

ESTUDO EXPERIMENTAL DE ALGUMAS SUBSTÂNCIAS ANTITÓXICAS

Efeito contra a intoxicação pelo Tetracloreto de Carbono

LÚCIO PENNA DE CARVALHO LIMA

DIETER KOCH-WESER

As primeiras referências a extratos hepáticos com propriedades antitóxicas datam de 1926 e são devidas ao japonês Sato¹. Este autor atribuiu à substância extraída do fígado, uma natureza hormonal e deu-lhe o nome de "Yakriton".

Em 1926, Forbes e Neale², com técnica diversa, prepararam um extrato de fígado diferente do obtido por Sato, e que, segundo os autores, protegia, experimentalmente, ratos contra intoxicações por clorofórmio e tetracloreto de carbono. Mais tarde, Forbes, Neale e Scherer³, modificaram a técnica original de preparação e em 1937, Forbes e McConnell⁴, conseguiram cristalizar o produto.

Em 1938, Neale e Winter⁵, purificaram e identificaram a substância cristalizada ativa do extrato, como sendo a xantina-sódio. Verificaram, outrossim, que além da xantina-sódio, outras substâncias, como o ácido nucleico, a guanosina, a guanidina e a hipoxantina, exerciam, também, ação protetora.

Ainda em 1938, Barrett, McLean e McHenry⁶, demonstraram que a fração anti-necrótica de Forbes, Neale e Scherer, assim como a xantina-sódio, eram eficientes na proteção do fígado contra a intoxicação pelo tetracloreto de carbono.

Fitzhugh⁷, confirmou esses resultados quanto às intoxicações moderadas pelo tetracloreto de carbono; administrando-se altas

Trabalho apresentado à Seção Científica do Instituto Adolfo Lutz de 14 de setembro de 1943.

doses de tóxico, não havia alteração da letalidade nos animais de experiência. A dose de xantina empregada na proteção era de 100 mgrs. por 100 grs. de pêso do animal.

Forbes⁸ em 1939, mostrou o efeito benéfico da xantina-sódio ou preparações hepáticas que a contivessem, em casos de cirrose hepática experimentalmente produzida pelo tetracloreto de carbono; a dose eficiente de xantina-sódio, neste caso, era também de 100 mgrs. por 100 grs. de pêso.

Vars, Ravdin e Goldschmidt⁹, demonstraram que outras substâncias, como o ricinoleato de sódio, que produzem, quando injetadas sub-cutâneamente, a formação de um abscesso, teem boa ação protetora. Admitem êles que essa ação se deva a produtos de cisão das proteínas que aparecem no fígado em virtude de um catabolismo proteico aumentado pela presença de um abscesso.

Entre nós, quem tem estudado o assunto com mais detalhe é Gilberto Villela, do Rio de Janeiro. Num primeiro trabalho, Villela¹⁰ demonstrou a eficiência do extrato de Forbes contra as intoxicações pelo tetracloreto de carbono e pelos arsenicais; além disso, introduziu algumas modificações na técnica de preparação do extrato.

Noutro trabalho¹¹, admite êle que existam vários tipos de frações hepáticas protetoras e que, quanto mais purificado o produto, tanto menor a ação que exercerá; isto porque, pelo processo de purificação, seriam eliminadas várias substâncias que agem sinèrgicamente no sentido de reforçar a ação antitóxica. A essas substâncias, êle dá o nome de "fatores acessórios". Baseando-se nessas idéias, preparou um extrato que contendo todos os fatores, teria eficiência máxima.

Ainda em outra publicação¹², Villela mostra que extratos isentos de xantina ou substâncias pigmentares podem ser bastante ativas.

Dada a grande quantidade de produtos antitóxicos existentes no comércio e o largo emprêgo que êles teem entre nós, procuramos no presente trabalho, verificar a eficiência de alguns. Usamos igualmente, um extrato preparado segundo a técnica de Forbes e Neale e, também o xantinato de sódio (xantina-sódio) em diferentes doses.

