

Pesquisas sobre a acção physiologica das toxinas bacterianas *

I — Sobre a actividade physiologica dos filtrados de culturas do bacillo coli. Reacções do intestino isolado e perfundido.

por

Antonio Augusto Xavier e Genesio Pacheco

(Com 11 figuras no texto)

Experiencias bastante antigas de Gilbert (1893) mostraram a existencia de substancias toxicas soluveis nas culturas do bacillo coli. O caldo de cultura filtrado em vela Chamberland e injectado por via intravenosa em coelhos, em quantidades consideraveis, determina um conjunto de symptomas, uns nervosos ou neuro-musculares, outros intestinaes, por elle minuciosamente estudados e descriptos.

Em época menos remota estes estudos fôram retomados por Vincent (1925) que procurou fundamentar a existencia de duas toxinas diferentes nas culturas do bacillo coli, — uma toxina *neurotropica* e uma toxina *enterotropica*.

As pesquisas de Vincent consistiram principalmente em a analyse dos symptomas consequentes á injectão dos filtrados de culturas do bacillo coli nos animaes de laboratorio, e no exame das lesões *post-mortem*, porventura presentes. Segundo Vincent, symptomas e lesões são condicionadas por duas toxinas distinctas: 1) uma *exotoxina* occorrendo de preferencia nas culturas jovens de 23 horas a 5 dias e actuando de maneira electiva sobre o systema nervoso central, — por isso definida como uma *toxina neurotropica*. 2) uma *endotoxina*, obtida mais facilmente de culturas velhas de 15 a 20 dias, alcalinas, de pH acima de 10, favoravel, por conseguinte, á lyse microbiana. Essa é uma *toxina enterotropica*, exercendo acção particularmente nociva sobre a parede do estomago e principalmente sobre o intestino delgado.

Não discutiremos neste trabalho a possivel existencia destas substancias toxicas nas culturas do bacillo coli, bem assim sua caracterisação como verdadeiras toxinas microbianas. Nada obstante, dada a ele-

* Recebido para publicação a 23 de Novembro de 1937 e dado á publicidade em Junho de 1938.

clividade, assignalada por Vincent, de uma substancia toxica obtida das culturas de 15 a 20 dias para a parede do intestino, pareceu-nos merecer interesse experimentar os filtrados de culturas do bacillo coli, respectivamente de 48 horas e de 20 dias, numa preparação de intestino isolado e perfundido.

PREPARO DOS FILTRADOS

Preparavamos os filtrados semeando em caldo simples¹ as amostras de bacillo coli previamente seleccionadas, deixando-as depois vegetar durante 18 a 20 dias em estufa a 37° C.: as culturas eram então filtradas em disco Seitz EK, e o producto da filtração, uma vez verificada sua esterilidade, distribuido em tubos de ensaio, protegido com uma camada de vaselina esterilizada, e mantido em baixa temperatura e ao abrigo da luz. Em algumas experiencias, ao envez de filtradas, eram as culturas submetidas á centrifugação durante 1/2 hora, a 3.000 voltas por minuto.

Todas as amostras utilizadas houveram-se como bacillos coli fecaes typicos. Daremos aqui as caracteristicas bacteriologicas de duas dellas, as amostras 267 e 295 de nossa colleção. A amostra 267 foi por nós isolada em Fevereiro de 1937 de fezes humanas. Trata-se de um germe movel, fermentando, com producção de gazes, glycose, lactose, mannita e maltose, e não fermentando a saccharose; coagulando rapidamente o leite; produzindo indol, Vm + e Vp —; não liquefazendo a gelatina. A amostra 295, original de Escherich, está catalogada desde 1920 sob o n.º 86, na N. C. T. C. do Lister Institute of Preventive Medicine. Essa amostra conserva os seus caractéres quer quanto á mobilidade, quer no que concerne á fermentação de açucares, producção de indol, etc.

Ambas as amostras são toxicas, a amostra 267, entretanto, mostrando-se bem mais toxica do que a amostra 295. (d.l.m. camondongo = 0.1 cc. para o filtrado do caldo de cultura da amostra 267; > 0.3 cc. para o filtrado do caldo de cultura da amostra 295).

