

## Tesis de Posgrado

# Interferon : Su inducción y relación con los procesos neoplásicos humanos

Cortada de Fortuny de De la Peña, Nuria E. A.

1973

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Cortada de Fortuny de De la Peña, Nuria E. A. (1973). Interferon : Su inducción y relación con los procesos neoplásicos humanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1424\\_CortadadeFortunydeDelaPena.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1424_CortadadeFortunydeDelaPena.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Cortada de Fortuny de De la Peña, Nuria E. A. "Interferon : Su inducción y relación con los procesos neoplásicos humanos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1973.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1424\\_CortadadeFortunydeDelaPena.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1424_CortadadeFortunydeDelaPena.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Universidad de Buenos Aires

" INTERFERON: SU INDUCCION Y RELACION CON  
LOS PROCESOS NEOPLASICOS HUMANOS "

Nuria E.A.Cortada de Fortuny de de la Peña

'1424 -

TESIS presentada para optar al título de Doctor en  
Ciencias Biológicas.

DIRECTOR DE TESIS:

Doctora Eugenia S. de Lustig

CONSEJERO DE ESTUDIOS:

Doctor Jorge M. De Carlo

A la memoria de mi padre

PROLOGO

Mi más profundo reconocimiento a todas las personas que me han brindado la oportunidad y la ayuda para aprender. En especial a mi tutora de tesis, la Dra. Eugenia S. de Lustig, quien me ha guiado, enseñado y alentado durante estos primeros años de mi transitar en la ciencia.

También mi más sincero agradecimiento a la Srta. Catalina Sasko, a la Srta. Lidia Castelluccio y al Sr. Isidoro Tolcachir por su incomparable colaboración técnica.-

Indice. . . . .	5
Prólogo . . . . .	4
Introducción. . . . .	6
A.-GENERALIDADES DEL SISTEMA INTERFERON. . . . .	8
1) Producción de Interferón	
2) Métodos de ensayo	
3) Caracterización de los Interferones	
4) Mecanismo de acción	
5) Replicación de Interferón a la profilaxis y tratamiento de las enfermedades virales.	
6) Actividad antitumoral del Interferon	
B.-ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA INDUCCION DE INTERFERON POR ACIDOS NUCLEICOS EXTRAIDOS DE TEJIDOS NORMALES Y TUMORALES. . . . .	49
C.- INDUCCION DE INTERFERON EN CULTIVOS CELULARES HUMANOS. ESTUDIO DEL PESO MOLECULAR. . . . .	65
D.- INDUCCION DE INTERFERON EN CULTIVOS DE LINFOCITOS DE PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS. . . . .	75
BIBLIOGRAFIA. . . . .	89

## INTRODUCCION

La lucha contra las enfermedades virales representó y representa todavía una de las principales inquietudes de la medicina.

El primer fenómeno de inhibición entre dos virus no relacionados antigénicamente, fue observado ya en 1937 por Findaly y Mc Callum entre los virus de la fiebre amarilla y el de la enfermedad del Rift Valley. Este hecho llamó la atención de dos investigadores ingleses, Isaacs y Lindemann quienes observaron que no había posibilidad de que este fenómeno se debiera a la formación de anticuerpos. En 1957 estos autores lograron aislar del líquido alantoico de huevos embrionados infectados con virus de Influenza atenuado, una sustancia de origen celular capaz de tener acción viral interferente, propiedad que determinó su nominación de INTERFERON.

Este hallazgo introdujo el problema de la lucha antiviral en el conjunto de las defensas naturales.

Desde su descubrimiento esta sustancia de tipo proteico ha nucleado el interés de muchísimos científicos. Esto ha sido en primera instancia debido a las enormes esperanzas cifradas en torno a su posible acción terapéutica y luego a la puesta en evidencia de su relación con otros procesos biológicos celulares fundamentales.

El Interferón también denominado "Sistema Interferón" por la complejidad de eventos biológicos que involucra, es un temprano mecanismo de defensa celular que el hombre comparte con la mayor parte de los vertebrados incluyendo los poiquilótermos.

Este sistema de defensa natural contra los virus sería desde el punto de vista evolutivo de aparición anterior a una defensa inmunitaria humoral completa y jugaría un rol de importancia en el control de las enfermedades virales de los vertebrados inferiores. H.K.Oie and P.C.Loh (1971), E.Falcoff y B.Fauconnier (1965), A.B.Beasley y M.Sigel (1967).

El sistema Interferón opera por intermedio de proteínas con características muy especiales producidas por las células frente a una gran variedad de estímulos no solamente virales, hecho que varía el concepto inicial que de él tenían sus descubridores.

Como la respuesta tipo Interferón a la infección viral se demostró que estaba mediada por su ácido nucleico, fue el propósito de la primera parte experimental de esta tesis estudiar si los ácidos nucleicos tisulares poseen el mismo poder inductor de los virales. Se estudió en particular si un ácido nucleico proveniente de un tejido tumoral tenía propiedades inductoras diferentes al de un ácido nucleico de origen tisular normal.

Siendo el sistema celular "in vitro" un método fácilmente reproducible y de precisa valoración de Interferón, se investigó su inducción "in vitro" comparándolo con otros sistemas "in vivo".

En la segunda parte experimental de la tesis se abordó el estudio del "sistema Interferón" en el Hombre analizando:

- 1) La capacidad de las células humanas "in vitro" de producir Interferón.
- 2) Las condiciones óptimas para su inducción.
- 3) Sus características fisicoquímicas.

En base a todas estas pautas previas se ha llevado a cabo un estudio comparativo de la respuesta Interferón en los enfermos neoplásicos con respecto a los individuos normales.



## A.- GENERALIDADES DEL SISTEMA INTERFERON

### 1º.- Producción de Interferón

Dado la variedad y complejidad de los procesos biológicos involucrados dentro de la producción y acción de esta sustancia, se ha convenido en referirse a él como "Sistema Interferón".

Dentro de este sistema Interferón podemos distinguir claramente dos etapas principales, la producción de Interferón que incluye tanto la inducción como la liberación del mismo y su actividad sobre las células que comprende los mecanismos de acción y los diferentes efectos biológicos que es capaz de promover sobre ellos.

Podemos hoy afirmar que la capacidad de producir Interferón es una propiedad inherente al genoma celular, y que es a su vez específico para cada especie.

Este temprano mecanismo de defensa celular, es inducido en las células por una enorme cantidad y variedad de virus, de microorganismos y sustancias químicas y se traduce en la producción de una proteína de bajo peso molecular que liberada al medio o al torrente sanguíneo es capaz de penetrar en otras células vecinas o lejanas al lugar de su producción e inducir en ellas un mecanismo de resistencia viral.

Vemos entonces que el Interferón no es por sí mismo antiviral, sino que éste estimula un mecanismo que confiere a las células propiedades antivirales.

Es importante recalcar que estas propiedades antivirales no son específicas para ningún virus. Si bien en forma teórica y general podemos decir que todas las células son susceptibles de ser inducidas a producir Interferón, hay evidentemente como en todos los fenómenos biológicos determinada elasticidad,

vemos así que hay sistemas de inducción (inductor-Cepa o tipo celular) más efectivos que otros.

### Inductores

Son capaces de inducir la producción de Interferón los virus, tanto sus cepas salvajes como las atenuadas, los inactivados ya sea por calor, rayos ultravioletas o productos químicos, y entre los organismos vivos los Protozoarios, Bacterias, Bacteriófagos, Rickettsias y Micoplasmas. También han demostrado ser inductores numerosas sustancias químicas, ya sean de origen natural (extractos de antibióticos, productos mitogénicos de plantas, constituyentes de tejidos animales) como polímeros sintéticos. Entre ellos merecen especial mención los ácidos ribonucleicos (ARN) de doble hélice como el Poli I:C (A.K.Field y col. 1967), el Cloruro de Tilorone que es primer compuesto sintético de bajo peso molecular que ha probado ser un inductor activo por vía oral, y los polisacáridos polianiónicos.

En las tablas I y II se resumen todos los inductores no virales de Interferón descubiertos hasta el presente.

Los virus poseen algunas ventajas como agentes inductores:

- a) son inductores potentes;
- b) poseen una variedad de ácidos nucleicos ADN de una o dos cadenas o ARN comprendidos en una estructura compacta;
- c) se pueden obtener en grandes cantidades, ya sea de animales, bacterias o plantas;
- d) sus mutantes letales condicionales defectivos en una o más características permiten el dilucidamiento de las etapas involucradas en la inducción.

Los inductores virales utilizados con mayor frecuencia, debido a que inducen grandes títulos de Interferón, son los representantes de los dos grupos de Mixovirus que incluyen virus patógenos respiratorios del hombre y de los animales, y los Arbovirus. También han mostrado ser inductores de

Interferón representantes de otros grupos de virus animales importantes, se repliquen estos o no en las células expuestas a ellos. Vemos así que, los Adenovirus (virus que contienen un ADN de doble cadena) son inductores muy pobres especialmente en células humanas, sin embargo inducen Interferón en células de pollo. I. Beladi y col. (1970).

Algunas preparaciones virales parcialmente inactivadas por irradiación ultravioleta o calor pueden inducir mejor Interferón que antes de la inactivación, otros virus sin embargo pierden su capacidad inductora cuando se los inactiva.

Un ejemplo de esto es el de los virus de Influenza, Newcastle, Parotiditis epidémica y Sendai, que aumentan su capacidad inductora en algunas células huésped cuando se los somete a irradiaciones suaves con luz UV o calentándolos a baja temperatura.

El virus de Sendai (Parainfluenza tipo I) cuando se lo somete a este tratamiento aumenta sin embargo su capacidad inductora en célula de ratón y la pierde sobre cultivos de leucocitos humanos, E. Falcoff (1966). Ciertos Arbovirus irradiados como los de la Encefalitis del Oeste también pierden su capacidad inductora en células L (línea de ratón tumorigénica) pero no sobre células de embrión de pollo, E. De Clerq (1965).

#### Respuesta celular in vivo:

Las células provenientes del sistema reticuloendotelial ya sean éstas circulantes o fijas, son las mejores productoras de Interferón. Sin embargo la identificación del tipo celular directamente responsable, es todavía un punto de controversia.

Trabajos de L.B. Epstein, M.J. Cline y T.C. Merigan, (1971) señalarían a los linfocitos como las células productoras,

demostrando además la necesidad de la interacción con los macrófagos para obtener una alta producción. Esto hablaría de la posibilidad de la existencia de un fenómeno de memoria tipo inmunológica para el Interferón.

En el animal intacto los mayores títulos de Interferón se encuentran en el sitio tisular de mayor replicación viral.

Los órganos que representan una importante fuente de Interferón circulante son, el bazo, el hígado, los pulmones y el timo.

#### In vitro:

Una gran variedad de células en cultivo son capaces de producir Interferón pero esta capacidad varía enormemente de cepa a cepa.

El grado de diferenciación celular importa a la capacidad de ser inducibles de las células, de acuerdo al grado y tipo de diferenciación celular habría diferencias en la represión de los genes para Interferón. Fig. 1 y las células responderían solo en la forma en que la derepresión de los mismos está permitido para ese tipo celular, S.E.Grossberg (1972).

#### Mecanismo de inducción:

A pesar de que el Interferón es producido por las células en respuesta a un gran número de agentes, los mecanismos de reconocimiento de la célula para con el inductor y las etapas subsiguientes involucradas en la producción del mismo son hasta hoy poco conocidas.

El lugar o el mecanismo celular de reconocimiento del inductor fueron y siguen siendo debatidos. Luego de haber demostrado A. Isaacs (1963) que los ácidos nucleicos eran los responsables de la inducción por medio de virus y que era necesaria la penetración de ellos a la célula para que

ésto ocurriera, acaba de ser demostrado por A.K.Field y col. (1972) que en el caso de la inducción con Poli I:C no es imprescindible una penetración celular del ácido nucleico para lograr la inducción.

Recientemente A. Meayer y A.C.Burque, han sugerido que la inducción de Interferón por virus de la enfermedad de Newcastle no infectivo dependería de la actividad del virión y de la RNA polimerasa llevada por él.

Para poder comprender las bases de la inducción de un virus sobre células de una especie animal determinada, es necesario tener una información muy precisa de la interacción temprana virus-célula especialmente del efecto de los virus sobre el metabolismo celular y de las actividades de las enzimas asociadas al virus.

Las experiencias realizadas con inhibidores metabólicos como la 5-fluorodeoxiuridina y la aminopterina que bloquean la síntesis de ADN demuestran que ésto no es esencial para la producción de Interferón. Sin embargo los agentes que producen daño al ADN celular como la irradiación con luz UV y la mitomicina C inhiben su formación D.C. Burke, J.J.Skehel y A.J.Hay (1968).

Vemos además que los inhibidores de la síntesis proteica como la actinomicina D que inhibe directamente la transcripción ADN-mARN bloquean la producción de Interferón, mientras que otros inhibidores como la cicloheximida, la parafluorfenilalanina y la puromicina inhibidores funcionales de la síntesis proteica también inhiben o detienen su formación, A.K.Field y col. (1972).

Esto sugiere que para una producción continua de Interferón las células inducidas requieren una síntesis de ARN-ADN dependiente y un funcionamiento activo de toda la maquinaria celular destinada a la síntesis proteica. J.Vilcek (1970).

El hecho de que un bloqueo a nivel de transcripción genética inhiba la producción de Interferón implica la síntesis de un ARN mensajero específico para Interferón. Esto ha sido demostrado por J. De Maeyer-Greiguard, E. DeMaeyer y L. Montagnier (1972) que inyectando un ARN extraído de células inducidas a producir Interferón de una especie (ratón) sobre células de otra especie (mono) indujeron en esta última la producción de Interferón específico de la primera especie (ratón).

Se confirma así la existencia de un ARN específico para Interferón en cada especie y su posible traducción en un sistema heterólogo.

La posibilidad de detectar la expresión de un ARN mensajero para una proteína específica constituye además una valiosa contribución al estudio de la regulación de la expresión genética en células eucarióticas.

### Liberación de Interferón

Uno de los eventos que caracteriza una inducción de Interferón es su rápida liberación al medio extracelular.

En general se puede detectar Interferón a partir de las 2 horas de haber puesto en contacto a las células con el inductor y la liberación del mismo aumenta hasta alcanzar un pico máximo a un tiempo que está dado por el sistema utilizado, disminuyendo luego paulatinamente. Este ciclo se completa en la mayor parte de los sistemas en 24 horas, luego de las cuales se puede obtener un nuevo ciclo de producción efectuando una reinducción. La respuesta de los diferentes sistemas a una reinducción es disímil por lo que no se puede dar una pauta común de comportamiento.

Es de mencionar aquí los estudios de A. Billiau, H. van den Berghe y P. de Somer (1972) sobre la respuesta de los

cultivos de fibroblastos humanos, frente a la inducción de Interferón con Poli I:C. Demuestran estos autores que el tiempo óptimo de contacto de las células con el inductor es de 2 horas, el pico máximo de liberación del Interferón lo encuentran a las 6 horas de remover el inductor. A las 24 horas de la primera inyección reinducen, obteniendo un estado de hiperreactividad.

El lapso de tiempo entre una inducción y la siguiente no puede ser menor de 20 a 24 horas puesto que, previo a este tiempo, la célula es refractaria a una reestimulación.

Según J.Vilcek, (1970) el estado refractario podría estar causado por la síntesis de una proteína represora durante la inducción que inhibiría la traducción del mRNA para Interferón, este autor no descarta tampoco la posibilidad de la existencia de factores de control que afectarían etapas post-traduccionales como podrían ser la conversión de una proteína precursora en Interferón activo o la degradación del mismo.