PARTE EXPERIMENTAL

MÉTODOS EMPREGADOS

Na maioria dos trabalhos sôbre o assunto, o efeito antitóxico do produto em estudo é avaliado pela capacidade de impedir a morte em animais experimentalmente intoxicados. Nas nossas experiências, o critério seguido foi o inicialmente proposto por Forbes e Neale²: o julgamento do efeito antitóxico é feito pelo exame anátomo patológico do fígado dos animais empregados.

O tóxico utilizado por nós foi o tetracloreto de carbono comercial destilado, aproveitando-se apenas o que passava entre 76 e 78° C., despresando-se todo o resto.

Os animais empregados foram ratos albinos, adultos, pesando em geral, entre 220 e 300 grs. Sua alimentação consistia em: pão, milho, verduras, batata, cenoura, leite, farinha de ossos e farinha de carne.

Nosso primeiro cuidado, foi determinar a dose de tetracloreto de carbono que pudesse ser empregada sem matar os animais de experiência. Para isso usamos um lote de 56 ratos albinos, adultos. Esses ratos foram divididos em sete grupos de oito ratos cada um. Aos animais de cada grupo, foram administradas doses crescentes de tetracloreto de carbono, de acôrdo com o quadro seguinte:

Grupo	N.º de ratos	Dose de tetracloreto por 100 grs. de pêso	N.º de ratos mortos
I	8	0,1 cc.	0
II	8	0,2 cc.	0
III	8	0,4 cc.	1
IV	8	0,6 cc.	4
V	8	0,8 cc.	4
VI	8	1,0 cc.	8
VII	8	1,2 cc.	8

Desta maneira, tomamos com sub-letal, a dose de 0,2 cc. de tetracloreto de carbono por 100 grs. de pêso de rato. É interessante lembrar que, neste ponto, os nossos resultados coincidem aproximadamente com os de Cameron e Karunaratne¹⁸; já Forbes, Neale e Scherer³, acharam necessário administrar pelo menos 1 cc. de tetracloreto de carbono por 100 grs. de pêso, afim de conseguir lesão do fígado. Essa diferença de resultados talvez possa ser

explicada pela variação do teor em cálcio do sangue dos ratos empregados, como sugere Minot¹⁴.

Procuramos em seguida verificar, para esta dose de tóxico, qual seria o efeito no organismo do rato e quanto tempo após a sua administração o efeito seria máximo.

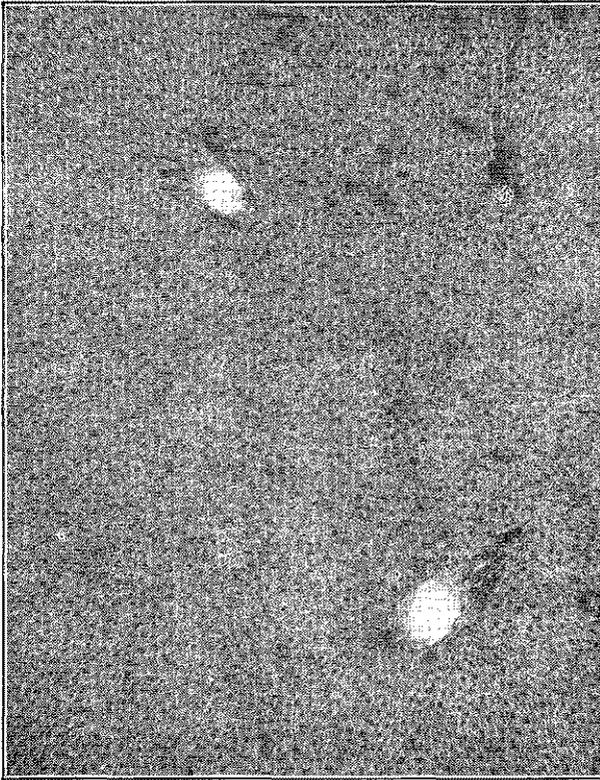
Para esse fim, empregamos um lote de 10 ratos do seguinte modo: 1 rato de controle, sem receber tóxico, foi sacrificado 24 horas depois do início da experiência; outro rato de controle, nas mesmas condições foi sacrificado 96 horas após. Os restantes 8 ratos receberam, simultaneamente, uma dose de 0,2 cc. de tetracloreto de carbono por 100 grs. de peso, sendo sacrificados respectivamente 24, 48, 72 e 96 horas após a administração do tóxico.