ENSAIO DOS FILTRADOS NA PREPARAÇÃO DE INTESTINO ISOLADO E PERFUNDIDO.

Nestas experiencias utilisámos uma preparação de intestino delgado de coelho, segundo o methodo de Cohnheim-Magnus, modificado por Lohmann (1912). Coelhos normaes, de ambos os sexos, ca. 2 kgs. de peso, eram sacrificados no momento da experiencia. Immediatamente após a morte, a cavidade abdominal era aberta largamente, e das primeiras porções do intestino delgado, excisada uma alça de cerca de 20 cm's., logo immersa em liquido de Ringer-Tyrode da composição seguinte (para 1.000 cc. de agua-bidistillada): NaCl 8.0 grs; KCl 0.2 grs.; CaCl₂ 0.2 grs.; MgCl₂ 0.1 gr.; NaHCO₃ 1.0 gr.; NaH₂PO₄ 0.05 grs.; Dextrose 1.0 gr. Os saes eram todos de procedencia Kahlbaum, *pro-analysi*. As soluções de reserva, feitas em concentração conveniente, eram guar-

¹ A principio as sementeiras eram feitas tambem em caldo-figado. Logo aos primeiros ensaios, porém, tivemos de abandonar esse meio de cultura, passando a utilizar exclusivamente o caldo simples, pelo motivo que adiante referiremos.

dadas em frascos separados, de vidro neutro. Desse modo pôde-se ter sempre uma solução perfusora recentemente preparada, o que é de extrema importância para o bom exito das experiencias.

Um segmento de intestino de 3 a 4 cms. de comprimento era então suspenso em solução de Ringer-Tyrode convenientemente oxygenada e mantida em temperatura constante (38-40° C) durante todo o tempo das experiencias.

Nossas experiencias eram feitas de preferencia á temperatura de 40° C. É essa na realidade a temperatura da cavidade abdominal do coelho, o que se pôde verificar facilmente fazendo uma pequena casa na parede abdominal do animal e ahi inserindo um thermometro. Isto pôde ser feito no animal vivo, ou immediatamente após a morte.

Em algumas experiencias utilisámos segmentos do jejuno-ileo e mesmo das porções do ileo juxta-cecal. Ainda de outras vezes aproveitámos porções do intestino grosso, segmento continuando imediatamente o cego. Sem entrarmos em a analyse minuciosa destas experiencias, convem resaltar desde logo a differença entre o modo de comportar-se das porções visinhas do duodeno e aquellas proximas do cego. Como é sabido, nas primeiras prevalecem os chamados movimentos pendulares; nas ultimas porções do delgado, predominam as contracções peristalticas.

Em geral, uma só preparação servia a varios ensaios, renovando-se cada vez a solução de Ringer-Tyrode, depois de realisada a experiencia, por meio de um frasco de reserva no qual o liquido de Ringer-Tyrode era mantido tambem em temperatura constante (40° C). De outras vezes, a preparação servia a um unico ensaio, reinstallando-se um novo segmento de intestino a cada nova experiencia. Para isso, um segmento de intestino, logo depois de retirado do animal, era immerso em liquido de Ringer-Tyrode e posto no frigorifico, para ser utilizado numa série de experiencias, num periodo de 4 a 6 horas. Em cada ensaio, o filtrado de cultura era adicionado á solução de Ringer-Tyrode na qual já estava immersa a preparação. Os resultados eram registrados por meio de uma alavanca inscriptora num cylindro enfumaçado deslocando-se lentamente. A alavanca estava aparelhada para a inscripção frontal e ampliava os movimentos do segmento de intestino na relação de 1/5. O tempo era marcado em intervallos de 10 segundos utilizando-se um dispositivo descripto por um de nós em trabalho anterior (Xavier, 1931). Os traçados comprehendem as seguintes curvas (de cima para baixo).

