

Alterações fisiológicas do sistema nervoso central de rã pelas toxinas de *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens* e *Cl. septicum*

por

Genésio Pacheco, Gobert Araujo Costa, Isaac Moussatché e Milton Thiago de Mello

Interessando-nos estudar a influência das toxinas da gangrena gasosa sobre o sistema nervoso central, para confirmação da teoria explanada por PACHECO & COSTA (1), seguimos duas diretrizes: o estudo das alterações texturais e o das alterações funcionais.

As alterações texturais consecutivas à intoxicação aguda pelas toxinas de *Cl. perfringens*, *Cl. histolyticum* e *Cl. septicum*, em camundongos, já foram objeto de trabalho anterior (2).

No presente trabalho descrevemos os resultados de nossas experiências no sentido de demonstrar o aparecimento de alterações funcionais do sistema nervoso central, em consequência da ação das toxinas de germes da gangrena gasosa.

Para a verificação desta questão empregamos o método de estudo dos reflexos espinais na preparação «medula isolada-trem posterior» de rã, segundo OZORIO DE ALMEIDA & Cols. (3).

O emprêgo de preparações de órgãos isolados tem se revelado um método frutuoso em fisiologia, para exame da atividade funcional. OZORIO DE ALMEIDA & Cols. acentuam a vantagem de tais métodos eliminarem influências intercurrentes de outros órgãos ou aparêlhos nas reações neles promovidas por excitantes ou reagentes, obtendo-se, assim, reações orgânicas puras, provocadas experimentalmente.

A preparação «medula isolada-trem posterior» de rãs, utilizada por esses pesquisadores no exame do funcionamento nervoso, permite analisar a reação motora reflexa da perna, consecutiva à excitação mecânica da pata.

Os mesmos autores estabeleceram quais os elementos influentes nos reflexos obtidos com essas preparações, ou sejam: a temperatura do banho, fatores sazonais e climáticos, oxigenação e teor de CO² (4,5). Em con-

seqüência das alterações decorrentes de tantas circunstâncias, torna-se obrigatório o emprego simultâneo de número suficiente de preparações testemunhas, de contra-prova, na exploração do fenômeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Toxinas e antitoxinas — Trabalhamos com toxinas parcialmente purificadas, obtidas mediante crescimento dos clostrídios respectivos em meios de cultura especialmente destinados à sua produção, sendo dêstes separadas por filtração esterilizante, na época apropriada.

A toxina do *Cl. perfringens* foi obtida pelo cultivo do germe em caldo de coração de bovino, a 34° C durante 10-12 horas. A do *Cl. septicum* foi obtida cultivando o germe em caldo com Bacto-peptona «Difco», glicosado a 1%, durante 10-12 horas a 34° C. A do *Cl. oedematiens* foi obtida cultivando o germe em caldo simples com Bacto-peptona «Difco» a 37° C. durante quatro dias. A purificação era realizada pelo tratamento com sulfato de amônio, segundo a técnica de HENRY & LACEY (6). Finalmente as toxinas eram dosadas no seu poder letal em camundongos.

A D.L.M. de cada uma das toxinas era a seguinte :

<i>Cl. perfringens</i>	0,02 mg
<i>Cl. septicum</i>	0,5 mg
<i>Cl. oedematiens</i>	0,01 mg

Nas provas feitas com toxinas neutralizadas, eram utilizadas as antitoxinas padrões fornecidas pelo «National Institute of Health» de Washington.

Tôdas as diluições eram feitas em solução de Ringer-Locke e preparadas de tal modo que o volume a injetar fôsse de 1 ml por 100 g de pêso vivo de rã.

A dose de toxina a injetar foi determinada depois de vários ensaios com cada uma das toxinas, de modo a serem obtidos resultados nítidos. Com isto verificamos que havia uma dose ótima, aquém e além da qual eram muito irregulares os resultados.

Rãs — Os animais utilizados nas provas pertenciam à espécie *Leptodactylus ocellatus*, muito comum no Rio de Janeiro. Para cada prova eram utilizadas 10 rãs, com o pêso médio de 40-60 g; cinco dêstes animais eram inoculados com a toxina diluída ou com a mistura de toxina + antitoxina (rãs de prova), enquanto os outros cinco eram inoculados somente com a

solução de Ringer-Locke ou com a mistura desta solução com antitoxina, respectivamente (rãs testemunhas).

Após a inoculação, as rãs eram conservadas rigorosamente nas mesmas condições, em recipientes individuais, à temperatura comum do laboratório.

Técnica da inoculação — No início dos trabalhos procuramos determinar qual a via mais apropriada para a obtenção dos efeitos tóxicos, bem como o prazo ótimo para que a toxina se fixasse no sistema nervoso central.

A via subcutânea foi desprezada porque a inoculação da toxina era seguida, em geral, de necrose da região e as substâncias então produzidas iriam, certamente, mascarar os fenômenos pesquisados.

A via endovenosa também foi desprezada porque os resultados eram extremamente irregulares, além do grande número de animais mortos em cada prova.

Finalmente escolhemos a via intratraqueal, fazendo as inoculações diretamente no saco pulmonar, com o que obtivemos bons resultados.

A técnica da injeção era muito simples. Um auxiliar, com uma das mãos, segurava o animal pelas pernas e com a outra abria a bôca da rã passando uma pinça comum de dissecação, um pouco atrás dos olhos. Em seguida o operador segurava com uma das mãos a extremidade livre da língua da rã, puxando-a para fóra da bôca, enquanto que com a outra prendia, por meio duma pinça de forte pressão, a parte cartilaginosa do assoalho da cavidade bucal, correspondente ao corpo do osso hioide, fazendo pequena tração para fóra da bôca (Fig. 1). Com isto o assoalho

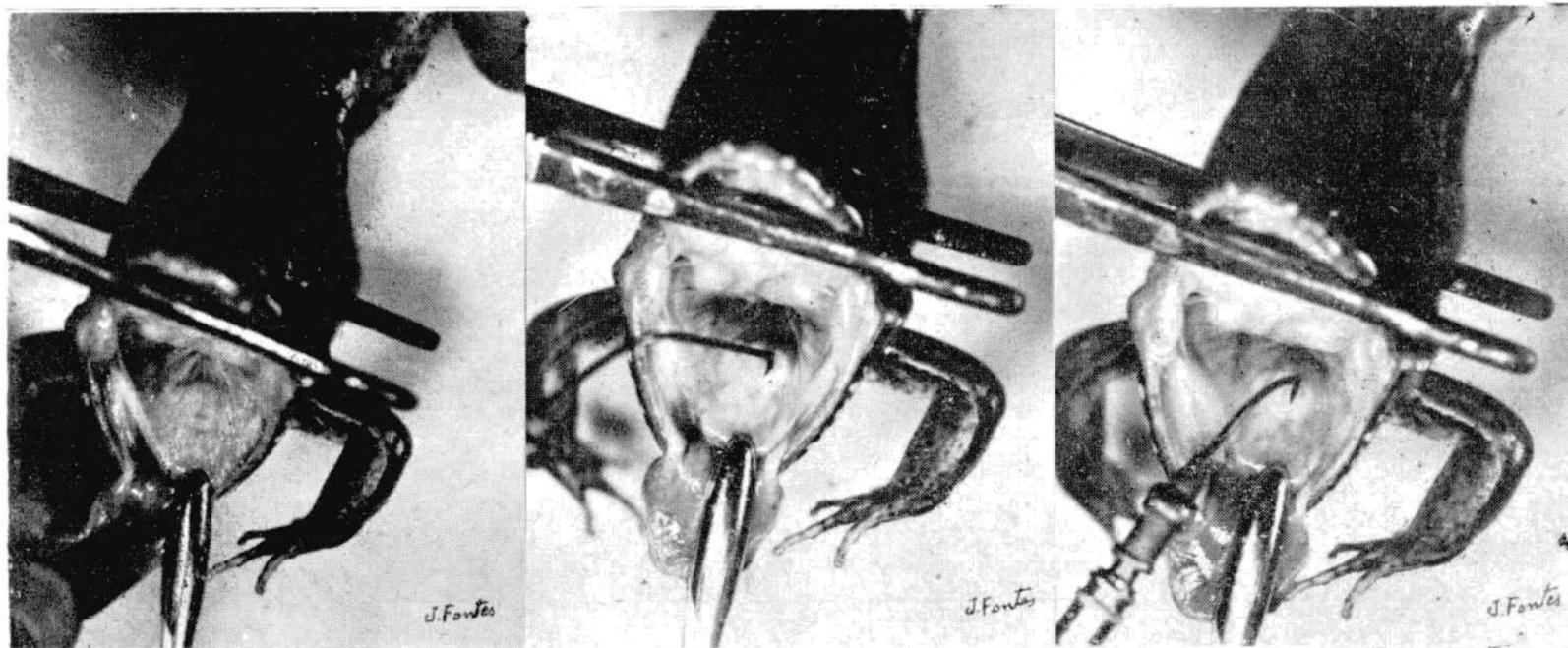


Fig. 1 — Rã em posição, pronta para ser inoculada.

Fig. 2 — Introdução da ponta da agulha no orifício da glote.

Fig. 3 — Agulha introduzida no saco pulmonar, através da glote.

da bôca se tornava perfeitamente visível, notando-se a abertura da glote. Nêsse momento o operador soltava a extremidade da língua e empunhava

a seringa de tipo tuberculina, com agulha de injeção (encurvada e com ponta romba), contendo já o volume conveniente de toxina diluída, correspondente ao pêso da rã, ou simplesmente a solução de Ringer-Locke, nas inoculações testemunhas. Mantendo a pequena tração com a outra mão, era introduzida no orifício da glote a ponta da agulha (Fig. 2). Feito isto, eram executados pequenos movimentos de lateralidade, com o fim de atingir o interior do saco pulmonar, o que era facilmente percebido pela facilidade com que a agulha se introduzia profundamente através da glote (Fig. 3). Injetava-se então, o líquido.