En un estudio muy minucioso sobre refractariedad o estado de hiporeactividad que se produce "in vivo" o "in vitro" debido a repetidas estimulaciones de Interferón E.C.Borden y F.A.Murphy (1971) llegan a conclusiones similares.

a) La depresión de la producción de Interferón no estaría causada por el inhibidor en sí mismo, sino por otro factor o represor sintetizado de "novo" que aparece algunas horas más tarde que éste y bloquea su síntesis.

b) La cinética del desarrollo del estado refractario es perfectamente separable del de la Inducción de Interferón y sería una manifestación tardía de la respuesta.

c) El grado de refractariedad depende de la cantidad de Interferón inducido.

M. Ho y M.K.Breinig (1965) y J.S.Youngner y J.V.Hallum (1969) en base a estudios de Inducción con endotoxinas en las que

obtienen una muy rápida producción de Interferón que no es inhibida por inhibidores de la síntesis proteica, sino por el contrario algunas veces es aumentada, postulan que habría un estado de Interferón preformado y otro en el que se produciría una síntesis "de novo".

S.E.Grossberg y J.J.Sedmak (datos no publicados), teniendo en cuenta muchas de las observaciones de heterogeneidad de peso molecular y diferencias de tiempo en la producción de Interferón dependientes del Inductor han elaborado una hipótesis de regulación de la producción de Interferón. Esta hipótesis cuyo modelo propone la existencia de 2 genes para la codificación de los Interferones está explicada y representada esquemáticamente en la Fig.I.

Existen además factores o productos químicos que son capaces de incrementar la síntesis de Interferón en algunos sistemas.

D.H.Carver y P.I.Marcus en 1967 encontraron que las células de pollo envejecidas in vitro tenían la capacidad de aumentar la producción de Interferón, y N.Kato y H.Eggers (1969) aislaron y caracterizaron de los sobrenadantes de cultivos envejecidos de embrión de pollo no infectados un factor denominado "aged-media-factor" que, agregado a cultivos celulares jóvenes era capaz de aumentar su capacidad productora de Interferón.

Hay también un grupo de sustancias polibásicas (albúmina metilada, neomicina, streptomina, sulfato de protamina y el DEAE dextran) que tienen la propiedad de aumentar la síntesis del Interferón inducido por ARN sintéticos de cadena simple o doble. A.Billiau y col.(1969) y F.Dianzani y col. (1969).

El mecanismo de acción de estas sustancias sería su combinación con los ácidos ribonucleicos en forma de proteger-



Los de la acción de la ribonucleasa lo que aumentaría de esta forma su penetración de las células.

## ESQUEMA HIPOTETICO PARA LA PRODUCCION Y REGULACION DE LOS INTERFERONES

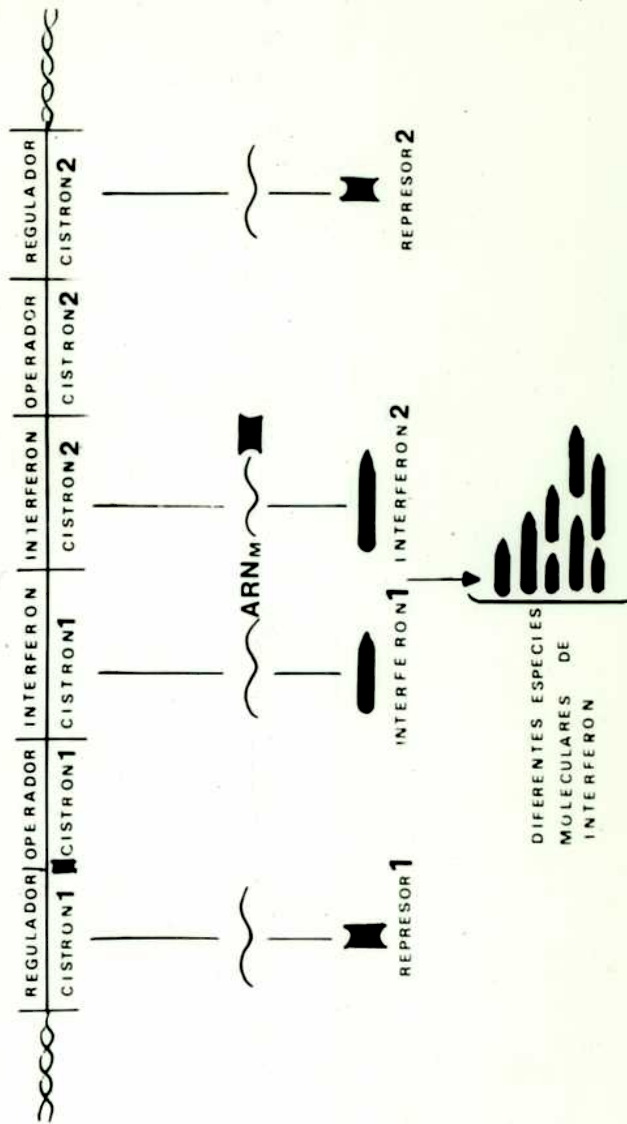


FIGURA I: ESQUEMA HIPOTETICO PARA LA PRODUCCION Y LA  
REGULACION DE LOS INTERFERONES.

Hay dos genes para Interferón, cada uno con un regulador que codifica para un represor. El inductor se uniría al represor Interferón y el operador Interferón pondría en funcionamiento la transcripción del gene estructural para la posterior formación de la proteína Interferón I en general de bajo peso molecular.

La inducción viral requiere tiempo y es inhibida por la administración temprana de actinomicina D.

El gene II para Interferón no estaría regulado de la misma manera y podría producir su mensaje continuamente pero sin llegar a expresarlo plenamente debido a estar regulado por un represor a nivel traduccional. Este gene II sería el que se expresa en el caso de la Inducción con endotoxinas en la que hay una rápida liberación de Interferón de alto peso molecular.

El operador Interferón podría ejercer control sobre el gene estructural II dependiendo esto del inductor utilizado. La interacción de los dos genes permitiría la eventual formación de cinco especies moleculares de Interferón diferentes. Múltiples especies moleculares de Interferón han sido observadas en muchos animales con un solo inductor.

INDUCTORES NO VIRALES DE INTERFERON

Microorganismos

Toxoplasma gondii.  
Besnoitia jellisoni.  
Bacterias Coliformes.  
Salmonella (grupo).  
Klebsiella (grupo).  
Borderella pertussis.  
Haemophilus influenzae.  
Listeria monocytogenes.  
Brucella abortus.  
Rickettsia prowazeki.  
Rickettsia burneti.  
Rickettsia tsutsugamushi.  
Bedsonia (agentes TRIC).  
Mycoplasma pneumoniae (PPLO).  
Francisella tularensis.  
Serratia anarcescens.  
Coxiella burneti.  
Plasmodium berghei.  
Trypanosoma cruzi.

Productos Microbianos

Endotoxinas (lipopolisacáridos de Bacterias Gram neg.).  
Streptolisina- O-Streptococcus pyogenes  
Tuberculina.  
Mananos de Candida albicans y de Saccaromyces cerevisiae.  
Antígeno Fasi I de C. burneti.  
Complejo ARN-polisacárido de Cunninghamella blakesleeana.  
Cicloheximida (Streptomyces griseus).  
Kanamicina.  
Productos de plantas  
Fitohemaglutinina (Phaseolus vulgaris).  
Mitógeno de Phytolacca americana.  
Extractos de Hongos  
Cortinellus shiitake ("Donko").

INDUCTORES NO VIRALES DE INTERFERON

Productos Químicos

Copolimero del Piran.

Acido algínico.

Sulfato de Polivinilo.

Polisacáridos fosforilados

Fosfato de Dextran.

8-Mercaptoadenina.

Productos Químicos Sintéticos

Bis-DEAE fluorene, o

Tilorone.

Copolimeros policarboxílicos.

Acidos nucleicos de origen natural

ARN doble cadena:

Statolon-Micofago de

Penicillium stoloniferum.

Melenina: Micofago de P. funiculosum.

E.coli no permisiva infectada con el fago T 2.

Reovirus 3

Colifago MS 2 (FR).

Virus de la polihedrosis citoplasmática (CPV).

Virus del arroz enano.

ARN de una cadena:

Levadura.

ADN

Esperma de Salmon.

Sarcoma 180 tumor.

Tumor producido por Metilcolantreno.

Tumor inducido por el virus del

Sarcoma de Rous (RSV).

Acidos nucleicos sintéticos

ARN de una cadena:

Policitidilico (Poli -rC).

Poliinosinico (Poli-rI).

ARN de Doble cadena:

Poliribocitidilico.

Poliriboinisinico (Poli I:C)

Tiofosfatos análogos de poliribonucleotidos.

Homopoliribonucleotidos.

## 2°.- METODOS DE ENSAYO PARA TITULACION DE INTERFERON

Teniendo en cuenta que el Interferón es rápidamente liberado de las células productoras, todos los métodos de ensayo incluyen la recolección de los medios extracelulares los que son sometidos a un bio-ensayo.

En general, la titulación del Interferón se basa en la inhibición de la replicación de un virus o de componentes virales en las células tratadas con Interferón, comparándolos con los de las células no tratadas.

La elección de un ensayo con virus está determinada por la sensibilidad al Interferón y la de un determinado animal de experimentación o de un cultivo celular en base a la especificidad de la especie huésped y a la sensibilidad al desarrollo de un mecanismo antiviral.

Vemos así que un ensayo tipo de Interferón estaría compuesto por los siguientes pasos:

- 1° Tratamiento del cultivo celular o del animal de laboratorio elegido con distintas diluciones de Interferón.
- 2° Inoculación del virus revelador.
- 3° Titulación del virus revelador emergente por: a) Hemaglutinación, b) hemoadsorción, c) formación de placas, d) efecto citopatogénico (que se puede evaluar en base a la capacidad de las células sobrevivientes a la citólisis viral de captar un colorante vital), e) infectividad, f) inhibición de la síntesis del ARN viral, g) enfermedades inducidas en animales, h) modificación del metabolismo celular, j) inhibición de la producción de una proteína estructural de los Mixovirus como la neuraminidasa. Los más utilizados son, el de reducción de placas y el de reducción de efecto citopatogénico en cultivo de tejidos.

El título de Interferón contenido en una muestra está dado

como una medida de la inhibición de la replicación viral en el sistema de ensayo elegido y se expresa como la recíproca de la dilución del mismo que da "1 unidad efecto".

Siendo una unidad efecto la que está contenida en la mayor dilución de Interferón que reduce a la mitad el título del virus revelador.

En la elección del tipo de ensayo se tienen en cuenta fundamentalmente el tipo de Interferón y el número de muestras a valorar. Para tener un buen sistema para titular Interferón es requisito indispensable la elección de un virus que sea infectivo para las células a utilizar y al mismo tiempo sensible a la acción antiviral del Interferón. Entre los virus más utilizados están el de la Estomatitis vesicular, el virus de Sindbis y el de vacuna que son infectivos para muchos cultivos celulares.

Los virus de Chikungunya, O'nyong-nyong y Semliki Forest se utilizan para el Interferón de pollo, mientras que para el Interferón de ratón son muy utilizados los de Semliki Forest y el de la Encefalitis equina del oeste.

Respecto de la elección del cultivo celular, éste debe pertenecer a la misma especie de que proviene el Interferón a titular y ser sensible a la acción de éste. Esto último es importante dado que muchas líneas celulares continuas derivadas de embriones muy jóvenes manifiestan una baja sensibilidad al Interferón.

Los cultivos celulares más utilizados en ensayos de Interferón son:

1° Cultivos primarios y secundarios de embriones que hayan cumplido las 3/4 partes del desarrollo fetal.

2° Células L de ratón cepa LCL 1.

3° Fibroblastos humanos primarios o diploides derivados de fetos humanos casi a término, de niños recién nacidos o

de adultos.

4° Células AF/57 humanas diploides, derivadas de células de líquido amniótico de un feto de 6 meses.

La sensibilidad de las células a la acción del Interferón sería una función determinada genéticamente y la falta de sensibilidad estaría relacionada a la actividad de un inhibidor o represor de la acción del Interferón. C.Chany y col. (1971).

Existen importantes evidencias de que los mecanismos de regulación celular están involucrados en la acción del Interferón. M.A.Güggenheim y col. (1969).

Ha sido demostrada la presencia de factores que afectan el estado antiviral inducido por el Interferón en tejidos embrionarios jóvenes, en células tumorales, en cultivos infectados con virus, en las membranas del corion y del amnios, en el líquido alantoico de huevos infectados con la cepa Herts 33 del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y en el suero fetal bovino, F.Fournier y col. (1969), C.Chany (1971), C.Chany (1967), Truden y col. (1967), B.Galliot y col. (1973), K.Pancker y M.Boxaca, (1967).

Estos factores denominados TAI (Tissue antagonist) y Estimulón no tienen acción directa sobre el Interferón o sobre los virus sino que su acción está mediada por células y actuaría sobre la actividad de la proteína antiviral. La naturaleza química de estos "bloqueadores" es compleja, los trabajos de F. Fournier y col. (1969) y de B.Galliot y col. (1973) sugieren la posibilidad de que en el caso del Estimulón se trate de una glicoproteína.

El significado biológico de esta sustancia plantea la hipótesis de que contribuya a la disminución del estado antiviral en las células de replicación lenta restituyendo la susceptibilidad a los virus, siendo también un elemento



importante en el mantenimiento de las infecciones virales latentes.

Cuando se comparan los sistemas "in vitro" e "in vivo" el estado antiviral debería persistir "in vivo" más de lo que en realidad persiste. El bloqueador en cuestión contribuiría a este hecho. Esto ayuda a explicar la refractariedad natural o inducida de muchas células o tejidos a la acción del Interferón.

Esta hipótesis proviene del hecho que la mayoría de las células en los diferentes tejidos no se dividen activamente, el estado antiviral persiste hasta la división celular y la primera generación luego de la replicación celular está parcialmente protegida contra los virus.

Los Interferones producidos en las distintas especies animales y por las diferentes cepas o líneas celulares comparten algunas características biológicas y fisicoquímicas que las separan y diferencian ampliamente de otros conocidos inhibidores de virus.

Para evitar la identificación equivocada de una inhibición viral o de un evento biológico como mediado por Interferón es indispensable comparar las propiedades del inhibidor en estudio con aquellas que son particulares y distintivas de un Interferón.

Una caracterización suficiente de Interferón debe incluir: a) Comprobación de su origen celular no viral; b) inactivación del mismo por acción de enzimas proteolíticas tales como la tripsina; c) especificidad de especie huésped para su acción; d) actividad antiviral mediada por células; e) falta de especificidad viral respecto de su acción antiviral; f) propiedades fisicoquímicas específicas.

a) Origen celular del Interferón

La demostración del origen celular del Interferón incluye la utilización de metodologías que permitan eliminar la posibilidad de que el inhibidor sea una partícula viral interferente, para ello se utiliza la ultracentrifugación a 100.000 g durante 4 horas en presencia de 0,06% de gelatina lo que permite sedimentar las partículas virales interferentes.

Otro método utilizado es el de incubar el inhibidor viral con anticuerpos (suero hiperinmune) contra el virus inductor.

En ambos casos el título de Interferón del sobrenadante debe permanecer constante.

La interrupción de la síntesis del ARN celular con actino-

-micina D inhibe la producción de Interferón en un 80% de las células inducidas. En forma similar la interrupción de la síntesis funcional de proteínas celulares con cicloheximida p-fluorfenilalanina o con puromicina inhibe también en un 80% la producción de Interferón.

b) Actividad antiviral mediada por células.

El Interferón no inactiva los virus directamente uniéndose a ellos como lo hacen otros inhibidores virales. No es antiviral por sí mismo sino que al penetrar en las células sensibles a él, desarrolla en ellas un mecanismo de acción antiviral.

