

# **Ação inibidora do gás carbonico sobre as convulsões experimentais**

III) Experiências na crioepilepsia da rã. Mecanismo da ação inibidora do gás carbonico nas convulsões

por

**H. Moussatché**

(Da Divisão de Fisiologia do Instituto Oswaldo Cruz)

Nas duas partes anteriores deste trabalho(1) estudámos a ação inibidora do gás carbonico nas convulsões estricninas do coelho e nas provocadas pela excitação química (estricnina e acetilcolina) direta da cortex cerebral de cães. Vimos também na introdução que M. OZORIO DE ALMEIDA(2) estudou a ação do gás carbonico nas convulsões pelo resfriamento brusco da medula espinal da rã (crioepilepsia) e observou que quando estes animais respiravam durante vinte minutos uma mistura gasosa de ar atmosferico contendo uma concentração de gás carbonico superior a 20%, não era mais possível obter o ataque de crioepilepsia.

Utilisamos este efeito do gás carbonico na crioepilepsia para estudar o mecanismo da ação inibidora do gás. Tem sido objeto de estudo dos autores que investigaram sobre esta ação do  $\text{CO}_2$  nas convulsões, saber se agiria ele especificamente ou sua ação estaria ligada a uma modificação do pH do meio intercelular. Problema identico encontra-se ao estudar outras ações fisiológicas ou farmacológicas exercidas pelo gás carbonico; um esclarecimento deste ponto, poderia ser utilizado nestes outros domínios. Assim seria na regulação dos movimentos respiratórios pelo gás carbonico, onde o problema de seu mecanismo de ação está ainda aberto. Nós, porém, vamos nos adstringir exclusivamente ao estudo do mecanismo de ação do  $\text{CO}_2$  nas convulsões.

Na introdução da primeira parte resumimos os resultados dos principais trabalhos sobre a influencia do gás carbonico nas convulsões. A formação de ácido carbonico pela dissolução do gás carbonico no sangue, e a modificação do pH deste em consequência, levou muitos dos autores a pensar numa influência do pH nas crises convulsivas. Numa série de trabalhos experimentais e clínicos, seus autores estudaram as variações do pH do sangue antes, durante e depois das crises

convulsivas, chegando a resultados que os levaram a uma interpretação patogênica da epilepsia. Esses estudos despertaram um interesse particular depois dos trabalhos de FOERSTER(2a) e ROSETT(3) utilizando a prova da hiperpnéa no diagnóstico da epilepsia. COLLIP e BACKUS(4) e DAVIS, HALDANE e KELLAWAY(5) estudaram as alterações sanguíneas durante a hiperexcitabilidade neuromuscular e contrações tetânicas ocasionadas pela hiperpnéa, constatando uma correlação entre estes fenômenos e a alcalose consequente à hiperpnéa. Como na prova hiperpnéa ha uma alcalose consequente a grande eliminação de gás carbonico, a crise convulsiva decorrente seria causada pela alcalose e, nas convulsões espontaneas teriamos uma alcalose ligada ou uma diminuição da tensão de gás carbonico do sangue de causa incontrollavel ou a uma outra causa qualquer. Restaria saber se sempre haveria uma alcalose preconvulsiva e aqui os trabalhos foram discordantes.

Observações sobre a influencia do jejum e dietas cetogenicas, que aumentavam a quantidade de ácido formada pelo organismo e tinham efeito benéfico na epilepsia humana, reforçavam o ponto de vista de uma influencia da reação do sangue na epilepsia. Esse conjunto de resultados levava às seguintes conclusões gerais: fatores que desviam o pH do sangue para o lado ácido, dificultam o aparecimento das convulsões; fatores que tendem a elevar o pH favorecem as convulsões. Podia-se, desde logo, fazer restrições a um ponto de vista tão geral: no coma diabético e, portanto, em plena acidose, tinham-se observado convulsões.

