

## ESTUDOS SÔBRE A CAUSA DE MORTE NO TÉTANO

### V. Investigações "in vitro" sôbre a respiração aeróbia e anaeróbia de tecidos de camundongos inoculados com toxina tetânica.

(NOTA PRÉVIA)

Kurt KLOETZEL (1)

#### RESUMO

Foi investigada a respiração aeróbia e anaeróbia "in vitro" de tecidos de camundongo com tétano experimental.

Verificou-se que a respiração do diafragma de animais injetados com toxina é sensivelmente menor que nos controles, em atmosfera de 95% de nitrogênio e 5% de dióxido de carbono. Quanto à respiração aeróbia, o consumo de oxigênio deste músculo é maior no tétano que nos animais controles e da mesma ordem de grandeza que nos animais não inoculados mas submetidos ao jejum.

Ao emprêgo de homogenizados de encéfalo não se verificaram diferenças significativas entre animais com tétano e os controles.

Diante destes dados sugestivos de um bloqueio da glicólise no tétano experimental, o autor analisa os resultados proporcionados por experiências conduzidas "in vivo" tanto no homem como no animal, concluindo haver evidência também a êste nível de investigação de um distúrbio no metabolismo dos carboidratos.

Estas alterações não parecem, contudo, específicas do tétano.

#### INTRODUÇÃO

Em trabalhos anteriores<sup>8</sup> registramos os nossos dados sôbre o tétano humano e experimental, parte de um plano concebido para a elucidação da causa de morte nesta enfermidade.

A pobreza dos dados proporcionados pelo exame anátomo-patológico de indivíduos falecidos de tétano grave e de animais de laboratório sempre nos sugeriram que, tal qual em outras intoxicações, também no tétano o distúrbio fundamental fosse uma "lesão bioquímica"<sup>13</sup>. Certos aspectos clínicos no tétano humano e experimental se assemelham aos quadros clínicos da hipoglicemia, da avitaminose B<sub>1</sub>, das intoxicações por excesso de oxigênio, cianuretos, estricnina,

fluoreto, malonato, iodoacetato e da "Maple syrup disease", moléstia recentemente descrita<sup>11</sup>. Provavelmente esta semelhança do tétano com os envenenamentos em muitos de seus aspectos passou despercebida por apresentar o tétano uma particularidade que lhe é própria, um tempo de incubação relativamente longo, mesmo o tétano que se segue à injeção de toxina tetânica. Parece-nos, contudo, que PAPPENHEIMER<sup>12</sup> conseguiu remover êste obstáculo, com invulgar inteligência, explicando o prolongado tempo de incubação no tétano e na difteria à luz da bioquímica.

Em tese publicada em 1951, WENSINCK<sup>17</sup> mostrou que era baixo o teor de glicogênio

(1) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo — Clínica de Moléstias Tropicais e Infectuosas (Diretor: Prof. J. A. Meira). Médico da Clínica de Moléstias Tropicais e Infectuosas.

do músculo no tétano local ou generalizado, mesmo quando o animal era sacrificado no período de incubação. Admitiu existir um distúrbio na síntese do glicogênio no tétano. Pôde também verificar que a glicólise do diafragma bem como a formação de ácido láctico em extratos musculares estavam diminuídas.

Trabalhos posteriores dêste autor e seus colaboradores<sup>19, 20</sup> indicaram a existência de um bloqueio na glicólise anaeróbia, que se evidenciava por um acúmulo de frutosedifosfato e se deveria à “função deficiente” do sistema triosefosfatodehidrogenase. Estas verificações foram feitas apenas no tétano local. Informa WENSINCK<sup>18</sup> ainda que a adição de DPN restituía o poder glicolítico dos extratos de músculo.

Decidimos retomar esta trilha abandonada por WENSINCK e, além de repetir parte de suas experiências, procurar estendê-las ao tétano generalizado e a outros órgãos, o encéfalo sobretudo.

#### MATERIAL E METODOS

O animal por nós empregado era o camundongo branco. Os animais utilizados para as experiências da série I e II pesavam 25-30 gramas, para as demais experiências 15-20 gramas.

A toxina tetânica bruta (Instituto Butantã) era injetada debaixo da pele do dorso, seguindo-se, após tempo de incubação variável com a dose administrada, um tétano generalizado, cujas características no camundongo já foram por nós descritas<sup>8</sup>. Os animais eram anestesiados com éter e abertos após a parada respiratória, quando o coração via de regra ainda batia em ritmo normal.

