

CONSERVAÇÃO DA VITALIDADE DO VIRUS AMARILICO INOCULADO NO TESTICULO DE COBAIAS (*) - (**)

POR

FLAVIO DA FONSECA

Uma análise das técnicas de cultura e inoculação utilizada em bacteriologia, micologia, parasitologia e principalmente no estudo dos virus permite concluir que o tecido seminal constitui meio excelente para o desenvolvimento de varias especies parasitarias.

Como base para o cultivo de virus em culturas de tecido tem sido utilizado o testiculo por varios pesquisadores. Andrewes (1) e Topacio e Hyde (2), obtiveram por esse meio a cultura do virus III, a qual é, entretanto, negativa quando empregadas celulas do figado, baço, rim e medula ossea. O virus do herpes foi tambem cultivado em celulas de testiculo de coelho por Andrewes (3). O virus da pseudorraiva, segundo Traub (4), e o virus vacinico, segundo Harde (5), são igualmente passíveis de cultivo em presença de celulas testiculares. A propria cultura do virus amarellico foi já obtida por Haagen e Theiler (6) e por Haagen (7), utilizando culturas de tecido seminal de coelho e de cobaio.

As reações escrotais, devidas à localização na vaginal de *Pfeifferella mallei* e de algumas das muitas especies de *Rickettsia* são bastante conhecidas.

(*) A presente nota já se achava elaborada e tinha sido entregue para publicação nos Comptes Rendus de la Société de Biologie, quando nos foi dado ler, no Tropical Diseases Bulletin 35(7):496.1938, uma referencia a um trabalho de Hugh H. Smith sobre a persistencia do virus amarellico inoculado nos testiculos de camundongos brancos. Esse trabalho fora publicado no Amer. Journ. Trop. Med. 18(1):77.1938, cujo exemplar se extraviara antes de chegar à biblioteca do Instituto Butantan, que ainda o não possui, razão pela qual escapou à nossa revisão bibliografica. Nele refere Smith ter efetuado 20 passagens com virus Asibi, 42 com virus francês, além de outros, observando maximo da concentração do virus no 7.º dia e persistencia até mais ou menos o 20.º.

(**) Trabalho realizado no Instituto Butantan em colaboração com o extinto Serviço Especial de Defesa contra a Febre Amarella, a cujo Diretor, Dr. H. de Beaurepaire Aragão, apresentamos agradecimentos.

A inoculação do *Treponema pallidum* em coelhos, a de *Leishmania tropica* e de *Leishmania brasiliensis* em camundongos brancos, a de cogumelos das blastomycoses em cobaias, da mesma maneira que o tropismo testicular demonstrado pelas larvas de *Porocephalus clavatus* administradas por via oral a cobaias (neste volume), testemunham igualmente constituírem as células seminiais um ambiente propício ao desenvolvimento de muitos parasitas fóra dos seus hospedeiros naturais.

Baseado no conhecimento destes fatos empreendemos pesquisas tendentes a experimentar a via testicular como porta de entrada do vírus amarelado em algumas espécies animais, tendo utilizado camundongos brancos da estirpe Swiss, cobaias e gambá (*Didelphys aurita*).

Não tínhamos ainda nesta ocasião conhecimento dos trabalhos de Lloyd e Mahaffy (8), que já haviam verificado a possibilidade de manter-se e multiplicar-se o vírus amarelado no testículo de camundongos sensíveis durante um lapso de tempo máximo de 120 horas. Estes pesquisadores conseguiram obter até 9 passagens em série, inoculando vírus neurotrópico por via testicular, não tendo, todavia, conseguido reisolar o vírus em duas tentativas após o decurso de 140 horas, falhando às vezes a inoculação mesmo com 120 horas apenas.

As observações de Lloyd e Mahaffy visaram tão somente o estudo do comportamento do vírus inoculado em testículo de camundongo, com vistas sobretudo à obtenção de amostra orquidotrópica passível de futura aplicação em técnica de vacinação, não tendo interessado a esses pesquisadores conhecer o prazo máximo de persistência do vírus inoculado.

Em nosso trabalho visava a finalidade primária verificar o comportamento do vírus inoculado por esta via em diversas espécies animais nas quais já fossem conhecidos os resultados da inoculação por vias mais comuns. Secundariamente, depois de observada a persistência da vitalidade do vírus no testículo de cobaias, tivemos em mira conseguir processo fácil de conservação da atividade do vírus amarelado durante prazo mais ou menos longo sem necessidade de passagens frequentes ou de utilização da técnica de secagem em vácuo e a baixa temperatura, só possível em laboratórios dotados de aparelhagem adaptada a esse processo.

Além do de Lloyd e Mahaffy, o único trabalho que conhecemos em que é feita referência à prática de inoculações testiculares de vírus amarelado é o de Cowdry e Kitchen (9), que apenas visaram a pesquisa de inclusões nucleares em tecidos diretamente inoculados com o vírus, não tendo sequer verificado a vitalidade do vírus introduzido por essa via.