Para el desarrollo de este mecanismo es necesario que las células se encuentren en un estado de síntesis continua de ARN y de proteínas celulares.

Todos los inhibidores a nivel de transcripción o de traducción genética imposibilitan que en las células tratadas con Interferón se ponga en marcha el mecanismo que las conduce al estado de resistencia viral. Es por lo tanto suficiente la incorporación al medio de los inhibidores de síntesis proteica conjuntamente con el Interferón a probar para que en las células no se desarrollen los mecanismos de actividad antiviral.

c) Efecto de enzimas proteolíticas

La comprobación de la naturaleza proteica del Interferón es una propiedad muy importante del mismo. El procedimiento usual para esta verificación es la incubación del inhibidor con una concentración de 100 ug/ml. de tripsina recristalizada. La digestión con tripsina inhibe el 80% de la actividad del Interferón. La inhibición con otras enzimas proteo-

líticas también es efectiva.

d) Especificidad de especie huesped

Esta caracterización consiste en comparar el título antiviral del inhibidor sobre células homólogas con el título del mismo sobre células heterólogas. Resulta así por ejemplo, que el Interferón producido en la especie pollo solo será activo sobre células de pollo.

Existen sin embargo algunas excepciones a esta regla que es necesario mencionar y que indicarían que el concepto presente de especificidad de especie de la acción del Interferón debe ser revisada o quizás modificada.

Se ha encontrado reactividad cruzada entre las células humanas y las de mono con Interferones heterólogos R.A. Bucknal (1967). También entre distintas especies de aves dentro de un determinado orden hay una considerable reactividad cruzada, por lo que quizás se debía hablar de especificidad de familia u orden, J.M. Moehring y W.R. Stinegring (1970).

Sin embargo hay que tener en cuenta que en general el Interferón es más activo sobre células de la misma especie que lo produjo.

Una clara excepción a esta regla es la reactividad cruzada que observaron J. Desmyter, W. Rawls y J.L. Melnick en 1968 entre los Interferones humanos y de conejo.

Estos investigadores observaron que el Interferón humano producido por fibroblastos humanos diploides (FS) era 20 veces más activo sobre células de riñón de conejo que sobre células humanas.

R.E. Levy, R.R. Golgher y K. Paucker, (1970) confirmaron y amplificaron este descubrimiento para los Interferones humanos preparados en células diploides y heteroploides de varios orígenes,

todos los cuales conferirían resistencia antiviral a las células de conejo por lo menos en el mismo grado que a las células humanas.

Un efecto similar aunque de menor grado se observó con Interferones de leucocitos humanos sobre células L de ratón.

Este hecho nos hablaría de una posible similitud estructural entre los Interferones humanos, de conejo y de ratón, aunque el efecto inverso sin embargo no se observa pues los Interferones de conejo y de ratón no protegen las células humanas.

Los tests de neutralización cruzada con suero-anti-Interferón revelan que tanto el suero anti-Interferón conejo, como el anti-Interferón células L inhiben el efecto protector del Interferón humano.

En forma similar pero en menor intensidad el suero anti-Interferón humano inhibe las acciones de los Interferones de conejo y de células L, aunque estas últimas no son protectoras sobre células humanas.

La presencia de antígenos determinantes comunes entre huéspedes que están muy separados desde el punto de vista taxonómico es consistente con la observación de reacciones cruzadas entre las células de conejo y las humanas. T.N. Harris (1958).

En vista de estos descubrimientos no se aplica en el presente un muy estricto criterio respecto de la caracterización de Interferones en lo que se refiere a su especificidad de especie.

#### e) Falta de especificidad viral de la acción antiviral.

Una de las propiedades relativamente específica de la resistencia tipo Interferón, es su amplio espectro de actividad antiviral. Esto se demuestra en forma sencilla haciendo

ensayos de un Interferón dado en el que se utilizan varios virus no emparentados como reveladores.

Teniendo en cuenta las limitaciones tales como, que no todos los virus se replican en todos los sistemas celulares, vemos que un determinado Interferón es activo para cualquier virus.

Existen sin embargo algunas excepciones a esa regla, en las que no hay acción antiviral de Interferón, como son la del virus de la Polio, replicado sobre células de Primates, la del virus de Newcastle, replicado sobre células de pollo y la de ciertas cepas de Herpes simplex, replicado sobre células de roedores.

#### f) Propiedades físico químicas

La actividad biológica de los Interferones está mediada por proteínas que comparten algunas características físico químicas muy particulares.

Entre ellas está su estabilidad dentro de un rango muy amplio de pH- (pH2 a pH9); su estabilidad al calentamiento durante 1 hora a 56° ; su estabilidad a consecutivas congelaciones y descongelaciones ; su propiedad de no ser dializable; y la de no sedimentar a 100.000 g durante 2 horas. Algunos Interferones pueden ser más lábiles que otros a estas propiedades.

Aunque hasta el presente no ha sido posible purificar completamente ningún Interferón, se han podido determinar algunas pautas físico químicas de los mismos, como el espectro de pesos moleculares que van desde 20.000 a 160.000 entre los cuales están comprendidos varios tipos de Interferones.

Los minuciosos trabajos de W.A.Carter (1970) aportan una valiosa información al respecto. En estudios realizados sobre Interferón de ratón e Interferón humano utilizando

técnicas de purificación por precipitación diferencial, centrifugación, cromatografía en gel y "isoelectric focusing" este autor determinó que las moléculas de ambos Interferones estaban compuestas por el agregado de 2 subunidades proteicas idénticas desde el punto de vista químico y de su actividad biológica.

El Interferón de ratón tiene así un peso molecular de aproximadamente 38.000 daltons y contiene 2 subunidades de 19.000 daltons.

El Interferón humano tiene un peso molecular de 24.000 y contiene 2 subunidades de 12.000 cada una.

En cuanto a los componentes isoelectricos de los distintos Interferones, muchos investigadores establecieron que éstos eran muy heterogéneos. Este hecho llevó a D.Stancek, M.Gressnerova y K.Paucker (1970) y K.H.Fantes (1970) a una reinvestigación de las cargas moleculares de los Interferones de ratón, de conejos y humanos. Dado que otras propiedades amén de la carga eléctrica pueden determinar el comportamiento de las proteínas en las resinas de intercambio ionico y la unión o endoosmosis pueden introducir artificios sobre la migración electroforética, la resolución de estas técnicas para la determinación de los puntos isoelectricos resulta cuestionable.

Teniendo en cuenta que las proteínas pueden aparecer homogéneas sobre la base de criterios inmunológicos, electroforéticos o por virtud de su cristalización, estos autores utilizando la separación por "iselectrofocusing" técnica de W.A.Susor y col. (1969) de los distintos componentes isoelectricos en un gradiente de pH en anfolito que permite una amplia resolución de las preparaciones proteicas determinaron que:

1°. Los Interferones de ratón inducidos por NDV o por poli I:C son heterogéneos respecto de su composición isoelectri-

-ca, siendo predominantemente alcalino con los picos de mayor actividad biológica entre los pH 6 y pH 9.

2° Los Interferones humanos inducidos por NDV o por poli I:C sobre distintos tipos celulares son también heterogéneos respecto de su punto isoeléctrico, manteniéndose todos los picos de actividad entre pH 3 y pH 7. Aunque ambos Interferones son de naturaleza predominantemente acídica en el inducido por NDV se encuentran los picos de actividades más dispersos.

3° El Interferón preparado con células de riñón de conejo tiene componentes isoeléctricos activos dispersos en un amplio rango de los gradientes pero predominantemente entre pH 5,5 y pH 7 con un pico máximo de pH 6.

4° El Interferón inducido por virus en líquido alantoico de embrión de pollo, K.H, Fantes (1969) tiene también componentes isoeléctricos heterogéneos, encontrándose los picos activos dispersos en un rango desde pH 6,6 a pH 7,1.

El hecho de que diferentes inductores sobre un mismo tipo celular induzcan Interferones con perfiles isoeléctricos diferentes sugiere que los distintos inductores pueden, en determinados sistemas, activar o promover la síntesis de proteínas o Interferones disímiles dentro de la misma célula.

El carácter heterogéneo de los Interferones con respecto a su carga isoeléctrica, no permite sin embargo ninguna especulación con respecto a si la actividad biológica va unida a las distintas moléculas de diferentes cargas, o si en realidad nos encontramos realmente frente a varios Interferones diferentes.

No hay que descartar tampoco que la heterogeneidad puede también, en alguna medida, ser el resultado de la degradación o modificación de las proteínas durante el aislamiento.

Sin embargo es sumamente probable que muchas de las múl-



tiples formas moleculares estén presentes dentro de la célula.

#### 4.- MECANISMOS DE ACCION

La expresión de la actividad o el estado de resistencia antiviral inducido en las células por Interferón está constituido inicialmente por un proceso que comprende 2 fases: inducción del estado antiviral y penetración. La primera de ellas, la inducción del estado antiviral es independiente de la concentración de Interferón externa e implicaría un mecanismo de reconocimiento a nivel de membrana celular.

La fase de penetración es por el contrario dependiente de la concentración de Interferón externa e involucra un mecanismo de transporte activo.

Se puede modificar la expresión de actividad del Interferón, afectando cualquiera de estas dos fases del proceso.

Esto fue comprobado por R.B.Stewart y E.T.Sheaff (1972) con una serie de experiencias que comprendían el bloqueo del sistema o aparato de penetración con Interferón inactivado con tripsina que compite con el Interferón por el sitio activo y reducción de la penetración de un sistema inducido en presencia de paraclorobenzoato de mercurio (p-CMB) que se une a los grupos sulfidrido del Interferón y reduce el transporte activo del mismo.

El hecho de que la penetración de Interferón sea un componente inicial importante para el posterior desarrollo de su actividad, explicaría los diferentes niveles de estado antiviral que pueden llegar a alcanzar las células según su especie, tipo celular, grado de diferenciación o de transformación.

Una vez finalizado el proceso de penetración celular el Interferón acciona el desarrollo de un complejo mecanismo de defensa celular.

Las experiencias de S.Yamazaki y R.Wagner (1970), P.I.Marcus y col.(1971) y de H.S.Bialy y Colby(1972), diseñadas para estudiar la resistencia celular inducida por tratamiento con Interferón en las siguientes etapas; detención de síntesis proteica celular, replicación del ácido nucleico viral, citopatogeneidad y síntesis proteica viral- revelan, que en las células tratadas con Interferón previo a la infección con virus se inhibe la síntesis del ARN o del ARN mensajero temprano del virus inducido por la Polimerasa del virión, y la síntesis proteica viral, pero no se puede prevenir la detención de la síntesis proteica celular.

Esto supone que el sistema Interferón puede no consistir en una sola especie molecular con un sólo modo de accionar sino que este sistema puede involucrar reacciones que inhiban independientemente la traducción viral, la transcripción del ARN viral o el proceso de transcripción y traducción virales asociados.

El mecanismo por el cual se produce la inhibición de la producción de las proteínas virales, ha sido objeto de múltiples hipótesis, basadas sobre estudios con inhibidores de síntesis proteicas en sistemas inducidos, y sobre experiencias realizadas en sistemas inducidos libres de células en los cuales es posible medir la formación de proteínas marcadas heterólogas en presencia de su ARN mensajero específico, F.Dianzani y col. (1969), I.Kerr (1970) y E.Falcoff y R. Falcoff (1972).

Los trabajos con inhibidores de la síntesis proteica demuestran que, para que el mecanismo de resistencia viral se desarrolle en un sistema celular, luego de su tratamiento con Interferón, es requisito indispensable la síntesis de ARN mensajero y de proteínas. Este hecho llevó a P.I.Marcus y a J.M.Salb (1966) a postular un mecanismo de acción basado en la síntesis de una proteína inhibidora de la traducción

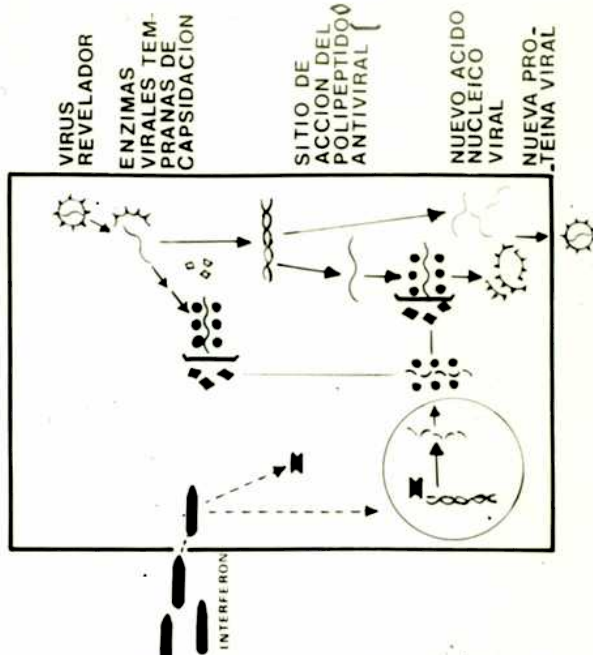
genética viral (TIP).

El poder demostrar el bloqueo de la síntesis de proteínas virales en forma diferencial respecto de las celulares en los sistemas tratados con Interferón fue una tarea ardua que recién obtuvo resultados concluyentes en los recientes trabajos de E.Falcoff y R.Falcoff (1972). Demuestran estos estudios, en un sistema libre de células, que el tratamiento con Interferón bloquea completamente no sólo la síntesis de proteínas virales, sino también la síntesis de cualquier proteína foránea al sistema.

Esto cuestiona y replantea todo el sentido del modo de accionar del sistema Interferón, señalándolo como un mecanismo regulador de la síntesis proteica en células de mamíferos.

En la figura II se muestra un esquema en el que están considerados los mecanismos de producción y acción del Interferón teniendo en cuenta todas las evidencias experimentales estudiadas hasta el presente.

II - ACCION



I - PRODUCCION

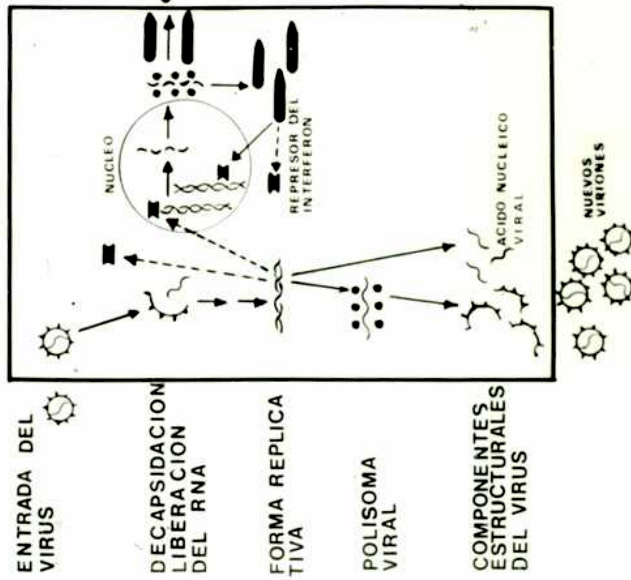


FIGURA II: ESQUEMA DE LOS CONCEPTOS SOBRA LA PRODUCCION (I)  
Y ACCION (II) DEL INTERFERON

I) Se utiliza como ejemplo de inductor, un virus ARN de una sola cadena. Se supone que la actividad inductora está desarrollada por su forma replicativa doble cadena.