Pelos cortes histológicos feitos no fígado, coração, baço, rins e supra-renais, verificamos que alterações verdadeiramente típicas eram encontradas apenas nos cortes de fígado; conforme a intensidade do processo, as alterações consistiam essencialmente, desde ligeiros depósitos de gordura, até esteatose e degeneração hidrópica intensas do fígado, às vezes mesmo com início de necrose, de distribuição centro e médio lobular.

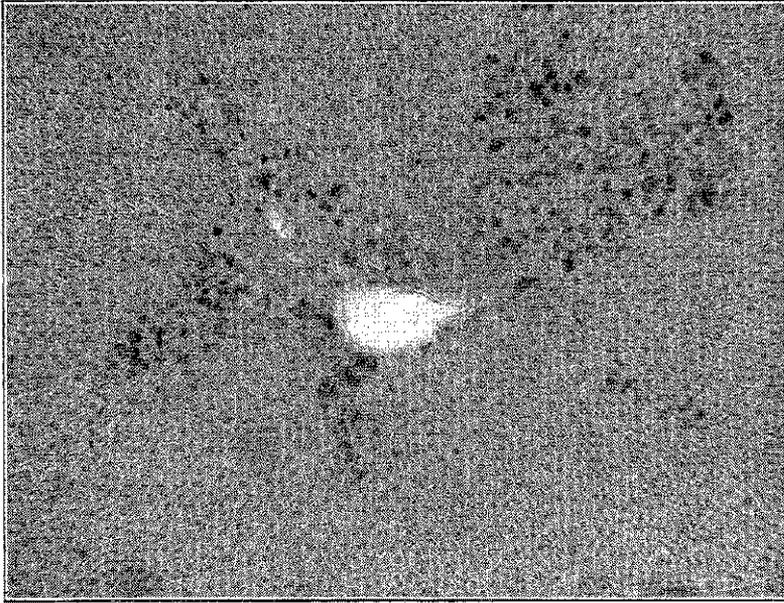
Além disso, verificamos que as lesões mais pronunciadas eram encontradas nos fígados dos ratos sacrificados 48 horas após a administração do tóxico. Nos ratos sacrificados antes e depois desse tempo, as lesões eram menos intensas, o que corresponde exatamente aos resultados obtidos por Cameron e Karunaratne¹³. Estes autores verificaram que para uma dose única de tóxico, o máximo de intoxicação se verifica após 48 horas; depois desse tempo, já tem início a regeneração do tecido hepático, sendo que depois de 7 dias, todo o tecido necrosado já foi removido.

Estabelecidos esses pontos, procedemos então às experiências com os vários produtos a nossa disposição e que chamaremos *A*, *B*, *C*, *D*, *E* e *F*. Os produtos *A*, *B* e *C* encontram-se no comércio; *D* é um extrato preparado segundo a técnica de Forbes e Neale² parcialmente purificado, sendo que 1 cc. do extrato corresponde a 60 grs. de fígado; *E* é uma solução de xantinato de sódio (xantina-sódio) e *F*, uma suspensão de xantinado de sódio.