Os efeitos benéficos do gás carbonico observados nas crises convulsivas poderiam ser explicados pela acidose que provoca. Foi com a finalidade de produzir acidose que LENNOX(6) fez um epilético respirar o próprio ar expirado, isto é, uma atmosfera com porcentagem crescente de gás carbonico e decrescente de oxigênio, notando uma ação sedativa sobre as crises frequentes convulsivas que o doente apresentava. Observou também que, juntando gás carbonico ao ar inspirado, a prova da hiperpnéa era negativa (7); os indivíduos não entravam em convulsões. Estes primeiros resultados levaram LENNOX e colaboradores (8, 9, 10, 11) a investigar a importancia do oxigênio e gás carbonico nas convulsões e, posteriormente, na atividade elétrica da cortex.

Experimentalmente, a importância da acidose na inibição das crises convulsivas, foi abordada por vários autores. FRÖLICH e SOLÉ(12) perfundiram rãs com estriçnina em líquido de Ringer e notaram que as convulsões eram atenuadas se a solução perfundente era acidificada e exaltadas se alcalinizada. Também LENNOX, NELSON e BEETHAN(13) atenuaram pela injeção de ácido lático convulsões em coelhos provocadas pela injeção de tujona ou homocanfina. SWINGLE, WENNER e STANLEY (14) estudaram o efeito do gás carbonico na tetania produzida em cães pela extirpação das tiroides e paratiroides; constataram exercer o gás carbonico ação inibidora. Procurando explicar o mecanismo dessa inibição e, baseados nos resultados satisfatórios obtidos por outros autores com a administração de ácido clorídrico, cloreto de cálcio, cloreto de amônio, tomaram como hipótese que o efeito do gás carbonico

fosse pela acidose que causava. Em suas experiências, dosaram esses autores o cálcio total do sangue, o conteúdo em gás carbonico e determinaram o pH. Sob a ação do gás carbonico, o pH do sangue teve sensível queda, mas o conteúdo de gás carbonico também caiu o que os levou a admitir que a acidose não era provocada pelo CO<sup>2</sup> mas pelo aumento no sangue de um ácido orgânico, provavelmente o ácido láctico. Em experiências ulteriores mostraram haver realmente, após tratamento dos animais em tetania paratireopriva, pelo gás carbonico, um notavel aumento do ácido láctico do sangue. Durante o período em que os animais apresentavam uma taxa elevada de ácido láctico no sangue, não apareciam convulsões; a queda do teor de ácido láctico era acompanhada do reaparecimento da tetania. Como explicação final, SWINGLE e colaboradores admitiram que o gás carbonico aumentava a quantidade de ácido láctico do sangue; essa acidose tornava o cálcio do soro mais difusível e, provavelmente, estimulava a excreção do excesso de fósforo, o que inibia a tetania paratireopriva. Mostramos em um trabalho anterior (15) que esse mecanismo não se applicaria à ação inibidora exercida pelo CO<sup>2</sup> nas convulsões por estricnização da cortex cerebral de cães. Nessas experiencias verificamos que a inalação de gás carbonico na taxa de 18%, concentração que inibe as convulsões por estricnização da cortex cerebral, produz uma queda no ácido láctico do sangue de cães normais, resultado idêntico ao observado por ANREP e CANNAN (16) e outros. Nos cães com convulsões, a suspensão da inalação do gás carbonico permitia, às vezes, que as convulsões reaparecessem, num momento em que a taxa de ácido láctico era ainda bem mais elevada do que a do início das experiências, sendo esse excesso de ácido láctico uma consequência das contrações musculares durante as convulsões.

Nessa ordem de idéias, diferindo porém em aceitar que uma alcalose adstrita a um ponto motor da cortex cerebral seria a origem de crises convulsivas, foram as pesquisas de DUSSEY DE BARENNE (17) e colaboradores para explicar o mecanismo da ação da estricnina sobre os centros nervosos. Admitiram que a applicação de estricnina sobre a cortex cerebral produzia uma alcalinização localisada; os resultados experimentais, porém, mostraram não haver após a applicação de estricnina e a aparição dos "spikes" alcalinização localisada, responsável pela atividade elétrica convulsiva que se segue à applicação de estricnina. JASPER e ERICKSON (18) estudaram a importância do pH na aparição das convulsões provocadas pela injeção de metrazol em gatos. Registraram, simultaneamente, o pH do sangue e o electrograma do girus sigmoide e concluíram pela independencia das convulsões das variações de pH observadas. Também LUBLIN e PRICE (19) estudaram a influencia da alcalose e acidose sobre a atividade elétrica normal da cortex cerebral e concluem que as alterações elétricas observadas pelo aumento ou diminuição da tensão de gás carbonico do sangue são devidas mais a uma ação especificada do gás do que a uma alteração do pH do líquido intersticial.

