

ESTUDOS SÔBRE A CAUSA DE MORTE NO TÉTANO

IV — Tétano experimental no camundongo branco: quadro clínico, metabolismo, glicogênio hepático e resistência à asfixia

Kurt KLOETZEL

RESUMO

Neste trabalho foi estudado primeiramente o quadro clínico determinado por doses variáveis de toxina tetânica, comprovando-se que doses baixas se fazem acompanhar de hipertonia muscular, enquanto que doses muito elevadas produzem paralisia completa do animal, com grande redução tanto no período de incubação como no tempo de sobrevida. A hipertonia muscular não se mostrou incompatível com a sobrevida nos animais injetados com baixas doses de toxina, verificando-se recuperação completa. Nenhum dos animais apresentou espasmo generalizado, corriqueiro no tétano humano de média e grande gravidade, indício certo de que a causa de morte nesta enfermidade deverá ser procurada alhures.

Animais injetados com 1,5 e 4,0 DMM (padronizados para o cobaio) recuperam o seu peso quando alimentados após período de jejum, mesmo depois que sintomas de tétano já se manifestaram. Da mesma forma, observa-se no grupo injetado com 4,0 DMM que o glicogênio hepático volta a seus níveis iniciais durante a realimentação, o que indica que a "lesão bioquímica" que supomos existir no tétano ou não interfere na síntese do glicogênio ou se manifesta apenas como fenômeno terminal.

O metabolismo do animal injetado com toxina tetânica sofre pronunciada queda nas séries com 40.000 e 100 DMM, a despeito de acelerado consumo de glicogênio hepático. Esta evidência de incompleta metabolização dos carboidratos parece-nos indicativa de um bloqueio enzimático determinado pela toxina tetânica no camundongo branco.

O tempo de sobrevida a baixas tensões parciais de oxigênio é sensivelmente menor no animal inoculado, mesmo quando este fôr examinado antes de se manifestarem os sintomas de tétano. A nosso ver isto atesta a existência de um bloqueio no metabolismo anaeróbio dos carboidratos.

Êstes achados não são específicos do tétano, como mostrou a revisão bibliográfica. Estamos ainda impossibilitados de decidir se os fenômenos aludidos constituem a "causa de morte" da doença ou se são apenas fenômenos terminais, subsidiários a uma intoxicação mais extensa.

INTRODUÇÃO

Em trabalhos anteriores⁹ focalizamos o quadro clínico e laboratorial do tétano humano. Como fase preparatória para investigações mais pormenorizadas da ação histotóxica da toxina tetânica efetuamos uma série

de ensaios preliminares em camundongos brancos, a fim de determinar não só os aspectos clínicos nestes animais de laboratório como colhêr dados sôbre o metabolismo energético nos mesmos. Diante da variabilidade do

quadro determinado por diferentes doses de toxina, foi mister a execução de diversas séries de experiências.

Trabalhos de WENSINCK & col.^{17, 18, 19} já anteriormente haviam mostrado a existência de uma "lesão bioquímica" no tétano experimental. Cumpria-nos no presente trabalho verificar se também "in vivo" indícios de um distúrbio no metabolismo dos carboidratos podiam ser verificados.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos camundongos brancos de 20-25 g de peso, em boas condições de saúde. A toxina lhes era injetada debaixo da pele do dorso, em concentrações variáveis. Empregamos a toxina bruta do Instituto Butantã; esta toxina contém 40.000 DMM por ml, sendo titulada para o cobaio.

Os animais submetidos ao jejum eram deixados em gaiola metálica completamente limpa e a eles era fornecida água durante todo o período da experiência.

O metabolismo era medido em aparelho especial, sendo o animal encerrado numa cesta metálica que, sem restringi-lo demais, impedia-lhe contudo a movimentação ampla. O aparelho era enchido com ar. Cada experiência durava 30 minutos, sendo iniciada depois que se verificara o equilíbrio térmico do aparelho. As experiências realizavam-se a 23°C, mais ou menos. O aparelho era coberto com um pano, a fim de se evitarem os estímulos visuais.

