

OBSERVAÇÕES

EM TORNO DO PHENOMENO DE DURAN-REYNALS

POR

R. GODINHO E J. TRAVASSOS

Numerosas investigações sobre o effeito do extracto de certos organs em relação ao poder infectante de determinados virus chamados filtraveis e de algumas bacterias vêm sendo realizadas por varios pesquisadores a partir de 1928, depois que Duran-Reynals (1), dos laboratorios do Instituto Rockefeller, publicou as primeiras observações sobre o assumpto. De seus estudos originaes sobre o aumento do poder de infecção da neuro-vaccina sob a accão do extracto de tecido testicular concluiu que as lesões cutaneas produzidas pela orchi-vaccina de Noguchi são influenciadas apenas ligeiramente por aquella substancia, o mesmo não acontecendo quando ella actúa conjunctamente com o virus commum do cow-pox, determinando lesões consideravelmente augmentadas. Verificou tambem, que, embora em grão muito ligeiro, o extracto de rim possue propriedades identicas ás de tecido testicular.

O resultado da parte essencial dessas experiencias foi, em seguida, applicado pelo A., com a collaboração de Sunner-Pi (2), sobre um germe de manifesta affinidade cutanea, com o fim de evidenciar toda a diferença que, desse ponto de vista, poderia existir entre uma bacteria e um virus filtravel. Foram injectados em cobaias 2 a 3 c.c. de uma cultura de estaphylococco em caldo, datando de 24 horas e adicionada de 1 a 3 c. c. do liquido sobrenadante do extracto fresco de testiculos de cobaia nova; a uma serie de testemunhas foi dada a mesma dose da cultura e completado o volume com solução salina. De modo nitido ficou demonstrado que o poder infectante do estaphylococco é praticamente sempre augmentado pela acção de certas substancias contidas nos extractos salinos de testiculos normaes. Assim, do ponto de vista da exaltação da infecção pelo extracto testicular, não encontraram diferença alguma apparente entre o virus vaccinico e o estaphylococco, ambos dotados de manifesta affinidade cutanea.

Posteriores estudos de Duran-Reynals (3), indicaram que o effeito do extracto parece exercer-se antes sobre o terreno do que sobre o virus, porquanto o virus injectado por via venosa se localizaria mais facilmente na area da pelle

previamente injectada com o extracto testicular. Estudando o effeito dos extractos de rim, de cerebro e de figado, esse auctor concluiu que, á semelhança do de testiculo, elles provocam tambem aumento das lesões, porém em grão menor. Notou que os coelhos apresentavam symptomas geraes, com cerca de 25 % de mortalidade, quando soffriam a exaltação das lesões vaccinicas pelo extracto testicular.

Sobre o processo das lesões visceraes consequentes á introducção da vaccina neuro-testicular os estudos de Ledingham e sua assistente M. Barratt (4), do Instituto Lister, confirmaram as observações de Douglas, Smith e Price, quanto á hypothese da responsabilidade directa do virus por tales lesões e sugeriram a probabilidade de alguma infecção bacteriana intervir no decurso da cachexia.

Pijoan (5), do Laboratorio de Pomona, em California, dando maior desenvolvimento aos estudos de Duran-Reynals, verificou a acção do extracto de diferentes organs sobre vinte amostras de bacterias diversas, encontrando em alto grão uma exaltação da infecção excepto em relação ao extracto de baço que, ás vezes, produz lesões ainda menores do que nos casos ordinarios.

Com o virus herpetico, da estomatite dos cavallos, da molestia de Borna e da vaccina fez Hoffmann (6), nos laboratorios do Instituto Rockefeller, interessantes verificações quanto á variavel exaltação das lesões por influencia dos extractos, conseguindo tornar virulentas amostras attenuadas de virus do herpes ou tornando infectante para certas especies ou tecidos resistentes o virus da estomatite vesicular. Dahi concluiu este A. que o phenomeno de Reynals pode servir de importante agente para o estudo dos virus filtraveis.