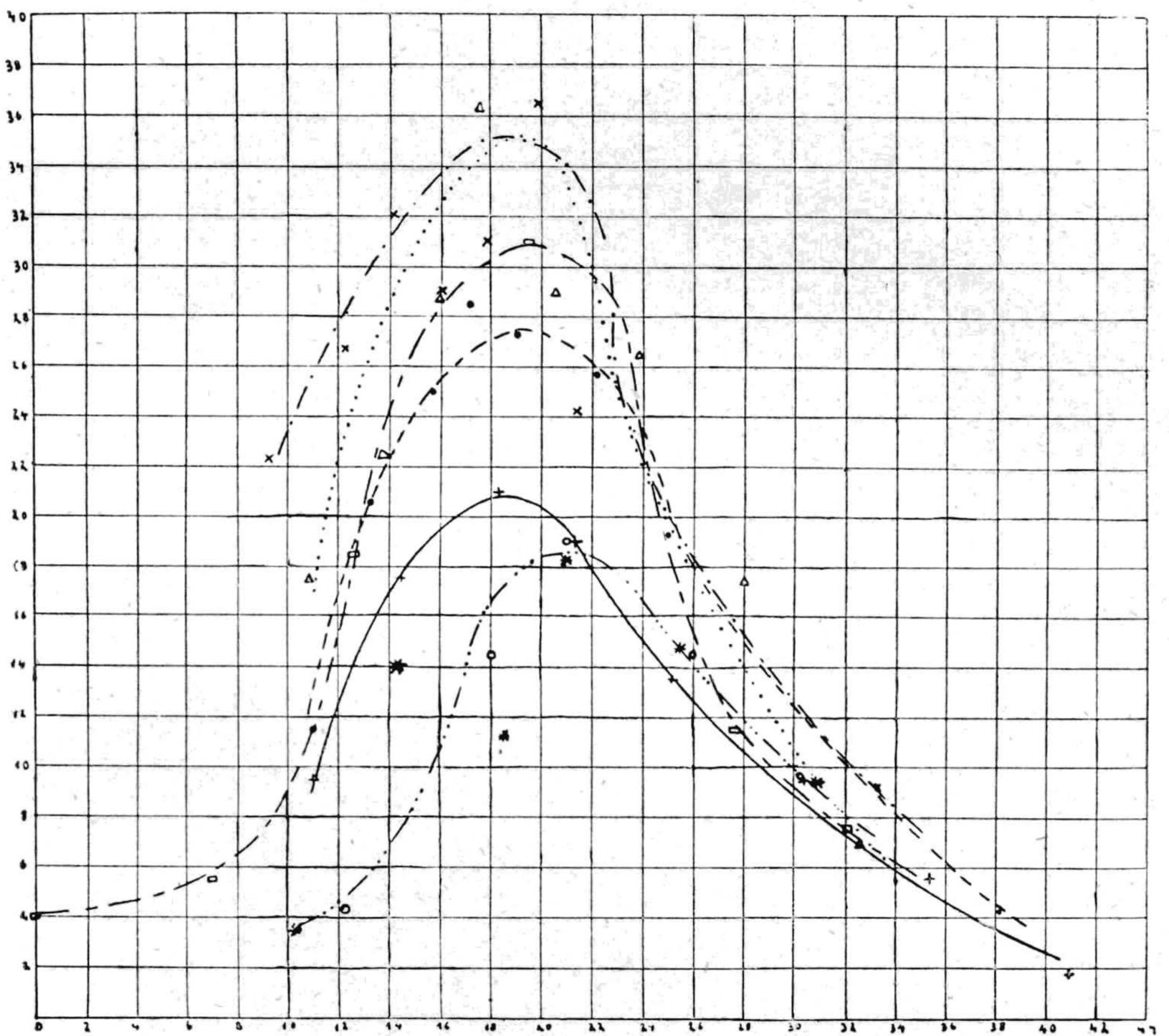


Fig. 4 — Ação da temperatura do banho e da época do ano, sôbre o tempo de duração dos reflexos. Segundo Ozorio de Almeida & Cols. (4).

Tempo de incubação — Depois de vários ensaios, verificamos que o prazo de três dias era o mais conveniente para que se processasse a intoxicação do sistema nervoso central, motivo pelo qual os animais eram obser-

vados durante êsse prazo de tempo, sendo os recipientes lavados diàriamente, no mínimo uma vez, para evitar a absorção de produtos de excreção através do tegumento.

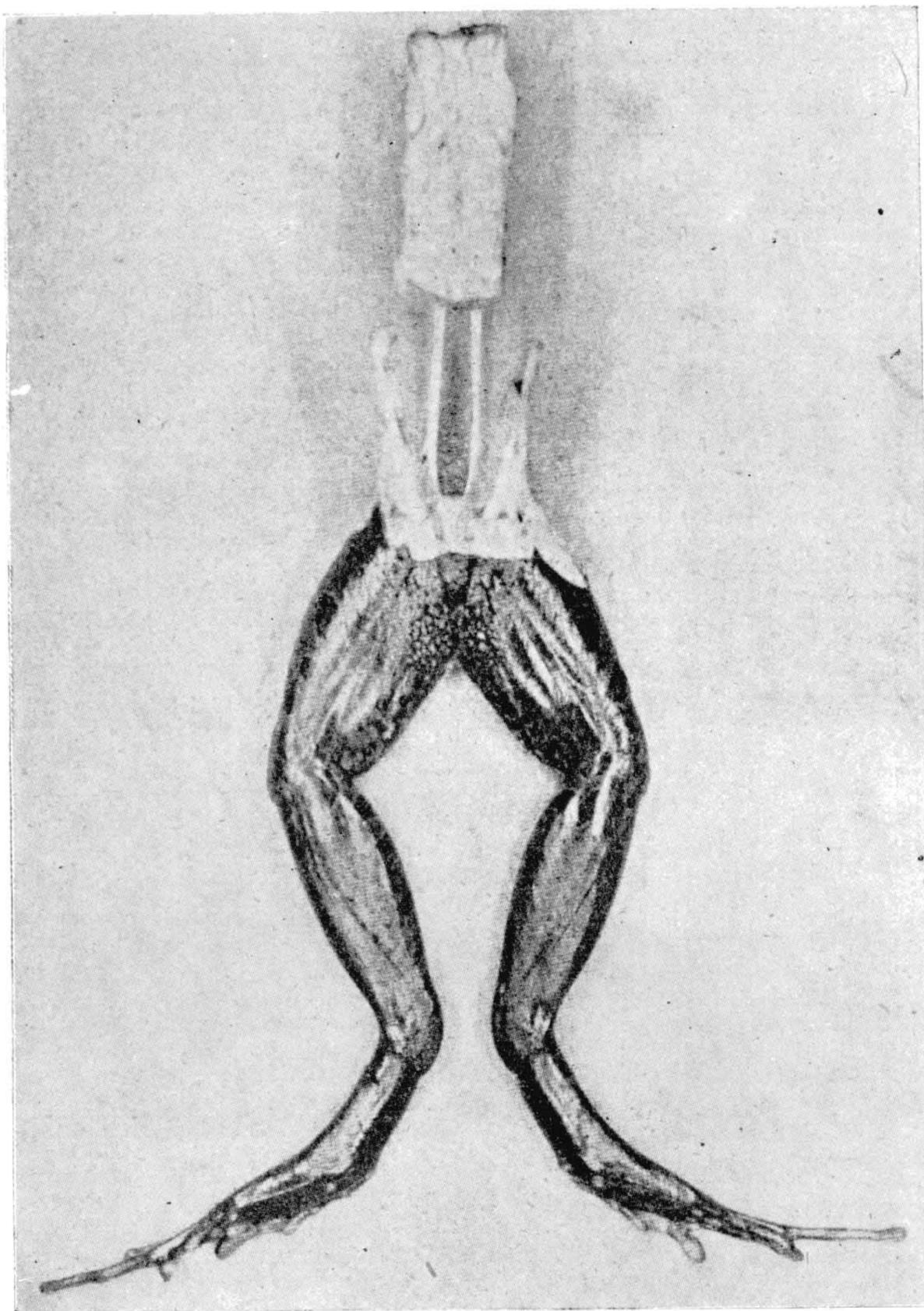


Fig. 5 — Preparação medula isolada — trem posterior de rã. Vista dorsal.
Segundo Ozorio de Almeida & Cols. (7).

Técnica de preparação da «medula isolada-trem posterior» — Em virtude de terem OZORIO DE ALMEIDA & Cols. verificado a grande influência da temperatura do banho de Ringer em que é mergulhada a medula, bem como da estação do ano, procuramos, sempre que possível, fazer grande

número de preparações levando em conta êsses fatores. Ainda mais, conforme já havia sido assinalado pelos autores citados, as diferenças nos tempos de duração dos reflexos se fazem sentir com maior intensidade, de acôrdo com a época do ano e a temperatura do laboratório, em torno dum ótimo de temperatura do banho que oscila de 18 a 20° C (Fig. 4). Sendo assim, sempre que o número de rãs era pequeno, em virtude de morte dos animais, antes da realização da prova, procurávamos fazer as determinações nessa faixa de temperatura.