Para a determinação do glicogênio hepático era o animal sacrificado com uma pancada na nuca, imediatamente aberto e um fragmento de fígado imerso em solução fervente de potassa cáustica. A dosagem obedeceu às normas expostas por HAWK & col.⁶.

Determinava-se o tempo de resistência à asfixia encerrando um animal inoculado e um controle em um balão de vidro, dentro do qual se fazia entrar uma mistura de nitrogênio com 3-5% de oxigênio. O animal era declarado morto quando cessavam os movimentos de "gasping".

A verificação do tempo de incubação do tétano experimental baseia-se em critérios um tanto subjetivos. Com doses de toxina

que determinam hipertonia muscular o primeiro sinal é a dificuldade no andar; mais precisa ainda é u'a manobra de que atualmente lançamos mão e que consiste em pendurar o animal pela cauda e observar se este consegue curvar o corpo para cima, numa tentativa de libertação. Findo o período de incubação do tétano se pode notar que a flexibilidade do tronco é maior num sentido que noutro. Quando o camundongo fôr injetado com doses maciças de toxina (em nosso caso 10.000 e 40.000 DMM), o primeiro sinal de tétano é a taquipnéia, só mais tarde observando-se sinais mais evidentes de paralisia muscular.

Os sinais clínicos foram observados em 127 animais injetados com doses variáveis de toxina. As nossas observações serão reunidas sob quatro tópicos, dada a semelhança do quadro clínico para doses de toxina da mesma grandeza.

Dados sobre o metabolismo e o glicogênio hepático normal foram obtidos em 55 animais controles. Os mesmos fenômenos e ainda a perda de peso do animal foram observados em 99 camundongos inoculados. O Quadro I fornece maiores pormenores.

QUADRO I

Padronização das experiências constantes da Fig. 4.

Série	Dose de toxina (DMM para cobaio)	Nº de animais
A	40.000	18
B	100	5
C-1	10	5
C-2	10	5
D-1	4	12
D-2	4	12
D-3	4	12
E-1	1,5	10
E-2	1,5	10
E-3	1,5	10

RESULTADOS

1) Quadro clínico

Grupo I — Tempo de incubação maior que 100 horas (0,1-0,5 DMM).

A sintomatologia mais evidente é a hipertonia muscular, que se manifesta mais comumente como uma escoliose, acompanhada da hipertonia dos membros anterior e posterior do lado da concavidade do tronco (Fig. 1). Ocasionalmente é só a escoliose que se faz notar. Mais raramente existe apenas a hipertonia dos dois membros posteriores (Fig. 2), devendo isto ser conseqüência de particularidades na absorção da toxina inje-



Fig. 1 — Camundongo injetado com 0,5 DMM de toxina tetânica 150 horas antes.

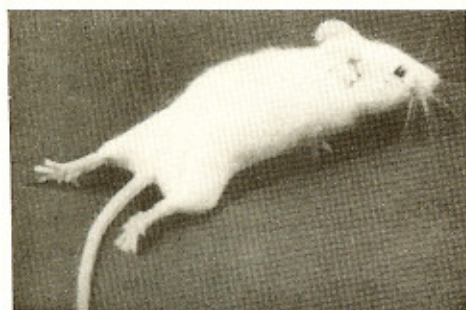


Fig. 2 — Do mesmo grupo que o animal da figura anterior mas apresentando quadro clínico diferente.

tada. Nos animais menores ou com as doses maiores pode observar-se comprometimento mais generalizado, como pelo eriçado e maior emagrecimento. Neste grupo de animais não há evidência de comprometimento respiratório, não aparecem espasmos ou a "síndrome cefálica".

Com 0,1 e 0,25 DMM só os animais menores têm sintomas. Estas doses são compatíveis com a sobrevivência e mesmo com 0,5 DMM apenas um dentre dez animais vem a morrer, se bem que todos tenham sinais clínicos. A recuperação se faz rapidamente, já com 400 horas não restando sinais do tétano.