- 1) — Traçado dos movimentos rhythmicos do intestino isolado e suspenso em solução de Ringer-Tyrode á temperatura de 38-40° C.
- 2) — Abscissa inscripta 1 cm. abaixo do traçado das contracções rhythmicas do segmento de intestino, indicando o tonus de posição do preparado no inicio das experiencias.
- 3) — Traçado do tempo, inscripto em intervallos de 10 segundos.

RESULTADOS

Discriminam-se na preparação de intestino isolado e suspenso em solução de Ringer-Tyrode oxygenada e mantida em temperatura conveniente (38-40° C), duas funcções distinctas: uma funcção tonica, con-

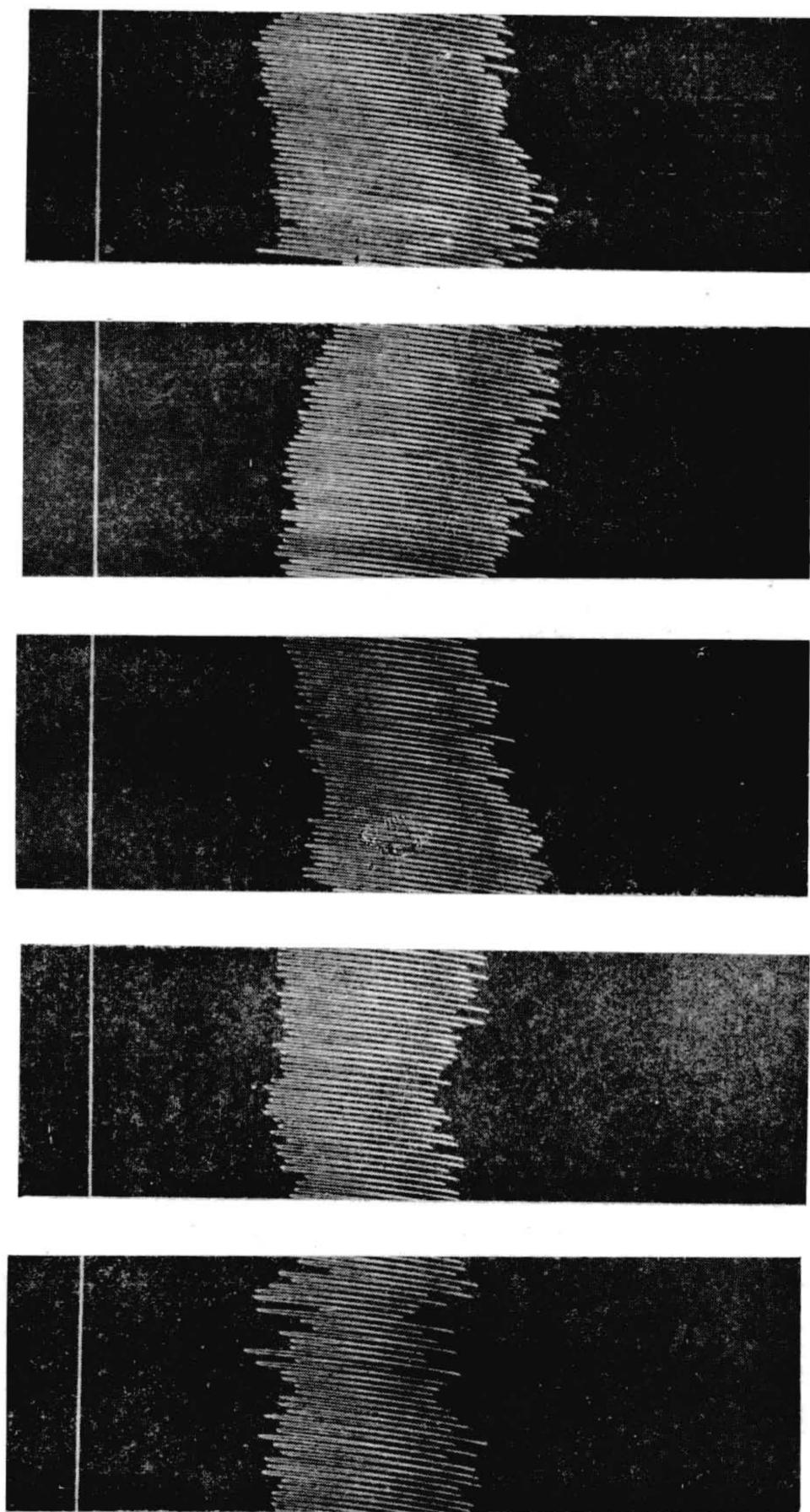


Fig. 1 — Intestino delgado de coelho, isolado e suspenso em solução de Ringer-Tyrode. Contrações rítmicas do intestino. Traçados tomados de 5 em 5 minutos, por espaço de meia hora. 1 cm. da abscissa = 1 minuto.

dicionando um tonus de posição do preparado e uma função automatica, caracterisando-se por uma actividade rhythmica. As contracções peristalticas tem aqui menor importancia e podem apenas ser apreciadas, principalmente — e é justamente o caso de nossas experiencias — quando se utilizam as porções do intestino delgado visinhas do pyloro, isto é, da sua porção ou segmento proximal. Nestas condições de temperatura e de oxygenação do liquido de Ringer-Tyrode a preparação do intestino delgado contrahe-se sempre com rhythmmo equal (18 a 20 oscillações phasicas por minuto), sendo as contracções, em geral, inscriptas no cylindro enfumaçado com uma amplitude de 2 a 3 cms. (Fig. 1).

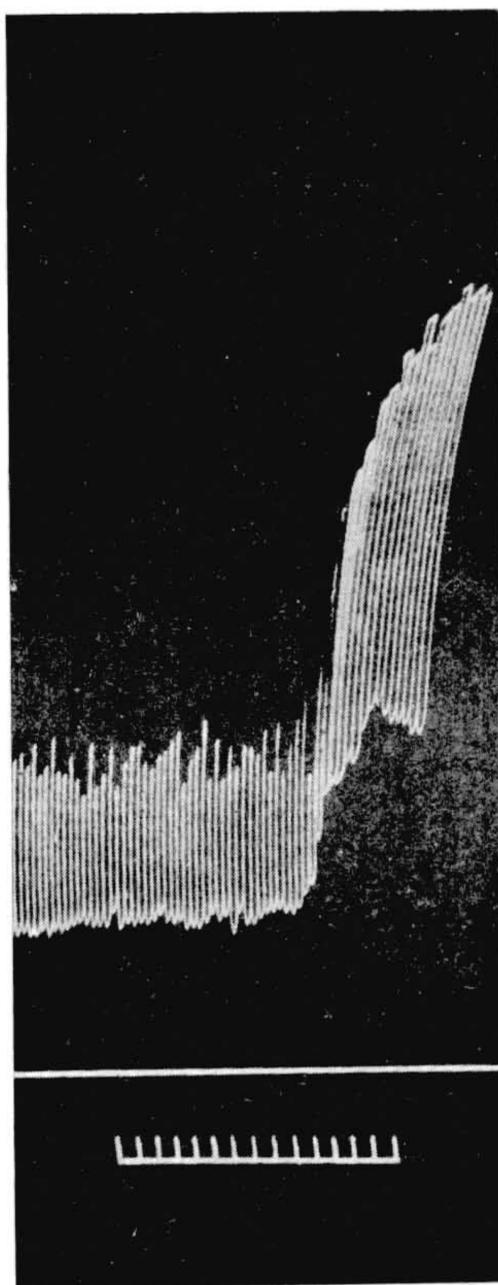


Fig. 2—1 cc. de mistura de filtrados (culturas de varias amostras de bacillo coli). Tempo marcado em intervallos de 10 segundos.

Neste trabalho referiremos tão sómente os resultados das pesquisas realisadas com os filtrados de culturas antigas de 18 a 20 dias.

Numa primeira série de experiencias utilisámos uma mistura de filtrados de culturas de varias amostras de bacillo coli. Posteriormente usámos os filtrados obtidos de culturas de uma unica amostra coli (amostras 267 e 295). Os resultados, num e noutro caso são identicos. (Fig. 2).

