnica de Dulbecco⁷, foi feita em placas plásticas de Petri, de 60 mm, após diluição em Hanks BSS. Na titulação do interferon foram utilizadas 50 PFU/0,5 ml.

Produção de interferon — O interferon, ou substância semelhante, produzida nas culturas de EB3, após estimulação, era titulado, depois de 24 horas de incubação das culturas com 2 ml de soro humano não diluído, para cada 10 ml de meio. Passado este tempo, o sobrenadante das culturas EB3 era clarificado por centrifugação a 1.500 r.p.m. durante 30 minutos e dialisado contra tampão de gli-

cina-HCl pH=2, durante 24 horas, a 4°C para eliminar antígeno Austrália residual; seguia-se nova diálise contra PBS pH=7,5, durante 48 horas, a 4°C.

Titulação do interferon — O interferon, ou substância semelhante, produzida nas diversas culturas EB3 estimuladas, após o tratamento referido anteriormente, foi titulado em cultura de células L645, pela técnica de redução do número de placas, usando-se o vírus da estomatite vesicular, como “challenge virus”: culturas L645, em camada simples, foram incubadas, de um dia para o outro, com 2 ml de diluições seriadas do líquido sobrenadante das culturas EB3 e lavadas, duas vezes, com PBS; em seguida adicionava-se a cada placa 0,5 ml de suspensão de vírus contendo 50 unidades formadoras de placas; depois de decorrido o período de adsorção de 60 min., à temperatura ambiente, retirava-se o inóculo e cobria-se a cultura com 5 ml de meio de Eagle, com dupla concentração de vitaminas e aminoácidos, glutamina a 3%, 5% de soro fetal bovino, bicarbonato de sódio a 8,8% e antibióticos e 1% de agar; a segunda camada de meio contendo vermelho neutro era adicionada depois de 24 horas e a titulação feita 48 horas após a adição do “challenge virus”. Os títulos do interferon são expressos pela recíproca da mais alta diluição capaz de reduzir o número de placas ocasionadas pelo vírus da estomatite vesicular de 50% (PDD₅₀/2 ml).

RESULTADOS

Na Tabela 1 são apresentados os títulos de interferon, ou substância semelhante, obtidos no sobrenadante de diversas culturas EB3, não submetidas a qualquer estímulo com soros humanos. No total de 39 testes realizados com dez culturas diferentes obtiveram-se resultados, cujas médias geométricas dos títulos (PDD₅₀/2 ml) são semelhantes. Na Tabela 2 apre-

TABELA 1

Títulos de interferon, ou substância semelhante, no sobrenadante de culturas EB3

Cultura n.º	Número de testes	Título interferon (PDD ₅₀ /2 ml)	Média geométrica* (G)
1	4	< 2 — 2	1.2
2	4	< 2 — 2	1.2
3	4	< 2 — 4	1.4
4	4	< 2 — 2	1.4
5	4	< 2 — 2	1.2
6	4	2	2.0
7	4	< 2 — 4	2.0
8	4	< 2 — 2	1.2
9	4	2	2.0
10	3	< 2 — 2	1.4

* Para cálculo da média geométrica, os títulos de valor < 2 foram considerados como de valor igual a 1.

sentam-se os resultados obtidos após estimulação das culturas EB3 com soros negativos e positivos para o antígeno Austrália, em função da reação de fixação do complemento. O significado dos títulos fixadores de complemento para o antígeno Austrália, em termos de número de partículas presentes, não foi considerado, mas os resultados obtidos parecem ser significativos. Analisando as médias geométricas dos títulos (PDD₅₀/2 ml), pode ver-se que, enquanto com os soros negativos os resultados são semelhantes aos referidos na Tabela 1, com soros positivos, particularmente, com títulos maiores que 256 as médias geométricas são muito mais elevadas do que as obtidas com as culturas EB3 não inoculadas, que serviram de controle.