Mais recentemente GELLHORN e HEYMANS (20) estudaram a influência da anoxia, asfixia e gás carbonico sobre os potenciais normais e convulsivos da cortex cerebral de gatos e cães; verificaram que o gás carbonico, na concentração de 10,6%, tem sobre os potenciais convulsivos estricnicos uma ação predominantemente excitante. Seria importante que os autores tivessem estudado também a influência de concentrações maiores, uma vez que são estas as que se mostram inibidoras sobre as convulsões e que reduzem a amplitude dos potenciais elétricos convulsivos como o mostrou, entre outros, POLLOCK (21) para as convulsões químicas e elétricas.

Ainda que algumas experiências levem a admitir agir o gás carbonico especificamente, o problema é hoje debatido, tanto mais por não esclarecer em que consiste essa especificidade de ação.

Foi para esclarecer este ponto, se o gás carbonico agiria por uma ação especifica ou por uma modificação do pH do sangue ou dos centros nervosos na sua inibição sobre a crioepilepsia, que realizamos as experiencias descritas neste trabalho. Constituíram em perfundir rãs através a aorta com líquido de Ringer com pH diversos e recolher o líquido perfusor da veia abdominal. O pH deste líquido era determinado e tomado como índice do pH no meio intercelular. Nas rãs submetidas à perfusão realizavamos depois a crioepilepsia.

**MÉTODOS:** As experiências foram realizadas em rãs *L. ocellatus*. As rãs eram perfundidas através uma das crossas aorticas com uma solução de Ringer oxigenado e acidificado com HCl. O pH do Ringer a perfundir era determinado previamente. Fizemos experiencias com líquidos perfundentes entre pH 5.2 e 6.2. As soluções eram preparadas no momento da experiência. O líquido perfundido era recolhido através uma canula introduzida na veia abdominal e, nas últimas porções perfundidas, redeterminavamos o pH; este último valor era o que tomavamos como índice do pH existente na medula espinhal. As determinações do pH eram feitas ou pelo metodo colorimétrico ou pelo eletrométrico, empregando, neste caso, um eletrodio de quinidrona de um aparelho Pehavi. A perfusão durava 5 a 12 minutos. Terminada a perfusão fazíamos rapidamente a preparação medula-isolada trem-posterior e verificávamos o ataque convulsivo pelo resfriamento da medula conforme técnica descrita anteriormente (22). Em outra série de experiencias, para verificar o pH do sangue das nossas rãs normais e as variações deste pH quando submetíamos os animais à ação do gás carbonico, empregando a técnica da insuflação pulmonar através uma canula inserida na glote da rã. A insuflação foi feita com uma mistura gasosa de 25% de gás carbonico em ar atmosférico, durante 20 a 25 minutos. Terminada a insuflação, puncionávamos o ventrículo e colhíamos o sangue para a determinação do pH; a determinação era feita imediatamente após a retirada do sangue. A amostra de sangue não foi colhida sob parafina. O pH foi verificado com o electrodio de vidro de um aparelho Beckman.