Nestes primeiros ensaios os filtrados fôram empregados em concentrações bastante elevadas, 0.5 cc. a 1 cc. para 39 cc. de solução de Ringer-Tyrode.

Addicionando o filtrado de cultura do bacillo coli ao liquido de Ringer-Tyrode no qual está immersa a preparação, observa-se um aumento subitaneo e consideravel do tonus, essa condição persistindo durante alguns minutos, e desaparecendo imediatamente, desde que se substitua o liquido de Ringer-Tyrode, adicionando de filtrado, por uma solução de Ringer-Tyrode fresca. As oscillações phasicas persistem, e

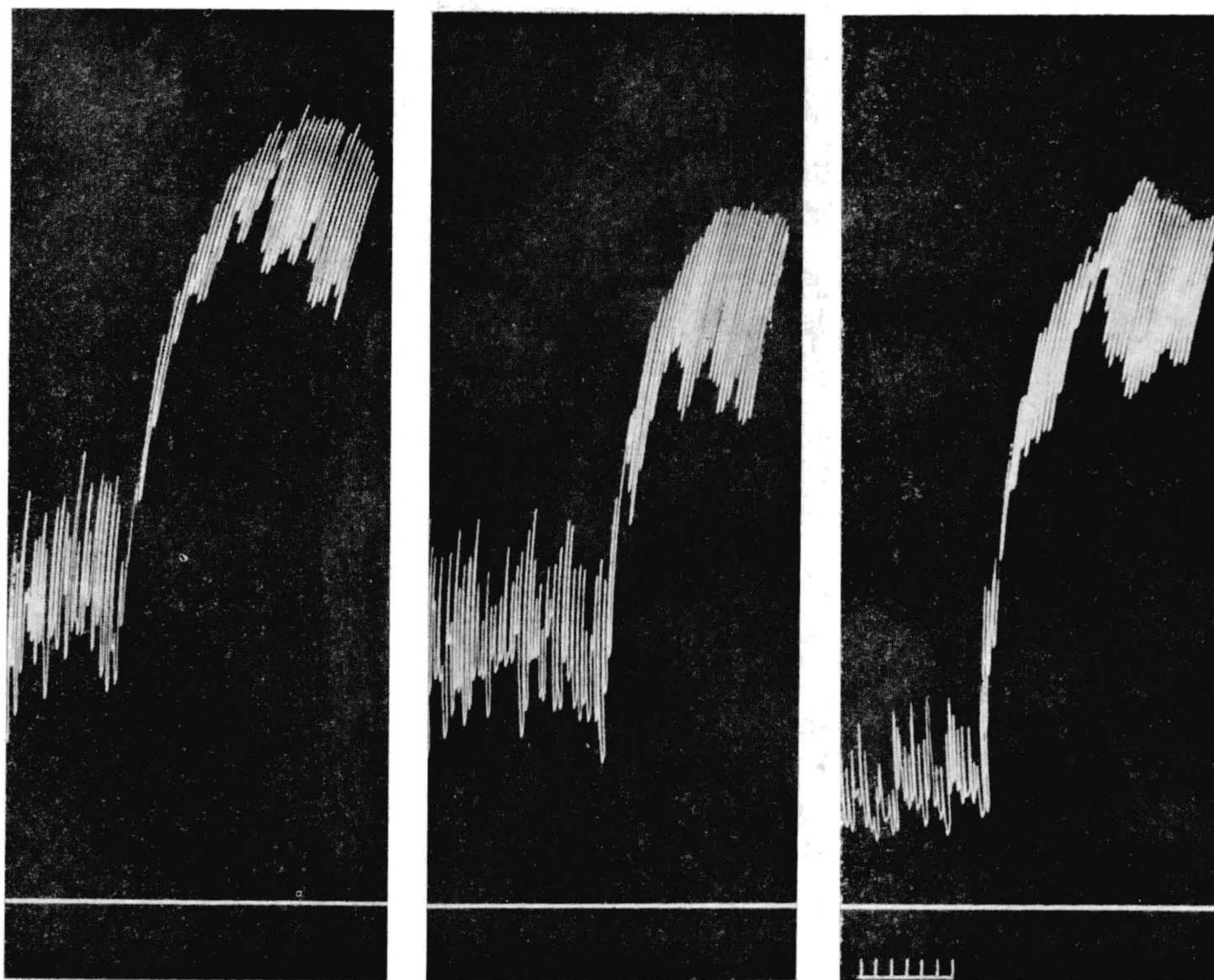


Fig. 3 — Traçados typicos obtidos com filtrado de cultura da amostra 295. Consideravel elevação do tonus. Augmento da amplitude das oscillações phasicas. Os tres traçados foram tomados com intervallos de 5 minutos.

A substituição do banho de Ringer-Tyrode + filtrado, por um liquido de R. T. fresco deixa o preparado em condição de reagir a uma nova dose de filtrado. Tempo = 1 minuto.