Las etapas de la replicación viral se muestran para indicar que los productos celulares pueden ser tanto nuevos virus como Interferón. El inductor de Interferón se une al represor del gene para Interferón localizado en el DAN del huésped. Esta unión permite la derepresión del genoma del huésped para la producción de ARNm específico el cual es inducido por la maquinaria ribosómica celular. Los Interferones se liberan rápidamente de las células para conferir protección a las células vecinas pero pueden también inducir resistencia antiviral en la misma célula.

II) Los Interferones pueden actuar en la superficie celular o penetrar a las células para unirse al represor del cistron del huésped que codifica para la proteína antiviral.

Luego de la derepresión se produce la proteína antiviral por intermedio de la maquinaria celular normal.

Esta proteína inhibe la replicación viral a nivel ribosómico. Se inhibe de esta manera la producción de enzimas virales tempranas, los ácidos nucleicos virales, y las proteínas estructurales, lo que resulta en una reducción del título viral.

## 5.- APLICACION DE INTERFERON A LA PROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES VIRALES.

El concepto de utilización de la interferencia viral en la profilaxis y el tratamiento de las enfermedades virales proviene de observaciones clínicas y experimentales.

Los diseños experimentales en los estudios de interferencia viral con Interferón han sido de dos tipos:

- 1) La administración de Interferón exógeno.
- 2) La inoculación de un agente o producto inductor de Interferón.

1) Las experiencias en que se ha utilizado Interferón exógeno para prevenir una infección viral han estado frecuentemente limitadas por el factor de dosis dado que en muchos casos es difícil producir fuera del huésped títulos de Interferón suficientes para inhibir la replicación viral en los sitios de infección críticos.

Hay sin embargo algunos autores que han efectuado con éxito experiencias de este tipo. En 1962 B.R.Jones, J.E. K.Galbraith y M.K.Alhussaini trataron queratitis humana causadas por el virus de vacuna con aplicación de Interferón producido en cultivos de células de riñón de mono obteniendo muy buenos resultados. En 1966 E.Falcoff y col. trataron enfermos de leucemia mieloide con Interferón inoculado en forma endovenosa de los cuales 7 eran leucemias linfáticas, 3 eran citomegalias y 1 tenía Herpes generalizado.

En ningún caso se observaron efectos secundarios y el tratamiento con Interferón se consideró efectivo.

En lugar de inyectar el virus o el inductor para estimular la formación de Interferón también es posible la

administración en forma local mediante inhalaciones o aplicaciones tópicas.

Este método ha dado excelentes resultados en la prevención de enfermedades virales de tracto respiratorio superior como las que produce el virus de Influenza y en las infecciones oculares con virus de Herpes simplex o vacuna. V.D.Soloviev (1968) y T.Kishida y col. (1970) inoculando Interferón en forma de aerosol en la cavidad nasal y en la mucosa nasofaríngea respectivamente, en un número significativo de voluntarios infectados luego de 48 a 72 horas con virus de Influenza obtuvieron protección efectiva contra esta enfermedad.

Con respecto a la administración de Interferón exógeno T.Kishida y col. demostraron recientemente que éste puede ser efectivo también a través de la barrera placentaria confiriendo protección al feto y al neonato contra una infección viral.

La posibilidad de administrar Interferón durante la preñez que se transmita en forma vertical al feto o al recién nacido podría resultar de enorme aplicación humana en casos de virus como el de la rubeola, previniendo efectos teratógenos del feto por acción viral.

## 2) Inducción de Interferón

a) Con virus.— Los trabajos en que se utilizó el segundo tipo de diseño experimental inoculando un agente inductor en el huésped, han sido los que han aportado sin embargo resultados más positivos y los que han abierto un camino de real posibilidad terapéutica.

Esto es quizá sólo debido al simple hecho de que se induce más Interferón en el huésped del que se puede aplicar a éste en forma pasiva. Las primeras experiencias demostrativas de



ésto en el hombre fueron las de E.F.Wheelock y W.A.Sibley (1964) y J.K.Petralli y col. (1965) quienes detectaron la presencia de Interferón en la sangre de chicos que habían sido inoculados con vacuna del Sarampión subcutáneamente y observaron que en estos niños la vacunación antivariólica con virus de vacuna no era factible pues su piel estaba protegida contra la infección viral.

b) Con otros inductores.-Los inductores no virales como el poli I:C inducen grandes títulos de Interferón ya sea su administración en forma inyectable o externa, y su acción terapéutica es efectiva en animales, K.Munk y T.H.Frick (1972) y A.K.Field y col. (1967).

Sin embargo su administración para uso humano se ve impedida por los efectos tóxicos colaterales que acarrea. Estos efectos tóxicos han sido también demostrados "in vitro" por W.E.Stewart y col. (1972).

Estos autores comprobaron que la presencia de Interferón sensibiliza las células haciéndolas más sensibles a los posibles efectos tóxicos de otras sustancias e incluso de sus propios metabolitos. Por lo tanto la utilización en el hombre de un buen inductor de Interferón acarrearía aparte de la posible toxicidad propia de la droga, la sensibilización de las células a sufrir esa toxicidad con exacerbación debido a una gran producción de Interferón. No se puede tampoco dejar de lado que el paciente puede estar sufriendo una infección viral subclínica y por lo tanto posea Interferón circulante que lo sensibiliza a los efectos tóxicos del poli I:C.

Otro de los problemas que trae la utilización de inductores de Interferón es el mantenimiento de niveles efectivos del mismo en la circulación debido al ya mencionado fenómeno

de hiporeactividad o refractariedad.

El descubrimiento reciente de L.B.Epstein y col. (1972) de que los linfocitos sensibilizados a un determinado antígeno (virus inactivado) incrementen su respuesta de producción de Interferón cuando son puestos nuevamente en contacto mediante una reinmunización con el mismo antígeno, (virus vivo) nos indica que el Interferón tendría una función importante como mediador de la inmunidad celular. Este hecho supondría un rol preponderante en la resistencia o en la recuperación posterior a una infección.

## 6.- ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL INTERFERON

La inhibición por parte del Interferón de la replicación de los eventos desencadenados por virus no sólo infecciosos, sino también de aquellos de demostrado poder oncogénico, centró de pronto la atención de los investigadores sobre la importancia de esta proteína en el campo de la oncología. <sup>4</sup>

Interferón inhibe la replicación completa de los virus oncogénicos ADN, que comprenden los virus del Polioma, del SV40, y los adenovirus, de los virus oncogénicos ARN, que incluyen los del Sarcoma de Rous y de Moloney, los de la Leucemia de Friend y de la Leucemia de Raucher.

La transformación celular in vitro inducida por estos virus, en muchos sistemas también es inhibida por el Interferón.

En células murinas 3T3 infectadas con virus SV40, M.N.Oxman y col. (1967) observaron que el pretratamiento con Interferón disminuía y retardaba la producción de antígeno T. La síntesis de antígeno T representa una función viral temprana que resulta de la traducción del ARN mensajero viral producido bajo el control del ADN viral integrado al genoma celular.

En el caso de que las células hayan sido transformadas por el virus SV40 previamente al tratamiento con Interferón, la inhibición de la formación del antígeno T no se produce. Para explicar este hecho M.N.Oxman y col. proponen la hipótesis de que el ARN mensajero transcrito a partir de un ADN de SV40 ya integrado al genoma celular, no es más reconocido como extraño.

En células de mono infectadas también con este virus, se produce no sólo la inhibición de la formación del antígeno T, sino además la del ARN viral temprano, M.N.Oxman y col.(1967).

La estimulación de la síntesis del ADN celular que induce el virus SV40 no es inhibida de manera alguna por el Interferón.

Las experiencias con un virus híbrido, de Adenovirus 7 y SV40 muestran que la transformación y la formación de antígeno T producida por el Adenovirus 7 es menos sensible al Interferón que la producida por SV40.

Existe la posibilidad de que la sensibilidad viral al Interferón involucre el reconocimiento del ARN mensajero viral.

Los resultados inhibitorios de la replicación de virus oncogénicos y de su efecto transformante obtenidos "in vitro" por el Interferón, no son directamente extrapolables "in vivo" donde evidentemente hay un número considerable de factores que pueden intervenir en la replicación de un virus y que son diferentes de los que actúan sobre el desarrollo de un proceso tumoral.

Esta posible dicotomía en lo que representa la replicación de un virus oncogénico y su efecto de transformación celular fue sugerida por P.E.Came y D.H.Moore (1971) en un trabajo sobre el efecto inhibitorio del Interferón y su potente inductor el ácido Poli I:C sobre el desarrollo del carcinoma mamario del ratón.

Estos autores observan que en la cepa de ratones R III que tiene una incidencia del 90% de carcinoma mamario (debido a la presencia del virus MTV conjuntamente a otros factores) cuando es tratada con Interferón exógeno o con Poli I:C no desarrolla tumores o el desarrollo de los mismos se encuentra frenado y disminuído. La acción del Interferón no inhibe sin embargo la concomitante presencia del MTV en la leche de estos ratones.

Esto sugiere que el Interferón puede actuar directamente sobre las células transformadas sin afectar el mecanismo de

replicación viral.

También la administración de Interferón o sus inductores ha demostrado tener una acción antineoplásica efectiva en el caso de los virus de la leucemia de Friend y de Raucher, convirtiendo estas leucemias en infecciones virales persistentes y aumentando significativamente la sobrevida. E.F. Wheelock (1968-1970).

El crecimiento de varios tumores sólidos que hoy se conoce contienen virus infectivo o en los cuales hay una continua replicación viral es inhibido por el ácido Poli I:C. Estos tumores incluyen el Reticulosarcoma, el Linfoma linfático, los producidos por el virus del Sarcoma de Moloney, y por el tumor inducido por el Adenovirus humano tipo 12, H.B.Levy (1970). Cuando el crecimiento de estos tumores ya ha alcanzado un determinado grado el tratamiento con Poli I:C es capaz de producir una regresión y una disminución en el tamaño de los mismos.

T.Kishida y col. (1971) demostraron que el Interferón o sus inductores son también capaces de inhibir completamente el desarrollo de un tumor producido por un carcinógeno químico o por el transplante de células malignas transformadas por un corticosteroide.

Esto ubica la acción del Interferón definitivamente como anti tumoral independientemente del agente etiológico que ha producido el tumor.

Su acción se podría explicar en base a los trabajos de I. Gresser y col. (1970), S.H.S.Lee y col. (1971) y T.Kishida y col. (1971), quienes establecieron "in vitro" el efecto del Interferón a nivel celular.

Estos autores demuestran la acción inhibitoria selectiva del Interferón sobre la replicación de las células tumorales y heteroploides respecto a las normales o diploides.

Estos resultados se encuentran todavía en una fase de discusión sin embargo serían explicables a nivel molecular si se tiene en cuenta la posibilidad de que el Interferón desencadene en las células un mecanismo de regulación de la síntesis de proteínas anómalas.

ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LOS INTERFERONES SOBRE VIRUS ONCOGENICOS Y CELULAS TUMORALES.

EN CULTIVOS CELULARES

" IN VIVO"

VIRUS SV40 -----FORMACION DE ANTIGENO T

ADENOVIRUS -----FORMACION DE ANTIGENO T

VIRUS DEL SARCOMA DE ROUS

VIRUS DEL SARCOMA DE MOLONEY

VIRUS DE LA LEUCEMIA DE FRIEND

VIRUS DE LA LEUCEMIA DE RAUCHER

CELULAS DE LA LEUCEMIA L 1210

CELULAS HeLa

CELULAS JTC-13- DE UN TUMOR MURINO  
INDUCIDO CON CORTICOSTEROIDES.

VIRUS DE LA LEUCEMIA DE FRIEND

VIRUS DE LA LEUCEMIA DE RAUCHER

RC 19: TUMOR TRANSPLANTABLE INDUCIDO POR  
EL VIRUS DE RAUCHER

EL 4: TUMOR TRANSPLANTABLE INDUCIDO POR  
EL 9:10 DIMETIL- 1:2 BENZANTRACENO

CARCINOMA DE MAMA ESPONTANEO EN  
RATONES R III

TUMOR INDUCIDO POR EL 20-METILCOLANTRENO

TUMOR INDUCIDO POR CELULAS L-m EN  
RATONES C<sub>3</sub>H





ACCION INHIBITORIA DE LOS INDUCTORES DE INTERFERON SOBRE VIRUS ONCOGENICOS Y LA TRANSFORMACION

CELULAR

" IN VIVO "

INDUCTOR                      SOBRE CULTIVOS CELULARES

POLI - rI

VIRUS DE LA LEUCEMIA DE

VIRUS DEL POLIOMA

FRIEND.

VIRUS DEL SARCOMA DE MOLONEY ( MSV ).

POLI - rC

VIRUS DEL SARCOMA DE

VIRUS DEL SARCOMA DE MOLONEY (MSV-PV).

MOLONEY.

LEUCEMIA DE RAUCHER.

LEUCEMIA 1210.

LEUCEMIA DE FRIEND.

MT-1-TUMOR INDUCIDO POR ADENOVIRUS 12.

CARCINOMA DE MAMA ESPONTANEO EN RATONES R III.

RETICULOSARCOMA.

LINFOMA LINFATICO.

FIBROSARCOMA.

RC-19-TUMOR TRANSPLANTABLE INDUCIDO POR EL VIRUS DE RAUCHER.

RHT-1-CELULAS DE HAMSTER TRANSFORMADAS POR EL VIRUS DE RAUCHER.

EAC<sub>2</sub> H-TUMOR ASCITICO DE EHRlich.

MELANOMA MURINO.

B) ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA INDUCCION DE INTERFERON POR  
ACIDOS NUCLEICOS EXTRAIDOS DE TEJIDOS NORMALES Y TUMORALES.

Se han analizado en la parte general todos los inductores virales y no virales que pueden inducir Interferón en los diferentes sistemas biológicos.

Son escasos sin embargo los estudios sobre la inducción de Interferón por ácidos nucleicos provenientes de tejidos normales y tumorales.

K.E.Jensen y col. (1966) obtuvieron inducción de Interferón con DNA de esperma de arenque en embriones de pollo y también por instilación en ratones. H.Strander y K.Cantell (1966) obtienen Interferón con el mismo tipo de DNA en cultivo de linfocitos humanos.

Durante estos últimos años se han realizado en nuestros laboratorios del Departamento de Investigaciones del Instituto Roffo estudios que han llevado a establecer las siguientes premisas:

1°) Los ácidos nucleicos tisulares de diferentes especies (pollo, ratón, cobayo y bovino) y de diferentes órganos, son buenos inductores de inhibidores virales.

2°) Las células son capaces de reconocer ciertos grados de heterogeneidad en cuanto al origen de un ácido nucleico. Esto nos ha inducido a estudiar si los ácidos nucleicos provenientes de tejidos tumorales eran reconocidos con respecto a su capacidad inductora de Interferón como extraños.

## MATERIAL Y METODOS

### Animales de experimentacion:

Ratones endocriados de la cepa C3H de aproximadamente 3 meses de edad, provenientes del bioterio del Instituto de Oncología "Angel H.Roffo".

### Tumores

Tumores de Metilcolantreno (MCT) inducidos en ratones C3H por trasplante subcutáneo en un pellet de parafina conteniendo 7% de Metilcolantreno. Los tumores son mantenidos por pasajes subcutáneos seriados singeneicos.

### Embriones de pollo

Embriones de pollo Leghorn de 12 días de incubación.

### Virus

Virus de vacuna , proveniente de vacuna antivariólica preparada en el Departamento de Virus de Vacuna del Instituto Nacional de Microbiología "Carlos C.Malbrán", con el título de  $10^{8,25}$  unidades formadoras de pocks por ml.

Virus de la Estomatitis vesicular (VSV) cepa indiana, mantenido en la Sección Cultivo de Tejidos del Instituto Roffo por pasajes seriados en cultivo de fibroblastos de embrión de pollo con un título de  $10^{7,3}$  TCD<sub>50</sub>/ml.