CONTRIBUIÇÃO PESSOAL

Procuramos, da nossa parte, fazer um estudo previo de certas condições do phenomeno de Duran-Reynals, especialmente no que se refere á influencia do aquecimento do extracto, da filtração e da quantidade do mesmo para melhor orientar a sua applicação, relativamente tanto ao virus commum da polpa vaccinica do Instituto, como ao virus puro filtrado, ambos obtidos segundo a technica descripta por um de nós e Lemos Monteiro (7). O extracto foi preparado com testiculos normaes de vitello, não immune á vaccina, retirados sob rigorosa asepsia e, em seguida triturados no apparelho Felix e emulsionados em Ringer na proporção de 1.000 c. c. da solução para 200,0 grs. de tecido finamente tritulado; filtrada a emulsão, foi verificada a sua esterilidade pelos meios ordinarios de laboratorio.

A primeira verificação teve em mira confirmar a realidade do phenomeno de Reynals e, para isto, dois coelhos foram inoculados por via intradermica, do lado direito com 0,2 c. c. de polpa diluida a 1/50 e do lado esquerdo com 0,2 c. c.

de uma mistura, em partes iguais de polpa e extracto testicular não filtrado, sendo a diluição final da polpa ajustada igualmente a 1/50.

Falam em favor da realidade do aumento das lesões os resultados do quadro abaixo e a photographia n.º 1.

I

VIRUS VACCINICO E EXTRACTO TESTICULAR

(Sobre o factor de Duran-Reynals)

DATA DA INOCULAÇÃO — 9 — IV — 1931

Datas	Polpa (1/50)			Polpa e extracto (1/50)		
	11 - IV - 31	13 - IV - 31	15 - IV - 31	11 - IV - 31	13 - IV - 31	15 - IV - 31
Coelho n.º 113	1,0×1,0 I	0,5×0,5 I	0,5×0,5 I	3,5×2,0 I	2,0×2,0 I	2,0×2,0 I
Coelho n.º 127	2,0×1,5 I	1,5×1,5 I	1,0×1,0 I	3,5×2,5 I	2,0×2,0 I	2,5×2,0 I

Os algarismos árabes indicam a medida tomada no maior diâmetro das pustulas; os romanos, o número de pustulas desenvolvidas.

Para demonstrar a influencia do calor sobre a actividade do extracto testicular tomamos dois coelhos, que receberam, por via intradermica no lado direito, 0,2 c. c. de polpa vaccinica mais extracto testicular não aquecido e, do lado esquerdo, 0,2 c.c. da mesma polpa mais extracto aquecido a 100° em banho maria, durante 15 minutos. A diluição final da polpa foi de 1/50.

II

VIRUS VACCINICO E EXTRACTO TESTICULAR

(Influencia do calor sobre a actividade do extracto)

DATA DA INOCULAÇÃO — 11 — IV — 1931

Datas	Polpa mais extracto não aquecido			Polpa mais extracto aquecido		
	11 - IV - 31	13 - IV - 31	17 - IV - 31	11 - IV - 31	13 - IV - 31	17 - IV - 31
Coelho n.º 122	3,0×2,0 I	G	G	1,5×1,5 I	1,5×1,5 I	1,0×1,0 I
Coelho n.º 128	2,0×1,5 I	1,4×1,4 I	1,4×1,4 I	0,5×0,5 I	0,5×0,5 I	0,5×0,5 I

G — indica generalização da pustula vaccinica; os demais algarismos têm a mesma significação que no quadro n.º I.

III

INFLUENCIA DA FILTRAÇÃO DO EXTRACTO ATRAVÉS
DE VELAS DIATOMACEAS

Os coelhos 126 e 144 recebem do lado direito 0,2 c.c. de polpa mais extracto filtrado em partes iguaes e do lado direito 0,2 c. c. de polpa diluida a 1/50.