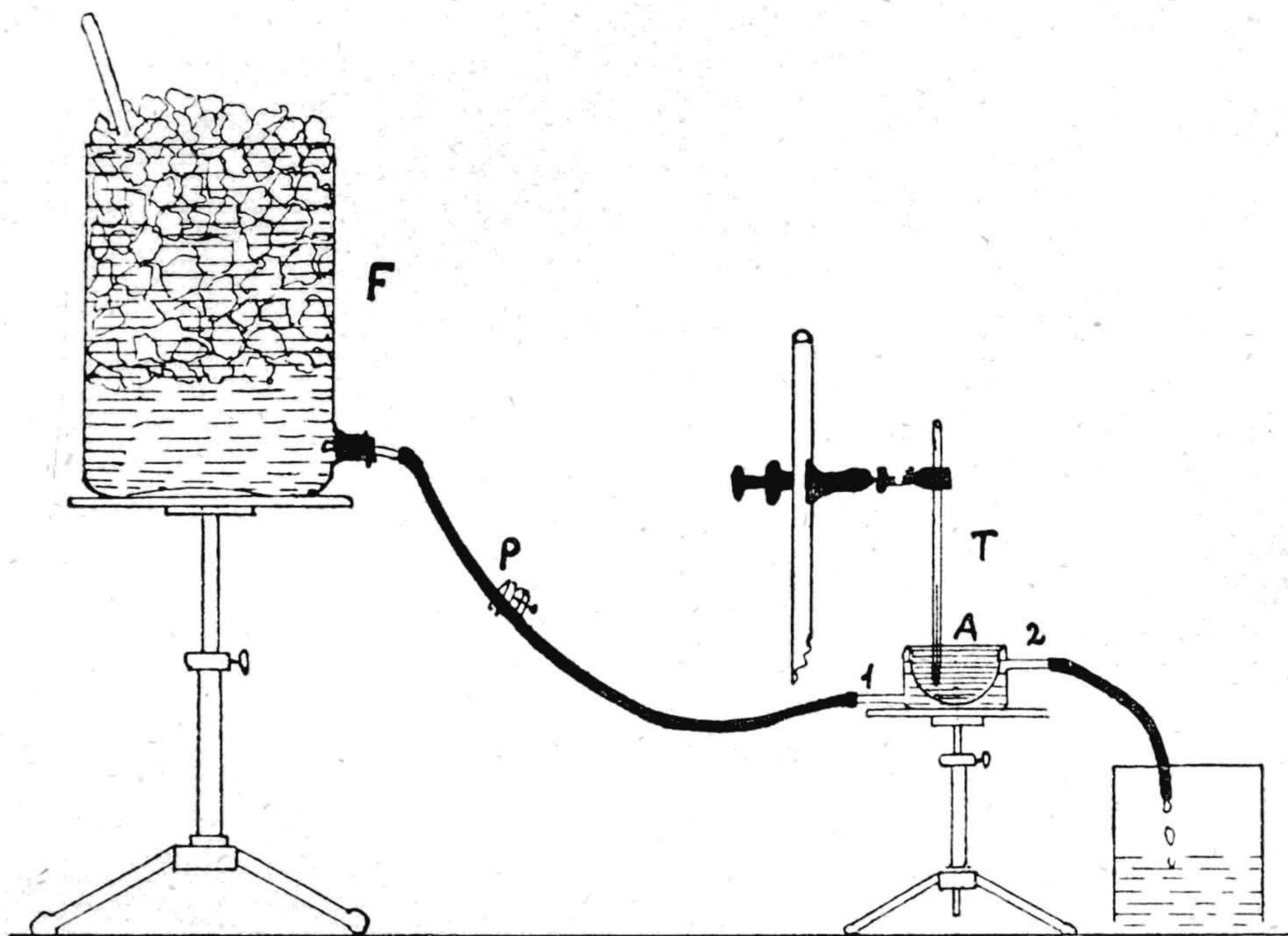


Fig. 6 -- Esquema do aparelho empregado para o resfriamento do sistema nervoso isolado (banho de Ringer). Segundo Ozorio de Almeida & Cols. (7).

Para fazer as preparações seguimos a técnica descrita por OZORIO DE ALMEIDA & Cols. (3,7), a qual transcrevemos a seguir: «Corta-se a medula separando-a do encéfalo e prende-se a rã numa placa de cortiça. Incisa-se a pele do dorso longitudinalmente desde o anus até a cabeça, afastando lateralmente as duas porções. Depois de ter cortado também as grandes aponevroses dorsais, levanta-se o sacro com uma pinça, cortando com a tesoura os músculos sacro-coccigeano e íleo-coccigeano que recobrem os nervos lombares. Êstes são rapidamente dissecados e isolados. Introduzindo um dos ramos da tesoura de cada lado, entre o osso ilíaco e a linha lateral

da coluna vertebral, fazem-se incisões paralelas a esta, por fóra das apófises transversas das vértebras, até atingir a secção superior, que separou a coluna vertebral do crânio. Termina-se o isolamento da coluna cortando todos os órgãos ou tecidos que estão presos a ela; rebate-se a mesma para trás, para concluir a preparação isolando os ossos ilíacos e separando o trem posterior de todos os órgãos vizinhos». (Fig. 5). Suspende-se a preparação num suporte, por meio dum fio de linha grossa, preso a cada extremidade do osso ilíaco.

Para a observação do tempo de duração dos reflexos, sob a influência de várias temperaturas do banho, a medula isolada é resfriada por meio dum pequeno aparelho (Fig. 6) descrito por OZORIO DE ALMEIDA & Cols. (7).

O banho de Ringer onde é mergulhada a coluna vertebral contendo a medula, é previamente colocado à temperatura desejada, para cada determinação. Tendo sido feita rapidamente a preparação, os reflexos são examinados e a medula é mergulhada no banho.

Os reflexos são examinados pinçando manualmente os dedos ou outras regiões das patas, mais ou menos fortemente. Em nossas experiências a excitação era provocada de três em três minutos, diminuindo o intervalo para um minuto, quando percebíamos que os reflexos estavam em vias de se esgotarem, a fim de ser melhor precisado o momento de seu desaparecimento.

A reação motora da perna, por excitação mecânica da pata, traduz-se, em geral, por uma flexão porém, quando a temperatura do banho é superior a 20° C, às primeiras flexões seguem-se apenas reflexos de extensão das pernas.

RESULTADOS DAS PROVAS

Os gráficos que apresentamos resumem os resultados que obtivemos, de modo a verificar não somente a influência da temperatura do banho e da época do ano, como também, e principalmente, a influência da dose de toxina.

Clostridium perfringens — Os gráficos de n.ºs 1 e 2 mostram que, quando a quantidade de toxina foi insuficiente, a resposta foi irregular. Por outro lado, na dose de 0.01 g de toxina por 100 gramas de rã (gráficos n.ºs 3, 4, 5), a resposta foi bastante regular. Com dose um pouco mais elevada, foi obtido um encurtamento ainda maior do tempo de duração dos reflexos, em comparação com a testemunha (Gráfico n.º 6).

Os gráficos n.ºs 7 e 8 demonstram com bastante nitidez que quando a toxina estava neutralizada especificamente com antitoxina, havia coincidência nos tempos de duração dos reflexos ou então esses tempos eram maiores nas preparações provenientes de rãs inoculadas com toxina mais antitoxina, do que nas inoculadas apenas com antitoxina.

Clostridium oedematiens — Os gráficos de n.ºs 9, 10 e 11 demonstram que com a dose ótima de 0.015 g de toxina por 100 g de rã, o tempo de duração dos reflexos ficou sensivelmente diminuído, em comparação com as testemunhas. A discrepância encontrada no terceiro ponto da última curva deve correr por conta de variações individuais das rãs, da mesma forma que no terceiro de uma das experiências com a toxina neutralizada (Gráfico n.ºs 12 e 13).

Clostridium septicum — Na dose de 0.015 g de toxina por 100 g de rã, os resultados foram variáveis, conforme se verifica pelos gráficos de números 14 e 15; no primeiro, correspondente a uma prova feita no inverno, houve concordância no tempo de duração dos reflexos; no segundo, relativo a uma prova feita no verão, os resultados foram mais nítidos. Com a dose maior (Gráficos n.ºs 16 e 17), os resultados foram significativos; nas duas provas realizadas, foram feitas preparações em duplicata na temperatura de 14° C (rãs A e B).

A prova feita com toxina neutralizada especificamente, mostra haver coincidência num ponto da curva e pequenas variações nos outros (Gráfico n.º 18).

Conclusões — Os resultados encontrados por nós, dos quais apontamos no presente trabalho apenas os mais significativos, mostram que as toxinas gangrenosas elaboradas pelos *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens* e *Cl. septicum* determinam um encurtamento do tempo de duração dos reflexos espinais em preparações de "medula isolada-trem posterior" de *Leptodactylus ocellatus*, em última análise, uma alteração do funcionamento nervoso.

ABSTRACT

The authors carried on experiences in order to confirm the neurotoxic theory of gas gangrene explained by Pacheco & Costa, using preparations of isolated cord-posterior train of *Leptodactylus ocellatus* as described by OZORIO DE ALMEIDA & Cols.

Frogs were intoxicated 3 days before the test with partially purified toxins of *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens* and *Cl. septicum*.

The intoxication produced a shortening of spinal reflexes duration time of such preparations, showing a typical alteration of the reflex activity of the spinal cord.

BIBLIOGRAFIA

1. PACHECO, GENÉSIO & COSTA, GOBERT ARAUJO
1947. Teoria neurotóxica da gangrena gasosa. Rev. Bras. Med., 4 (1) : 13-16.
2. PACHECO, GENÉSIO ; ALMEIDA, RITA A. DE & COSTA, GOBERT ARAUJO
1945. Alterações do sistema nervoso central na intoxicação aguda pelas toxinas de anaeróbios da gangrena gasosa. Brasil Médico, 59 (44-45) : 375.
3. OZORIO DE ALMEIDA, MIGUEL; MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M.
1938. Quelques préparations de système nerveux isolé employées en Physiologie et en Pharmacodynamie. Livro Jubilar do Professor Lauro Travassos: 359-366.
4. OZORIO DE ALMEIDA, MIGUEL; MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M.
1941. Action de la température sur le maintien et la résistance des réflexes de la préparation moelle-train postérieur de la grenouille. Rev. Bras. Biol., 1(1) : 95-102.
5. OZORIO DE ALMEIDA, MIGUEL; MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M.
1941. Influence de l'anhydride carbonique et de l'oxygène en pourcentages variables sur les courbes de durées des réflexes de la préparation moelle isolée train postérieur de la grenouille en fonction de la temperature. Rev. Bras. Biol., 1(3) : 293-300.
6. HENRY, H. & LACEY, M.
1920. The precipitation of B. Welchii toxin. J. Path. Bact. 23 : 273.
7. OZORIO DE ALMEIDA, MIGUEL; MOUSSATCHÉ, H. & VIANNA DIAS, M.
1941. Recherches sur l'attaque épileptiforme produit par le refroidissement brusque de la moelle épinière. Premier mémoire-Introduction et technique. Rev. Bras. Biol. 1(2) : 165-177.