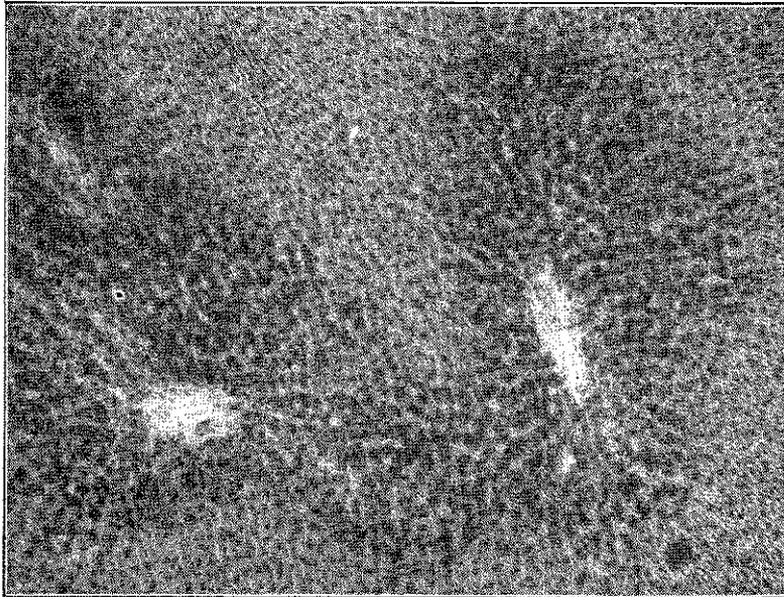
De maneira geral, o método seguido por nós, foi o de proteger os ratos, com esses produtos, durante certo espaço de tempo e injetar em seguida a dose já citada de tetracloreto de carbono; ao fim de 48 horas, os ratos eram sacrificados, sendo feitos cortes histológicos de seus fígados com coloração específica para gordura.



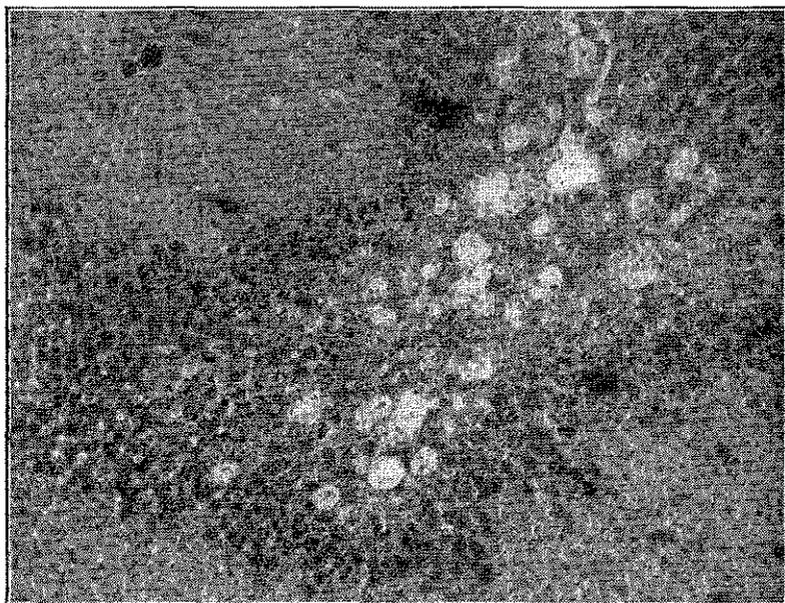
Aspécto de figado de rato normal.



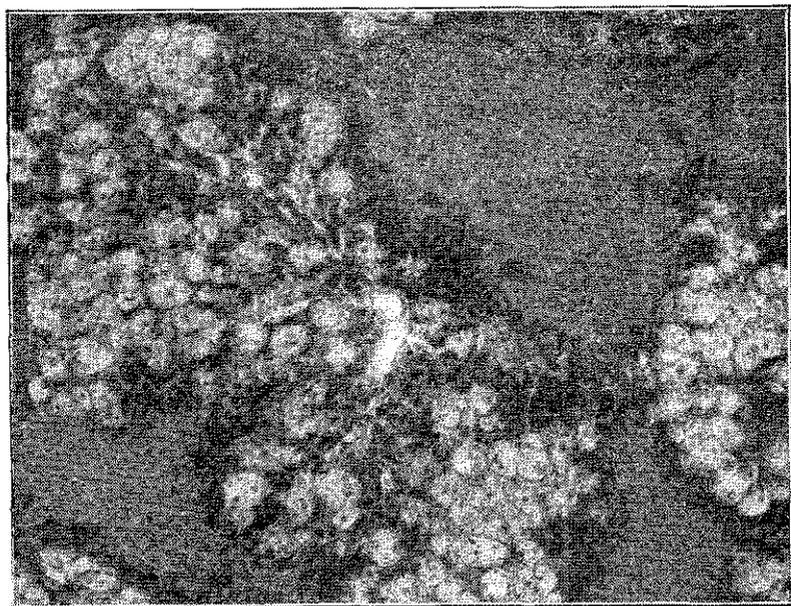
Fígado apresentando grau 1 de intoxicação.