Grupo II — Tempo de incubação de 15-50 horas (1,0-5,0 DMM).

Todos os animais têm sinais de tétano e todos vêm a morrer da doença.

A rigidez muscular, em tudo semelhante àquela do grupo anterior, sempre está presente, a sua intensidade não guardando relação com o tempo de sobrevivência. Além da hipertonia observa-se comprometimento generalizado, com taquipnéia e hiperpnéia, pelo eriçado e às vezes priapismo. Os animais exibem a "síndrome cefálica" já registrada por PILLEMER & WARTMAN¹³, com epístaxe, repuxamento dos músculos faciais e secreção ocular que recobre em crostas a rima palpebral.

Os animais não têm convulsões ou espasmos generalizados. Ao manuseio, que sobremaneira abrevia o tempo de sobrevivência, nota-se com freqüência a parada respiratória e subsequente "gasping", via de regra seguida de morte. Não sabemos se houve nestes animais espasmo de glote ou espasmo de toda a musculatura respiratória. Durante este acidente o animal esvazia a bexiga.

Grupo III — Tempo de incubação médio de 9 horas (100 DMM).

A escoliose e a rigidez dos membros é inconstante e menos acentuada. Em lugar da escoliose notamos por vezes o aparecimento de uma "corcunda", isto é, uma lordose lombar acentuada.

Os outros sinais clínicos são idênticos aos do grupo anterior.

Grupo IV — Tempo de incubação menor que 8 horas (10.000 e 40.000 DMM).

Só em dois animais pudemos observar hipertônias musculares, com discreta escoliose. Predomina, ao contrário, a paralisia de toda a musculatura, que se inicia via de regra pelo pescoço e cintura escapular. Ao caminhar o animal apoia a cabeça sobre as patas dianteiras, como se fôra excessivo o peso a suportar. A respiração é rápida e empenha toda a musculatura, o tronco arqueando-se a cada movimento respiratório. Próximo ao fim intercalam-se períodos de apnéia, provavelmente por exaustão física.

Quando a deambulação não é mais possível o animal tem aspecto "em ampulheta" (Fig. 3), já assinalado por PILLEMER & WARTMAN¹³. Segundo a nossa interpretação, porém, isto independe de retração diafragmática, como quiseram êstes autores, mas da paralisia da parede abdominal, que toca o solo. Quando o animal fôr dependurado pela cauda não consegue esboçar nenhum movimento de defesa: está flácido como uma boneca de pano.

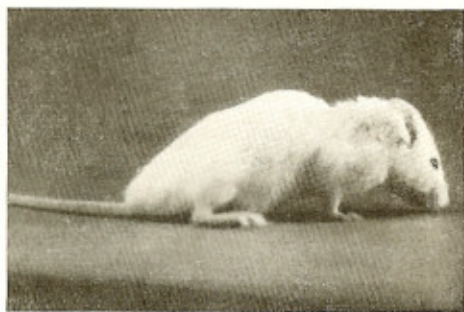


Fig. 3 — Animal injetado 4 horas antes com 40.000 DMM de toxina tetânica.

Com doses maciças como estas não se verificam espasmos, não há "gasping" nem "síndrome cefálica". Notamos priapismo somente uma vez.

A morte é tranqüila, após um período de aproximadamente o dobro do tempo de incubação.

2) *Mecanismo de morte*

Temos a impressão que os animais do grupo I, e mesmo alguns do grupo II morrem por caquexia, por impossibilidade de se alimentarem. Só os animais mais rígidos vêm a morrer, com uma perda média de peso de 26%.

As mortes por nós presenciadas nos grupos II e III deram-se após apnéia, por espasmo de glote ou da musculatura respiratória.

Não conseguimos caracterizar a morte no grupo IV por nenhum sinal objetivo. Ao se abrirem os animais após a parada respiratória, ainda está bem corado o sangue arterial e continua batendo o coração. Se anteciparmos o desfecho, sacrificando o animal com éter, notamos que resiste tanto tempo ao anestésico como os animais controles.