sua amplitude augmenta em geral ao dobro de seu valor, observado antes da addição do filtrado de cultura do bacillo coli ao banho de perfusão. Não se notam, em geral, alterações do rhythmmo, aceleração ou retardamento das oscillações phasicas por minuto. (Fig. 3).

A addição de caldo simples ao liquido perfusor não determina reacções da preparação no sentido de um exaggero do tonus do segmento de intestino, antes se verifica uma leve diminuição do tonus, ou mesmo

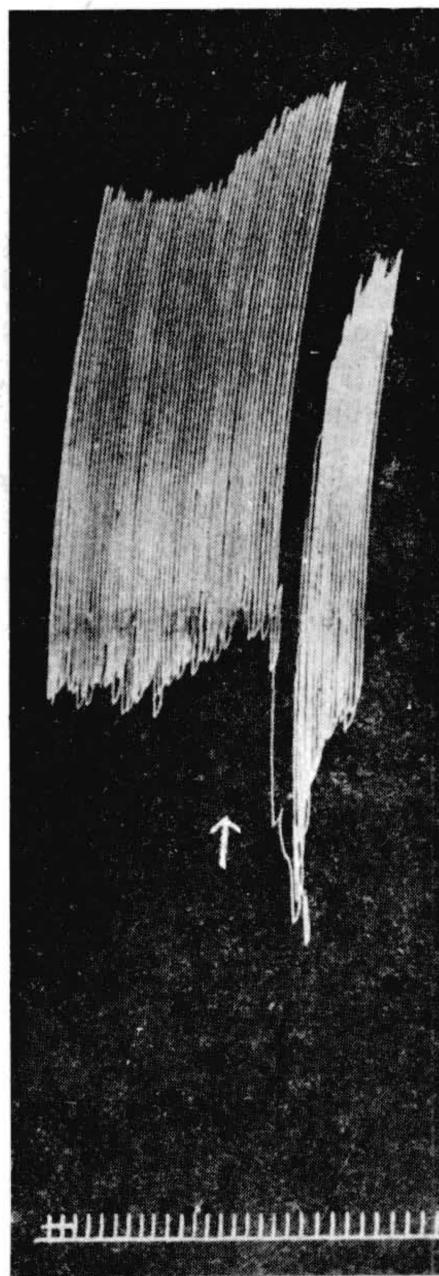


Fig. 4 — 1 cc. de caldo simples. Inibição. Diminuição marcada do tonus. Tempo inscripto em intervallos de 10 segundos.

uma ligeira excitação do mechanismo de inibição. (Fig. 4). Si o caldo simples se mostra inactivo sobre a funcção tonica, já o mesmo não acontece ao meio caldo-figado. A addição desse meio de cultura ao banho perfusor determina uma reacção analoga áquella observada com o filtrado