### Cultivo de células

Cultivo de fibroblastos de embrión de pollo preparados a

partir de una suspensión de células de embrión de pollo por tripsinización de embriones de pollo de 10 días. Las células se sembraron en tubos de cultivo Leighton en una concentración de  $1 \times 10^6$  células por ml. en medio de cultivo 199 con el agregado de 10% de suero fetal bovino. Las monocapas se establecieron a las 24 horas de cultivo.

Cultivo de fibroblastos de embrión de ratón preparados por tripsinización de embriones de ratón de 12 días de gestación.

Las células se sembraron en tubos Leighton en una concentración de  $1,5 \times 10^6$  células por ml. en medio 199 suplementado de 10% de suero fetal bovino. Las monocapas se establecieron a las 48 horas.

El medio de mantenimiento de ambos tipos de cultivos contenía sólo 2% de suero fetal bovino.

ADN de tumores de Metilcolantreno (ADN-MCT): La extracción de este ácido nucleico fue efectuada en la Sección Química Biológica del Instituto de Oncología "Angel H. Roffo".

Se utilizó la técnica de U. Marmur (1961). El contenido de desoxiribosa se determinó con la técnica de K. Burton (1955). El contenido de ARN se midió con el método de Z. Dische y E. Borenfreund (1956). Los ensayos de proteínas se llevaron a cabo con la técnica de O. H. Lowry y col. (1951).

El contenido en polisacáridos se determinó por el método de la antrona S. T. Scott y E. H. Melvin (1953).

La desnaturalización por calor (ADN-MCT/HD) se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se calentó el ADN-MCT en solución salina citratada (SSC) a  $100^\circ\text{C}$  durante 15 minutos y luego se enfrió rápidamente mezclándolo con un tercio de su volumen con SSC 3X, congelándolo a  $-40^\circ\text{C}$ , O. Klammerth (1965).

Se midió la hipercromicidad.

Tratamiento con desoxiribonucleasa: 50 ug/ml de ADN-MTC se incubaron con 90.000 unid. Dornasa/mg de desoxiribonucleasa Biochem. en  $\text{SO}_4 \text{ Mg } 0,05 \text{ M}$  durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ .

Inducción del inhibidor viral: Se preparó una solución de 400 ug/ml de ADN/MTC en Buffer de fosfatos. Se inocularon 0,25 ml. de esta solución conteniendo 100 ug de ADN/MTC por embrión, vía membrana corioalantoidea (MCA), y se incubaron durante 4 hs. a  $37^\circ\text{C}$ .

Determinación directa del inhibidor en MCA: Este ensayo se llevó a cabo sobre embriones de pollo inoculados via MCA con el inductor (ADN-MTC).

Luego de 4 hs. de incubación los huevos se inocularon también via MCA con 0,25 ml. de una dilución de virus de vacuna stock  $10^{-5}$  y se incubaron durante 72 hs. a  $37^\circ\text{C}$ . Se colectaron las MCA y se procedió al recuento de pocks.

Obtención del Interferón: Se cosechó el líquido alantoico de huevos inoculados con ADN=MCA luego de 4hs. de incubación, y se lo sometió a las siguientes pruebas de caracterización: a) efecto de pH: dialisis a pH2, pH9; b) ultracentrifugación a 100.000 g durante 1 h. a  $0^\circ\text{C}$ ; c) calentamiento a  $56^\circ\text{C}$  durante 1 hora.

Para la preparación de los controles de líquido alantoico normal se utilizó el mismo procedimiento.

Las preparaciones de Interferón se envasaron en frascos siliconados y se guardaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta el momento de ser utilizados en los siguientes ensayos.

Ensayos biológicos:

a) Actividad interferente del Interferón exógeno:

Se cosechó el líquido alantoico a diferentes intervalos de tiempo de 1 a 24 hs. luego de la inoculación del inductor. Se hizo el estudio de la dinámica de la formación de Interferón: 1) sobre MCA; se inocularon 0,2 ml de líquido alantoico conteniendo el inhibidor sobre MCA, luego de 4 hs. de absorción se inoculó el virus revelador como en el método directo de titulación.

II) "in vitro": El líquido alantoico conteniendo el inhibidor se diluyó 1:2 con medio de cultivo 199 adicionado de un 3% de suero fetal bovino inactivado. Con 1,5 ml. de esta dilución se inocularon monocapas de células de embrión de pollo establecidas en tubos Leighton y se incubaron durante 20 hs. a 37°C.

Los cultivos se lavaron dos veces con PBS y se inoculó el virus revelador (vacuna o VSV) en una dilución  $10^{-3}$  a partir de los respectivos stocks.

b) Digestión enzimática: El líquido alantoico conteniendo el Interferón se incubó con tripsina al 0,25% durante 1 h. a 37°C.

c) Especificidad de especie: Se efectuó el ensayo "in vitro" sobre cultivos de embrión de ratón.

## RESULTADOS

Los resultados de las reacciones para establecer los criterios de pureza para los diferentes "batches" de ADN-MTC fueron los siguientes:

Contenido total de ADN - - - 75 - 81%  
Contenido de ARN - 3%  
Proteínas totales - - 2-5%  
Contenido de polisacáridos - menos del 3,5%  
ADN/MTC/HD- 30% de hipercromicidad

### Inducción de la actividad interferente

Determinación directa sobre MCA: Los resultados obtenidos se expresan como el número promedio de pocks en un total de 10 experiencias.

El ADN-MTC indujo un marcado descenso en el número de pocks (52,8%) comparado al número obtenido en los controles tomados como el 100%.

El ADN desnaturalizado por calor produjo sólo una pequeña inhibición del 0,5% en el número de pocks.

El ADN tratado con desoxiribonucleasa y la desoxiribonucleasa sola produjeron también valores bajos de inhibición del 15,8 y 10,6% respectivamente. (Ver Histograma I).

### Actividad del Interferón exógeno:

II Sobre MCA: El Interferón exógeno produjo un 59,2% de inhibición en la replicación del virus revelador, mientras las preparaciones controles de líquido alantoico control y de Interferón tratado con tripsina no tuvieron ningún efecto inhibitorio. (ver Histograma II).

II) "In vitro" El Interferón exógeno protege del efecto citopatogénico de los virus reveladores (VSV o Vacuna) las monocapas de fibroblastos de embrión de pollo. (Ver fotografías 1, 2, 3 y 4).

#### Dinámica de la formación de Interferón:

En la figura (1) están representados los resultados obtenidos con el líquido alantoico cosechado a diferentes intervalos de tiempo luego de la inducción.

La actividad interferente se detectó a las 2 hs. de la inducción alcanzando el pico máximo a las 4 hs., a partir de las cuales la actividad disminuyó paulatinamente.

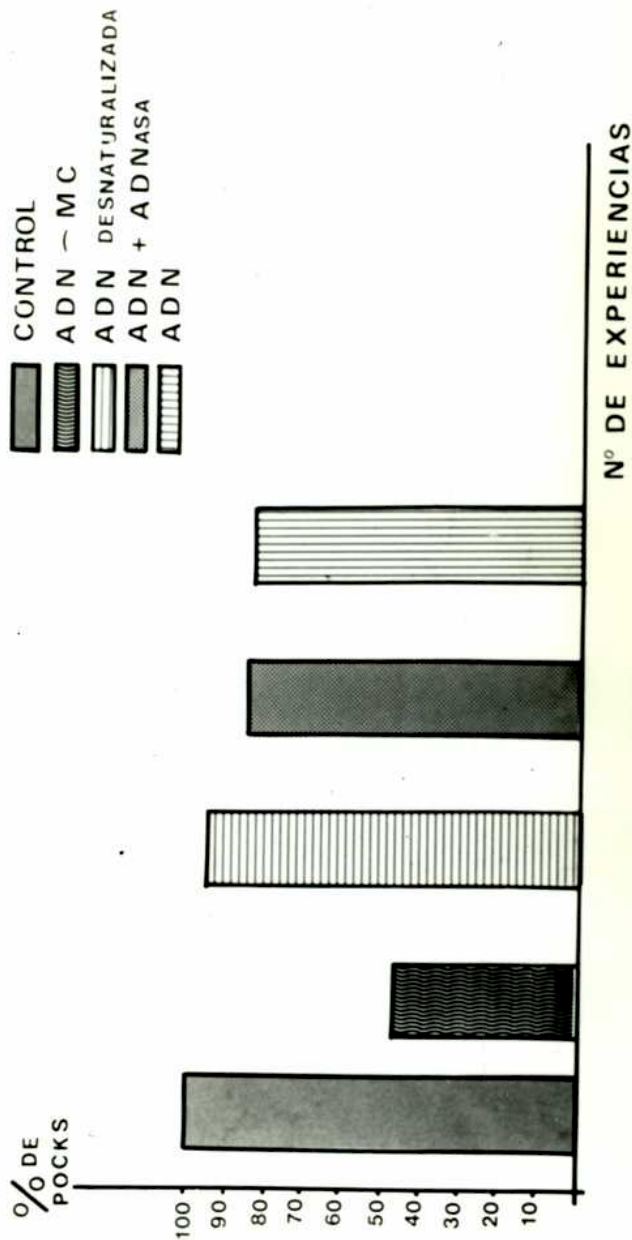
#### Especificidad de especie:

En los ensayos "in vitro" sobre monocapas de embrión de ratón el Interferón exógeno proveniente de líquido alantoico de huevos inoculados con ADN-MTC no ejerció protección alguna frente a la acción citopatogénica de los virus reveladores de Vacuna o VSV.

Estos resultados son indicadores de la especificidad de especie de estas preparaciones de Interferón.



## INHIBICION DIRECTA

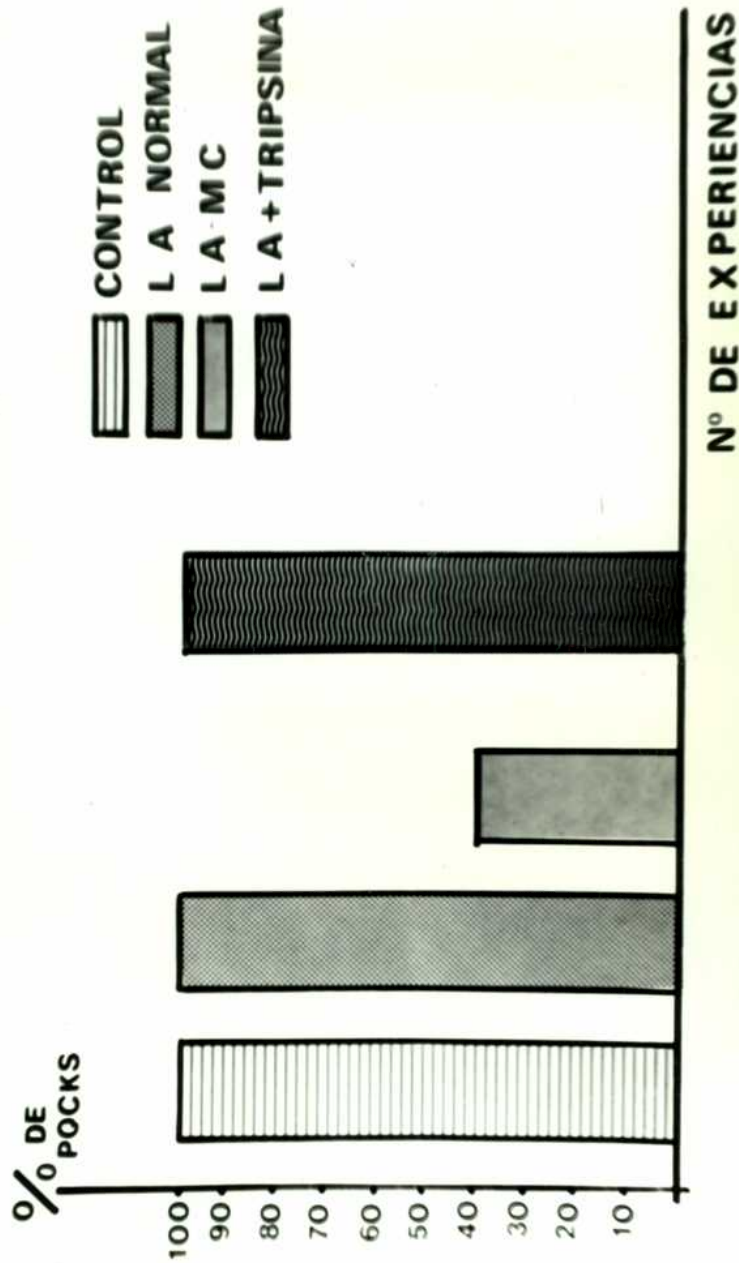


**HISTOGRAMA I:** Inhibición en MCA de embrión de pollo de la replicación del virus de vacuna (% de Pocks) en función del número de experiencias.

El número de Pocks de los controles se tomó como el 100%.

El ADN-MTC induce una inhibición del 52,8% en el número de Pocks. El ADN desnaturalizado y el tratado con ADNasa inducen valores de inhibición no significativos.

# DEFENSA PASIVA



HISTOGRAMA II: Inhibición en MCA de embrión de pollo de la replicación del virus de vacuna (% de Pocks) producido por Interferón exógeno inducido en líquido alantoico (LA) de huevos embrionados en función del N° de experiencias.

El Interferón inducido por el ADN-MTC produce una disminución del 59,2% en el N° de Pocks. El L.A. normal y el tratado con tripsina no producen disminución de la replicación del virus revelador.



FOTOGRAFIA I: Monocapa de fibroblastos de embrión de pollo.





FOTOGRAFIA II: Monocapa de fibroblastos de embrión de pollo inoculado con virus de vacuna en una dilución  $10^{-3}$ .

Efecto citopatógeno a las 72 horas.

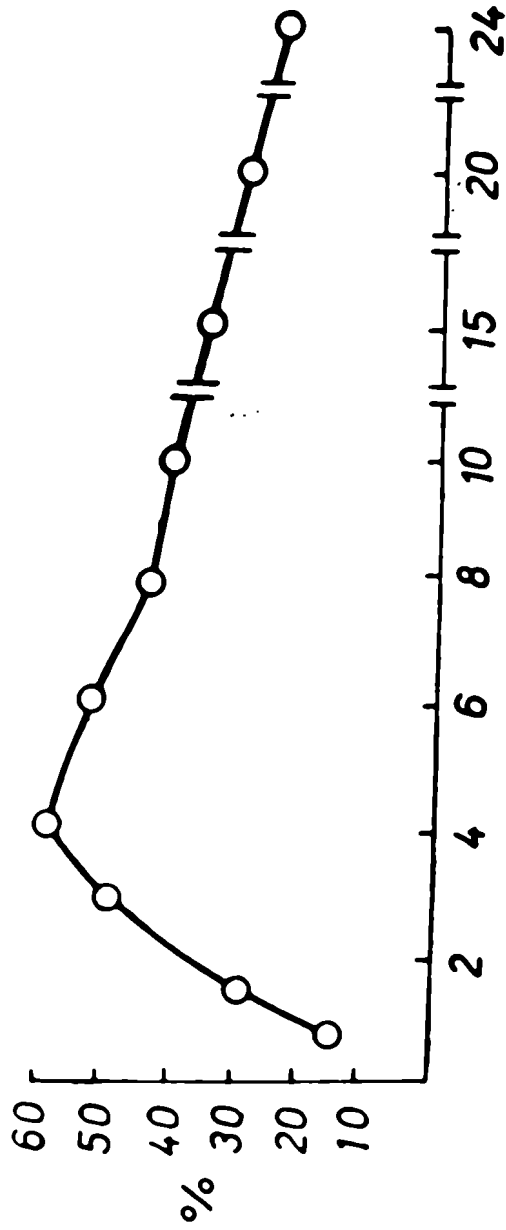


FOTOGRAFIA III: Monocapa de fibroblastos de embrión de pollo tratada previamente a la inoculación de virus de vacuna  $10^{-3}$  con Interferón exógeno inducido en líquido alantoico de huevos embrionados.