1 — Dose insuficiente; resultados irregulares.

2 — Dose insuficiente; resultados irregulares.

3 — Dose suficiente; resultados regulares.

4 — Dose suficiente; resultados regulares.

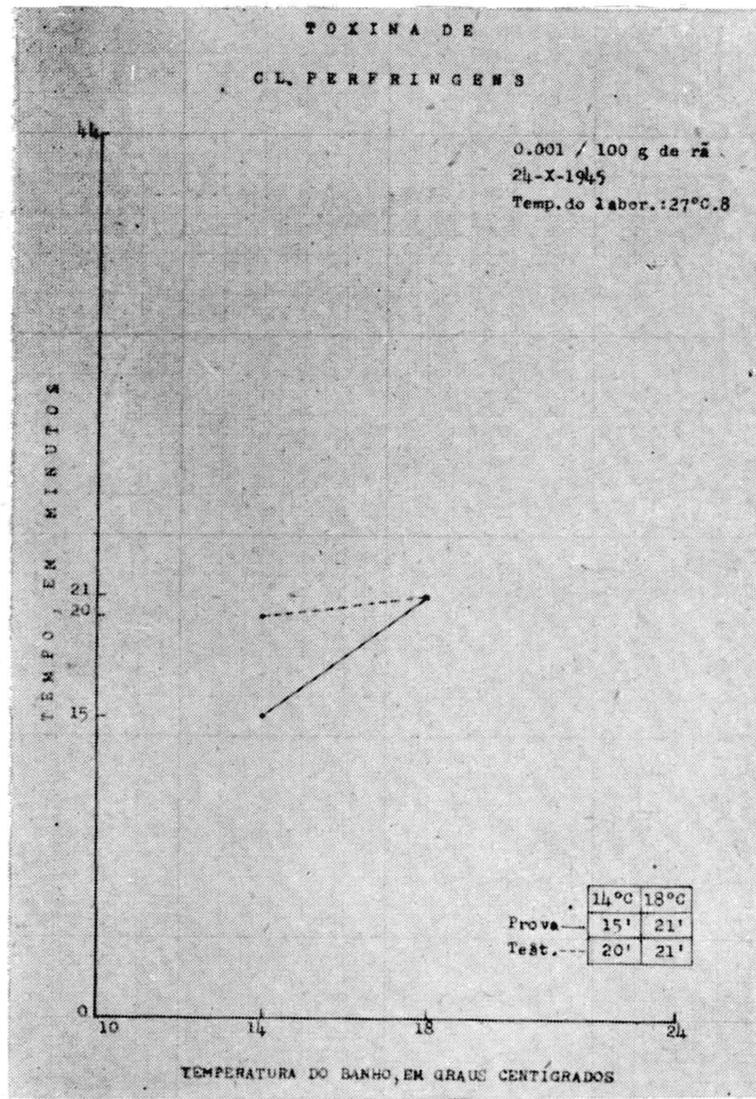


Gráfico 1

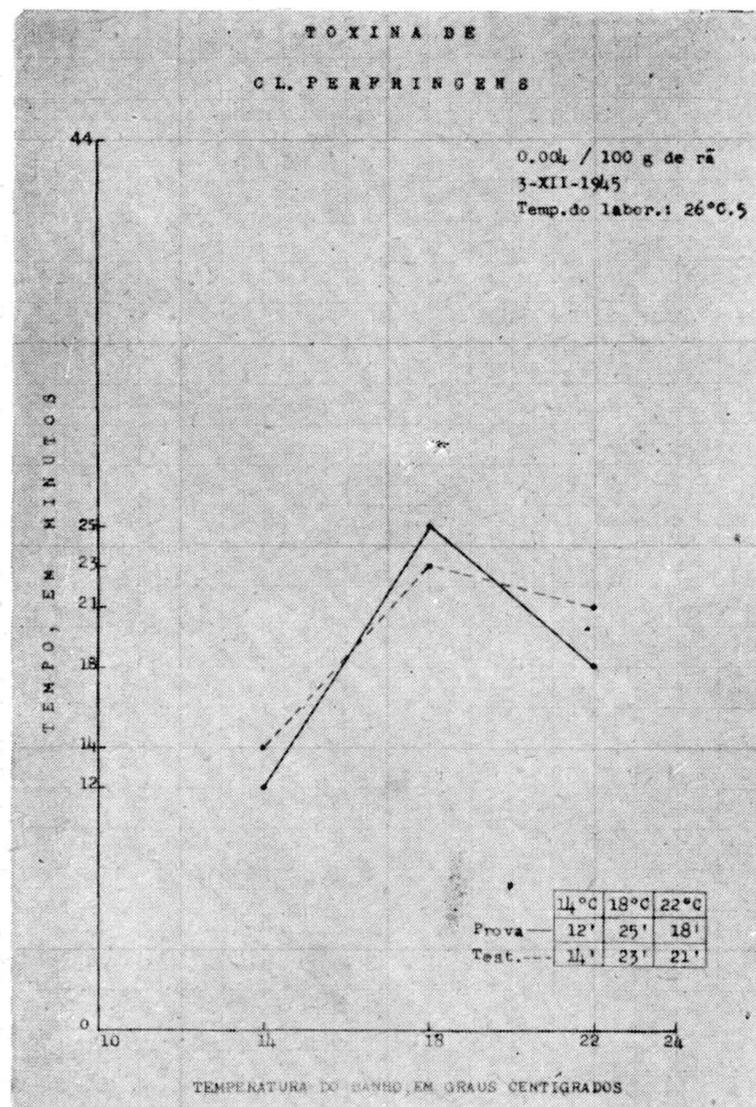


Gráfico 2

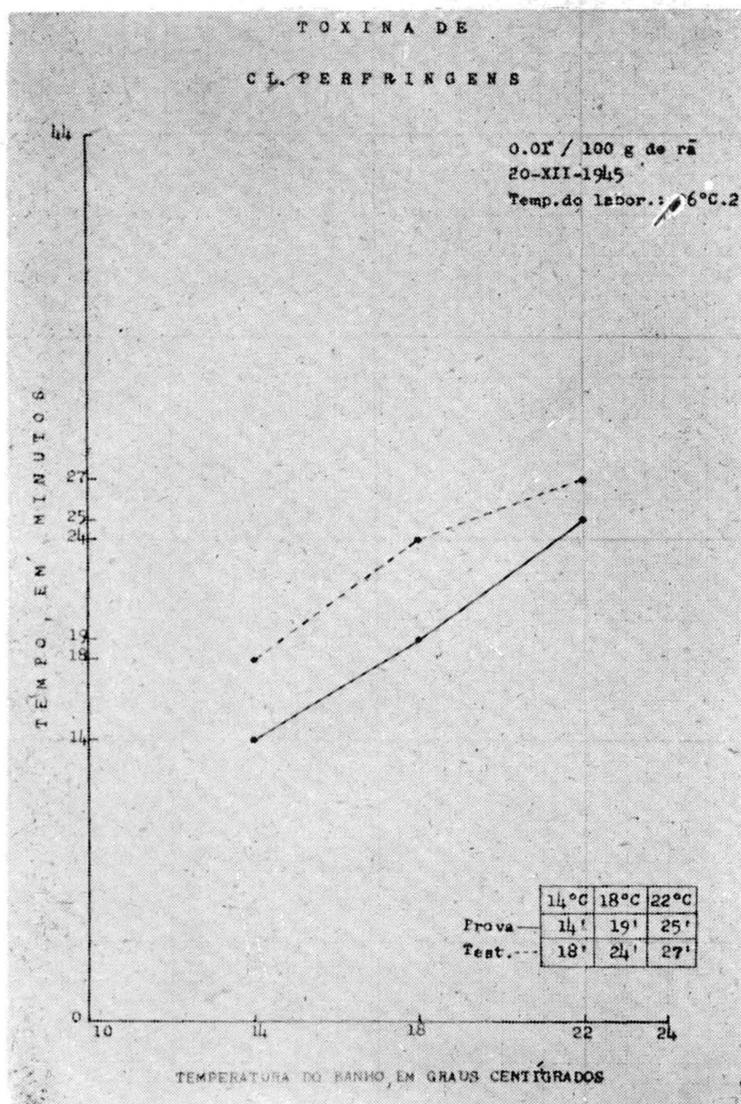


Gráfico 3

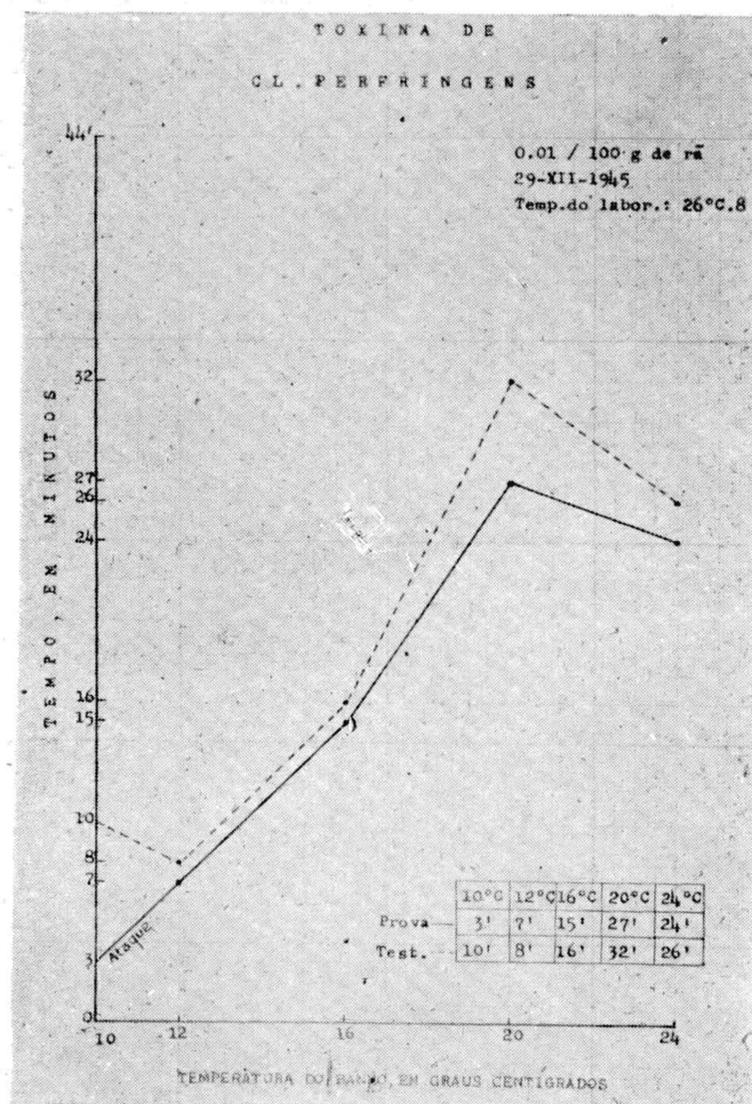


Gráfico 4

5 — Dose suficiente; resultados regulares.

6 — Dose suficiente, aumentada; resultados mais nítidos.

7 — Neutralização dos efeitos tóxicos.

8 — Neutralização dos efeitos tóxicos.

