

614.47:614.512

DIFFERENÇA DA CAPACIDADE DE IMMUNIZAÇÃO DA COBAIA (*CAVIA PORCELLUS* L.) E DO PREÁ (*CAVIA RUFESCENS* LUND) CONTRA A ANATOXINA DIPHTERICA

POR

GERTRUD VON UBISCH & JANDYRA P. DO AMARAL

INTRODUÇÃO

Entre as secções previstas na actual reorganização por que, desde 1931, passa o Instituto Butantan consta a de Genetica experimental (com Cytologia e Embryologia), a qual tem por função, além de outras, a de "estudar experimentalmente os phenomenos de actividade cellular, reproducção, hereditariedade, variação e selecção".

Afim de dar inicio em 1934 ás actividades scientificas da secção de Genetica, a d'rectoria do Instituto, além de trabalhos experimentaes destinados á ampliação e melhoramento de certas culturas agricolas, destinadas á alimentação de animaes, commetteu á nova secção um estudo sobre selecção de cavallos; nesse estudo se visaria especialmente seleccionar, por meio de cruzamento, uma raça de equinos bons productores de antitoxina; para isso, se têm experimentado previamente garanhões e eguas de diversas raças, que se immunizam com a toxina diphterica, para depois se ensaiarem no mesmo serviço os respectivos descendentes. Como, porém, essa verificação exigiria muitos annos de trabalho, ficou resolvido, por occasião do inicio de actividade da titular da nova secção de Genetica, que se approximaria o problema por outra face, dado que existia, no bioterio geral do Instituto, um grande numero de cobaias que vinham sendo hybridizadas com preás e cuja selecção teria que ser feita de accordo com os conhecimentos da genetica moderna.

Sendo as cobaias applicaveis em verificações immunologicas, um estudo nelas baseado poderia, além de indicios para o caso da criação de cavallos, fornecer, por analogia, resultados por si mesmos importantes. Havia, além disso, outro facto que justificava o trabalho com cobaias: occorrem no Brasil os preás

selvagens, provaveis antecessores das cobaias domesticas, os quaes com estas podem ser cruzados. Com effeito, ensina-nos a genetica moderna que nada nos dá conhecimentos mais profundos sobre um determinado genero de animaes ou de plantas do que o estudo dos cruzamentos entre especies differentes.

Os primeiros resultados deste trabalho, feito sobre cobaias e preás em relação á anatoxina diphterica e realizado, em estreita collaboração, pelas secções de Genetica e de Immunologia, surgem agora como nota previa, em antecipação de um artigo mais extenso, que só maior somma de dados, accumulados em um periodo mais longo, nos permittiria dar á publicidade.

E' sabido que a aproveitabilidade de qualquer especie de animal para fins immunologicos depende principalmente da constancia de suas reacções ou susceptibilidade a determinadas substancias. No particular, o ideal seria que todos os animaes da mesma especie reagissem igualmente ao mesmo principio, ou, pelo menos, que fosse minima a amplitude de sua variação neste particular. Todavia, em relação á cobaia encontram-se, de vez em quando na literatura, observações mais ou menos occasionaes a mostrar maior amplitude nesta especie do que o normal.

Procurando-se uma explicação para estas divergencias, apresentam-se duas possibilidades: uma é que a variabilidade póde provir de variações individuaes que não pódem ser eliminadas sinão por aferições muito amplas ou doseamentos de oscillação muito maior do que a normalmente observada na pratica: a outra, talvez mais provavel, é que a algumas differenças morphologicas, entre ellas notadas no tocante ao tamanho do corpo, cor do pello e typo de pelle, resultantes como são de mutações occorridas em raças locaes e provenientes de cruzamento entre estas, correspondem, tambem, reacções physiologicas differentes. Neste caso, póde-se esperar que as especies selvagens occupem os extremos: ou se immunizam mais facilmente ou mais difficilmente do que a especie cultivada, enquanto os mestiços entre as duas especies têm que estar entre os paes, offerecendo-nos, pois, a possibilidade de analysarmos geneticamente os factores ignorados

CONSIDERAÇÕES GENETICAS

Conforme já mencionámos na Introduccão, a situação para o estudo a respeito do cruzamento entre as especies de *Cavia*, é muito favoravel no [Brasil, onde occorrem preás selvagens, cruzaveis com cobaias. Deste modo, teriamos

a possibilidade de fazer provas com animaes, possuidores desde o sangue puro de preá até o sangue puro de cobaia, através de todas as gradações possíveis.