Após pesagem eram os órgãos lavados em solução de Ringer. O encéfalo era submetido a homogenização durante dois minutos em solução gelada de Ringer-fosfato ou Ringer-bicarbonato, conforme a experiência planejada.

As determinações eram feitas no aparelho de Warburg, pelas técnicas habituais<sup>16</sup>. As determinações aeróbias eram feitas em Ringer-fosfato, com potassa cáustica a 4% no

compartimento central, as anaeróbias em Ringer-bicarbonato. No primeiro caso, os frascos eram enchidos com ar, no segundo caso eram “lavados” e enchidos com u’a mistura de 95% de nitrogênio e 5% de dióxido de carbono. Acrescentava-se glicose para uma concentração final de 0,2% em tôdas as experiências, exceto quando indicado no quadro. Todos os animais, menos aqueles das duas experiências da série I, eram alimentados e postos em contacto com água. Por ocasião do sacrifício, todos os animais já apresentavam sintomas de tétano generalizado; sômente nas experiências da série II procuramos relacionar a gravidade dos sintomas com os resultados colhidos no aparelho de Warburg.

Os resultados nas figuras 1 e 5 encontram-se expressos em função do “pêso fresco” do órgão. No quadro I os coeficientes referem-se ao consumo de oxigênio ou produção de dióxido de carbono por miligrama

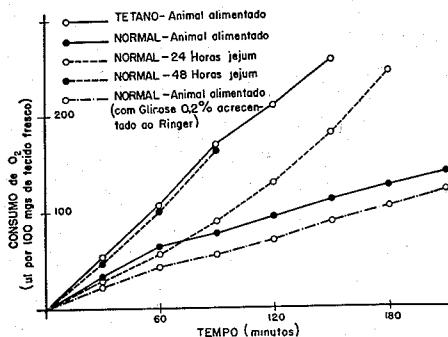


Fig. 1 — Consumo de oxigênio «in vitro» do diafragma de camundongos normais e inoculados com toxina tetânica (40.000 DMM).

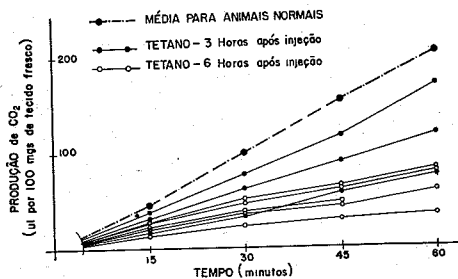


Fig. 2 — Produção de dióxido de carbono «in vitro» do diafragma de camundongos normais e inoculados com toxina tetânica (40.000 DMM).

QUADRO I

Respiração «in vitro» de diafragma e encéfalo de camundongos normais e com tétar ) experimental por toxina tetânica.

Série	Experiência	N.º de animais	Órgão	Solução utilizada	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>	Q <sub>N<sub>2</sub></sub> /G
I	Tétano — 40.000 DMM	9	Diafragma	Ringer-fosfato	5,3	
	Normal — alimentado	7	Diafragma	Ringer-fosfato	3,3	
	Normal — jejum 24 h.	6	Diafragma	Ringer-fosfato	2,8	
	Normal — jejum 48 h.	6	Diafragma	Ringer-fosfato	5,0	
	Normal — alimentado	2	Diafragma	Ringer-fosfato-glicose	2,1	
II	Normal	14	Diafragma	Ringer-bicarbonato-glicose		10,2
	Tétano — 40.000 DMM	8	Diafragma	Ringer-bicarbonato-glicose		4,4
III	Tétano — 1 DMM	10	Diafragma	Ringer-bicarbonato-glicose		3,6
	Normal	10	Diafragma	Ringer-bicarbonato-glicose		5,0
IV	Normal	7	Encéfalo	Ringer-fosfato	4,3	
	Tétano — 40.000 DMM	6	Encéfalo	Ringer-fosfato	3,9	
V	Tétano — 40.000 DMM	9	Encéfalo	Ringer-bicarbonato-glicose		6,5
	Tétano — 5 DMM	3	Encéfalo	Ringer-bicarbonato-glicose		5,2
	Normal	6	Encéfalo	Ringer-bicarbonato-glicose		5,4

de “pêso sêco”, tendo êste sido determinado em animais controles, não utilizados para as experiências mas da mesma idade que os lotes usados.