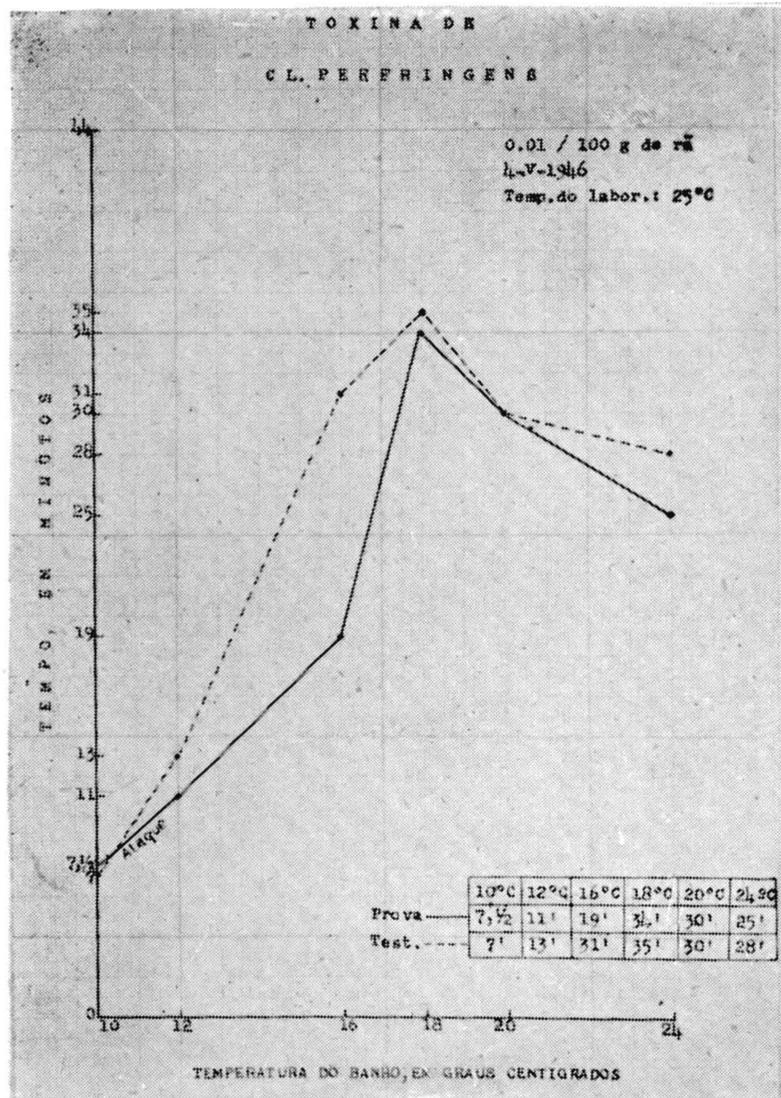


Gráfico 5

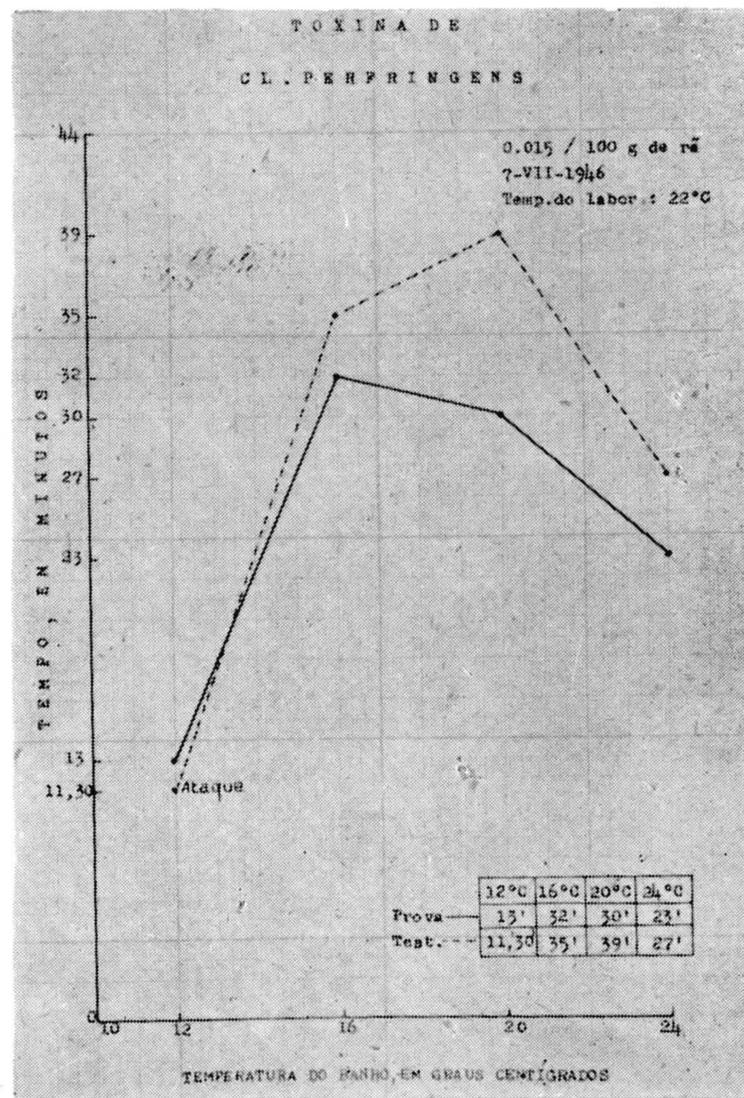


Gráfico 6

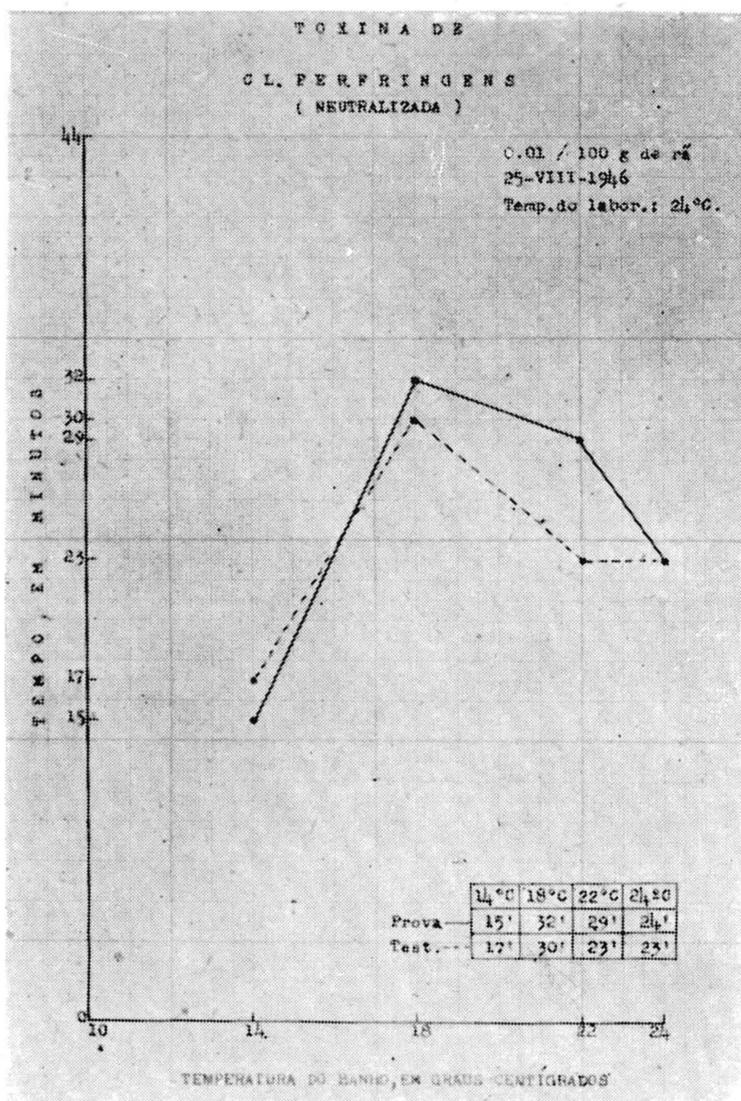


Gráfico 7

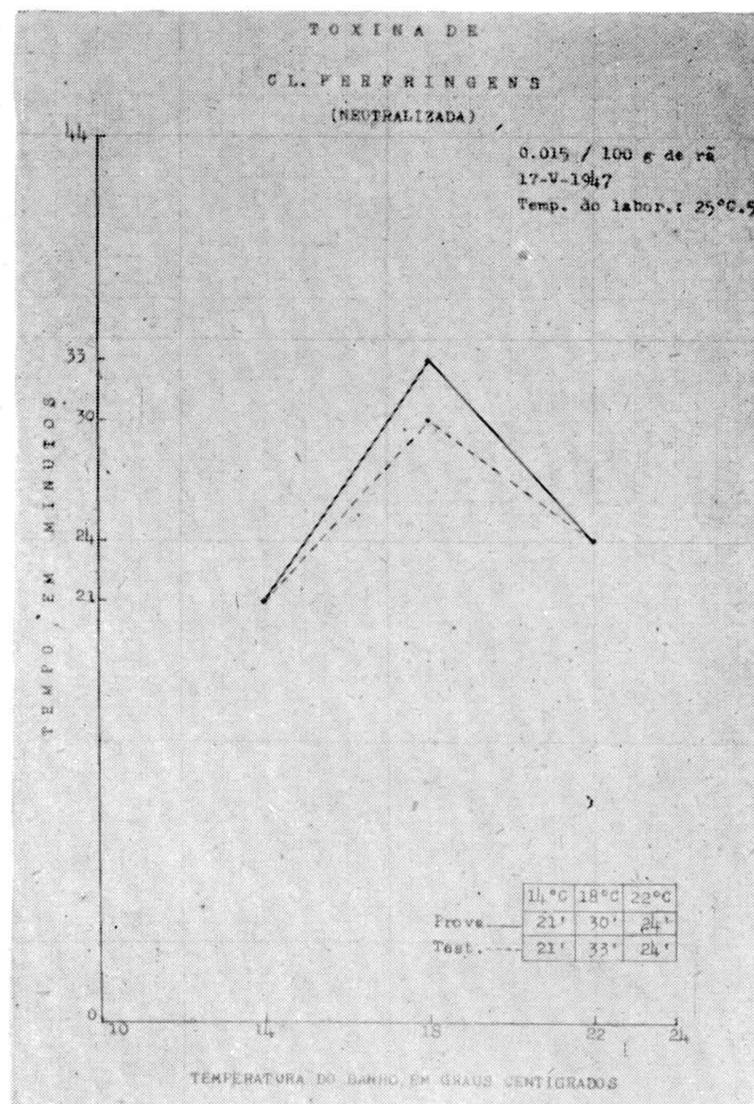


Gráfico 8

9 — Dose suficiente; resultados regulares.

10 — Dose suficiente; resultados regulares.

11 — Dose suficiente; resultados regulares.

12 — Neutralização dos efeitos tóxicos.