3) *Perda de peso durante o tétano* (Fig. 4)

Esta não foi determinada para a série A, em vista do curto tempo de sobrevivência. Os dados para a série E mostram que os animais não submetidos ao jejum perdem peso tardiamente, quando os sinais clínicos já estão avançados. Por ocasião da morte de metade destes animais o peso médio do grupo é de 87% do peso inicial, confirmando que com 1,5 DMM a morte não se deve à inanição. O mesmo podemos dizer para as séries B e C, com perda média de peso de, respectivamente, 9 e 5%.

As séries D e E mostram que os animais recuperam o peso inicial após o jejum, achado a que vamos aludir mais adiante.

4) *Metabolismo durante o tétano* (Fig. 4)

O metabolismo do animal não inoculado, normalmente alimentado, é de 1,01 ml de oxigênio por minuto, em média.

O metabolismo durante o tétano é baixo; esta queda é menos intensa nas séries C, D e E, inoculadas com doses menos maciças de toxina. As divergências que aparecem na série C entre os animais em jejum e os normalmente alimentados se devem, a nosso ver, ao reduzido número de animais examinados.

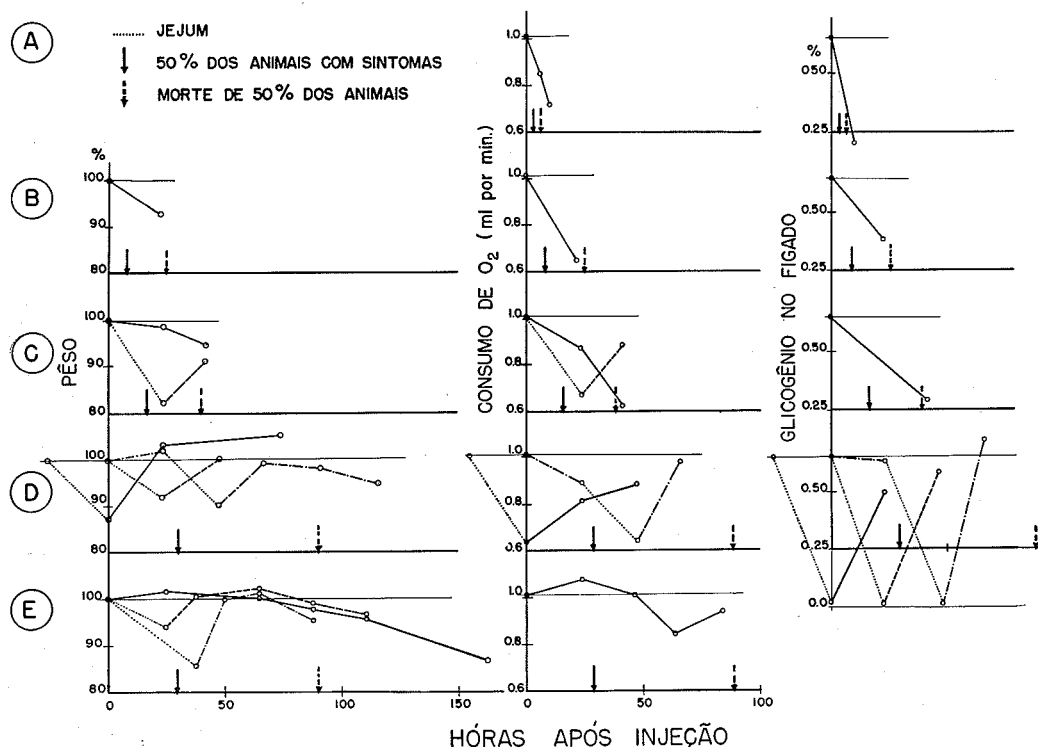


Fig. 4 — Pêso, metabolismo e glicogênio hepático nas 5 séries de experiências (vide Quadro I).

A queda no metabolismo é pronunciada nas séries A e B. Êste ponto será discutido mais adiante.

5) Glicogênio hepático durante o tétano (Fig. 4)

O fígado dos animais contrôles contém em média 0,65% de glicogênio.