DATA DA INOCULAÇÃO — 9 — IV — 1931						
Polpa mais extracto filtrado				Polpa diluida		
Datas	13 - IV - 31	15 - IV - 31	17 - IV - 31	13 - IV - 31	15 - IV - 31	17 - IV - 31
Coelho n. ^o 126	2,0×2,0 I	2,5×2,2 I	2,5×2,5 I	0,4×0,4 I	0,8×0,8 I	0,8×0,8 I
Coelho n. ^o 144	2,0×2,0 I	G	G	1,0×1,0 I	1,0×1,0 I	1,0×1,0 I

IV

INFLUENCIA DA QUANTIDADE DE EXTRACTO TESTICULAR

O extracto é diluido a 1/5, 1/50 e 1/500 e misturado em partes iguaes com polpa diluida a 1/25, obtendo-se assim diluição a 1/10, 1/100 e 1/1000 do extracto, ficando a polpa diluida a 1/50. Os coelhos 107 e 152 foram inoculados com 0,2 c. c. do extracto puro e 0,2 c. c. das misturas acima.

DATA DA INOCULAÇÃO — 9 — IV — 1931						
COELHO N. ^o 107				COELHO N. ^o 152		
Datas	11 - IV - 31	13 - IV - 31	15 - IV - 31	11 - IV - 31	13 - IV - 31	15 - IV - 31
Extr. puro	3,0×3,0 I	2,0×2,0 I	G	3,0×2,0 I	G	G
Extr. 1/10	2,0×3,0 I	G	G	3,0×2,0 I	G	G
Extr. 1/100	1,0×1,0 I	1,0×1,0 I	1,0×1,0 I	2,0×2,0 I	2,5×2,0 I	3,0×2,0 I
Extr. 1/000	0,5×0,5 I	0,8×0,8 I	0,5×0,5 I	1,5×1,0 I	1,5×1,5 I	1,8×1,5 I

Verificadas as condições do phenomeno e a influencia que sobre elle exercem o aquecimento, a filtração e a quantidade do extracto, tratámos de observar a sua acção sobre o virus puro, filtrado e sobre o virus vaccinico commum das polpas do Instituto e, finalmente procurámos determinar o seu limite de actividade afim de verificar si a influencia do extracto se exerceia mais sobre o virus ou sobre o terreno.

Para a experiencia com o virus filtrado utilizámos o de uma das partidas preparadas no Instituto de n.º 4.707 (em 10-IV-1931), de actividade previamente determinada pelo methodo de Gins e que, na diluição de 1/20.000, ainda se mostrava fortemente positivo. Partindo, pois, desse titulo, dois coelhos foram injectados por via intradermica, dando os resultados que se vêm no quadro n.º V.

V

DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE ACTIVIDADE DO VIRUS FILTRADO

COELHO N.º 234

DATA DA INOCULAÇÃO — 7 — V — 1931

Títulos das diluições	Resultados	
	Com extracto	Sem extracto
1/20.000	G	1,5 × 1,2
1/30.000	G	0,8 × 0,8
1/40.000	G	0,4 × 0,5
1/50.000	G	0,4 × 0,4
1/60.000	G	0,3 × 0,3
1/70.000	G	0,2 × 0,2

VI

COELHO N.º 257

DATA DA INOCULAÇÃO — 15 — V — 1931

Títulos das diluições	Resultados	
	Com extracto	Sem extracto
1/ 50.000	1,0 × 1,0	0,8 × 0,8
1/ 75.000	G	0,5 × 0,5
1/100.000	(II) 0,6 × 0,6	0,4 × 0,4
1/125.000	(II) 0,1 × 0,1	0,2 × 0,2
1/150.000	G	(III) 0,6 × 0,1
1/200.000	O	0,1 × 0,1

Com o mesmo fim e em identicas condições inoculámos dois outros coelhos com o virus ordinario da polpa vaccinica de n.º 4.632, que se mostrava activa, em doseamento previo, até na diluição de 1/75.000; partindo desse titulo, chegámos a attingir o limite de 1/250.000 que em contacto com o extracto ainda determinava lesões generalizadas.