FOTOGRAFIA IV: Monocapa de fibroblastos de embrión de pollo tratada con líquido alantoico control y luego inoculada con virus de vacuna  $10^{-3}$ . Efecto citopatógeno a las 72 horas.



**FIGURA I:** Dinamica de la formación de Interferón inducido con ADN-MTC (100 ug por embrión).

Reducción % del N° de Pocks del virus de vacuna en MCA en relación al control (100% de Pocks) en función del tiempo en horas.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos indican que el ADN heterólogo extraído del tumor murino producido por Metilcolantreno induce Interferón y una resistencia tipo Interferón en el sistema de pollo utilizado.

Se obtuvieron resultados similares con todos los "batches" de ADN-MTC utilizados.

En todas las experiencias el inhibidor demostró poseer las características físicas, químicas y biológicas aceptadas como específicas de Interferón.

A pesar de no poder contar con un Interferón standard de referencia los datos obtenidos dan una evidencia clara de que el inductor inducido puede ser considerado Interferón.

La actividad del ADN-MTC extraído del tumor de Metilcolantreno no como inductor de Interferón concuerda con los resultados obtenidos por K.E.Jensen y col. (1963) con ADN comercial en altas dosis luego de un mínimo de 24 hs. de incubación. En nuestras experiencias, sin embargo, la actividad de Interferón se detectó a las 2 hs. de incubación con un pico de producción máxima a las 4 hs. de la inoculación del ADN.

La velocidad de producción de Interferón que alcanza su punto máximo a las 4 hs. sugiere que en este sistema el Interferón no está preformado.

La falta de inducción obtenida con el ADN tratado con desoxirribonucleasa evidencia que la capacidad inductora de Interferón de las preparaciones utilizadas está asociada al ADN nativo.

La capacidad inductora disminuída luego de la desnaturalización del ADN por calor, podría deberse a la dificultad de penetrar la membrana celular del ADN desnaturalizado como ya



fue observado con anterioridad por F.Laval y E.Malaise (1969), F.Laval y col. (1969) y G.L.Glick (1967).

Es importante puntualizar que no sólo distintos agentes inductores de Interferón actúan de distintas maneras sino que también un mismo inductor en distintos sistemas puede dar diferentes resultados, M.Finkelstein y col. (1968), utilizando tres sistemas celulares diferentes macrófagos murinos peritoneales, fibroblastos humanos y células 1929 observaron que no todos los inductores no virales eran activos en los tres tipos celulares estudiados.

W.E.Stewart y col. (1969) obtuvieron resultados positivos en un sistema de células de riñón de hamster inoculados con poli I:C.

K.E.Jensen y col. (1963-1969) obtuvieron inducción de Interferón con DNA en huevos embrionados y en cultivos de fibroblastos de pollo, sin embargo G.P.Lampson y col. (1967) obtuvieron resultados negativos con ADN bovino inyectado en forma intravenosa en conejos.

Esta discrepancia podría ser atribuída a la diferente sensibilidad de los sistemas utilizados.

Uno de los factores determinantes de los resultados obtenidos en este trabajo sería la especial permeabilidad de la membrana corioalantoidea que facilitaría la penetración del ADN/MTC.

Sin embargo a la luz de los nuevos trabajos de A.K.Field y col. (1972) que postulan como no imprescindible el que un ácido nucleico penetre en la célula para inducir Interferón, sería factible también que el ADN-MTC fuera reconocido a nivel de membrana celular por un posible efector de la inducción de Interferón.

C.- INDUCCION DE INTERFERON EN CULTIVOS CELULARES HUMANOS  
ESTUDIO DEL PESO MOLECULAR.

Dada la imposibilidad de contar en nuestro país con los Interferones Standard de Referencia Internacional, fue necesario producir en nuestro laboratorio un Interferón humano de Referencia debidamente caracterizado, a fin de poder utilizarlo como patrón.

Para ello se ensayaron varios sistemas humanos-virus-célula a fin de determinar cual de ellos nos proveería de un Interferón de título elevado y que fuera de fácil reproducibilidad.

Los sistemas ensayados fueron los siguientes:

- 1) Cultivo de fibroblastos humanos diploides-virus de la Estomatitis vesicular (VSV) cepa Indiana.

La inducción de Interferón se efectuó infectando monocapas de fibroblastos humanos diploides mantenidas en la Sección Cultivo de Tejidos del Instituto de Oncología "A.H.Roffo" con virus de la Estomatitis vesicular. Este virus procedente del Children's Hospital de Philadelphia se mantiene en nuestro laboratorio por pasajes sucesivos en cultivo de células de embrión de pollo. Su título por efecto citopatógeno (CPE) en cultivos de embrión de pollo es de  $10^{7,3}$ .

Para la inducción de Interferón este virus se utilizó en una dilución  $10^{-1}$ .

A partir del stock en medio de cultivo 199 adicionado de un 2% de suero fetal bovino.

Los cultivos infectados se incubaron durante 24 hs. a  $37^{\circ}\text{C}$ . El medio de cultivo conteniendo el Interferón se recogió y

dializó durante 24 hs. en un buffer ClNa ClH a pH2.

Luego de la dialisis el pH se ajustó a 7 con (HO) Na I N y se ultracentrifugó 2 hs. a 100.000 g. El sobrenadante se filtró por filtros Sartorius de 0,22 u de poro y se guardó en frascos siliconados a - 100°C.

2) Cultivo de leucocitos humanos-virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) cepa B<sub>1</sub> Zota.

La inducción de Interferón se llebó a cabo infectando cultivos de leucocitos provenientes de un pool de dadores voluntarios normales con virus NDV en una multiplicidad de infección de 10. Este virus proviene de los laboratorios Vineland Poultry-New Jersey U.S.A. y es Cofal y PPL0 negativo.

El detalle de las técnicas utilizadas en el cultivo de leucocitos y la inducción de Interferón está referido en el punto (D) de esta tesis.

3) Cultivo de leucocitos humanos-virus Sendai-(Parainfluenza tipo I).

El cultivo de leucocitos y la inducción de Interferón se hicieron según las técnicas detalladas en el punto D de esta tesis.

La titulación del Interferón obtenido en estos tres sistemas se llevó a cabo en la forma referida en el punto D midiendo la inhibición de la replicación del virus Sendai sobre cultivos de fibroblastos humanos diploides , F.S.(Foreskin).

Los títulos obtenidos están detallados en la tabla I. Para confeccionar el Interferón humano de referencia de nuestro laboratorio se eligió el sistema-Cultivo de leucocitos-

virus Sendai.

Esta elección se hizo en base al alto título obtenido en este sistema (similar al reportado en la literatura) y a la conveniencia practica de la utilización del virus Sendai como inductor.

VIRUS INDUCTOR	CULTIVO UTILIZADO	TITULO DE INTERFERON UNIDAD/ML.
SENDAI PARAINFLUENZA	LEUCOCITOS HUMANOS	2048
N D W (B <sub>1</sub> ZOTA)	LEUCOCITOS HUMANOS	2048
V S V (CEPA INDIANA)	FIBROBLASTOS HUMANOS DIPLOIDES	1024

**TABLA I: Títulos de Interferón humano obtenidos en diferentes sistemas.**

Las reacciones de caracterización efectuadas al Interferón humano de referencia se detallan a continuación:

- a) Diálisis a pH2 - 48 horas.
- b) Resistencia al calentamiento a 56°C durante 1 hora.
- c) Digestión con tripsina al 0,25% 1 hora a 37°C.
- d) Inhibición de la síntesis con 1 ug/ml de actinomicina D.
- e) Ultracentrifugación a 100.000 g. durante 2 horas.
- f) Determinación del peso molecular. El detalle de este estudio se desarrolla a continuación.

Determinación del peso molecular del Interferón humano  
por el método cromatográfico en columna de Sephadex

Teniendo en cuenta que el peso molecular del Interferón humano obtenido por A.W.Carter (1970) en otro sistema es de 24.000 daltons se utilizó para estas determinaciones una columna de Sephadex G 100. Ha sido demostrado por otro lado C. Jungwirth and G.Bodo, (1964) que de las columnas de Sephadex G 100 se obtienen los preparados más puros y las mejores determinaciones del peso molecular del Interferón de pollo (PM 32.000-35.000).

Preparación de la Columna

A 1.000 ml. de solución fisiológica se agregaron 10 ml. de Buffer de fosfatos 1 molar (solución de fosfato monosódico 1 M. en agua destilada y solución 1 M. de fosfato disódico en agua destilada, se miden 90 ml. del fosfato disódico y se le agregan 10 ml. del fosfato monosódico, el pH se ajustó a 8).

A 500 ml. de Buffer con fosfato se agregaron 10 grs. de Sephadex G 100 en pequeñas cantidades agitando constantemente para que no se formen grumos. Se colocó la mezcla a baño María llevado a ebullición y allí se mantuvo con agitación continuada durante 8 hs. Luego se dejó una noche en la heladera. La columna se llenó con la suspensión obtenida y se comunicó con un recipiente conteniendo el Buffer eluyente de fosfatos y lavándola repetidas veces.

Para poder determinar el peso molecular del Interferón en estudio se hizo la cromatografía previa de proteínas de peso molecular conocido para determinar su fracción de elución

en la columna preparada.

Se obtuvo de esta manera una curva control en la cual se interpoló el Interferón en estudio.

#### Siembra de las proteínas controles

Para el trazado de la curva control se utilizaron las siguientes proteínas: Tiroglobulina 2 mg.; Seroalbúmina bovina 10 gm.; Quimotripsinógeno 5 mg. y Citocromo C. 5 mg.

Después de recolectada cada muestra, la columna fue lavada con un volumen de Buffer fosfatos correspondiente al triple de la capacidad de la columna.

Las fracciones obtenidas (cada una comprende 3 ml. del volumen eluído) se leyeron a 280 ~~mu~~ en un espectrofotómetro Beckman con lámpara de hidrógeno. Los resultados obtenidos están representados en la Fig. 1.-



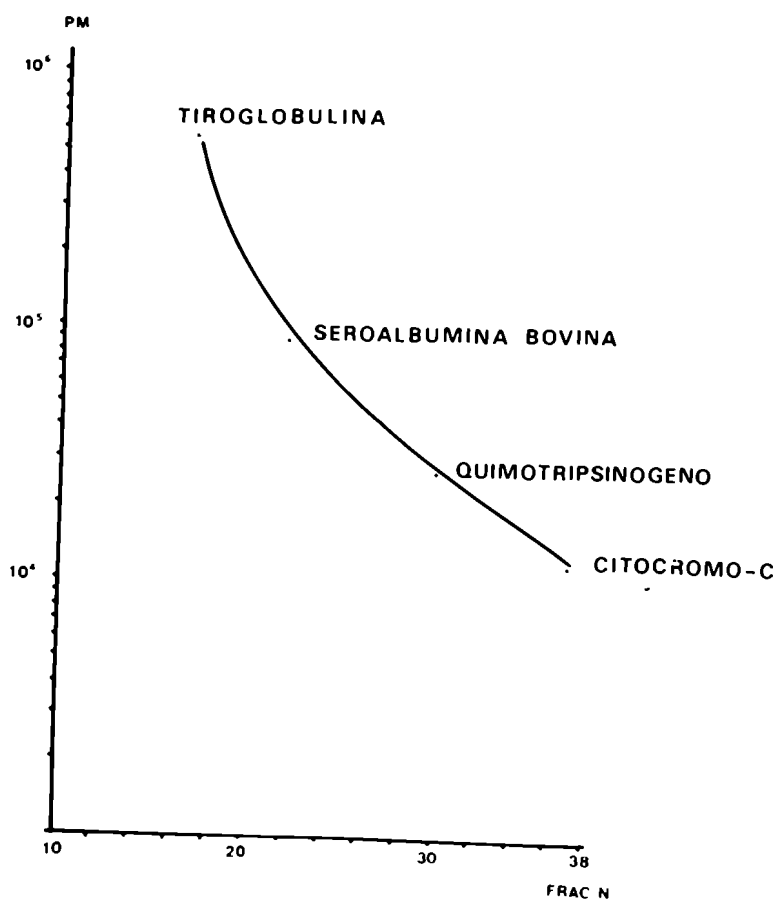


FIGURA I: Curva de proteínas control.

Relación entre el peso molecular (PM) y el volumen de elución de diferentes proteínas de PM conocido utilizadas como referencia para calibrar la columna. Fraccionamiento en gel de Sephadex G 100.

Determinación del peso molecular del Interferón humano  
en estudio.

Se realizó la cromatografía del Interferón en forma similar a la realizada para las proteínas controles.

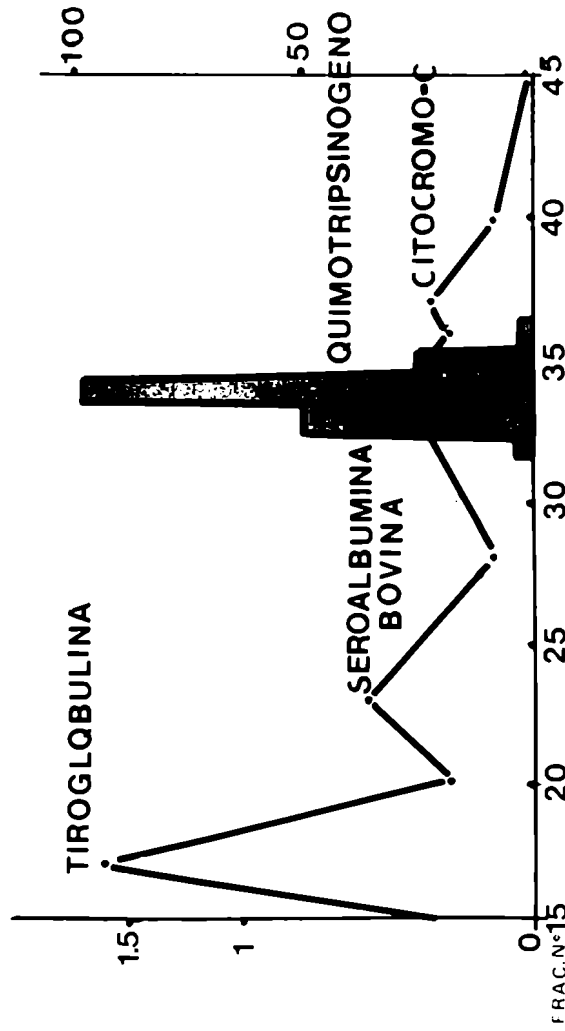
Se probó a continuación la actividad biológica Interferón de las fracciones de elución y se intercaló este valor en la curva de las proteínas controles ya obtenidas. En todos los casos la actividad antiviral máxima se obtuvo en la fracción N° 34 que correspondió en la curva de proteínas controles a la fracción de elución del quimotripsinógeno cuyo peso molecular es de 25.000 daltons.

La actividad Interferón máxima recuperable luego de la cromatografía fue de 100 unidades/ml.

En la Figura II están representados los títulos de Interferón recuperados en las diferentes fracciones de elución luego de la cromatografía en Sephadex G 100 interpoladas en la curva de proteínas controles.