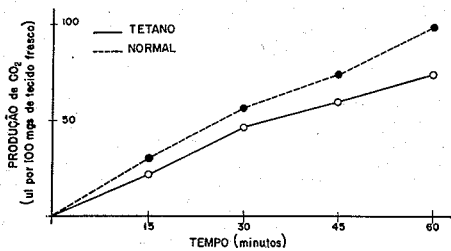


Fig. 3 — Produção de dióxido de carbono «in vitro» do diafragma de camundongos normais e inoculados com toxina tetânica (1 DMM).

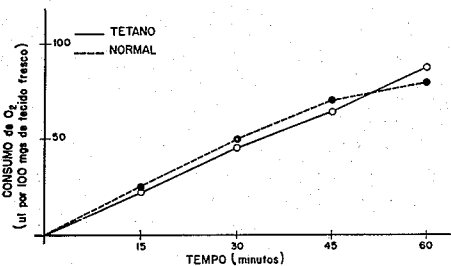


Fig. 4 — Consumo de oxigênio «in vitro» de homogenizados de encéfalo de camundongos normais e inoculados com toxina tetânica (40.000 DMM).

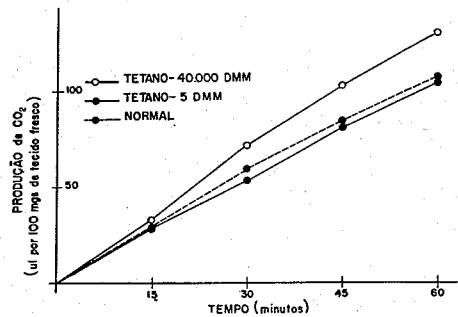


Fig. 5 — Produção de dióxido de carbono «in vitro» de homogenizados de encéfalo de camundongos normais e injetados com toxina tetânica (5 DMM e 40.000 DMM).

RESULTADOS

Os resultados experimentais estão reproduzidos nas figuras 1 a 5 e no quadro I.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Dada a semelhança na respiração aeróbia “in vitro” de diafragmas dos animais inoculados e dos animais submetidos ao jejum de 48 horas, não nos queremos deter na discussão das experiências da série I. Lembrem-

mos apenas que experiências anteriores já puseram em evidência que, semelhantemente ao animal em jejum prolongado, também o fígado do camundongo inoculado com 40.000 DMM de toxina sofre considerável depleção de glicogênio<sup>8</sup>.

No tocante à respiração anaeróbia, as nossas experiências confirmam os achados de WENSINCK & col.<sup>17, 19, 20</sup>, que primeiro apontaram a redução na glicólise do músculo de animal com tétano. As diferenças entre os animais injetados e os animais controles são “altamente significativas” para 40.000 DMM de toxina e apenas “significativas” para 1 DMM. Possivelmente isto encontra explicação à luz dos dados anteriormente mostrados<sup>8</sup>, isto é, que a dose de 1 DMM é compatível com a sobrevivência do animal se este pudesse ser convenientemente alimentado. Acreditamos que com esta dose baixa o animal não sucumbe do tétano propriamente dito.

Poderá ser verificado que a glicólise nos animais controles da série III é muito inferior aos animais da série II. Os animais usados para esta última série eram mais velhos que os demais, e sabe-se que a proporção tecido muscular/tecido tendinoso do diafragma muda com a idade.

No que diz respeito ao encéfalo, não puderam ser apontadas diferenças significativas entre os animais normais e os animais doentes. Não sabemos no momento dizer se o tecido nervoso comporta-se diferentemente do músculo ou se apenas foram artificiais as condições experimentais. Dada à dificuldade em se obter fatias homogêneas de encéfalo é hábito empregar-se homogenizado deste tecido, o que envolve maior ou menor rotura celular.