VII

COELHO N.º 287		
DATA DA INOCULAÇÃO — 7 — V — 1931		
Titulos das diluições	Resultados	
	Com extracto	Sem extracto
1/ 75.000	G	1,6 × 1,2
1/100.000	G	0,8 × 0,8
1/105.000	G	0,6 × 0,6
1/110.000	G	0,5 × 1,0
1/115.000	G	0,6 × 0,6
1/120.000	G	0,6 × 0,6

VIII

COELHO N.º 255		
DATA DA INOCULAÇÃO — 15 — V — 1931		
Titulos das diluições	Resultados	
	Com extracto	Sem extracto
1/100.000	G	0,5 × 0,5
1/125.000	G	0,7 × 0,7
1/150.000	G	1,0 × 1,0
1/175.000	G	0,3 × 0,4
1/200.000	G	0,3 × 0,3
1/250.000	G	0,5 × 0,5

LOCALIZAÇÃO DO VIRUS, PREVIAMENTE INOCULADO POR VIA VENOSA, NA PELLE DE COELHOS, INJECTADOS POR VIA DERMICA COM EXTRACTO TESTICULAR

Quatro coelhos recebem, em tres pontos da pelle depilada, 0,5 c. c. de extracto testicular puro, 0,5 c. c. de extracto diluido a 1/10 e 0,5 c. c. de extracto diluido a 1/100; dois outros recebem em regiao não irritada (pelos cortados á tesoura).

0,2 c. c. de extracto testicular 24 e 48 horas depois da inoculação de 2 c. c. do virus puro e 2 c. c. da polpa vaccinica na diluição 1/25, por via venosa, respectivamente.

IX

N.º do coelho	Material inoculado	Data da inoc. do extr.	Diluição do extracto			Observações
			Ext. puro G.	Ext. 1/10 G.	Ext. 1/100 G.	
130	Virus puro	10.IV.1931				Pelle depilada (irritada) e extracto inoculado ao mesmo tempo.
108	"	"	G	G	G	
129	Polpa 1/25	"	G	G	G	
140	"	"	G	G	G	
115	Virus puro	6.XI.1931	G	G	G	
55	Polpa 1/25	"	G	G	G	

TESTEMUNHAS

N.º do coelho	Data da inoc. do virus puro	Area irritada		Area não irritada
		Não inoculada com extracto	Inoculada c/ salina	
80	15.IV.1931	G	G	⊖
119	"	G	G	⊖
48	4.XI.1931	G	G	⊖
67	"	G	G	⊖

DUSCUSSÃO E SUMMARIO

As experiencias descriptas nestes ensaios confirmam a realidade do phemoneno de Duran-Reynals e mostram que o aumento da actividade do virus vaccinico, tanto em estado de pureza, como de mistura com os germes da polpa, é exercido pela acção do extracto testicular e que esse aumento soffre evidentemente influencia quando o mesmo extracto é aquecido ou filtrado. Diminue

tambem a sua acção á medida que se reduz a quantidade de mistura com o virus ou a polpa.

A possibilidade de ter á mão o virus vaccinico puro filtrado favoreceu o estudo isolado da influencia directa do extracto sobre o mesmo isento inteiramente de germes, que, sendo sensiveis, do mesmo modo á influencia do extracto, poderiam invalidar, até certo ponto, a conclusão de que, pelo augmento das lesões vaccinicas, só o respectivo virus devia ser responsabilizado.

Os resultados foram plenamente satisfactorios quanto á influencia directa do extracto testicular sobre o virus, ocasionando augmento das lesões, quando não a sua generalização com os caracteristicos todos descriptos por Duran-Reynals.

Procurando elucidar si a influencia do extracto se exerceia sobre o terreno ou sobre o virus, realizámos algumas experiencias que nos demonstraram, claramente, que tal acção se limita á diffusão do virus no tecido. Com effeito, os resultados de determinação do limite de actividade do virus, de mistura com o extracto testicular, comparativamente com o do virus diluido em salina, não demonstraram uma multiplicação do virus, o que nos leva a crer, de preferencia, na possibilidade de um processo de diffusão deste no derma.

A Duran-Reynals não escapou a mesma indagação e para isto fez inocular por via venosa o virus vaccinico e por via cutanea o extracto testicular, notando que aquelle se localizava de preferencia no ponto em que este havia sido introduzido, concluindo que só a influencia do extracto poderia determinar o facto.