Considerando-se que a distribuição dos valores das médias geométricas dos títulos (PDD₅₀/2 ml) têm distribuição normal, realizaram-se testes para o coeficiente de correlação a fim de se verificar se as mesmas podiam ou não ser consideradas independentes, quando comparados entre si. Tomou-se cada valor da média geométrica como uma medida de cada

cultura (Tabela 1) e de cada soro (Tabela 2) e adotou-se um nível de significância de $\alpha=0.05$. Neste nível, os testes para o coeficiente de correlação entre as médias geométricas dos títulos obtidos nas culturas controle e dos obtidos nas culturas inoculadas com soros negativos, do mesmo modo que os testes entre as médias geométricas dos títulos obtidos nas culturas controle e dos obtidos nas culturas inoculadas com soros positivos resultaram na aceitação da hipótese de que as variáveis em questão não são correlatas. Assim sendo, realizaram-se os testes de médias entre os valores acima referidos, usando-se das especificações do teste de médias de duas populações independentes, com desvios padrões desconhecidos e não supostamente iguais. Nestas condições não existem diferenças estatisticamente significantes entre as médias geométricas dos títulos de interferon, ou substância semelhante, obtidos nas culturas não estimuladas e nas estimuladas com soros humanos negativos; pelo contrário, comparando-se os valores obtidos nas culturas EB3 não estimuladas, com os obtidos nas estimuladas com soros positivos as diferenças são estatisticamente significantes.

TABELA 2

Títulos de interferon, ou substância semelhante, no sobrenadante de culturas EB3 inoculadas com soros humanos

Soro n.º	Número de testes	Título antígeno Au (FC)	Título interferon (PDD ₅₀ /2 ml)	Média geométrica* (G)
1	4	0	< 2 — 4	1,4
2	4	0	< 2 — 2	1,2
3	4	0	4	4,0
4	4	0	2 — 4	2,4
5	4	0	< 2 — 2	1,4
6	4	0	2	2,0
7	4	0	2 — 4	2,4
8	4	0	< 2 — 4	1,7
9	4	0	< 2 — 2	1,2
10	4	0	< 2 — 4	2,0
11	3	8	4 — 8	5,0
12	4	32	4 — 8	4,8
13	3	256	8	8,0
14	4	256	4 — 8	6,7
15	3	1.024	8 — 16	12,7
16	3	1.024	16	16,0
17	4	1.024	4 — 16	9,5
18	4	1.024	8 — 16	13,5
19	4	1.024	16	16,0
20	4	2.048	8 — 16	11,3

* Para cálculo da média geométrica, os títulos de valor < 2 foram considerados como de valor igual a 1.

DISCUSSÃO

A solução do problema da multiplicação do vírus da hepatite tipo B tem sido tentada dentro de diversas perspectivas. As observações de Hirschman e col.¹⁸ e as de Maynard e col.²¹ sobre a ocorrência de antígeno Austrália e anticorpos específicos no soro de chimpanzês, sugeriram a possibilidade de ser estudada a hepatite de longo período de incubação, através da inoculação experimental destes animais. No entanto, os casos de hepatite que ocorrem naturalmente em cerca de 30% dos referidos animais, parecem restringir o seu uso, como modelos adequados para o estudo em causa. O aparecimento de técnicas mais sensíveis como o radioimunoensaio poderão abrir caminho para a experimentação em outros sistemas animais²⁰.

Um outro ângulo sob o qual tem sido tentada a solução do problema da multi-

plicação do vírus da hepatite tipo B é a utilização de culturas celulares ou culturas de fragmentos de órgãos. As observações feitas por Zuckerman²⁷ de que culturas de células hepáticas de embrião humano, quando inoculadas com frações purificadas de soros humanos, contendo antígeno Austrália, apresentavam alterações citoplásmica, foram confirmadas por Brighton e col.⁴. Em trabalho posterior, Zuckerman e col.²⁹ conseguiram obter, em culturas de fragmentos de fígado embrionário humano, evidência da multiplicação do vírus da hepatite sérica, mediante determinação dos títulos fixadores de complemento do líquido sobrenadante das culturas para o antígeno Austrália. Resultados encorajadores já tinham sido conseguidos, anteriormente, em culturas de fragmentos de fígado de embrião humano, por Zuckerman²⁸. A irregularidade de aparecimento do efeito citopático em