Apesar de metabolismo mais baixo, verificamos que os animais da série A perdem quase 70% do seu glicogênio nas 10 horas subsequentes à injeção de toxina. Também foi grande esta perda nas séries B e C.

As experiências da série D indicam que o glicogênio hepático é ressintetizado após jejum, mesmo depois que os sinais clínicos de tétano já se manifestaram.

Não foi dosado o glicogênio nas experiências da série E.

6) Resistência à asfixia

São os seguintes os nossos resultados:

QUADRO II

Tempo de sobrevivência em ambiente de nitrogênio com 3-5% de oxigênio de animais injetados 48 horas antes com 10 DMM de toxina tetânica, em confronto com animais normais.

Experiência	Tempo de sobrevivência (seg.)		Sintomas do animal com tétano
	Tétano	Contrôle	
1	270	125	Escoliose grande.
2	50	180	Escoliose grande.
3	65	110	Rigidez generalizada. Laringospasmo momentos antes.
4	25	60	Escoliose discreta.
5	120	150	Escoliose discreta.
6	345	600	Escoliose discreta.
7	50	230	Escoliose discreta.
8	135	185	Escoliose grande.

Para remover possíveis objeções a esta série de experiências, decidimos repetir os ensaios com animais ainda assintomáticos:

QUADRO III

Tempo de sobrevivência em ambiente de nitrogênio com 3-5% de oxigênio de animais injetados 20 horas antes com 10 DMM de toxina tetânica, em confronto com animais normais.

Experiência nº	Tempo de sobrevivência (segundos)	
	Tétano	Contrôle
1	135	210
2	330	135
3	105	350
4	135	355
5	80	170
6	150	225
7	75	270
8	180	240
9	230	410
10	110	200

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

PELLOJA¹² já mostrara que o tempo de incubação no tétano experimental é tanto menor quanto maior fôr a dose de toxina administrada. De um modo geral observa-se o mesmo no tétano humano, que é tanto mais grave (isto é, maior dose de toxina fixada) quanto menor o tempo de incubação.

Anteriormente⁹ já dissemos duvidar que as manifestações mais óbvias do tétano humano, como espasmos e hipertonia muscular, pudessem ser invocadas como causa de morte nesta doença. Acreditamos que as nossas experiências em animais de laboratório apoiam esta crença. Os animais do grupo I, mesmo aqueles com considerável rigidez muscular, freqüentemente sobrevivem à enfermidade; espasmos generalizados jamais foram por nós observados, o que acreditamos dever-se à via de administração da toxina.

Diversos motivos nos fazem supor que, tivéssemos dado a toxina por via intramuscular, e diferente seria o quadro clínico neste particular.

Doses elevadas de toxina determinam não a hipertonia mas a paralisia flácida de toda a musculatura. Apesar de não ser lícita a tentativa de fazer um paralelo entre os nossos animais e o tétano humano, já que tão altas quantidades de toxina provavelmente nunca estarão em jôgo, lembramos que o tétano paralítico é de há muito conhecido⁴ e que a paralisia diafragmática já foi por nós verificada numa série de pacientes⁹.

Sugerem ainda os nossos dados que o emagrecimento durante a doença provavelmente é reflexo apenas de má alimentação; certamente não está aumentado o metabolismo do animal inoculado. Mostramos anteriormente⁹ que a cetonúria e o exagerado catabolismo das proteínas em nossos pacientes desaparecia uma vez que lhes fornecêssemos carboidratos em quantidade não muito superior àquela necessária em indivíduo normal.

WENSINCK & col.^{17, 18, 19} mostraram que existe no tétano local e generalizado um bloqueio no metabolismo dos carboidratos. Algumas de nossas observações presentes, bem como estudos "in vitro", objeto de outro trabalho⁸ o confirmam. Referem ainda os autores acima mencionados um distúrbio na síntese do glicogênio, achado que não pudemos reproduzir. Os animais das séries C, D e E recuperaram peso quando realimentados após jejum, e os da série D recuperaram todo o seu glicogênio hepático. A hiperglicemia, tão freqüentemente encontrada no tétano humano⁹, parece igualmente indicar que o glicogênio hepático não se encontra exausto.