De nossa parte, repetindo a experiencia acompanhada do necessario teste munho, não lográmos confirmar tal experientia. Notámos que, só nas areas que haviam soffrido irritações pela navalha ou mesmo pelo simples arrancamento do pelo, havia localização do virus com generalização da lesão sob influencia do extracto. Nas areas, porem, não irritadas, isto é, preparada a pelle apenas com cuidadoso corte á tesoura, sem ferir o derma, nenhuma manifestação foi observada. Por outro lado, tanto a inoculação do extracto testicular, como de salina nas areas irritadas determinou identico phenomeno comprovando as conhecidas experiencias classicas de Calmette e Guerin (8), de localização do virus no derma, ao nível das ligeiras erosões da pelle, quando elle é introduzido na circulação durante as primeiras 24 horas; "Lorsqu'on fait pénétrer directement le vaccin dans la circulation por voie intra-veineuse, on n'observe jamais chez le lapin d'eruption spontanée sur les muqueuses, comme M. Chauveau en a signalé sur le cheval. Mais, si, dans les premières 24 heures qui suivent l'introduction du vaccin dans les veines, on rase l'animal sur les dos, on voit apparaître le 3e. jour, sur la région rasée, une quantité de pustules parfaitement caractéristique. Aucune pustule ne se forme dans d'autres régions".

CONCLUSÕES

- 1.º) De acordo com os resultados dessas experiencias deixamos comprovada a realidade do phenomeno de Duran-Reynals.
- 2.º) A exaltação das lesões determinada pelo extracto testicular é identica, tanto sobre o virus commum da polpa vaccinica, como sobre o virus puro filtrado.
- 3.º) O aquecimento e a filtração do extracto exercem influencia sobre o phenomeno; a intensidade das lesões é proporcional á quantidade do extracto.
- 4.º) A previa penetração do virus vaccinico por via venosa não occasiona localização na area do derma posterior ou concomitantemente inoculada com o extracto e sim nos pontos irritados da pelle.
- 5.º) O phenomeno de Duran-Reynals está mais relacionado a um processo de diffusão do virus no derma do que propriamente a uma acção directa do extracto sobre o virus.