Dentre as diversas especies de Cavideos occorrentes na America do Sul as mais conhecidas são *C. aperea*, *C. rufescens* e *C. cutleri*, ao lado de muitas outras menos communs e pela primeira vez descriptas por O. Thomas, do Museu Britannico de Historia Natural. Tratando de uma raça de preá, *C. rufescens pamparum*, procedente do leste da provincia de Buenos Aires, escreveu Thomas (1) o seguinte: "Additional material only serve to increase the difficulty and complexity of the problem as to the species and subspecies which should be admitted in the restricted genus *Cavia*". Estas palavras caracterizam bem a situação, pois, cada vez que se encontra um preá selvagem, surge desde logo a difficuldade de se identificar a especie a que pertence. Essa difficuldade é, sem duvida, devida á enorme extensão em que as diferentes especies de Cavideos parecem hybridizar-se na natureza.

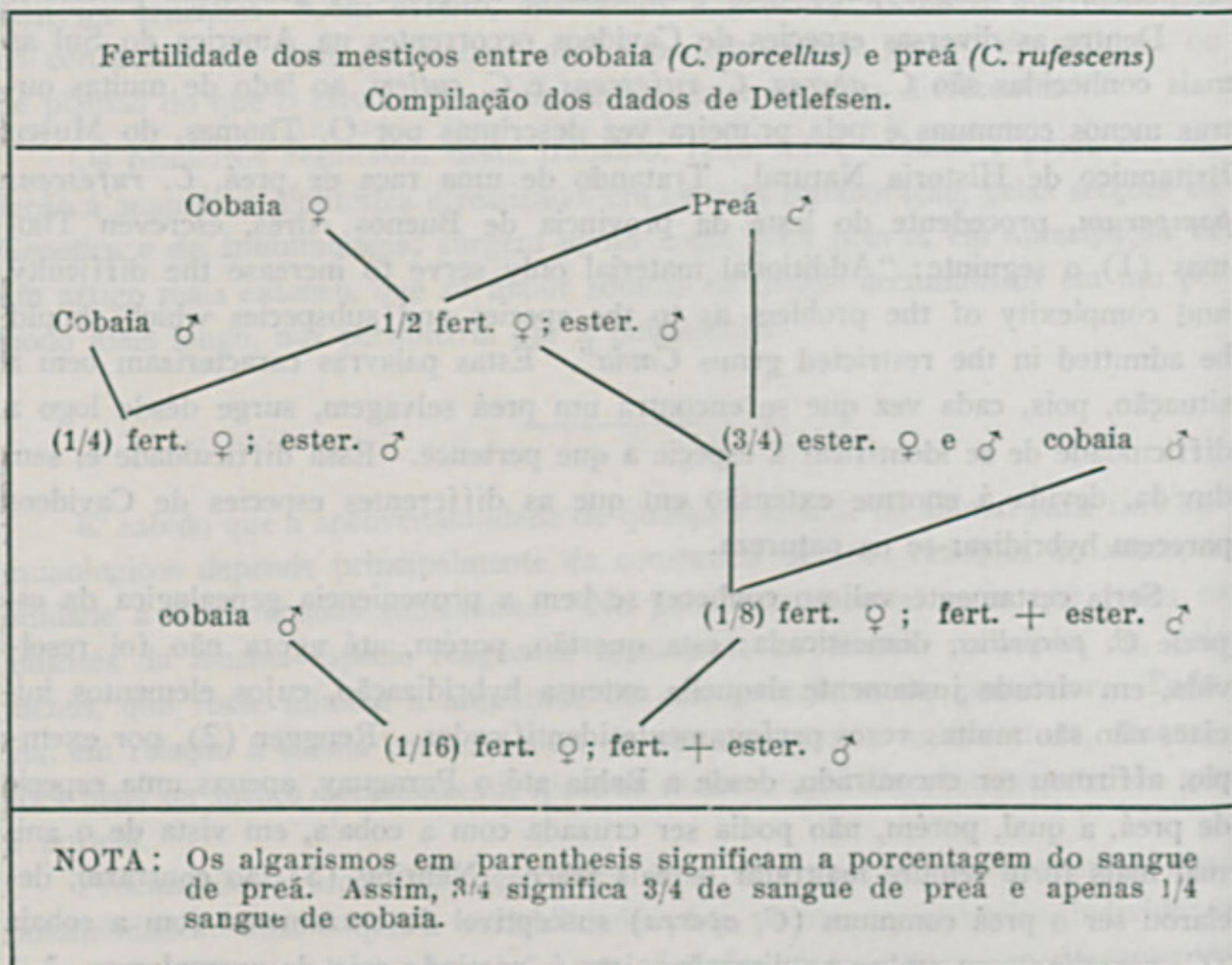
Seria certamente valioso conhecer-se bem a proveniencia genealogica da especie *C. porcellus*, domesticada; esta questão, porém, até agora não foi resolvida, em virtude justamente daquella extensa hybridização, cujos elementos iniciaes não são muitas vezes perfeitamente identificados. Rengger (2), por exemplo, affirmou ter encontrado, desde a Bahia até o Paraguay, apenas uma especie de preá, a qual, porém, não podia ser cruzada com a cobaia, em vista de o animal mais forte sempre maltratar o mais fraco. Nehring (3), ao contrario, declarou ser o preá commum (*C. aperea*) susceptivel de cruzamento com a cobaia (*C. porcellus*) em ambas as direcções, isto é, partindo seja de exemplares ♂♂ seja de exemplares ♀♀.