UNIDADES DE  
INTERFERON  
/ml

ABSORBANCIA



**FIGURA II:** Cromatografía de la preparación de Interferón humano de leucocitos en gel de Sephadex G 100.-

## D.- INDUCCION DE INTERFERON EN CULTIVOS DE LEUCOCITOS

### DE PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS.

Es conocida la capacidad de los leucocitos humanos a producir Interferón , I.Gresser,(1961); E.Falcoff,(1966);E.F. Wheelock,(1966);H.Strander,(1967) y A.Billiau,(1972).

Se ha comprobado que esta capacidad está modificada en los enfermos que padecen de leucemia aguda y crónica. S.H.S.Lee y col. (1966-1969) encuentran valores bajos de Interferón en los enfermos en tratamiento de leucemia linfocítica y mielogénica aguda y en los de leucemia linfocítica crónica de larga duración. Sin embargo en aquellos pacientes con leucemia linfocítica crónica de reciente diagnóstico o tratamiento, los títulos de Interferón obtenidos por estos autores son similares a los normales.

En la enfermedad de Hodgkin, T. Veskova (1971) observa que los leucocitos de estos pacientes producen de 10 a 20 veces menos Interferón que los de los dadores normales, siendo estos valores inferiores a los reportados para la leucemia mieloide aguda.

Teniendo en cuenta que el enfermo de cáncer se encuentra en un estado inmunitario deprimido y su propensión a las infecciones virales, era de interés establecer si tenía también disminuída la respuesta inmunitaria del tipo Interferón.

Se ha estudiado en este trabajo, si la respuesta a la inducción de Interferón de los leucocitos de los enfermos portadores de tumores sólidos vírgenes de tratamiento, difería de los valores obtenidos para los pacientes que pa-

-decen de enfermedades no neoplásicas y de los dadores normales.

### METODO

Células: a) Cultivo de leucocitos de sangre periférica humana.

La sangre se obtuvo directamente de la cánula de transfusión en los dadores normales y por extracción venosa en los pacientes. El volumen de extracción fue de aproximadamente 25 ml. por paciente. La sangre se vertió en un recipiente con solución anticoagulante (citrato de Na-glucosa) agitando suavemente, y se utilizó dentro de las 2 horas de la extracción. Los leucocitos se separaron con solución de Dextran de PM 180.000 al 6% (1 parte en 4 de sangre) agitando y manteniendo a 4°C durante 1 hora.

La capa superior conteniendo los leucocitos se extrajo con pipeta y se centrifugó 10' a 1.000 rpm. El pellet de leucocitos se lavó una vez con solución Buffer de fosfatos de pH7 y se procedió al recuento de células.

Los cultivos se hicieron en medio 199 más 2,5% de suero fetal bovino con una concentración de células de  $5 \times 10^6$ /ml en Erlenmeyers de 50ml.

b) Cultivo de células FS (Foreskin) humanas diploides provenientes del Wistar Institute de Filadelfia y mantenidas en nuestro laboratorio en medio Eagle Esencial Mínimo (MEM) más un 10% de suero bovino.

### VIRUS

Virus Sendai (Parainfluenza Tipo I) mantenido en la Sección Cultivo de Tejidos del Instituto de Oncología "Angel H.Roffo" por pasaje en líquido alantoico de embrión de pollo de 9 días.

El líquido se cosechó luego de 72 hs. de incubación a 36°, se clarificó por centrifugación y se envasó en ampollas de 1 ml. manteniéndolas a -100°C.

El título hemoaglutinante con eritrocitos de pollo fue de 1/1024.

### Inducción de Interferón

Se infectó una suspensión de leucocitos en Buffer de fosfatos con virus Sendai en una multiplicidad de infección de 10. Luego de mantener esta suspensión 2 horas a 37°C se desechó el virus no adsorbido por centrifugación y lavado con solución Alsever adicionada de un 10% de suero humano normal (SHN) pH 6,1. El pellet de leucocitos infectados se resuspendió en medio 199 más 2,5% de suero fetal bovino y se incubó 24 hs. a 37°C. El cultivo se centrifugó y el líquido sobrenadante conteniendo el Interferón fue caracterizado y titulado.

Las reacciones de caracterización que se llevaron a cabo con todas las muestras fueron, dialisis a pH2 durante 48 hs. luego de la cual el pH se elevó a 7 con OHNa IN y ultracentrifugación a 100.000 g. durante 2 hs. Luego de este tratamiento las muestras se filtraron por filtros Sartorius de 0,22 u de poro, se envasaron en frascos siliconados y se guardaron a -100°C. A cada muestra se le adjudicó un número de tal manera que su posterior titulación se realizara a ciegas.

Utilizando el mismo método de inducción se confeccionó un Interferón control de referencia a partir de un pool de sangre de 20 dadores normales. Sobre este Interferón control de referencia se realizaron además de las reacciones de caracterización ya mencionadas, el calentamiento 1 hora

a 56°C, el tratamiento con tripsina al 0,25%, y la determinación del peso molecular por cromatografía en gel de Sephadex G 100.

El peso molecular fue de aproximadamente 25.000 daltons. Se comprobó además la inhibición de la síntesis con 1 ug/ml de actinomicina D.

(Ver esquema I).-

Titulación de Interferón: Se realizó tratamiento de monocapas de células FS cultivadas en tubos Leighton con diluciones consecutivas a la mitad de Interferón en medio MEM más un 2% de (SB) suero bovino.

Fueron utilizados tubos por duplicado de cada muestra. Se permitió la absorción del Interferón durante 20 hs. a 37°C y luego de lavar las monocapas con 2 ml. de medio de cultivo se inoculó 0,1 ml. de virus Sendai en una dilución  $10^{-1}$ , este se dejó adsorber 2 hs. a 37°C y luego las monocapas se lavaron nuevamente con 2 ml. de medio agregando a continuación 1 ml. de medio fresco.

Los tubos se incubaron durante 24 hs. (tiempo completo para un ciclo de replicación viral) a 37°C y luego se congelaron a - 40°C.

Previo a la titulación los cultivos se descongelaron y se hizo un pool con el contenido de los que pertenecían a una misma muestra. Se centrifugó 5 minutos a 1.000 rpm. y el sobrenadante se tituló por hemoaglutinación.

El título de Interferón se expresó como la inversa de la última dilución del mismo que redujo a la mitad el título hemaglutinante del virus revelador.

El título del Interferón control de referencia fue de 2048 unidades/ml.

(Ver Esquema II).

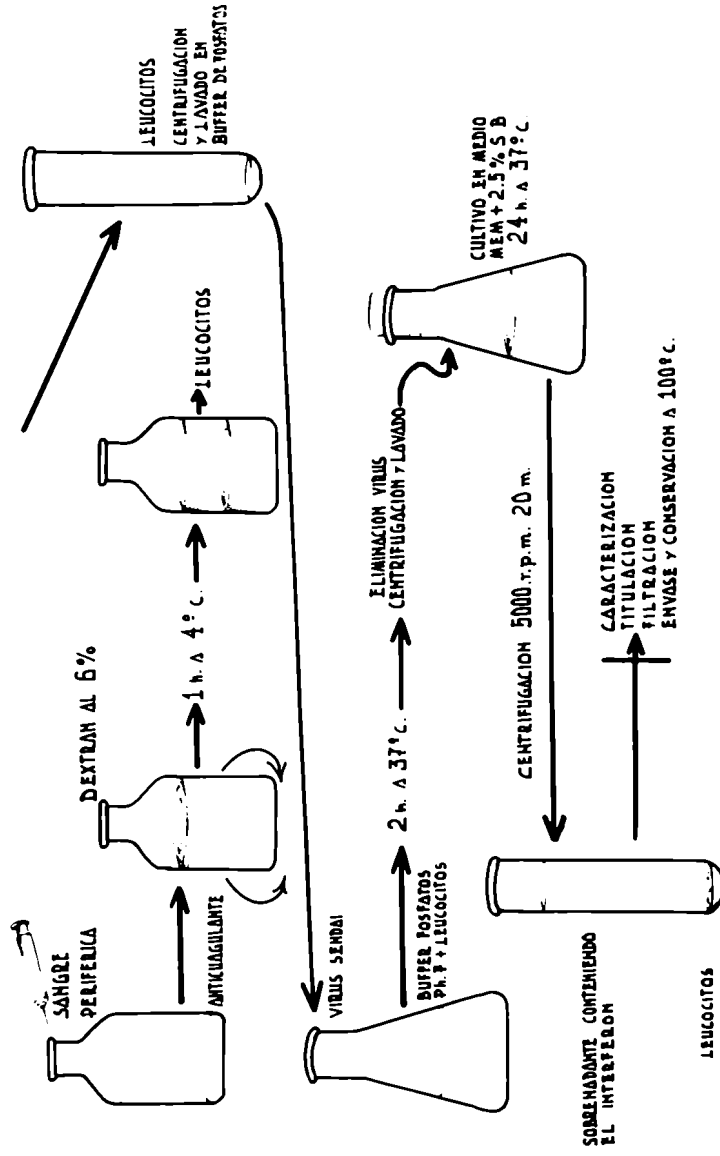
Elección de los pacientes: Se eligieron pacientes portadores de tumores sólidos vírgenes de tratamiento estudiados en el Instituto de Oncología "Angel H. Roffo".

El número de pacientes elegidos para este estudio fue de 37, 33 de los cuales eran portadores de neoplasias no tratadas, en estadios clínicos generalmente avanzados.

Ninguno de los pacientes seleccionados padecía en el momento de la extracción de una enfermedad viral detectable clínicamente.

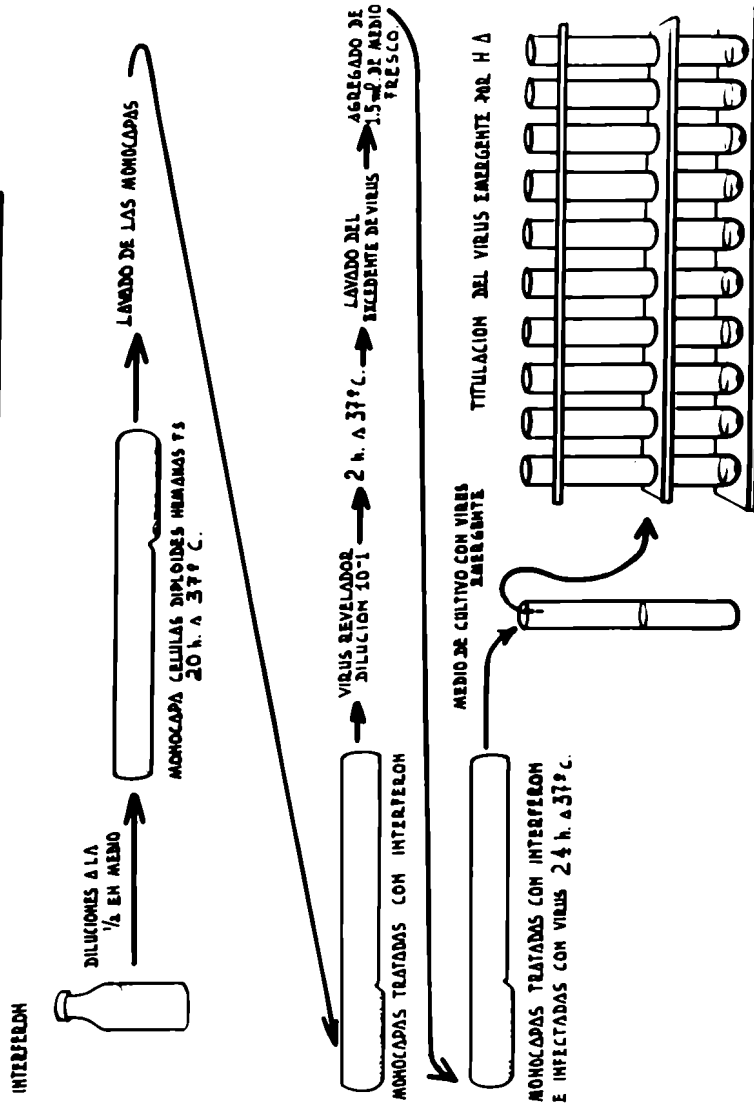


**INDUCCION DE INTERFERON EN CULTIVO DE LEUCOCITOS HUMANOS**



**ESQUEMA I: Proceso de la inducción de Interferón en cultivo de leucocitos humanos.-**

## METODO DE TITULACION DEL INTERFERON HUMANO



ESQUEMA II: Diferentes etapas involucradas en la titulación del Interferón humano.-

## RESULTADOS

La tabla I muestra los títulos de Interferón expresados en unidades por ml. obtenidos en los cultivos de linfocitos de pacientes portadores de neoplasias de diferente localización y tipo histológico.

Se puede observar que en todos los casos la capacidad de producir Interferón fue de 2 a 16 veces menor que los valores normales.

En el histograma están representados los títulos de Interferón obtenidos en los enfermos neoplásicos, tomando en consideración dos grupos de enfermos en especial, los portadores de cáncer de mama y de pulmón.

En la tabla II se observa que el promedio de los títulos de Interferón inducido en los pacientes cancerosos es en promedio 4,3 veces más bajo que los normales o los pacientes de otras enfermedades.

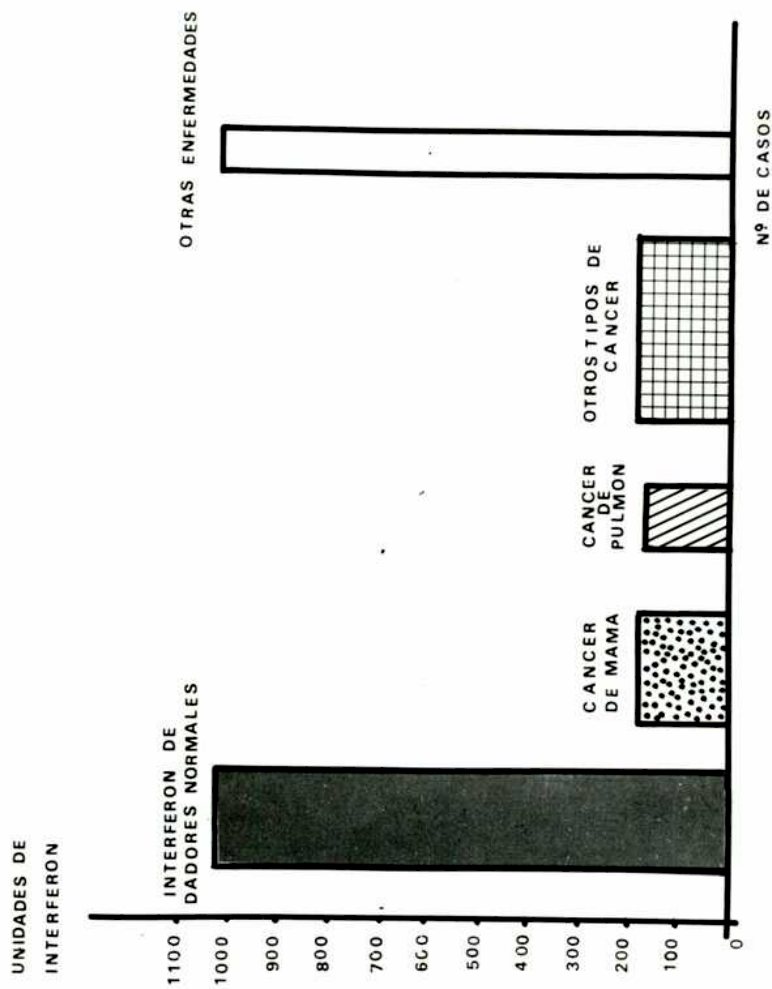
Los valores más bajos se han obtenido en enfermos portadores de cánceres metastásicos o tumores infiltrantes histológicamente muy indiferenciados.

Cabe acotar que uno de los pacientes luego de recibir tratamiento inmunoestimulante con BCG subió al doble su capacidad de producir Interferón.