ABSTRACT

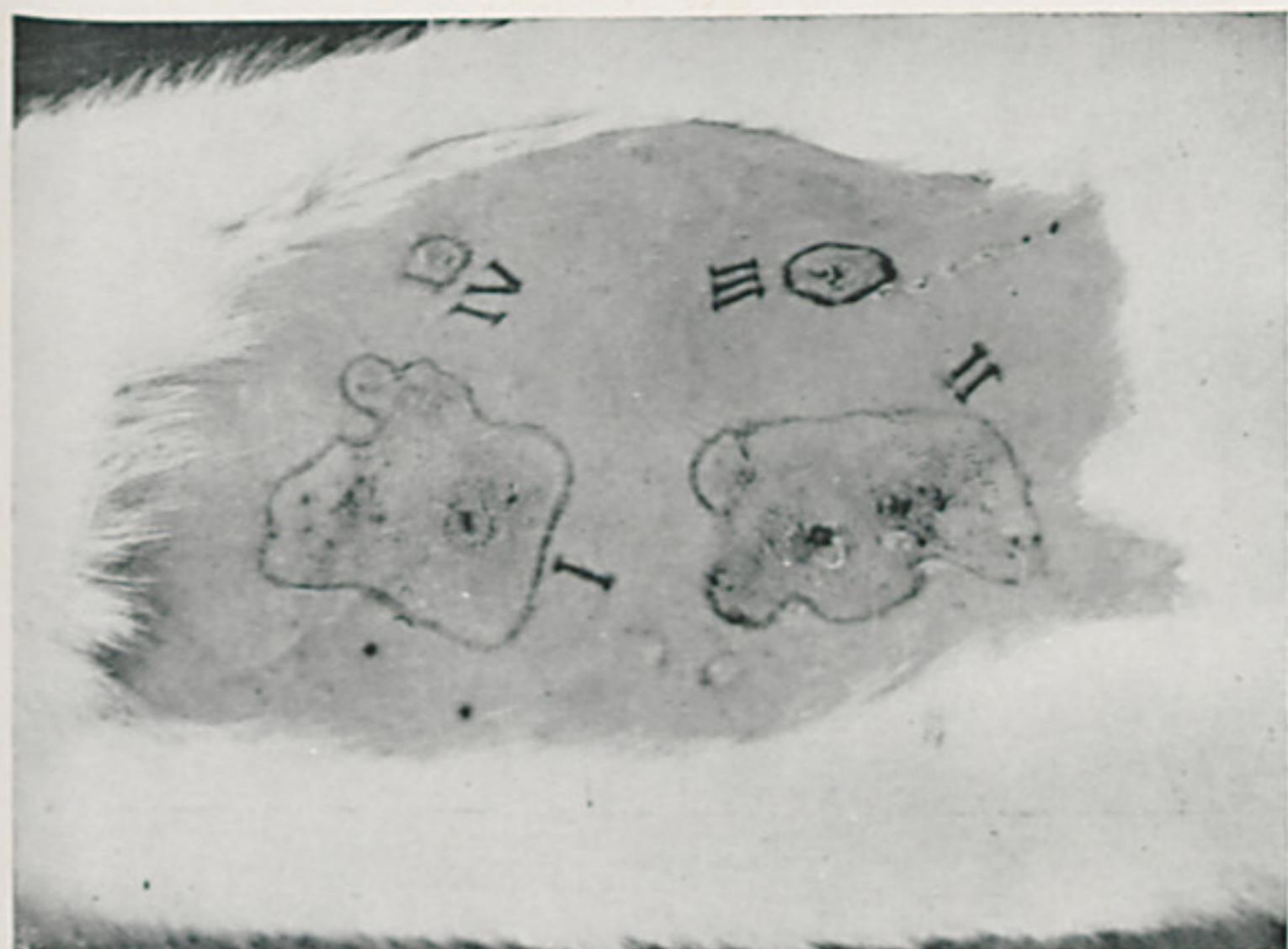
Experiments carried on with a view to checking up Duran-Reynals' phenomenon in relation with vaccine virus showed that the increase in the lesions as brought about by testicle extract is identical when either the virus of vaccine lymph or the pure filtered virus be employed. Heating and filtering the extract are detrimental to the phenomenon; the intensity of the lesions is proportional to the amount of the extract used. A previous intravenous inoculation of the vaccine virus does not cause this to localize in the derma area either posteriorly or simultaneously inoculated with the extract but in those points of the skin which have suffered an irritation. The Duran-Reynals' phenomenon seems to be more closely related to a diffusion process of the virus through the derma than to a direct action of the extract upon the virus.