Para a orientação ao nosso presente estudo, os trabalhos mais importantes foram os de Castle e os de Detlefsen (4) e Castle e Wright (5), cujas pesquisas se realizaram com todas as cautelas aconselhadas pela moderna sciencia da hereditariedade.

No momento, cumpre-nos accentuar que Castle e Detlefsen (4) trabalharam com preás (*C. rufescens*), dos quaes obtiveram duas ♀♀ e um ♂, procedentes de Campinas, neste Estado. Seus cruzamentos foram feitos apenas numa direcção, pois o ♂ foi sempre da especie *rufescens*. Na primeira geração obtiveram ♀♀ férteis e ♂♂ estereis. No cruzamento reversivo com o respectivo pai, a ♀ da primeira geração produziu ♀♀ e ♂♂ estereis. No cruzamento com um ♂ de cobaia (*C. porcellus*), todavia, a ♀ da primeira geração produziu ♂♂ [ainda estereis, mas ♀♀ férteis. A esterilidade dos ♂♂ manteve-se até a diluição de 1/8 ou 1/16 do sangue de preá (*C. rufescens*).

No quadro I se pódem observar facilmente estes resultados:

QUADRO I



Em virtude de as experiencias terem sido feitas em Washington, sob condições mesologicas e climaticas pouco apropriadas talvez para a vida dos preás selvagens, e em virtude tambem de todos os cruzamentos se terem originado apenas de 2 ♀ ♀ e 1 ♂ selvagens, é possivel que a esterilidade dos ♂ ♂ mestiços fosse antes devida a condições inherentes ao individuo ♂ do que propriamente a alguma incompatibilidade entre as duas especies. Em experiencias subsequentes, Castle e Wright (5) trabalharam com *C. cutleri*, que Castle foi pessoalmente buscar no Perú. Suas conclusões indicavam não ter havido dificuldade alguma no cruzamento entre *C. cutleri* e *C. porcellus*, sendo ferteis todos os mestiços obtidos, como affirmou Castle. A' luz dessas experiencias, é provavel que a especie de preá selvagem *C. cutleri* (e não *C. rufescens*) represente o verdadeiro antecessor da cobaia domestica (*C. porcellus*). A proposito, é interessante accentuar que Castle encontrou, em Ica, no Perú, uma raça aparentemente selvagem com o tamanho da cobaia, mas de cor muito semelhante á do preá, isto é, cor de cotia-ouro, apresentando no pelo faixas um tanto mais amarello-claras e mais largas do que as communs no pelo do preá. Trata-se da mesma forma que, em

sua Fauna do Perú, von Tschudi, em 1844, descreveu sob o nome de *Cavia cutleri*, a qual é chamada de "cuy del monte" pelos indigenas locais. De accordo com os nossos conhecimentos de genetica é muito provavel que a forma encontrada em Ica representasse uma raça de cobaia que houvesse recebido do preá local o factor dominante da cor cotia, assim: representantes de cobaias normaes, com as tres cores branca-preta-amarella, teriam sido hybridizadas com preás selvagens; sendo a cor cotia a dominante, grande parte dos descendentes do cruzamento, havendo recebido essa coloração protectora, teria sobrevivido, enquanto os hybridos portadores de outras cores teriam desaparecido por pouco adaptados á lucta pela vida. Assim sendo, aquella raça de cor de preá mais clara representaria não os antecessores propriamente dito, mas os descendentes desses antecessores cruzados por acaso com cobaias normaes.