## RESULTADOS

Na tabela I damos os resultados encontrados em nossas experiencias. Das dez experiencias realizadas somente em uma não tivemos o controle da temperatura em que foi mergulhada a medula espinhal. Em todas as outras a temperatura do banho era conhecida; sabemos de trabalhos anteriores em rãs normais que, nestas temperaturas, os ataques são, habitualmente, de forte intensidade. Comtudo, a diminuição da intensidade dos ataques, observada em parte das experiencias, não deve ser atribuida exclusivamente a uma influencia do pH do líquido perfusor. Ainda que o líquido perfundente tenha sido oxigenado, a oxigenação não deve ser suficiente para manter, durante todo o tempo da

TABELA I

RÃ NÚMERO	Temperatura banho Ringer	pH líquido perfundente	Resultado	pH líquido perfundido	Método
1.....	0.º	6.2	Ataque forte	6.6	Colorimetrico
2.....	1.º5	5.8	Ataque médio	6.5	Colorimetrico
3.....	0.º	5.8	Ataque médio	6.7	Colorimetrico
4.....	0.º5	5.8	Ataque forte	6.6	Colorimetrico
5.....	Cloretila	5.6	Ataque médio	6.2	Colorimetrico
6.....	1.º5	5.8	Ataque fraco	6.6	Electrometrico
7.....	0.º	5.8	Ataque médio	6.55	Electrometrico
8.....	0.º	5.8	Ataque fraco	6.4	Electrometrico
9.....	0.º	5.2	Ataque médio	6.55	Electrometrico
10.....	0.º	5.2	Ataque médio	6.7	Electrometrico

perfusão uma suplencia do oxigenio necessário aos tecidos; essa diminuição da intensidade do ataque pode correr, em boa parte, pela relativa anoxia. Experiencias preliminares de controle mostraram que se pode obter ataque de crioepilepsia 15 a 20 minutos depois de uma ligadura do bulbo arterial da rã ou depois de terminada a preparação medula isolada trem posterior; mas os ataques são de menor intensidade ou podem mesmo faltar nas preparações com tempo próximo de 20 minutos ou mais de anoxia, dependendo esse tempo de abloção do ataque e da temperatura exterior existente. Esses fatos não eliminam uma influência do pH na diminuição da intensidade dos ataques mas, a diminuição observada deve ser devida aos dois fatores acima considerados. Em todas as rãs, porém, obtivemos ataque. Os valores de pH encontrados no líquido colhido na veia abdominal foram sempre inferiores a 7.0. Nas esperiências n.º 5 e 8 obtivemos ataque com um líquido fluindo da veia abdominal respectivamente em pH 6.4 e 6.2. Se considerarmos que entre o pH do líquido perfundente e o do líquido perfundido há sempre uma diferença que indica uma alcalinização do líquido perfundente, podemos supor que o pH dos tecidos é inferior ao verificado no líquido colhido na veia abdominal. Esses resultados mos-

tram claramente que a perfusão de rãs com Ringer com pH ácido, fazendo cair o pH dos tecidos a um nível bem inferior ao normal, não é, por si só, suficiente para impedir o ataque de crioepilepsia.

*Valores do pH do sangue de rãs normais e sob a ação do CO<sup>2</sup> (§)*  
Em tres rãs normais determinamos o pH do sangue obtido atravez uma canula inserida na aorta. Os valores encontrados foram: 7.15, 7.25, 7.25. A rã em que encontramos o valor 7.15, esteve durante 20 minutos com uma canula na glote. Os valores 7.25 encontrados para as outras duas rãs estão em acordo com os assinalados para a rã européia nos meses de Julho a Setembro e que são 7.25-7.30 (Oppenheimer-Pincussen. — Tab. Biol. Period. Bd. VII, pg. 284). Durante a hibernação ou jejum há uma elevação do pH para 7.36-7.51.

Nas determinações feitas em rãs após a insuflação com a mistura gasosa contendo 25% de gás carbonico, encontramos os seguintes valores: 1) rãs em que o sangue foi colhido atravez uma canula inserida na aorta: 7.2, 7.2 e 6.95. Os dois primeiros valores foram determinados no sangue de uma mesma rã e o último em outra rã cujo sangue permaneceu em um electrodio em que se fez passar um jato da mesma mistura gasosa que foi utilizada para a insuflação pulmonar da rã. 2) rãs em que o sangue foi colhido diretamente por punção do ventrículo e no qual encontramos os valores seguintes: 6.8, 6.7, 7.05 e 7.05, sendo os dois últimos valores determinados na mesma rã.