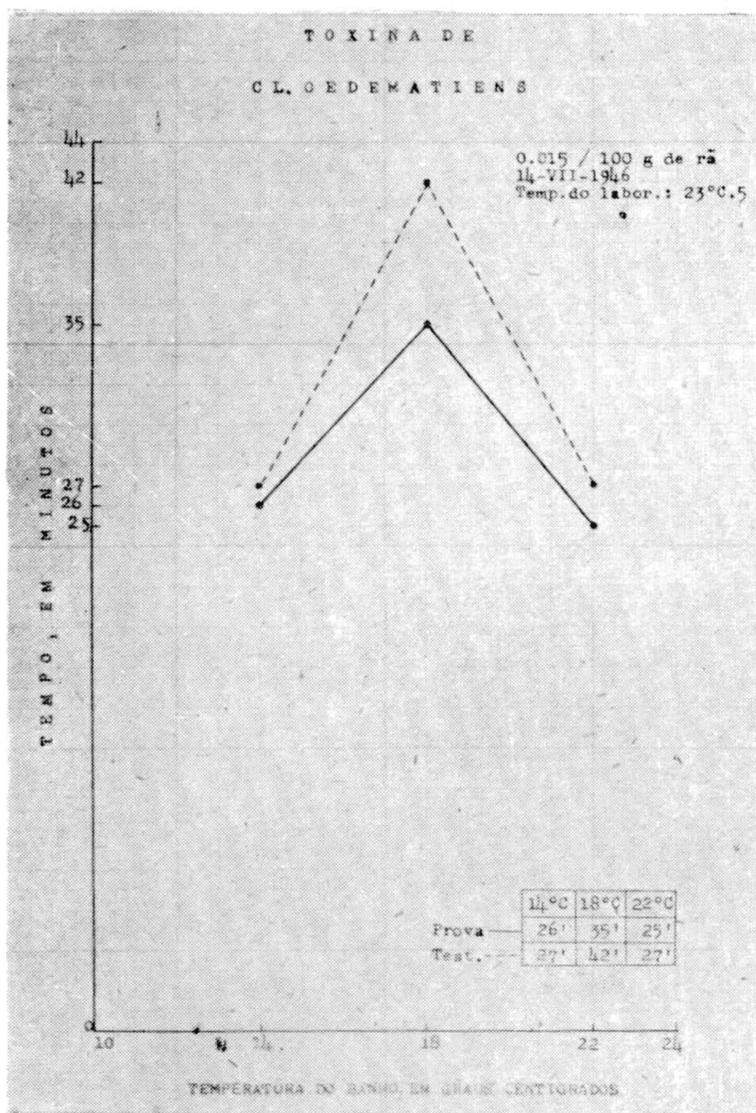


Gráfico 9

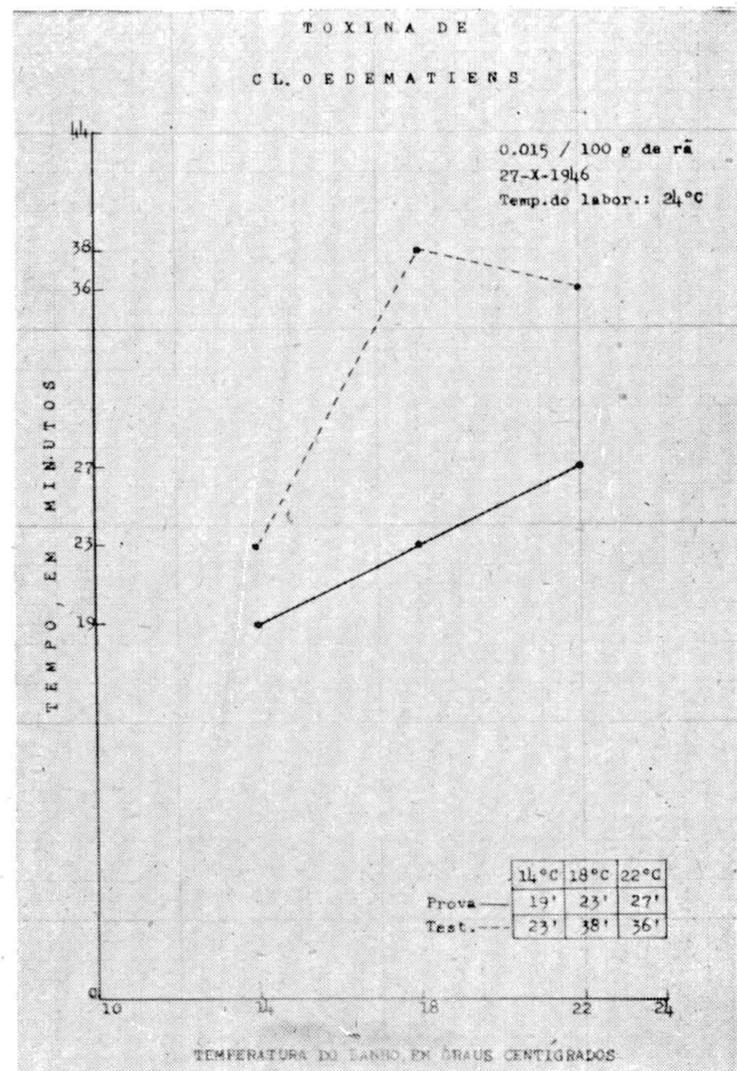


Gráfico 10

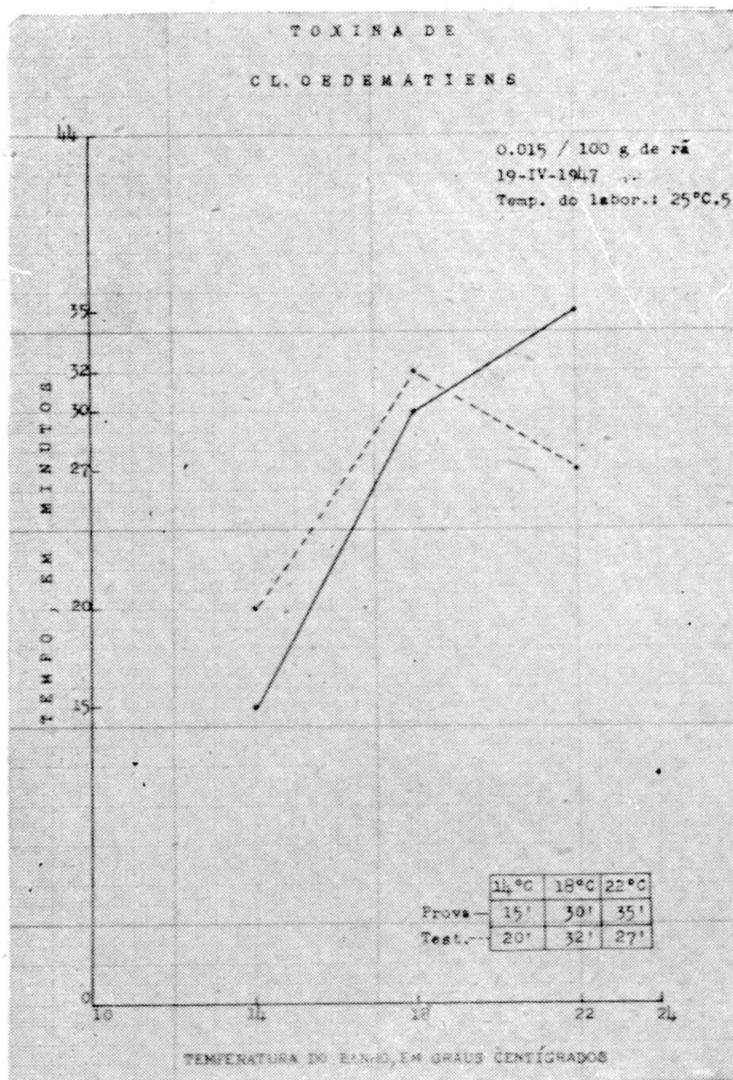


Gráfico 11

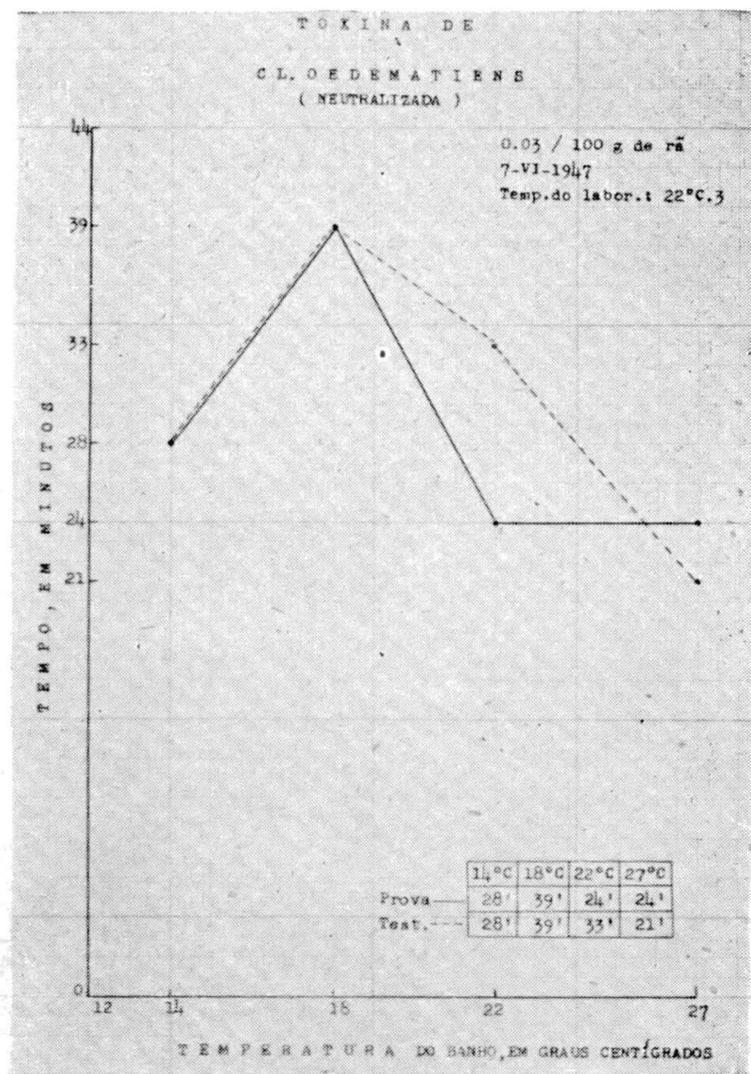


Gráfico 12

13 — Neutralização dos efeitos tóxicos.

14 — Dose insuficiente; coincidência dos tempos de duração dos reflexos. Prova feita no inverno.

15 — Resultado obtido com a mesma dose de toxina, no verão.

16 — Dose suficiente; resultados regulares.