O material utilizado constou de amostra do vírus Asibi e da amostra neurotrópica francesa, ambas obtidas da Fundação Rockefeller pelo dr. Henrique Aragão, diretor do extinto Serviço Especial de Defesa contra a Febre Amarela, ao qual consignamos o nosso agradecimento. A amostra Asibi foi por nós secada em

alto vacuo segundo a tecnica de Sawyer, Lloyd e Kitchen (10) e utilizada em diluição a 1 : 10. O virus neurotropico foi mantido quer por passagens sucessivas em camondongos sensiveis, quer seco em alto vacuo, sendo utilizado material conservado por ambos os processos diluido a 1 : 20.

Experiencia I — 6 camondongos da estirpe Swiss foram inoculados a 27-IV-38, por via testicular, com 0,1 cc. de virus Asibi a 1 : 10 em solução fisiologica. Sacrificados a 9-V, foi feita emulsão dos testiculos sendo inoculados por via cerebral seis camondongos com 0,03 cc., os quais não apresentam sintomas durante mais de 30 dias.

Experiencia II — *Didelphys aurita* 1815, inoculado com 0.25 cc. de diluição a 1 : 10 de virus Asibi em cada testiculo, a 27-IV-38. Não apresentou sintoma algum durante todo o tempo em que foi observado, nem mesmo virus circulante, pesquisado a 30-V e a 4-V, até 11-V, quando o animal foi sacrificado. Inoculado o produto da maceração dos testiculos em seis camondongos suissos, na dose de 0.03 cc., não foram observados sintomas até mais de 20 dias depois da inoculação.

Cobaia 1741 — Inoculada a 20-V-38 com 0.5 cc. de virus neurotropico a 1 : 20 em cada testiculo. Sangrada e sacrificada a 23-V, não foi obtido isolamento do virus circulante, sendo positiva a inoculação do tecido testicular em camondongos, apresentando-se estes doentes a partir do 4º dia.

Cobaia 1724 — Inoculada a 27-IV-38 com 0.25 cc. de virus Asibi seco diluido a 1 : 10 em cada testiculo. Sangrada a 30-IV e 4-V não foi obtido isolamento do virus. Sacrificada a 11-V, foi o macerato de testiculos inoculado por via cerebral em 6 camondongos, morrendo os primeiros a 17-V, tendo sido reisolado virus.

Cobaia 1740 — Inoculada a 20-V-38 com 0.5 cc. de virus neurotropico a 1 : 20 em cada testiculo. Sangrada a 23-V não foi obtido isolamento do virus. Sacrificada a 9-VI-38, foi feita passagem de macerato de testiculos para cerebro de camondongos, que apresentaram paralisia tipica a 14-VI-38.

Cobaias 1747 e 1748 — Inoculadas a 24-V-38 com 0.5 cc. de emulsão de virus neurotropico a 1 : 20 em cada testiculo. Sacrificadas a 11-VII-38 foi reisolado virus após inoculação do macerato de testiculos em camondongos. Nestes dois animais o virus permaneceu, portanto, ativo durante 48 dias.

De uma outra cobaia do mesmo lote que as precedentes inoculada pela mesma via e com o mesmo material a 24-V e sacrificada a 25-VI, não foi conseguido o reisolamento do virus, o que demonstra que a conservação da vitalidade não é sempre observada.

CONCLUSÕES

1.^a Não foi possivel reisolare o virus Asibi 12 dias depois de inoculado nos testiculos de camondongos brancos e de *Didelphys aurita*.

2.^a Foi observada persistencia de vitalidade do virus Asibi 14 dias após inoculação em testiculos de cobaia.

3.^a Foi reisolado virus neurotropico ativo até 48 dias depois da inoculação em testiculos de cobaia, parecendo, entretanto, inconstante a persistencia da vitalidade durante tão longo lapso de tempo.

4.^a A analogia de comportamento em relação ao desenvolvimento dos virus, observada entre as celulas seminais e os tecidos embrionarios, deve estar, provavelmente, ligada à grande atividade de reprodução, esta devida ao tipo identico de metabolismo (11), que lhes é, aliás, comum às celulas tumorais.

BIBLIOGRAFIA

1. *Andrewes C. H.* — Brit. Journ. Exper. Path. 10:188 et 273.1929.
2. *Topacio, T. & Hyde, R. R.* — Amer. Journ. Hyg. 15:98.1932.
3. *Andrewes, C. H.* — Journ. Path. a. Bact. 33:301.1930.
4. *Traub, E.* — Journ. Exper. Med. 58:663.1933.
5. *Harde, E. S.* — C. R. Soc. Biol. 78:545.1915.
6. *Haagen, E. & Theiler, M.* — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 29:435.1932 et Centralbl. f. Bakt. I. Orig. 125:145.1932.
7. *Haagen, E.* — Centralbl. f. Bakt. I. Orig. 128:13.1933 et Arch. f. Zellforsch. 18:405.1934.
8. *Lloyd, W. D. & Mahaffy, A.* — Journ. Immunology 25:471.1933.
9. *Cowdry, E. V. & Kitchen, S. F.* — Amer. Journ. Hyg. 11(2):227.1930.
10. *Sawyer, W. A.; Lloyd, W. D. & Kitchen, S. F.* — Journ. Exper. Med. 51(1):1.1929.
11. *Warburg,* — Cit. de *Martins, T.* — Glandulas sexuaes e hypophyse, S. Paulo 1937:493.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).