Fígado apresentando grau 2 de intoxicação.



Fígado apresentando grau 3 de intoxicação.



Fígado apresentando grau 4 de intoxicação.

O quadro seguinte dá uma ideia mais detalhada do decurso da experiência:

N.º de ratos	Antitóxico	Dose por 100 grs. de peso	Dose de tetracloreto por 100 grs. de peso
5	—	—	—
5	—	—	0,2 cc.
5	A	4 cc.	0,2 cc.
5	B	4 cc.	0,2 cc.
5	C	4 cc.	0,2 cc.
5	D	4 cc.	0,2 cc.
5	E	16 mgrs.	0,2 cc.
5	F	100 mgrs.	0,2 cc.

Deve-se notar que a dose de antitóxico não era dada de uma só vez, e sim em quatro vezes, sendo uma por dia, durante quatro dias seguidos. No dia da última dose de substância protetora, administrava-se também a dose de tetracloreto de carbono. O primeiro grupo de ratos não recebeu injeção alguma e o segundo recebeu apenas a injeção de tóxico; estes ratos serviram para contróle. Os ratos foram todos sacrificados 48 horas após a administração do tóxico.

Para facilitar a interpretação dos resultados, procuramos dar-lhes feição quantitativa. O nosso critério foi o seguinte: comparando os vários cortes de fígado, agrupámo-los em 4 graus de intoxicação, conforme a extensão das lesões encontradas; em seguida, para cada corte, determinava-se esse grau; somavam-se depois esses valores para cada grupo, tirando-se a média. Assim, conseguíamos obter um número para exprimir a intensidade da intoxicação observada em cada grupo.

Os graus por nós considerados foram os seguintes:

- Grau 1: ligeiro depósito de gordura, sem outros sinais de alteração do fígado.
- Grau 2: quantidade maior de gordura, mas ainda sem outras alterações do fígado.
- Grau 3: quantidade grande de gordura, já com início evidente de degeneração hidrópica das células.
- Grau 4: esteatose e degeneração hidrópica intensas.

Aos fígados que se apresentavam com aspecto normal, atribuíamos o valor 0.

É evidente que para o caso dos ratos de contrôle não intoxicados, não podemos falar de grau de intoxicação; todavia, como em alguns desses ratos observamos certa quantidade de gordura no fígado, também aos animais desse grupo, atribuímos valores, da mesma forma que para os outros, afim de permitir uma comparação mais perfeita.

Não devemos nos esquecer, além de tudo, que os valores assim obtidos não são precisos. Teem apenas a vantagem de facilitar a comparação dos resultados. Para evitar erros de observação muito grandes, nada menos de 6 pessoas afeitas às observações anátomo-patológicas examinaram as preparações, dando-lhes valores de acôrdo com o quadro acima; deve-se notar que ao fazer essas observações, cada um desconhecia os valores dados pelos outros e também a que caso correspondiam as lâminas observadas.

RESULTADOS OBTIDOS

De acôrdo com o sistema já explicado, os resultados obtidos nas nossas experiências foram os seguintes:

Antitóxico	Grau
Contrôles não intoxicados	0,6
Contrôles intoxicados	3,3
A	2,6
B	2,4
C	2,5
D	1,9
E	2,7
F	0,7

Para esclarecer melhor êsses resultados, apresentamos o gráfico nº 1, onde além do resultado médio de cada grupo, estão também representados o menor e o maior grau obtido em cada um dos grupos.