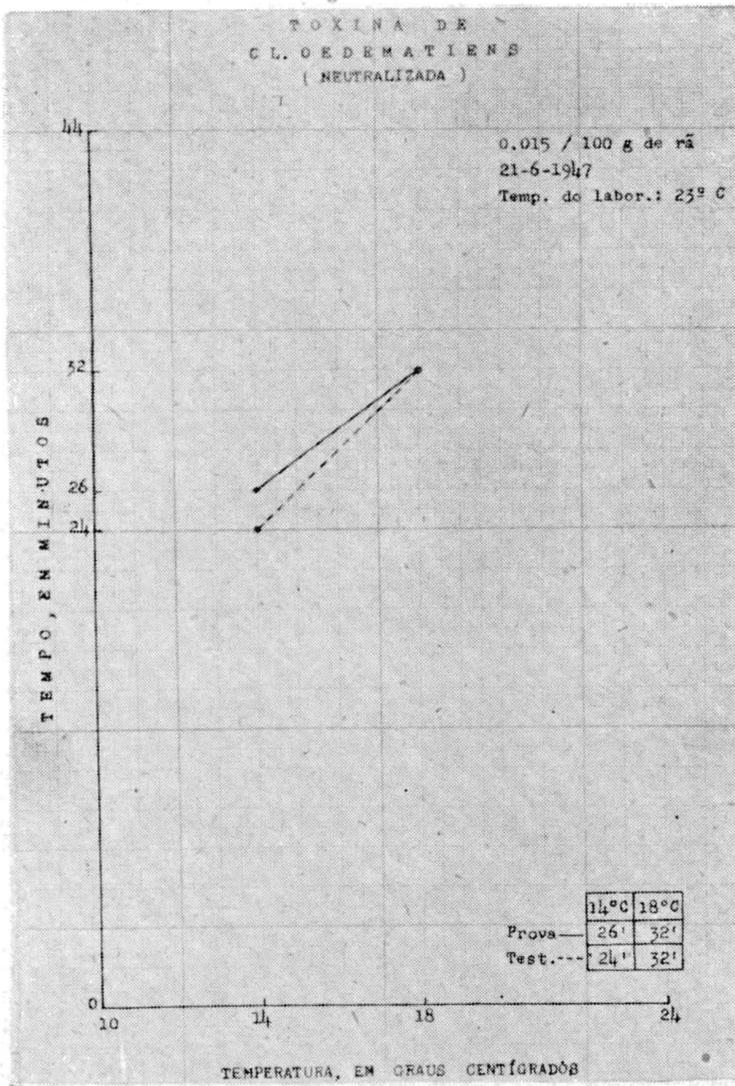


Gráfico 13

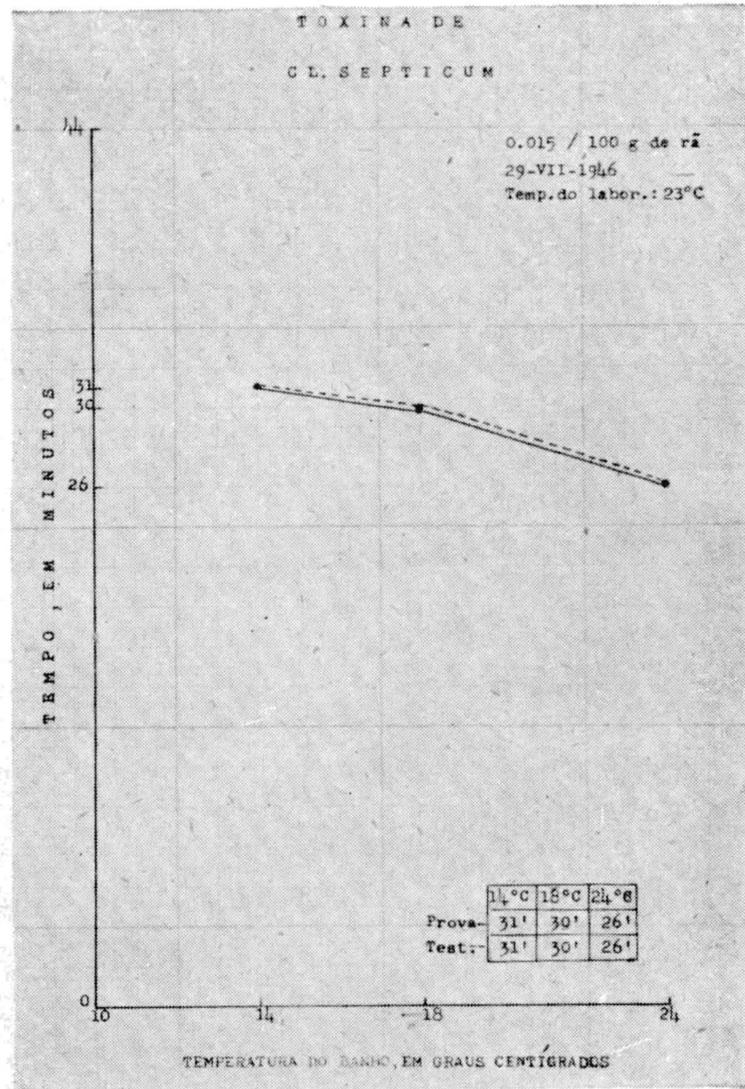


Gráfico 14

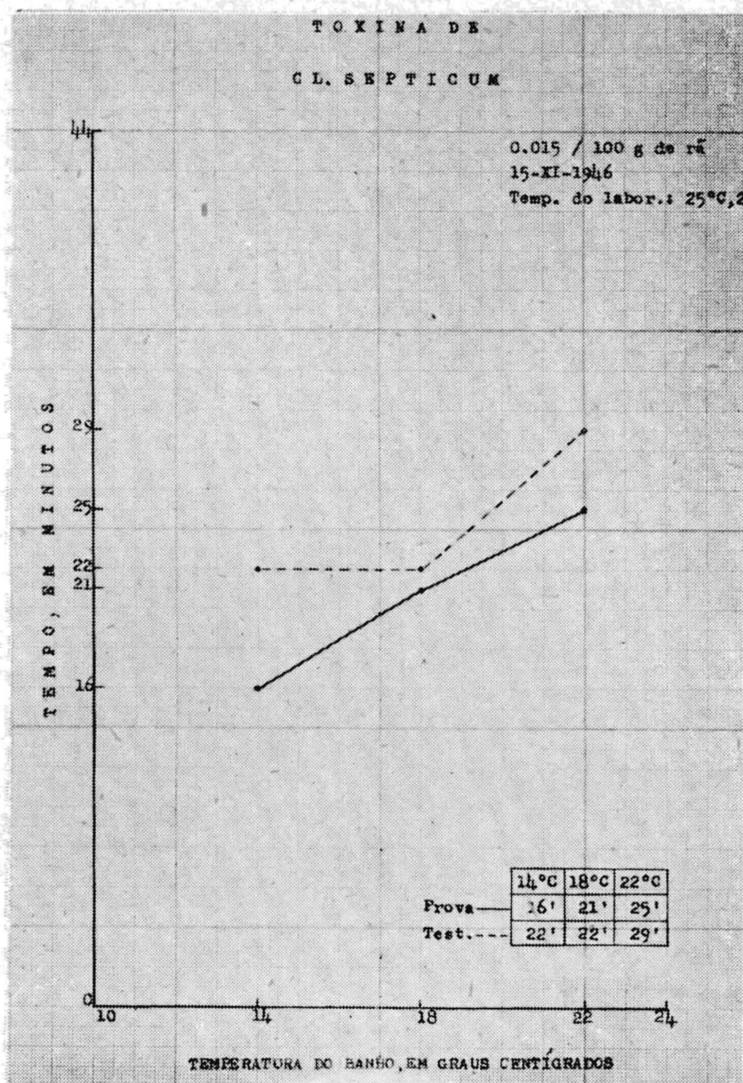


Gráfico 15

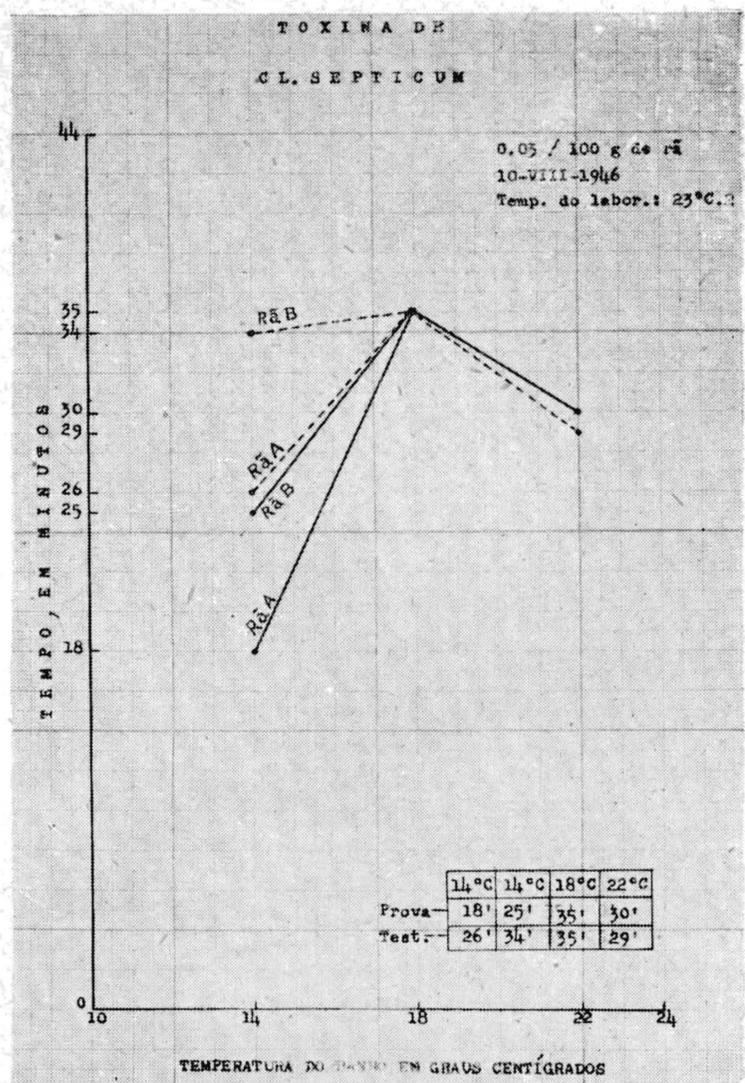