COMMENTARIOS SOBRE OS HYBRIDOS DO BUTANTAN

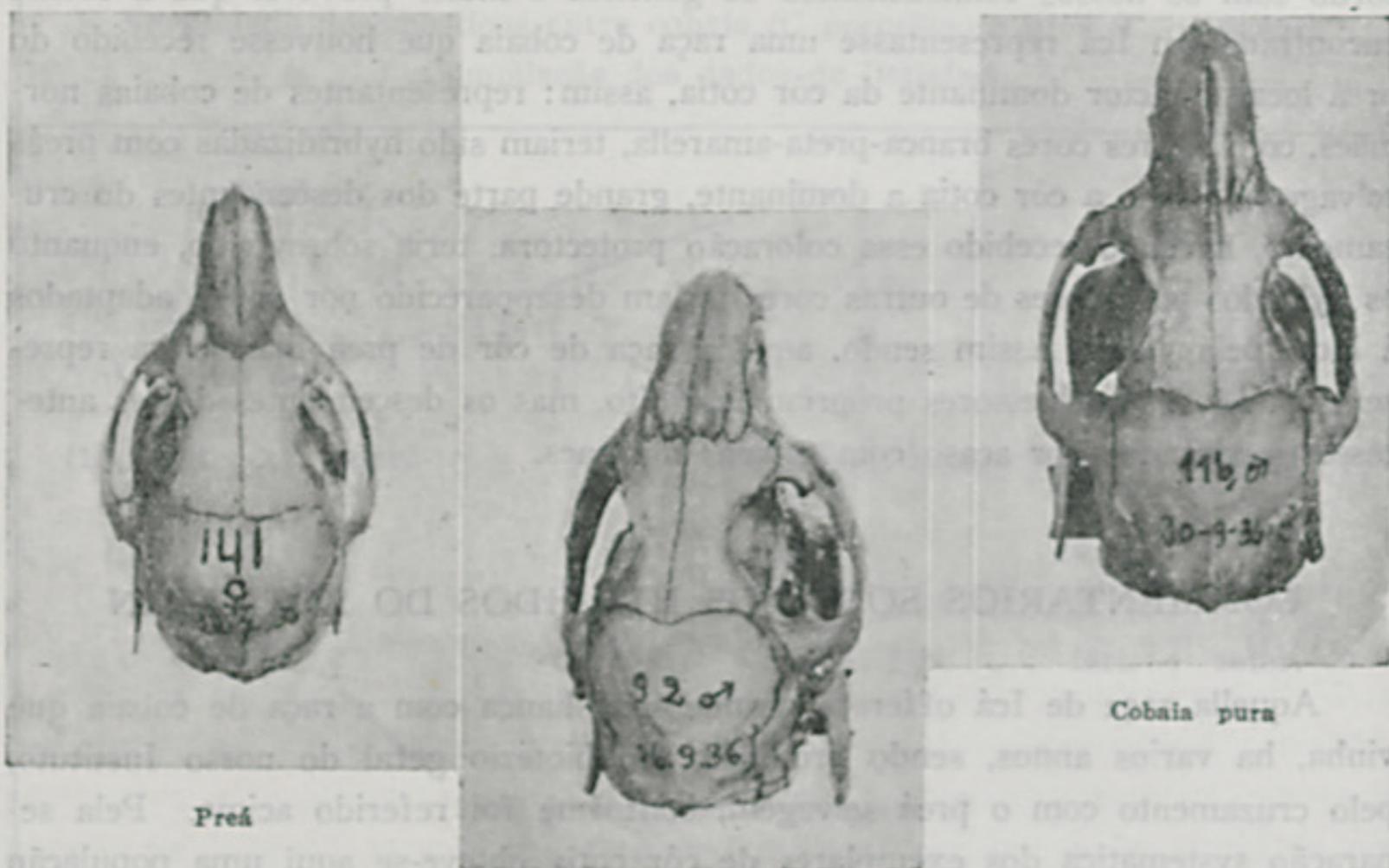
Aquella raça de Ica offerece grande semelhança com a raça de cobaia que vinha, ha varios annos, sendo produzida no bioterio geral do nosso Instituto, pelo cruzamento com o preá selvagem, conforme foi referido acima. Pela separação systematica dos exemplares de cor cotia obteve-se aqui uma população muito uniforme, semelhante ao preá quanto á cor, mas semelhante á cobaia quanto ao tamanho e ao temperamento. Em algumas gaiolas do bioterio geral ha tambem exemplares de cor só de preá, outros malhados com a cor cotia e finalmente outros pretos, sempre oriundos de cruzamento de cobaia com preás selvagens. Embora não se saiba a porcentagem exacta do sangue de cobaia e do sangue de preá nesses animaes, é certo que os de cor cotia são descendentes de preá, enquanto os que não têm essa cor podem ser ou não descendentes dessa especie.