culturas de células embrionárias inoculadas com soros humanos contendo antígeno Austrália, levou ao uso de marcadores, como o referido antígeno, capazes de servir como índice da multiplicação viral, e à utilização de outros índices. Carver e Seto⁵, aproveitando o fenômeno da hemadsorção de hemácias de bovinos em culturas inoculadas com vírus da doença de Newcastle, verificaram que o tratamento prévio destas culturas, com soros contendo antígeno Austrália interferia com a subsequente hemadsorção, efeito este neutralizado pelo soro anti-antígeno Austrália. Os mesmos autores, no entanto, consideram ser necessário desenvolver experiências adicionais antes de responsabilizar o vírus da hepatite tipo B pelo fenômeno observado. Berthold e col.³ verificaram que o soro de pacientes com hepatite do tipo B era capaz de induzir o aparecimento de interferência intrínseca¹⁹, em culturas diplóides de fibroblastos humanos, para o vírus da doença de Newcastle.

Recentemente Barinsky e col.², estudando a natureza do antígeno Austrália, parecem ter demonstrado a ausência de atividade biológica deste antígeno em culturas de leucócitos humanos, o que está em contradição com nossos resultados preliminares.

Os resultados por nós obtidos sugerem, no entanto, que o sistema celular EB3 parece poder ser utilizado para demonstrar uma provável interação com o an-

tígeno Austrália, através da titulação do interferon, ou substância semelhante, produzida após estimulação com soros humanos positivos para aquele antígeno. É evidente a alteração do padrão de produção de interferon, ou substância semelhante, pelo sistema EB3, após a estimulação. Nossos resultados adquirem particular interesse se considerarmos as condições em que a estimulação foi feita, usando células EB3, com elevada concentração de vírus endógeno, em que a produção de interferon está prejudicada. A adição de soros humanos positivos para o antígeno Austrália parece ter alterado a relação inversa existente entre os níveis de interferon e o conteúdo de vírus endógeno, fenômeno já observado por Swart e Young²⁵ e que pudemos confirmar em nossas experiências. O significado destes resultados não é no entanto compreendido, não sendo possível concluir sobre que mecanismo seria responsável pela diferente interação entre os soros negativos e os soros positivos para o antígeno Austrália e o sistema EB3. São necessárias experiências adicionais no sentido de ampliar e esclarecer estes resultados preliminares.

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Dr. Jair Lício Ferreira Santos, do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP, pelas sugestões dadas na análise estatística dos resultados.

RSPU-B/280

CANDEIAS, J. A. N. — [*The interferon or interferon-like substance production of EB3 cells after inoculation with human sera containing Australia antigen*]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 9:409-15, 1975.

SUMMARY: *The production of interferon or an interferon-like substance by EB3 cell cultures exposed to human sera containing Australia antigen is described. The normal pattern of interferon production by EB3 cells not inoculated with human sera is modified, after exposure to human positive sera for Australia antigen and it is suggested that this modification may provide a criterion for interaction of Australia antigen and EB3 cells.*