Também STAUDINGER¹⁵ pôde encontrar diminuição no glicogênio do fígado no tétano experimental. Os nossos dados permitem acreditar que isto se deva não a distúrbios na síntese, mas a incremento no consumo. Por certo não é resultado de jejum, não só em vista dos achados de nossa série E, mas considerando a série A, onde o glicogênio do fígado cai pronunciadamente no intervalo de algumas poucas horas.

Ora, verifica-se, particularmente nas séries A e B, um acelerado desgaste no glicogênio sem que o consumo de oxigênio sofra acréscimo. Um fenômeno desta natureza já permite afirmar que no distúrbio bioquímico desencadeado pela toxina tetânica certamente não participa um “desacoplamento” da fosforilação oxidativa, como ocorre com os hormônios da tireóide e nas intoxicações por dinitrofenol e outras substâncias². Lembra antes uma degradação incompleta dos carboidratos.

Estas alterações não são específicas do tétano. A simples injeção de epinefrina no animal de laboratório causa pronunciado desgaste no glicogênio hepático uma hora após a injeção, como mostraram WALAAS & WALAAS¹⁶. O aumento no consumo de glicogênio já foi observado por LE PAGE no choque hemorrágico¹¹ e no choque traumático¹⁰. GREEN & STONER⁵ mostraram exaustão do glicogênio e diminuição no consumo de oxigênio nos estados de choque, admitindo a existência de um bloqueio no metabolismo dos carboidratos. BORN³, contudo, acha este conceito por demais simplista, mostrando que a administração de hexose difosfato, piruvato e succinato ao animal não se mostra eficaz no tratamento destes quadros clínicos. AMBROSOLI & SCARPIONI¹ estudaram o choque pelo esmagamento (“Crush syndrome”), encontrando diminuição no glicogênio do fígado e aumento na glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato. Acreditam num bloqueio deste estágio em diante.

Esperar-se-ia que a diminuição do metabolismo do animal se acompanhasse de aumentada resistência à asfixia, desde que as outras condições não mudassem. Mas não é isto que verificamos: mesmo na fase de incubação do tétano é sensivelmente mais reduzido o tempo de sobrevivência a atmosferas pobres em oxigênio. Não acreditamos que isto se deva à exaustão do glicogênio dos tecidos. SMITH & OSTER¹⁴ mostraram que os gatos em jejum resistem mais à asfixia e em experiências não incluídas neste trabalho verificamos que o mesmo se aplica ao camundongo. Além disto, o fígado de nossos animais ainda continha 0,44% de glicogênio 20 horas após a administração de toxina tetânica, quando foram feitas as experiências reproduzidas no Quadro III. Quanto ao encéfalo, é sabida a tenacidade

com que mantém íntegro os seus estoques de glicogênio.

HIMWICH⁷ mostrou que a injeção de inibidores da glicolise diminui o tempo de sobrevivência à asfixia. Também os nossos dados atuais podem ser interpretados como mais um indício da existência de um bloqueio bioquímico no tétano experimental, tese que será debatida mais pormenorizadamente em outro trabalho⁹.

SUMMARY

Studies on the cause of death in tetanus. IV — Experimental tetanus in white mice: clinical features, oxygen consumption, liver glycogen and resistance to asphyxia.

In this preliminary study on experimental tetanus the clinical features following the injection of various amounts of tetanal toxin were first studied. Small doses of toxin will result in muscular hypertonia while massive doses result in complete paralysis, after a period of incubation and survival time very much shortened. In animals injected with small doses of tetanal toxin hypertonia is not a hindrance to life and complete recuperation may ensue. Generalized paroxysmal spasms were never seen in these animals, which we take as an indication that the cause of death in tetanus must be looked for elsewhere.