Detlefsen (4), estudando cranios dos hybridos por elle e por Castle obtidos de cobaias (*C. porcellus*) com preás (*C. rufescens*), verificou notaveis differenças nas respectivas suturas naso-frontaes e fronto-parietaes aliás já mencionadas ha muito tempo nas publicações dos systematistas. Em nossos estudos, pudemos confirmar essas verificações: conforme se vê nas Figs. 1 a 6, a sutura naso-frontal, no preá puro, forma um M, enquanto, na cobaia, segue uma linha recta; pelo contrario, a sutura fronto-parietal, no preá, segue uma linha mais ou menos recta, enquanto, na cobaia, é sinuosa.

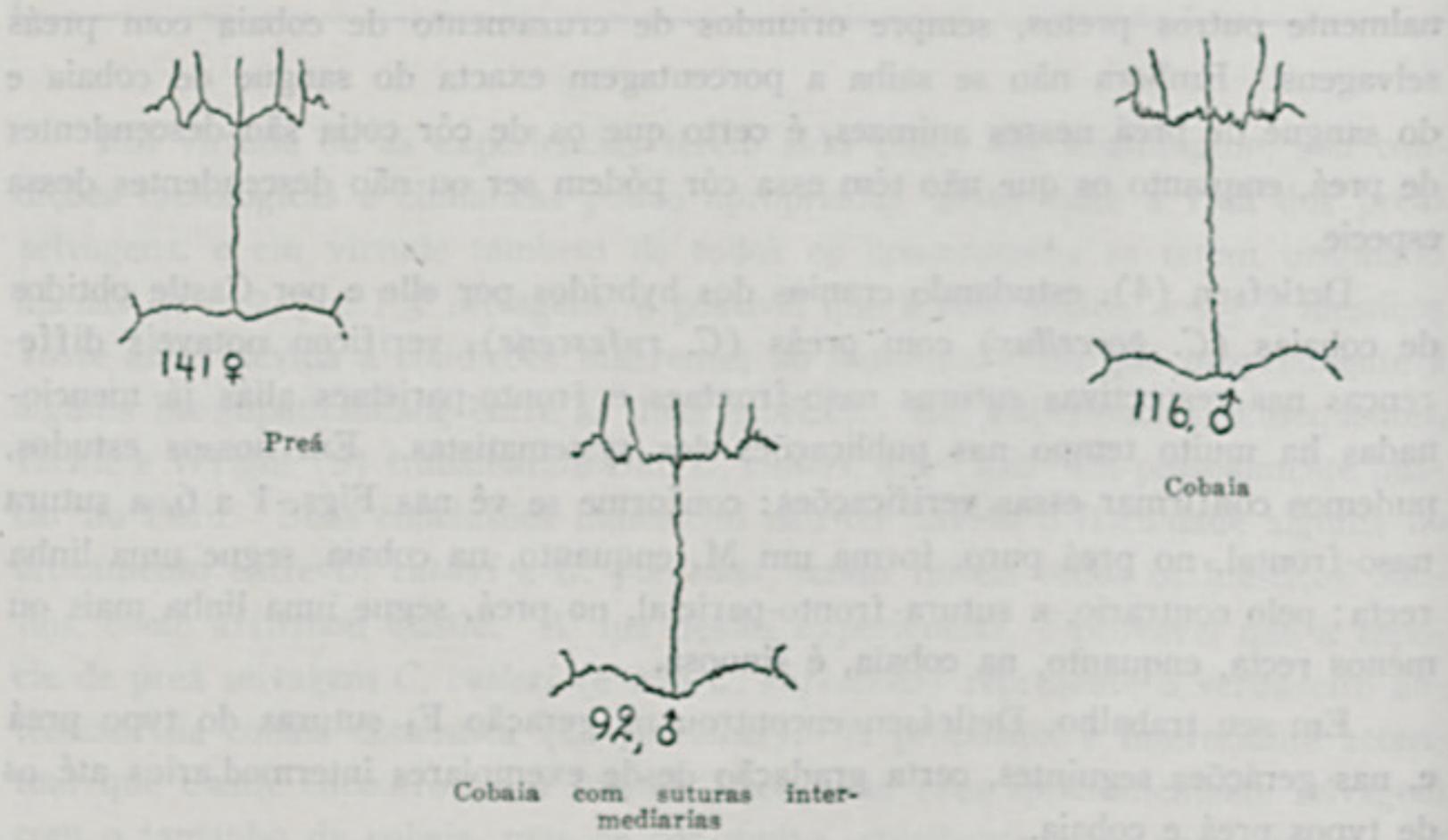
Em seu trabalho, Detlefsen encontrou na geração F_1 suturas do typo preá e, nas gerações seguintes, certa gradação desde exemplares intermediarios até os de typos preá e cobaia.