Por êsses resultados, verificamos que mesmo os fígados normais dos contrôles não intoxicados, podem apresentar certa quantidade de gordura. Além disso, embora alguns fígados apresentassem grau 4 de intoxicação, a média global do grupo dos contrôles intoxicados não chegou a atingir êste valor. A intoxicação a que foram submetidos os ratos, não é, por tanto, intensa em demasia, o que, segundo Fitzhugh¹, favorece a ação dos antitóxicos. Por êsse motivo, as experiências que ora apresentamos foram realizadas em condições boas para que as substâncias empregadas tivessem o máximo de sua eficiência.

DISCUSSÃO

Tomando em consideração primeiramente os produtos comerciais A, B, e C, vemos que forneceram resultados praticamente idênticos. Verificamos desde logo, que embora tenham exercido certa ação protetora, esta foi relativamente pequena, permitindo

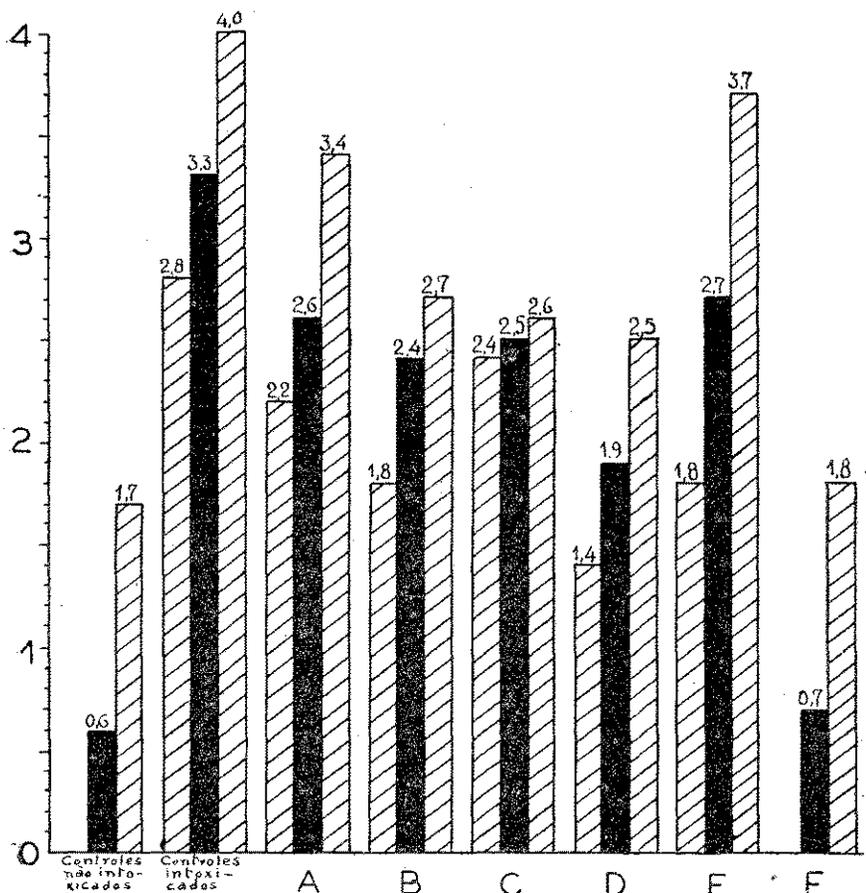


GRAFICO n.º 1 — As colunas cheias representam a média global do grupo; as colunas riscadas representam os valores extremos obtidos em cada grupo. NOTA: para o grupo dos controles não intoxicados e o grupo F, o valor mais baixo é 0, não havendo portanto uma coluna.