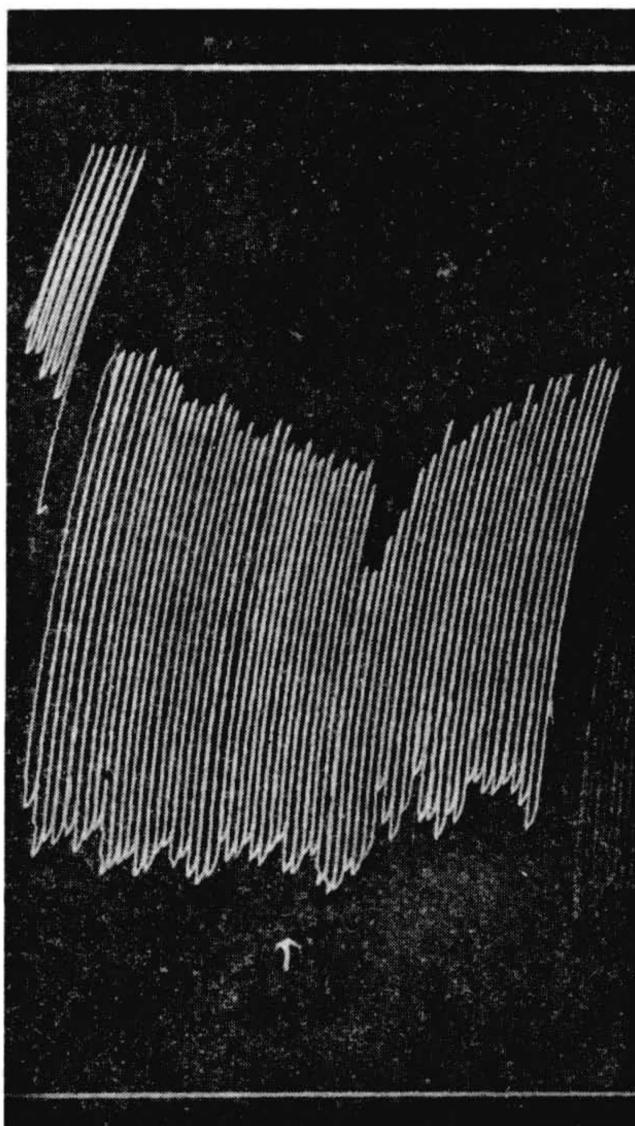


Fig. 5 — 1 cc. de caldo-figado. Ligeiro augmento do tonus. Leve e fugaz diminuição na amplitude das oscillações phasicas. 1 cm. da abscissa = 1 minuto.

coli, si bem, muito menos energica. (Fig. 5). Por isso mesmo, como já acima ficou accentuado, desde logo deixámos de cultivar o bacillo coli nesse meio de cultura.

CONCLUSÕES

- 1— O filtrado de culturas antigas do bacillo coli contem uma substancia, ou substancias, dotadas de actividade physiologica sobre o intestino isolado e perfundido.
- 2— Esta actividade se caracteriza principalmente por um augmento subitaneo e consideravel do tonus da preparação, com persistencia das oscillações phasicas.
- 3— A reacção do segmento de intestino é sempre reversivel, o augmento do tonus desaparecendo desde que se substitue o liquido de Ringer-Tyrode contendo o filtrado, por um Ringer-Tyrode novo.

- 4—O caldo de cultura preparado com figado ao envez de carne (caldo-figado) contem uma substancia comportando-se analogamente, si bem de modo muito menos energico, ao filtrado de cultura do bacillo coli, no que respeita á sua acção physiologica sobre o intestino isolado e perfundido.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The writers report experiments performed with filtrates of old cultures of colon bacilli upon the isolated and perfused rabbit gut. According to the experiments the writers suppose to exist one or more substances in the filtrates of old cultures of colon bacilli with physiological activity upon the isolated and perfused rabbit gut. Such activity is essentially characterised by a rapid increase of the intestine tonus. When the Ringer-Tyrode solution containing the filtrate is removed and replaced by a fresh one, the increase of the tonus disappears. Liver-broth medium causes a somewhat increase of the tonus of the gut but much less in intensity.

REFERENCIAS

GILBERT, A.

1893. C. r. Soc. Biol., **45** : 214.

LOHMANN, A.

1912. Zeitschr. f. biol. Technik u. Methodik, **2** : 272.

VINCENT, H.

1925. C. r. Ac. Sc., **180** : 1624.

XAVIER, A. A.

1931. C. r. Soc. Biol., **107** : 179.