Neste caso das suturas cranianas, como na da distribuição da cor, é possível dizer-se que um exemplar com suturas de preá ou de typo intermediario é

su fauna do Pará, von Tschudi, em 1844, descreveu sob o nome de *Cobaia* e qual é chamada de "cuy del monte" pelos indigenas locais. De acordo com os nossos conhecimentos de espécies é muito provavel que a forma



mucho uniforme, semelhante ao *Cobaia* intermediaria, mas semelhante a *Cobaia* pura, em alguns pontos do bionomia geral ha tambem exemplares de *Cobaia* pura, outros nathados com *Cobaia* e ha tambem outros tipos, sempre oriundos de cruzamento de *Cobaia* com *Preá*



de tipo *Preá* e *Cobaia*. Note-se que as suturas estannas como as da distribuição da *Cobaia* e ha

descendente do preá, ao passo que o individuo sem suturas do typo preá póde, ou não, ser descendente desta especie.

Em 35 crânios preparados de animaes oriundos do bioterio geral ou do bioterio da Secção de Genetica, nunca encontrámos um só que apresentasse suturas do typo puro de preá; em 11 delles o typo de suturas era intermediario, distribuindo-se esses 11 individuos, quanto á côr e pelo, da seguinte maneira:

- 2 de côr branca-preta-amarella e com pelos lisos,
- 5 de côr cotia e de pelos crespos,
- 1 de côr preta e de pelos lisos,
- 1 de côr cotia e de pelos lisos,
- 1 de côr preta-amarella e com pelos lisos,
- 1 de côr cotia-branca e de pelos crespos.

Esta relação mostra que tambem nestes animaes, que aparentemente seriam cobaias puras, se pôdem encontrar genas do preá.

CONSIDERAÇÕES IMMUNOLOGICAS

Como é sabido, a cobaia presta-se admiravelmente á verificação do poder vaccinante da toxina diphterica, reagindo sempre, quando pura (*C. porcellus*), ás solicitações antigenicas. Para effeitos de comparação, pareceu-nos interessante verificar qual seria o comportamento do preá puro (*C. rufescens*), quando submettido á inoculação com a anatoxina diphterica.

TECHNICA:

a) ANIMAES — Nossas experiencias foram, até agora, realizadas parallelamente sobre oito cobaias (*C. porcellus*) e cinco preás (*C. rufescens*), submettidos ás mesmas condições de immunização.

b) ANTIGENO — Foi usada a anatoxina preparada no Instituto:

5 cc. della, quando inoculados na cobaia pura, produzem, ao cabo de um mez, um titulo antitoxico no soro capaz de neutralizar 10 D.M.L. de uma toxina activa a 1:500.

c) DÓSES — Os animaes foram inoculados por via hypodermica com as doses de 0,5 cc., 1 cc., 1,5 cc., 2 cc., 2,5 cc., de anatoxina, no volume de 4 cc., completado com soluto physiologico, e no intervallo, seja de 10, seja de 20 dias entre cada dose.

d) SANGRIAS — Foram praticadas 10 dias após a ultima inoculação do antigeno, sendo feitas quatro sangrias em cada animal na Serie 1 e duas na Serie 2.

e) AFERIÇÃO — Foi obtida mediante a inoculação da mistura toxina + antitoxina padrão: Quadro II, Serie 1, ou de antitoxina + 1 D.M.L. de toxina: Quadro II, Serie 2, em pombos adultos de 300 gs., conforme processo adoptado no Instituto (6,7).