Estes resultados mostram que, mesmo com uma concentração de 25%, mais elevada do que a necessária para impedir o ataque de crioepilepsia, o pH do sangue não atinge valores mais baixos do que os obtidos com a perfusão e que levam a admitir ser uma queda do pH dos tecidos a causa da inibição do ataque de crioepilepsia pelo gás carbonico.

Os resultados acima expostos nos levam a admitir que o gás carbonico possui uma ação inibidora sobre a crioepilepsia que dependeria de um mecanismo específico do gás nos centros nervosos; as modificações do pH do líquido intercelular que ele acarreta, não seriam suficientes para explicar a inibição observada.

Cabera indagar o que se deveria compreender como uma ação específica do gás carbonico. Essa pergunta foi formulada pelos pesquisadores que defendem a teoria de uma ação específica do gás carbonico na regulação da respiração. As experiencias que a demonstram são de natureza variada. Nós não vamos apresentar todos os trabalhos que se dedicaram ao problema; isto nos levaria a um campo que não é o diretamente visado em nosso trabalho. Vamos, porém, resumir os resultados experimentais e as conclusões a que chegou JACOBS (23, 24) dadas as semelhanças existentes com as nossas experiencias.

JACOBS preocupou-se em saber como age o gás carbonico no protoplasma vivo: atravez a influência dos ions hidrogenio ou por uma ação específica. Para isto investigou a influência do gás carbonico em vários fenômenos. A ação sobre o centro respiratório não seria mais do que

---

\* As determinações de pH foram feitas pelos Drs. R. WURMSER e S. F. WURMSER, a quem agradecemos.

um caso particular de um mecanismo de ação geral do gás. Em uma variedade de suas experiências, JACOBS submeteu girinos de sapos (*Bufo americanus*) a influência de soluções de ácido clorídrico, oxálico, acético, salicílico e carbônico, todas com um pH entre 3.8 e 3.9. Essas experiências mostraram que, enquanto os girinos que se encontravam nas soluções dos outros ácidos resistiam mais de uma hora, os que se encontravam na solução de ácido carbonico resistiam apenas segundos. Estas experiências mostravam não ser o pH das soluções o fator que determinava a toxidez. Se, à solução saturada de gás carbonico, fosse adicionado bicarbonato de sódio até que o líquido chegasse a um pH de 6.9, isto é, quasi neutro, os resultados eram identicos. Uma solução de bicarbonato com a mesma concentração da anterior não se mostrava quasi tóxica. Esta experiencia eliminava a possibilidade do gás carbonico agir atravez o ion  $\text{HCO}^3$ , uma vez que este se encontrava em abundancia na solução de bicarbonato. Ainda mais, o gás carbonico agindo num meio tamponado quasi até a neutralidade, exercia seus efeitos identicamente aos da solução de ácido carbonico. Resultados semelhantes foram obtidos em experiencias com protozoários de diversas espécies. Não era, portanto, a acidez do meio que determinava a toxidez do gás carbonico. O gás carbonico possuía uma ação específica. Foi para esclarecer em que consistia essa especificidade de ação do gás carbonico que JACOBS fez experiencias com as flores de *Symphytum peregrinum*, planta da família das *Boraginaceas*, que possuem na fase de prefloração uma coloração purpura e quando a flor já desabrochou, uma coloração azul. Essa coloração depende de um pigmento intracelular e a mudança está ligada a uma variação de pH, a coloração púrpura aparecendo nas concentrações elevadas de hidrogênio e a azul nas concentrações baixas. O pigmento funcionaria então como um indicador intracelular.

JACOBS submeteu as flores na fase de coloração azul à influência de pH diversos, obtidos com água destilada, água destilada e  $\text{CO}^2$ , solução M/2 de  $\text{NaHCO}^3$  e  $\text{CO}^2$  e M/2 de  $\text{NaHCO}^3$ . As flores mergulhadas nas soluções de M/2  $\text{NaHCO}^3 + \text{CO}^2$  e na de água destilada +  $\text{CO}^2$ , mudaram, poucos minutos depois, para a cor púrpura, enquanto que as mergulhadas nos outros líquidos ou não mudavam de cor ou tornavam-se mais azues, sendo que as tratadas com a solução de bicarbonato, tornavam-se com o tempo de coloração esverdeada.