Animals injected with 1.5 and 4.0 MLD (guinea pig units) return to their normal weight after a period of fasting, even after the period of incubation. We have also found that liver glycogen in the group injected with 4.0 MLD returns to normal after feeding is resumed; this means that the “biochemical lesion” in tetanus does not affect glycogen synthesis or else occurs only as a terminal event.

Despite a marked fall in liver glycogen the oxygen consumption after 40,000 and 100 MLD decreases; this is evidence of incomplete degradation of carbohydrates.

Survival time at low oxygen tensions is markedly decreased in the animals with tetanus, even when these are tested at a time clinical signs are not yet evident. This we take to be one more indication of a block in carbohydrate metabolism.

It is clear after a review of world literature that these findings are not specific to tetanus. We are also undecided whether they ought to be considered the "cause of death" in this disease or are just incidentally connected with a more profound and extensive disturbance.

REFERÊNCIAS

1. AMBROSOLI, S. & SCARPIONI, L. — Sul comportamento di alcune attività enzimatiche interessante nel ciclo glicolitico in corso di shock. *Giorn. Clin. med.* 39:593-612, 1958.
2. BALDWIN, E. — Dynamic aspects of biochemistry. 3rd. ed. Cambridge, Oxford Univ. press, 1957.
3. BORN, G. V. R. — Some effects of injury on metabolism. (*In* FLOREY, H., ed. — General pathology. 2nd. ed. London, Lloyd-Duke, 1958. p. 227-254).
4. COURTOIS-SUFFIT, M. & GIROUX, R. — Les formes anormales du tétanos. Paris, Masson, 1916.
5. GREEN, H. N. & STONER, H. B. — Effects of injury on carbohydrate metabolism and energy transformations. *Brit. med. Bull.* 10:38-41, 1954.
6. HAWK, P. B.; OSER, B. L. & SUMMERSON, W. H. — Practical physiological chemistry. New York, Blakiston, 1954.
7. HIMWICH, H. E. — Brain metabolism and cerebral disorders. Baltimore, Williams & Wilkins, 1951.
8. KLOETZEL, K. — Estudos sôbre a causa de morte no tétano. V. Investigações "in vitro" sôbre a respiração aeróbica e anaeróbica de tecidos de camundongos inoculados com toxina tetânica. [no prelo].
9. KLOETZEL, K. — Studies on the cause of death in tetanus. [no prelo].
10. LEPAGE, G. A. — Biological energy transformation during shock as shown by tissue analyses. *Amer. J. Physiol.* 146:267-281, 1946.
11. LEPAGE, G. A. — The effects of hemorrhage on tissue metabolites. *Amer. J. Physiol.* 147:446-453, 1946.
12. PELLOJA, M. — Le tétanos expérimental par la toxine tétanique. Paris, Masson, 1951.
13. PILLEMER, L. & WARTMAN, W. B. — The clinical behavior, incubation period, and pathology of tetanus induced in white Swiss mice by injection of crystalline tetanal toxin. *J. Immunol.* 55:277-281, 1947.
14. SMITH, D. C. & OSTER, R. H. — Influence of blood sugar levels on resistance to low oxygen tension in the cat. *Amer. J. Physiol.* 146:26-32, 1946.
15. STAUDINGER, H. — Ueber de Kohlenhydrat-haushalt bei experimentellem Wundstarrkrampf. *Klin. Wchnschr.* 23:57-61, 1944.
16. WALAAS, O. & WALAAS, E. — Effect of epinephrine on rat diaphragm. *J. biol. Chem.* 187:769-776, 1950.
17. WENSINCK, F. — Onderzoekingen over de biochemische werking van het tetanustoxine. Utrecht, 1952. Tese.
18. WENSINCK, F.; BOVÉ, J. J. & RENAUD, H. — Glycolysis by muscle extracts in local tetanus. *Brit. J. exper. Pathol.* 34:681-686, 1953.
19. WENSINCK, F. & COHEN, J. A. — Carbohydrate metabolism in local and generalized tetanus. *Biochim. biophys. Acta* 10:184-185, 1953.

Recebido para publicação em 5 dezembro 1961.