QUADRO II

	Cobaías (<i>C. porcellus</i>)						Preás (<i>C. rufescens</i>)									
	Serie 1			Serie 2			Serie 1		Serie 2							
Anatoxina	69	99	110	116	130	103	167	139	95	117	175	144	135			
Total inoculado	7,5cc.						7,5cc.						3 cc.			
Dose maxima inoculada	2,5cc.						1,5cc.						1,5cc.			
Antitoxina	0,5cc. neutraliza						—						1 cc. não neutraliza			
Quantidade absoluta de soro puro neutralizando 1 L.+	0,1 neutraliza						0,1 neutraliza						1 cc. não neutraliza.		0,5 não neutraliza.	

Os resultados immunologicos por nós obtidos podem ser resumidos no quadro II.

RESULTADOS

Do exame deste quadro se deduz que ha nitidas differenças no comportamento das duas especies, cobaia e preá, ao estímulo produzido pelo antígeno diphtherico. A cobaia (*C. porcellus*) reage facilmente á excitação antigenica, ao passo que o preá (*C. rufescens*) a ella se mostra claramente resistente, apresentando muito menor capacidade de producção de antitoxina, pelo menos no que se refere á toxina diphtherica. Devemos accentuar que tambem experimentámos a resistencia da cobaia, comparativamente com a do preá, á toxina diphtherica; para isso, inoculámos, em 2 exemplares de cada especie, 1 D.M.L. de toxina por via hypodermica, tendo verificado que a cobaia e o preá têm a mesma sensibilidade áquella toxina. O comportamento das duas especies em relação á immunidadade contra outras toxinas será objecto de futuros trabalhos nossos.

DISCUSSÃO

O estudo do comportamento immunologico de especies muito proximas, ou de raças de uma mesma especie, apresenta interesse, que póde servir como um novo caminho para a comprehensão dos phenomenos de especiação e de estabelecimento de variedades e raças. No caso particular da cobaia, já se conhecem trabalhos que demonstram differenças immunologicas em certas linhagens. Assim é que Koltzoff (8) verificou que o teor de catalase no sangue varia dentro de certos limites, sendo que esta qualidade se transmite hereditariamente; desta maneira se poderão seleccionar raças com teor mais alto ou mais baixo de catalase. Tambem são conhecidas certas raças de cobaias, nas quaes a falta de alexina constitue factor transmissivel hereditariamente, segundo se depreheende dos estudos de Moore, Coca, Ecker e Hyde (9-12). Em relação a differenças sorologicas entre a cobaia (*C. porcellus*) e o preá (*C. rufescens*) conhecemos apenas um trabalho de Holzer (13), que, estudando as hemolysinas, as agglutininas e as precipitinas do sangue destas duas especies, verificou que é possivel estabelecer sua separação por meio da prova de agglutinação e hemolyse, mas não pela de precipitação. Este auctor estudou igualmente as reacções com o sangue dos hybridos de cobaia e preá, e, finalmente, investigou nellas os phenomenos de anaphylaxia; no entanto, neste ponto os resultados obtidos não foram uniformes, tendo alguns animaes morrido de choque, outros não. Todavía, em nossas experiencias, o estudo comparativo do ponto de vista, seja quantitativo, seja qualitativo do complemento do preá e da cobaia não demonstrou nenhuma differença apreciavel nestas duas especies (*).

De qualquer modo, os resultados por nós obtidos parecem particularmente interessantes, pois conseguimos demonstrar uma qualidade immunologica bem differente, nas duas especies comparadas, *C. porcellus* e *C. rufescens*.

(*) Ao dr. Nelson Planet agradecemos a gentil collaboração que nos proporeionou nesta prova da alexina.