Essas experiencias mostram que modificações do pH intracelular não estão em estreita dependência do pH de meio externo. As flores mergulhadas na solução de M/2  $\text{NaHCO}^3 + \text{CO}^2$ , com um pH de 7.4, tomaram a cor púrpura muito mais rapidamente do que as mergulhadas em água destilada com um pH de 5.0 a 6.0 (acidez devida ao  $\text{CO}^2$  do ar dissolvido). Essa diferença explica-se pela maior difusibilidade do  $\text{CO}^2$  que, penetrando na célula muito mais rapidamente do que os ions  $\text{H}^+$  ou  $-\text{HCO}^3$ , vai modificar o pH intracelular numa direção bem diversa da do pH de meio externo. Ainda trabalhando nas flores de *S. peregrinum*, JACOBS compara a difusibilidade do gás carbonico a dos

outros ácidos como o benzóico, salicílico, acético, clorídrico, encontrando resultados semelhantes aos observados nas experiências com girinos.

Os trabalhos sobre a penetração de ácidos em células animais, ainda que numerosos não estudaram comparativamente a difusibilidade de gás carbonico em relação a outros ácidos. Os primeiros estudos utilizando células animais que possuíam um pigmento intracelular funcionando como indicador, devem-se a HARVEY (25) utilizando os filamentos gonadais de *Stichopus ananus* que possuem um pigmento púrpura passando a vermelho alaranjado em meio ácido. Também CROZIER (26) estudou a penetração de ácidos na célula empregando o tegumento de um molusco nudibrânquio- *Chromodoris zebra*, que possui um pigmento de cor azul, passando ao roseo em pH cerca de 5.6. Esses autores estudaram o poder de penetração de vários ácidos e chegaram a resultados concordantes com os de JACOBS e HAAS (27) para as células vegetais; de mais de uma dezena de ácidos estudados, com pequenas variações, os ácidos salicílico, benzóico, fórmico, clorídrico, etc., estavam entre os de maior poder de penetração enquanto que o ácido acético, butírico, etc., entre os menos penetrantes.

Esses resultados mostram o comportamento semelhante das células animais e vegetais perante os ácidos experimentados e nos permitem admitir que também nas células animais o gás carbonico se distinguiria pela sua maior difusibilidade.

O mecanismo de inibição das convulsões pelo gás carbonico poderia ser explicado pela rápida penetração do gás nos neuronios, abaixando o pH interior; o valor do pH atingido dentro do neurônio independeria do pH encontrado no meio intercelular ou no sangue, e seria função das condições intracelulares existentes no momento. A tensão de gás carbonico no meio intracelular igualando-se rapidamente à existente no sangue devido à rápida difusibilidade daquele gás iria determinar o pH no neurônio. Isto nos permitiria compreender porque são tão discordantes os resultados experimentais existentes e que procuraram estabelecer uma correlação entre o pH do sangue e a aparição ou inibição das convulsões epileptiformes. Tal como foi observado nas experiências de JACOBS com as flores, também aqui poderíamos ter uma reação nitidamente alcalina no sangue ou no meio intercelular e o pH do meio intracelular descer a níveis baixos.

## S U M Á R I O

Neste trabalho descrevemos experiências destinadas a mostrar a influência do pH nas crises convulsivas por resfriamento da medula espinhal da rã e estudar o mecanismo da ação inibidora do gás carbonico sobre estas convulsões. Verificamos que o CO<sup>2</sup> não age através um abaixamento do pH do sangue ou do meio intercelular. O gás carbonico teria uma ação específica que estaria ligada à sua grande difusibilidade. Essa sua propriedade permitiria que penetrasse rapidamente no interior de neurônio, abaixando sensivelmente o pH intracelular, sem que houvesse nítida variação do pH do sangue.