Un caso de Lupus Eritematoso (enfermedad considerada autoinmune) mostró un título 4 veces menor de Interferón que los dadores normales.

COMPARACION DE LOS VALORES DE INTERFERON INDUCIDO EN CULTIVOS DE LEUCOCITOS DE PACIENTES PORTADORES DE TUMORES SOLIDOS, CON PACIENTES NO NEOPLASICOS Y CON DADORES NORMALES.

Localización del tumor.	Tipo Histológico	Nº de pacientes.	Título de Interferón promedio Uni/ml.
Mama	Adenocarcinoma	5	512
Mama	Carcinoma	6	362,6
Pulmón	Carcinoma Pavimentoso.	6	384
Tiroides	Carcinoma	2	768
Pierna	Melanoblastoma	1	265
Laringe	Carcinoma Pavimentoso semidiferenciado.	1	128
Esofago	Adenocarcinoma	2	384
Síndrome mediastínico	Met. de carcinoma indiferenciado	2	384
Recto	Adenocarcinoma	1	512
Ganglio	Fibrolinfosarcoma	1	1.024
Hueso iliaco	Condrosarcoma	1	1.024
Pierna	Sinoviosarcoma	1	256
Ingle	Fobrosarcoma	1	512
Ovario	Carcinoma	1	256
Mieloma generalizado	Plasmocitoma	1	512
Pancreas	-	1	256
<b>ENFERMEDAD NO NEOPLASICA.</b>			
Úlcera gástrica		2	2.048
Tuberculosis Peritoneal		1	2.048
Lupus eritematoso		1	512
<b>DADORES NORMALES</b>		<b>20</b>	<b>2.048</b>



**HISTOGRAMA:** Representa los títulos de Interferón (unid/0,5 ml.) obtenidos en cultivos de leucocitos de enfermos neoplásicos, no neoplásicos y de dadores normales en función del número de casos.-

TABLA II

PRODUCCION DE INTERFERON EN CULTIVO DE LEUCOCITOS  
DE PACIENTES PORTADORES DE TUMORES SOLIDOS.

COMPARACION CON PACIENTES NO NEOPLASICOS Y CON LOS  
DADORES NORMALES.

PACIENTES	N° DE CASOS	TITULO -PROMEDIO DE INTERFERON
PORTADORES DE TUMORES	33	476,2 Unid/ml.
NO PORTADORES DE TUMORES	3	2048 Unid/ml.
DADORES NORMALES	20	2048 Unid/ml.

## DISCUSION

De los experimentos realizados resulta claramente (a pesar de que la estadística no es elevada) que la producción de Interferón de los leucocitos de 33 pacientes con tumores sólidos de diferente localización, es de 2 a 6 veces más baja que el obtenido de grupos controles y de enfermos no portadores de tumores, que se encontraban también en estadios graves de su enfermedad.

Es interesante notar que los valores de los títulos de Interferón de dadores normales obtenidos por nosotros, son similares a los reportados en la literatura para Interferón humano de leucocitos.

En forma similar a lo que sucede en los dadores normales, C.G.Ray (1970) , no se ha podido establecer ninguna diferencia en los títulos de Interferón con respecto a la edad del portador ni al sexo, siendo todos los valores de los casos tumorales uniformemente bajos.

Si comparamos nuestros resultados con los de los diferentes autores que han estudiado Interferón en la Enfermedad de Hodgkin y en las leucemias linfáticas y mieloide crónica y aguda, nuestros resultados no son equiparables dado que en la mayoría de los enfermos estudiados por T.Veskovva (1971) en Hodgkin y por S.H.S.Lee y col. (1966-1969) en leucemias, habían recibido tratamiento quimioterápico o radioterápico cuya actividad depresora sobre la síntesis de Interferón es conocida.

Sin embargo los dos casos de tumores malignos sólidos no tratados, estudiados por T.Veskovva, muestran títulos de Interferón de 2 a 5 veces menores que los normales,

coincidiendo con nuestros resultados.

Es de hacer notar que los pacientes elegidos por nosotros tenían fórmulas leucocitarias normales aunque el número de leucocitos totales era en muchos casos superior a los valores normales.

Comparando el modo de titulación de Interferón utilizado por nosotros respecto del que han utilizado otros autores con referencia a enfermos neoplásicos, consideramos que nuestro método es más cuantitativo dado que mide la inhibición de un sólo ciclo de replicación viral. La determinación del título de virus por hemoaglutinación reduce el tiempo requerido para los ensayos de Interferón y provee de una alta sensibilidad y reproducibilidad al método.

La conveniencia de la utilización de este método de titulación ha sido recientemente confirmado por H.K.Oie y col. (1972).

Como conclusión se puede inferir que por lo menos en los estadios de cancer avanzado, el estado de inmunodepresión del paciente se refleja también en su capacidad de producir Interferón.

Se podría pensar que los factores bloqueadores del suero propio del enfermo impiden la recepción normal leucocitaria del estímulo viral para la inducción de Interferón, cabría también la posibilidad que los linfocitos o alguna de las poblaciones blancas de estos enfermos perdiera, tuviera bloqueada o reprimida la función de producir Interferón o alguna función coadyuvante del tipo memoria inmunológico que según L.B.Epstein y col. (1971) interveniría también en este tipo de respuesta.

El título de Interferón de los cultivos de leucocitos de los pacientes en tratamiento nos daría una pauta más para



evaluar la acción terapéutica durante el mismo.  
Este tipo de análisis ha sido incluido en los tests de rutina en pacientes tratados en nuestro Instituto en especial en aquellos sometidos a tratamientos inmunoestimulantes.-

BIBLIOGRAFIA

- Beasley, A.R. and Sigel, M.M.  
In Vitro, 3, 154-165, (1967)-
- Beladi, I., Bakay, M. and Pusztai, R.  
J.Gen.Virol., 8, 143-144, (1970)-
- Bialy, H.S. and Colby, C.  
J.Virology, 9, 286-289, (1972)-
- Billiau, A., Jonian, M. and De Somer, P.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 140, 485-491, (1972)-
- Borden, E.C. and Murphy, F.A.  
The J. of Immun., I, 134-142, (1971)-
- Bucknal, R.A.  
Nature (Lond.), 216, 1022-1023, (1967)-
- Burque, D.C., Skehel, J.J. and Hay, A.J.  
The Interferons, International Symposium  
Academic Press, (1968)-
- Burton, K.  
Biochem. J., 315-322, (1955)-
- Came, P.E., and Moore, D.H.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 137, 304-305, (1971)-
- Carter, A.W.  
Proc. Nat. Acad. Sci., 2, 620-628, (1970)-
- Carter, A.W., Pitha, P.M. and Marshal, L.W.  
J. Mol. Biol., 70, 567-587, (1972)-
- Carver, D.H. and Marcus, P.I.  
Virology, 32, 247-257, (1967)-
- Coppey, J.  
J. Gen. Virol., 14, 9- 14, (1972)-
- Chany, C. and Brailovsky, C.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 57, 87-94, (1967)-

- Chany, C., Lemaitre, J., Galliot R. et al.  
Perspectives in Virology, Ed. by Polard M.  
Academic Press, 7, 111-126, (1971)-
- Chirigos, M.A., Turner, W. et al.  
Int. J. Cancer, 4, 267-278, (1969)-
- De Clerq, E. and De Somer, P.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 132, 699-703, (1969)-
- De Maeyer, J., De Maeyer, E. and Montagnier, L.  
Proc. Nat. Acad. of Sci. U.S.A. 69, 1203, (1972)-
- Desmyter, J., Rawls, W.E. and Melnick, J.L.  
Proc. Nat. Acad. Sci., 59, 69-76, (1968)-
- Dianzani, F., Rita, G., Cantagalli, P. and Gagnoni, S.  
The J. of Immun., 102, 24 , (1969)-
- Dianzani, F., Neri, P. and Zucca, M.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 140, 1365-1378, (1972)-
- Dische, Z. and Borenfreund, E.  
Biochim. biophys. Acta (Amat.), 23, 369-342, (1956)-
- Epstein, L.B., Martin, J.C. and Merigan, T.C.  
The J. of Clin. Invest., 50, 744-753, (1971)-
- Epstein, L.B., Stevens, D.A. and Merigan, T.C.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2632-2636, (1972)-
- Falcoff, E. and Fauconnier, B.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 118, 609-612, (1965)-
- Falcoff, E., Falcoff, R., Fournier, F. and Chany, C.  
Ann. de L'Inst. Pasteur, 111, 562-584, (1966)-
- Falcoff, E. and Falcoff, R.  
Nature (New Biology), 240, 145-147. (1972)-
- Fantes, K.H.  
J. Gen. Physiol., 56, 113-133, (1970)-
- Fantes, K.H.  
Science, 163, 1108-1109, (1969)-
- Field, A.K., Tytell, A.A. and Lampson, G.P.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 58, 1004-1010, (1967)-

- Field, A.K., Tytell, A.A., Lampson, P. and Hilleman, M.R.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 140, 710-714, (1972)-
- Finkelstein, M., Bausek, G. and Merigan, T.  
Science, 161, 465-467, (1968)-
- Fournier, F., Rousset, F. and Chany, C.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 132, 943-950, (1969)-
- Galliot, B., Moreau, M.C., Renard, N. and Chany, C.  
Proc. Soc. Expt. Biol. and Med., 142, 266-270, (1973)-
- Glick, G.L.  
Cancer Res., 27, 2338-2341, (1967)-
- Gresser, I.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 108, 799-803, (1961)-
- Gresser, I.  
J.Nat. Cancer Inst., 45, 1145-1153, (1970)-
- Grossberg, S.E.  
The New England J. of Med., 287, 13-19, (1972)-
- Grossberg, S.E.  
The New England J. of Med., 287, 79-85, (1972)-
- Grossberg, S.E.  
The New England J. of Med., 287, 122-128, (1972)-
- Guggenheim, M.A., Friedman, R.M. and Rabson, A.S.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 130, 1242-1245, (1969)-
- Harris, T.N., Harris, S.  
Ann. N.Y.Acad.Sci., 73, 789, (1958)-
- Ho, M., and Breinig, M.K.  
Virology, 25, 331-330, (1965)-
- Isaacs, A., Cox, R.A. and Rotem, Z.  
Lancet, ii, 113-116, (1963)-
- Jensen, K.E., Neal, A.L., Owen, R.E. and Warren, J.  
Nature (Lond.), 200, 433-434, (1963)-
- Jensen, K.E., Neal, A.R., Owens, R.E. and Takano, K.  
Interferons, Finter N.B.(Ed), North-Holland,  
Pub. Co., Amsterdam, (1966)-

Jones, B.R., Galbraith, J.E.K. and Al-Hussaini, M.K.  
Lancet, I, 875-879, (1962)-

Jungwieth, C. and Bodo, G.  
Biochemische Zeitschrift, 339, 382-389, (1964)-

Kerr, I.M.  
J. of Virology, 7, 448-459, (1970)-

Kishida, T. and Imanishi, J.  
J. Kyoto Pref. Univ. Med., 179, 401-405, (1970)-

Kishida, T., Toda, S., Toida, A. and Hattori, T.  
C.R. Acad. Sci., 169, 1489-1492, (1971)-

Kishida, T., Maramatsu, S. and Hara, K.  
Experientia, (en prensa)-

Klammerth, O.  
Nature, (Lond.), 208, 1318-1319, (1965)-

Lampson, G.P., Tytell, A., Field, A.K., Nemes, M.M. and Hilleman M.R.  
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash), 58, 782-789, (1967)-

Laval, F. and Malaise, E.  
C.R. Acad. Sci. (Paris). 268, 3115-3117, (1969)-

Laval, F., Laval, J. and Malaise, E.  
C.R. Acad. Sci. (Paris), 268, 3119-3121, (1969)-

Lee, S.H.S., Ozere, R.L. and van Rooyen, C.E.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 122, 32-39, (1966)-

Lee, S.H.S. and Ozere, R.L.  
Cancer Res., 29, 645-652, (1969)-

Lee, S.H.S., O'Shaughnessy, M.V., and Rozee, K.R.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 139, 1438-1440, (1971)-

Levy, H.B., Law, L.W. and Rabson, A.S.  
Proc. Nat. Acad. of Sci. U.S.A., 62, 357-361, (1969)-

Levy, R.E., Golgher, R.R. and Paucker, K.  
J. Immunol., 104, 791-797, (1970)-

Levy, H.B.  
Arch. Intern. Med. 126, 78-83, (1970)-

Lowry, O.H., Rosenbraugh, N.L., Lewis, A., and Randall, R.K.  
J. Biol. Chem., 193, 265-275, (1951)-

Marcus, P.I. and Salb, J.M.  
Virology, 30, 502, (1966)-

Marcus, P.I., Engelhardt, D.L., Hunt, J.M. and Sekellick, M.J.  
Science, 174, 593-598, (1971)-

Marmur, U.  
J. Molec. Biol., 3, 208-218, (1961)-

Mayer, G.D. and Krueger, R.F.  
Science, 169, 1214-1215, (1970)-

Meayer, A. and Burque, D.C.  
Nature. (Lond.) (en prensa)-

Moehring, J.M. and Stinebring, W.R.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 173, 538-542, (1970)-

Munk, K. and Frick, T.H.  
Z. Naturforschung, 27-b, 220-222, (1972)-

Oie, H.K. and Loh, P.C.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 136, 369-373, (1971)-

Oie, H.K., Buckler, C.E. et al.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 140, 1178-1181, (1972)-

Oxman, M.N., Rowe, W.P. and Black, P.H.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 57, 941-948, (1967)-

Paucker, K. and Boxaca, M.  
Ann. Med. Exp. Biol. (Fenn). 31, 274-281, (1966)-

Paucker, K. and Boxaca, M.  
Bact. Rev., 31, 145-156, (1966)-

Petralli, J.K., Merigan, T.C. and Wilbur, J.R.  
New England J. of Med. 273, 198-201, (1965)-

Ray, C.G.  
J. Pediat., 8, 76-94, (1970)-

Scott, T.A. and Melvin, E.H.  
Anal. Chem. 25, 1656-1661, (1953)-

- Stancek, K.D., Gressnerova, M. and Paucker, K.  
Virology, 41, 740-750, (1970)-
- Stewart, R.B., Scott, W.O. and Sylkin, S.E.  
J. Virology, 4, 147-153, (1969)-
- Stewart, R.B. and Sheaff, E.T.  
Canad. J. of Microbiol., 18, 725-730, (1972)-
- Soloviev, V.D.  
The Interferons- International Symposium  
Academic Press, (1968)-
- Strander, H. and Cantell, K.  
Ann. Med. Exp. Fenn., 45, 20-29, (1967)-
- Susor, W.A., Kochman, M. and Rutter, W.J.  
Science, 165, 1260-1262, (1969)-
- Trudden, J.L., Sigel, M.M. and Dietrich, L.S.  
Virology, 33, 95-103, (1967)-
- Vilcek, J.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 173, 390-403, (1970)-
- Veskova, T. and Nemirowskaya, B.M.  
Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol., 16, 697-700, (1971)-
- Wheelock, E.F. and Sibley, W.A.  
Lancet, 2, 382-385, (1964)-
- Wheelock, E.F.  
J. of Bacteriol., 92, 1415-1421, (1966)-
- Wheelock, E.F. and Larke, R.P.B.  
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 127, 230-238, (1968)-
- Wheelock, E.F.  
Arch. Intern. Med., 126, 64-68, (1970)-
- Yamazaky, S. and Wagner, R.  
J. of Virology, 5, 270-273, (1970)-
- Youngner, J.S. and Hallum, J.V.  
Virology, 37, 473-475, (1969)-

*Richard P. Youngner*

*Richard P. Youngner*