O resultado assim verificado não era de todo inesperado. A actual directoria do Instituto, ha alguns annos, vinha notando sensivel variação nos resultados registados nos protocollos dos serviços de sorotherapia, em relação ás cobaias usadas para effeitos de aferição da actividade da toxina e da antitoxina diphtericas. Esta variação, que era maior do que a normal, conhecida desde os trabalhos fundamentaes de Ehrlich e de Behring, é agora explicada pela existencia de sangue de preá nas cobaias existentes no bioterio de Butantan.

O estudo comparativo de outros factores, assim como a analyse dos descendentes do cruzamento entre as duas especies, que está sendo feita por nós, poderá trazer dados ulteriores de maior interesse pratico e scientifico.

RESUMO

No estudo immunologico de especies muito proximas de Cavideos, taes como a cobaia (*C. porcellus*) e os preás (*C. rufescens* e outras), differenças interessantes têm sido assignaladas. Em experiencias agora realizadas ficou verificado que, enquanto *C. porcellus* reage facilmente ao antigeno diphterico, immunizando-se rapidamente, *C. rufescens* reage difficilmente, apresentando muito menor capacidade de producção de antitoxina. No entanto, estas 2 especies parecem igualmente sensiveis á fracção toxica da toxina diphterica.

ABSTRACT

In the course of immunological tests performed on certain closely allied species of cavies some interesting differences have been found to exist between the domesticated guinea-pig (*C. porcellus*) and the common wild-cavies (*C. rufescens* and others). A series of experiments now made with diphteria toxin (anatoxin) has disclosed that, whilst *C. porcellus* reacts very easily to this antigen, becoming rapidly immunized against it, *C. rufescens* reacts rather difficultly thereto, showing a much smaller capacity of antitoxin production. Both species, however, seem to be equally sensitive to the toxic fraction of diphteria toxin.

BIBLIOGRAPHIA

1. THOMAS, O. — A collection of Mammals from E. Buenos Ayres, with descriptions of related new mammals from other localities — Ann. & Mag. N. H. (8)V:239-247.1910.
2. RENGGER, J. R. — Naturgeschichte der Saeugetiere von Paraguay, Basel, 1830.

3. NEHRING, A. — Über Kreuzungen von *Cavia aperea* und *Cavia cobaya* — Stzb. Ges. naturf. Freunde zu Berlin 10.1893.
— Über Kreuzungen von zahmen und wilden Meerschweinchen, *Cavia cobaya* und *Cavia aperea* — Zool. Garten XXXV(1-3).1894.
4. DETLEFSEN, J. A. — Genetic studies on a Cavy Species Cross — Public. Carnegie Institution of Washington:1-132.10 tabs. 1914.
5. CASTLE, W. E. & WRIGHT, S. — Studies of inheritance in Guinea-pigs and rats — Public. Carnegie Institution of Washington (pt. I & II):1-121. 7 tabs. 1916.
6. PENTEADO, D. C. — Contribuição á sorotherapia anti-diphtherica — Ann. VIII.º Congr. Brasil. Med. I:474(1918)1925.
7. AMARAL, A. DO; ARANTES, J. B. & FONSECA, F. DA — Sobre a duração das actividades das antitoxinas e antivenenos — Mem. Inst. Butantan VII:331.1932.
8. KOLTZOFF, N. K. — Ueber erbliche chemische Bestandteile des Blutes — V. Int. Congress f. Vererb. Wiss. Berlin II:931-935.1928.
9. MOORE, H. D. — A study of the serum of guinea-pigs naturally deficient in complement — J. Immunology IV:425-441.1919.
10. COCA, A. — A study of the serum of complement-deficient guinea-pigs — Proc. Exp. Biol. & Med. XVIII:71.1920.
11. ECKER, E. — Quantitative relations between amboceptor and the serum of complement-deficient guinea-pigs — J. Inf. Diseases XXIX:611-614.1921.
12. HYDE, R. — Complement-deficient guinea-pig serum — J. Immunology VIII:267-286.1923.
13. HOLZER, F. J. — Ueber die serologische Differenzierung zweier Meerschweinchenarten — Ztschr. f. Immunitätsf. LXXXIV:170-176.1935.

(Trabalho de colaboração das Secções de Genética e de Immunologia do Instituto Butantan. Recebido em dezembro de 1936. Dado á publicidade em maio de 1937).