UNITERMS: *Antigen, Australia. Interferon. Biological activities.*

CANDEIAS, J. A. N. — Produção de interferon ou substância semelhante em culturas EB3 inoculadas com soros humanos contendo antígeno Austrália. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 9:409-15, 1975.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AURELIAN, L. & ROIZMAN, B. — The host range of herpes simplex virus; interferon, viral DNA and antigen synthesis in abortive infection of dog kidney cells. *Virology*, 22:452-61, 1964.
2. BARINSKY, I. F. et al. — Investigation of the nature of Australia antigen. I. The absence of biological activity of Australia antigen in human blood leukocyte culture. *Arch. Virol.*, 47: 193-200, 1975.
3. BERTHOLD, H. et al. — Intrinsic interference caused by hepatitis sera. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 143:698-700, 1973.
4. BRIGHTON, W. D. et al. — Changes induced by hepatitis serum in cultured studies. *Nature*, 232:57-61, 1971.
5. CARVER, D. H. & SETO, D. S. Y. — Production of hemadsorption-negative areas by serums containing Australia antigen. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 172:1265-7, 1971.
6. DUC-NGUYEN, H. & HENLE, W. — Replication of mumps virus in human leucocyte cultures. *J. Bact.*, 92:258-65, 1966.
7. DULBECCO, R. & VOGT, M. — Plaque formation and isolation of pure lines of poliomyelitis viruses. *J. Exper. Med.*, 99:167-82, 1954.
8. FORCE, E. E. et al. — Development of interferon in rabbit dermis after infection by herpes simplex virus. *Virology*, 25:322-5, 1965.
9. FRUITSTONE, M. J. et al. — An interferon produced in response to infection by herpes simplex virus. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 117:804-7, 1964.
10. GIRON, D. J. et al. — Interferon — inducing characteristics of MM virus. *Appl. Microbiol.*, 21:387-93, 1971.
11. GRESSER, I. — Production of interferon by suspensions of human leucocytes. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 108:799-803, 1961.
12. HENLE, G. & HENLE, W. — Evidence for a persistent viral infection in a cell line derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bact.*, 89:252-8, 1965.
13. HENLE, G. & HENLE, W. — Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bact.*, 91: 1248-56, 1966.
14. HENLE, W. & HENLE, G. — Effect of arginine-deficient media on the herpes-type virus associated with cultured Burkitt tumor cells. *J. Virol.*, 2:182-91, 1968.
15. HINUMA, Y. et al. — Replication of herpes-type virus in a Burkitt lymphoma cell line. *J. Virol.*, 1:1203-6, 1967.
16. HIRSCHNAN, R. J. et al. — Virus-like particles in sera of patients with infectious and serum hepatitis. *JAMA*, 208:1667-70, 1969.
17. LEE, S. H. & OZERE, R. L. — Production of interferon by human mononuclear leucocytes. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 118:190-5, 1965.
18. LOCKART Jr., R. Z. — Production of an interferon by L cells infected with Western equine encephalomyelitis virus. *J. Bact.*, 85:556-66, 1963.
19. MARCUS, P. J. & CARVER, D. H. — Hemadsorption-negative plaque test: new assay for rubella virus revealing a unique interference. *Science*, 149: 983-6, 1965.
20. MAUGH, T. H. — Hepatitis: a new understanding emerges. *Science*, 176: 1225-6, 1972.
21. MAYNARD, J. E. et al. — Viral hepatitis and studies of hepatitis associated antigen in chimpanzees. *Canad. med. Ass. J.*, 106:473-7, 1972.
22. RABSON, A. S. et al. — Morphologic, cytogenetic and virologic studies *in vitro* of a malignant lymphoma from an African child. *Int. J. Cancer*, 1:89-106, 1966.
23. STEWART, W. E. et al. — Priming: a nonantiviral function of interferon. *J. Virol.*, 7:792-801, 1971.

CANDEIAS, J. A. N. — Produção de interferon ou substância semelhante em culturas EB3 inoculadas com soros humanos contendo antígeno Austrália. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 9:469-15, 1975.

24. STRANDER, H. & CANTELL, K. — Production of interferon by human leucocytes *in vitro*. *Ann. Med. exp. Fenn.*, 44:265-73, 1966.
25. SWART, B. E. & YOUNG, B. G. — Inverse relationship of interferon production and virus content in cell lines from Burkitt's lymphoma and acute leukemias. *J. nat. Cancer Inst.*, 42:941-4, 1969.
26. WHEELLOCK, E. F. — Virus replication and high-titered interferon production in human leucocyte cultures inoculated with Newcastle disease virus. *J. Bact.*, 92:1415-21, 1966.
27. ZUCKERMAN, A. J. — Viral hepatitis and the Australia — SH antigen. *Nature*, 223:569-72, 1969.
28. ZUCKERMAN, A. J. — Conceptual basis of viral hepatitis. *Vox Sang. (Basel)*, 19:304-7, 1970.
29. ZUCKERMAN, A. J. et al — Australia antigen as a marker of propagation of the serum hepatitis virus in liver organ cultures. *Nature*, 236:78-81, 1972.

Recebido para publicação em 24-06-75
Aprovado para publicação em 30-06-75