Mas o encéfalo não precisa necessariamente apresentar os mesmos fenômenos que o músculo, apesar de tratar-se de uma intoxicação grave e extensa que certamente não limita a sua ação ao diafragma. ROSENTHAL & col.<sup>15</sup> já mostraram que a anoxia determinada pelo choque hemorrágico irreversível, pela intoxicação pelo monóxido de carbono e pela parada circulatória temporária, agressões que se refletem profundamente sobre o metabolismo de diferentes órgãos, no encéfalo não causam destruição de enzi-

mas respiratórias nem deficiência crítica de coenzimas. WILHELMI & col.<sup>21</sup> igualmente verificaram que o choque hemorrágico não altera o metabolismo “in vitro” do encéfalo, acreditando que o mesmo estivesse “melhor protegido” da anoxia que outros tecidos. LE PAGE<sup>9, 10</sup> mostrou que o encéfalo no choque não apresenta a mesma perda de glicogênio que o fígado ou o músculo, estando “bioquimicamente melhor conservado”.

Uma doença que lesasse todo o tecido nervoso, isto é, fôsse verdadeiramente neurotrópica, deveria refletir-se mesmo “in vitro” por alterações respiratórias, como nas experiências de RACKER & KABAT<sup>14</sup> com o vírus da poliomielite.

Mas talvez só uma parte do encéfalo seja lesado pela toxina tetânica, o bulbo por exemplo. Nestas circunstâncias, não esperaríamos que as nossas experiências, em que há “diluição” do bulbo com muito maior quantidade de outros tecidos nervosos, pudessem mostrar diferenças dignas de nota.

Poderá o bloqueio na glicólise anaeróbia constituir-se em causa de morte? Cabe examinar os nossos dados obtidos “in vivo” no camundongo e no homem, à procura de indícios de que não se limitam ao aparelho de Warburg as alterações metabólicas pela toxina tetânica.

Dados nossos<sup>8</sup> e de outros autores mostram a frequência com que ocorre a hiperglicemia no tétano humano, sobretudo o tétano grave. Esta hiperglicemia acompanha corriqueiramente os distúrbios na oxidação dos carboidratos<sup>5</sup>.

O exercício muscular na presença de um bloqueio da glicólise anaeróbia não se deve acompanhar de aumento do ácido láctico. É o que ocorre no tétano segundo alguns autores<sup>2, 3</sup> e é o que as poucas dosagens por nós efetuadas<sup>8</sup> parecem confirmar.

HIMWICH & col.<sup>7</sup> mostraram que o animal recém-nascido resiste mais tempo à asfixia que o animal adulto, em virtude de um acúmulo lento do déficit energético em seu S.N.C. A injeção de inibidores das enzimas respiratórias, ao bloquear a anaerobiose do animal, diminui o tempo de sobrevivência à asfixia<sup>6</sup>. Repetimos as condições destas experiências e já mostramos anterior-

mente<sup>8</sup> que o animal inoculado com toxina tetânica resiste menor tempo à respiração em atmosferas pobres em oxigênio que os animais controles. Eis aí mais um indício de que o bloqueio na glicólise tem correspondência no vivo.

Em um ponto capital, a nosso ver bastante sério, existe divergência entre o conceito firmado neste trabalho e a experiência prática. Qualquer distúrbio na utilização dos carboidratos, suprida pelo acelerado catabolismo das proteínas e das gorduras, levaria a um acúmulo de corpos cetônicos e aumentaria a excreção urinária de nitrogênio. É o que pudemos verificar no tétano humano. Entretanto, tanto a cetonúria como o balanço negativo de nitrogênio puderam ser diminuídos em nossos pacientes desde que a eles fornecêssemos suficiente glicose por via endovenosa<sup>8</sup>. No momento planejamos experiências adicionais para o esclarecimento deste ponto.

Os nossos achados não são específicos do tétano. Já mostramos anteriormente<sup>8</sup> que esta doença apresenta pontos em comum com outros tipos de “agressão” no que diz respeito à bioquímica do sangue, ao metabolismo basal, ao glicogênio hepático. Nem mesmo o bloqueio da glicólise anaeróbia parece-lhe característica: um bloqueio no metabolismo dos carboidratos no choque foi sugerido por GREEN & STONER<sup>4</sup> e melhor documentado por AMBROSOLI & SCARPIONI<sup>1</sup>.

#### SUMMARY

*Studies on the cause of death in tetanus. V. “In vitro” studies on aerobic and anaerobic respiration in tissues of mice inoculated with tetanus toxin.*

The “in vitro” respiration of tissues of mice injected with tetanus toxin has been studied.

Anaerobic respiration of the diaphragm of injected animals is significantly lower than in the normal animal. As to the aerobic respiration, it has been found that the oxygen consumption of injected animals is much higher than in the normal diaphragm, and just about as high as the respiration

of diaphragms from normal animals starved for 48 hours.