Gráfico 16

17 — Dose suficiente; resultados regulares.

18 — Neutralização dos efeitos tóxicos.

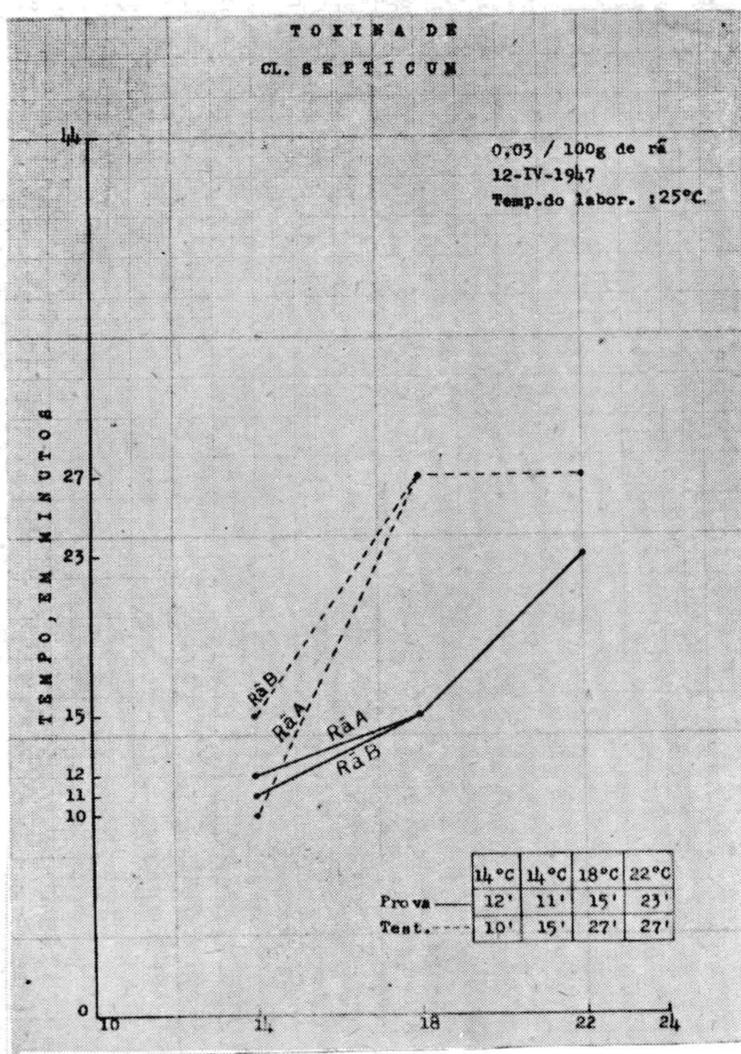


Gráfico 17

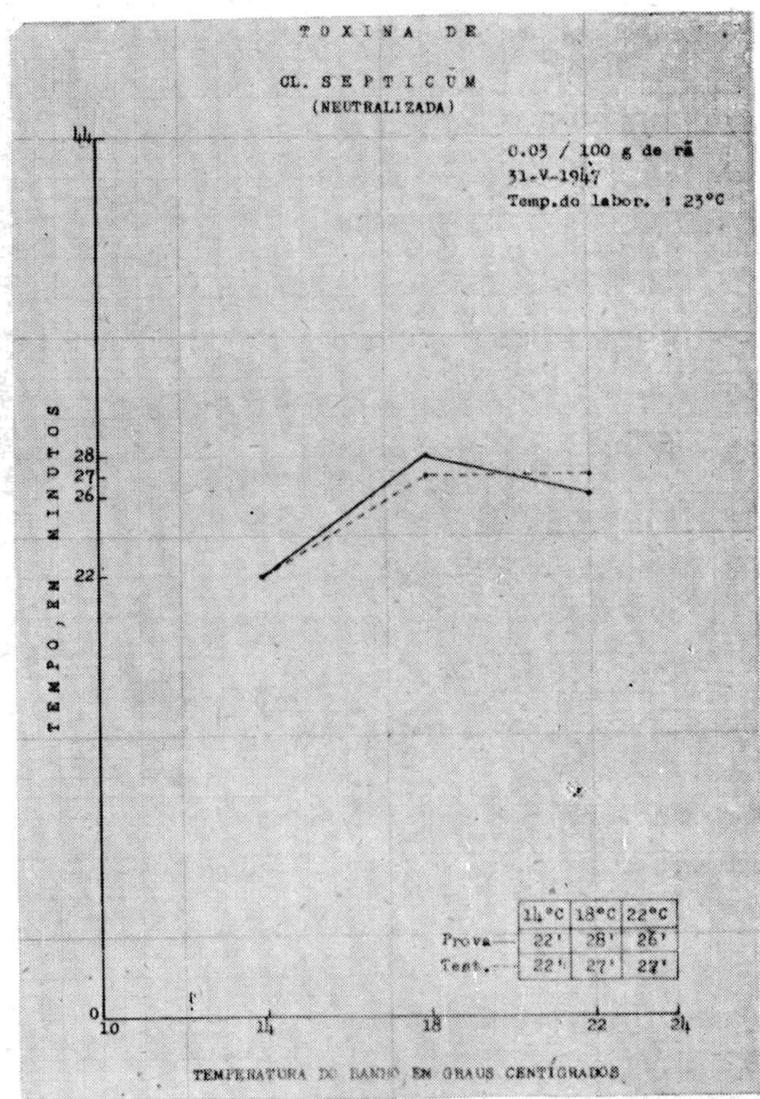


Gráfico 18