BIBLIOGRAPHIA

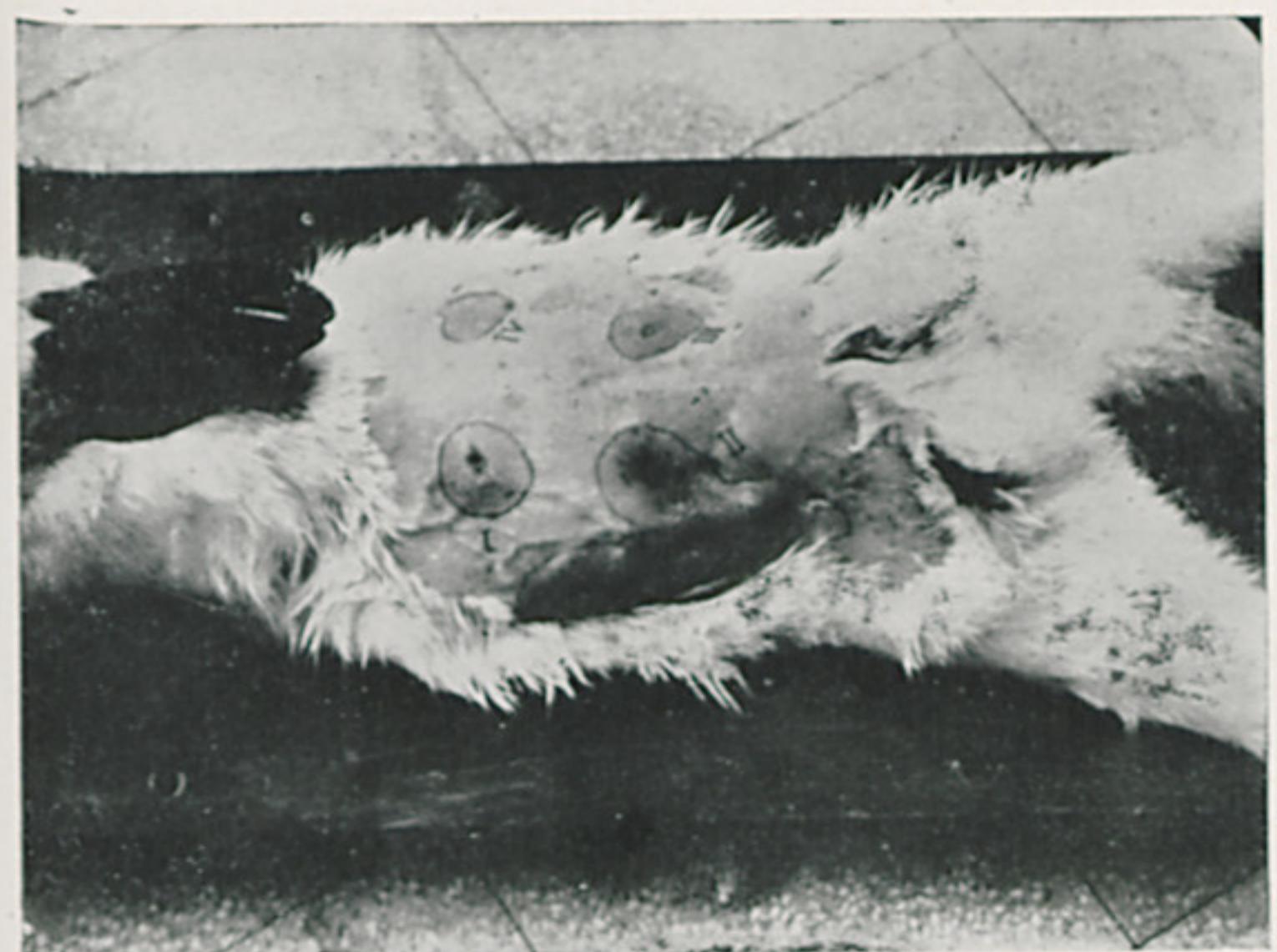
1. *Duran-Reynals, F.* — Exaltation de l'activité du virus vaccinal par les extraits de certains organes. — C. R. Soc. Biologie XCIX(19):6.1928.
2. *Duran-Reynals, F. & Suner Pi, J.* — Exaltation de l'activité du staphylocoque par les extraits testiculaires. — C. R. Soc. Biologie XCIX(38):1908.1928.
3. *Duran-Reynals, F.* — The effects of certain organs from normal and immunized animals on the infecting power of vaccine virus. — J. Exper. Med. L(3):327.1929.
4. *Ledingham, G. C. J. & Barati, M. M.* — Visceral lesions that may accompany experimental vaccinia in rabbits. — Lancet CCXVII(5532):515.1929.

5. Pijoan, M. — The action of testicle, kidney, and spleen extracts on the infective power of bacteria. — J. Exper. Med. LII(1):37.1931.
6. Hoffmann, C. D. — The effect of testicular extract on filterable viruses. J. Exper. Med. LII(1):43.1931.
7. Monteiro, J. Lemos & Godinho, R. — A prophylaxia da variola com o emprego do virus vaccinico filtrado e puro. — Bol. Soc. Med. Cirurg. S. P. XIV(10,11 e 12):440.1931.
8. Calmette, A. & Guerin, C. — Recherches sur la vaccine expérimentale — Annales de l'Inst. Pasteur XV(3):161.1901.