No differences have been found between normal and injected animals in aerobic or anaerobic respiration of brain homogenizates.

Therefore there is presumptive evidence of a block in the metabolic pathway of carbohydrates, at least in the diaphragm of injected animals. These data are compared with the result of “in vivo” investigations carried out previously in mice and in the human, and the conclusion is reached that a biochemical lesion seems to be active also in the alive animal and in our patients.

There is evidence that these findings are not specific to tetanus.

#### REFERÊNCIAS

1. AMBROSOLI, S. & SCARPIONI, L. — Sul comportamento di alcune attività enzimatiche interessate nel ciclo glicolitico in corso di shock. Giorn. Clin. med. 39:593-612, 1958.
2. DAVENPORT, H. A.; DAVENPORT, H. K. & RANSON, S. W. — Chemical studies of muscle contracture. I — The lactic acid content. J. biol. Chem. 79:499-505, 1928.
3. DEUTICKE, H. J.; HOLLMANN, S. & SCHAEFFER, H. — Ueber den Stoffwechsel des Muskles im Wundstarrkrampf. Pfluegers Arch. 248:39-50, 1944.
4. GREEN, H. N. & STONER, H. B. — Effects of injury on carbohydrate metabolism and energy transformation. Brit. med. Bull. 10:38-41, 1954.
5. HANDLER, P. — The effects of various inhibitors of carbohydrate metabolism, in vivo. J. biol. Chem. 161:53-63, 1945.
6. HIMWICH, H. E. — Brain metabolism and cerebral disorders. Baltimore, Williams & Wilkins, 1951.
7. HIMWICH, H. E.; BERNSTEIN, A. O.; HERRLICH, H.; CHESLER, A. & FAZEKAS, J. F. — Mechanisms for the maintenance of life in the newborn during anoxia. Amer. J. Physiol. 135:387-391, 1941.
8. KLOETZEL, K. — Studies on the cause of death in tetanus. Em publicação.
9. LE PAGE, G. A. — Biological energy transformations during shock as shown by

- tissue analysis. Amer. J. Physiol. 146:267-281, 1946.
10. LE PAGE, G. A. — The effects of hemorrhage on tissue metabolites. Amer. J. Physiol. 147:446-453, 1946.
  11. MENKES, J. — Maple syrup disease. Apresentado na reunião anual da American Epilepsy Society e na 40.<sup>a</sup> reunião anual da Association for research in nervous and mental disease. New York, Dezembro 8-10, 1960.
  12. PAPPENHEIMER Jr., A. M. — Apud Elliott, Page & Quastel — Neurochemistry. Springfield, Charles Thomas, 1955.
  13. PETERS, R. A. — Biochemistry of some toxic agents. Bull. Johns Hopkins Hosp. 97:1-42, 1955.
  14. RACKER, E. & KABAT, H. — The metabolism of the central nervous system in experimental poliomyelitis. J. exp. Med. 76:579-585, 1942.
  15. ROSENTHAL, O.; SHEMKIN, H. & DRABKIN, D. L. — Oxidation of pyruvate and glucose in brain suspensions from animals subjected to irreversible hemorrhagic shock, carbon monoxide poisoning, or temporary arrest of the circulation — a study of the effects of anoxia. Amer. J. Physiol. 144:334-347, 1945.
  16. UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H. & STAUFFER, J. F. — Manometric techniques. Minneapolis, Burgess, 1957.
  17. WENSINCK, F. — Onderzoekingen over de biochemische werking van het tetanustoxine. Utrecht, 1952. Tese.
  18. WENSINCK, F. — Comunicação pessoal.
  19. WENSINCK, F.; BOEVÉ, J. J. & RENAUD, H. — Glycolysis by muscle extracts in local tetanus. Brit. J. exper. Pathol. 34: 681-686, 1953.
  20. WENSINCK, F. & COHEN, J. A. — Carbohydrate metabolism in local and generalized tetanus. Biochim. biophys. Acta 10: 184-185, 1953.
  21. WILHELMI, A. E.; RUSSELL, J. A.; LONG, C. N. H. & ENGEL, M. G. — The effects of anoxia and of hemorrhage upon the metabolism of the cerebral cortex of the rat. Amer. J. Physiol. 144:683, 1945.

Recebido para publicação em 5 dezembro 1961.