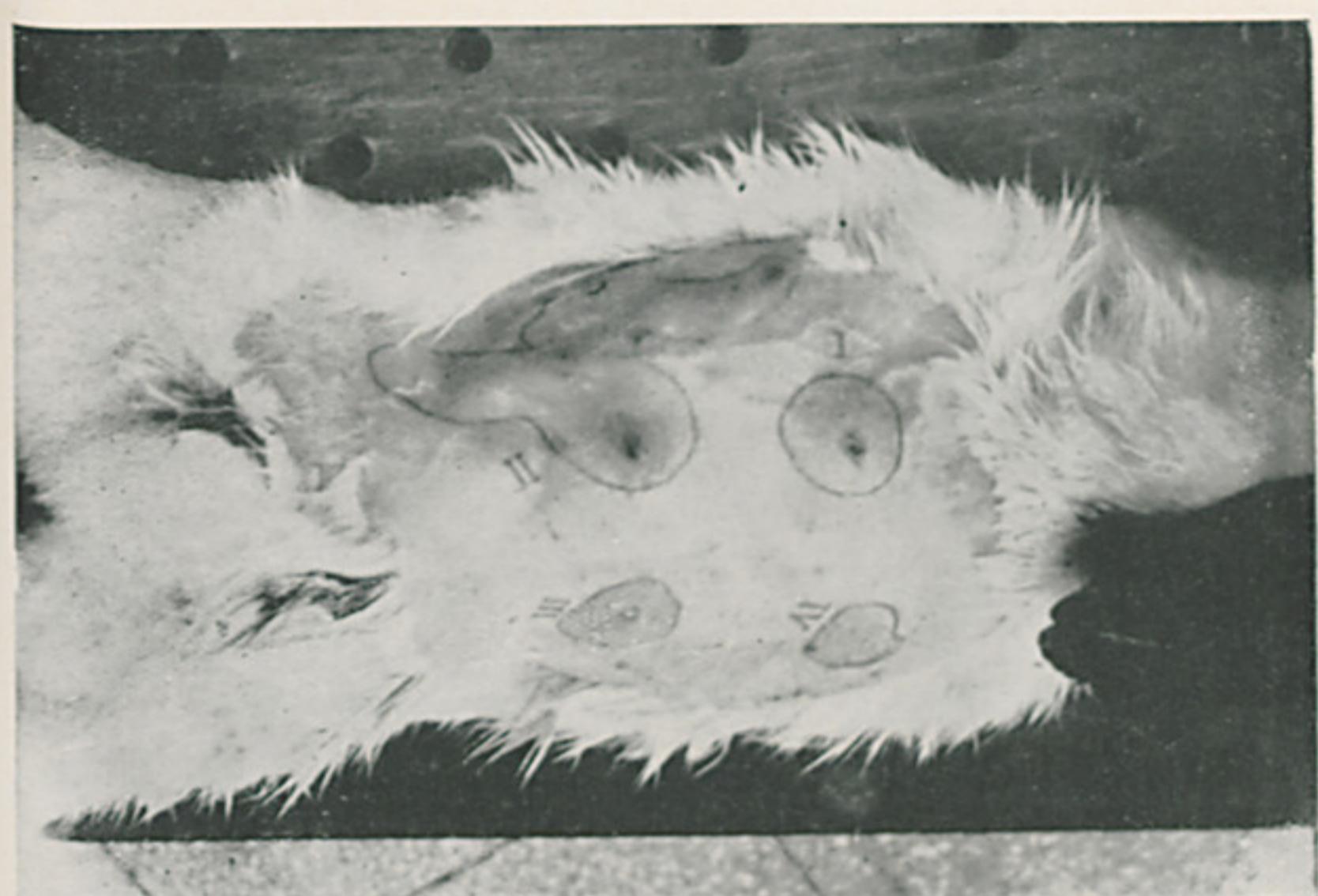
(Trabalho da Secção de Virus e Virustherapia do Instituto Butantan, apresentado á Semana do Laboratorio, Soc. Med. Cir. S. Paulo, janeiro de 1932).



Coelho N.^o 107



Coelho N.^o 152



Coelho N.^o 127



Coelho N.^o 122