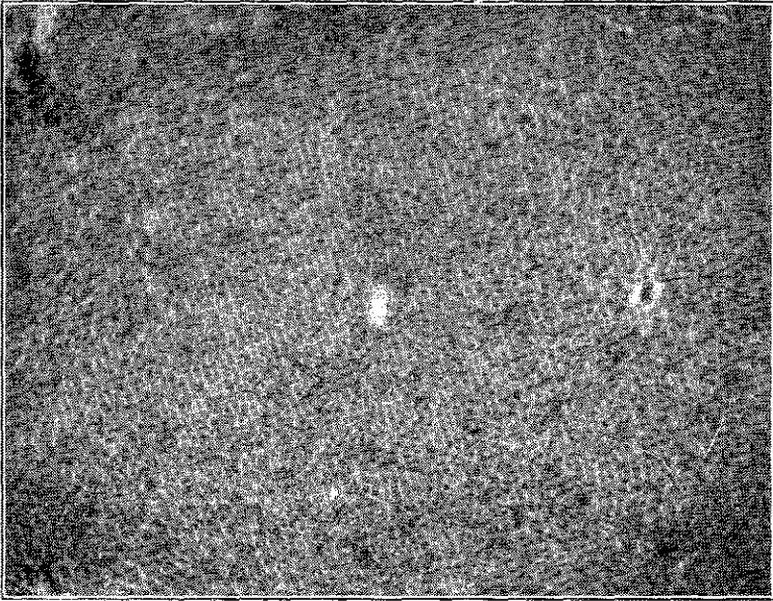
uma intoxicação bastante apreciável, revelada por uma quantidade grande de gordura nos fígados dos ratos de experiência. O valor das propriedades antitóxicas destes produtos ainda decresce de im-

portância, si considerarmos o fato de que os ratos por nós empregados eram animais em boas condições nutritivas, recebendo uma alimentação rica em hidratos de carbono, proteínas, vitaminas e cálcio, o que só por si confere capacidade para resistir melhor às intoxicações, como o demonstraram Davis e Whipple¹⁵, Messinger e Hawkins¹⁶, Miller e Whipple¹⁷, Miller, Ross e Whipple¹⁸ e vários outros autores. Além disso, a quantidade de tóxico usada foi, como já dissemos, relativamente moderada, não sendo mesmo suficiente para, de maneira geral, produzir uma degeneração hidrópica intensa nos ratos de contrôlo; apenas num animal conseguimos o grau 4 de intoxicação. Também não nos devemos esquecer que para obter êsse pequeno efeito protetor, foram necessários 4 cc. de extrato para cada 100 grs, de pêso do rato; em um homem adulto pesando 60 kgs., respeitadas as proporções, a quantidade necessária seria de 2.800 cc.. Verdade é que no homem, nunca se tem uma intoxicação tão intensa quanto à que se obtém experimentalmente, mas mesmo assim, a quantidade a ser empregada ainda deveria ser muito maior do que as habitualmente utilizadas na prática, para se obter finalmente, resultado pouco compensador.

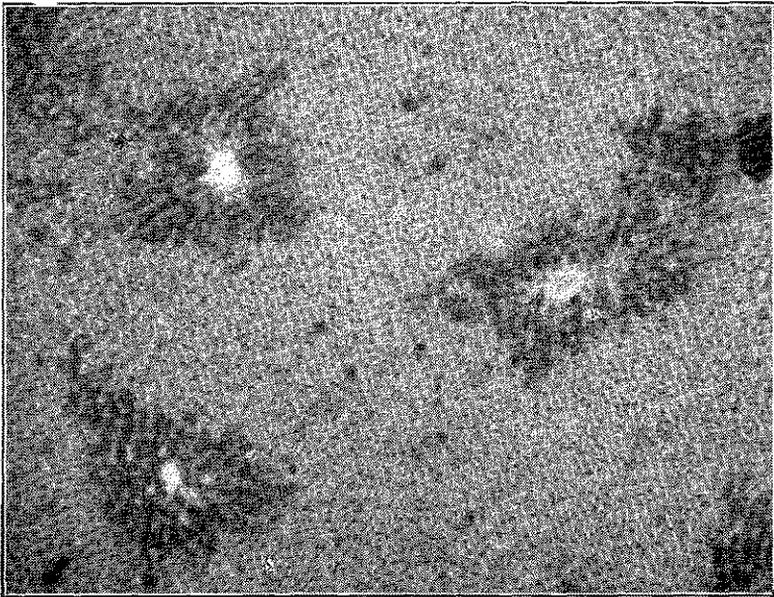
Com o produto *D*, que é o extrato preparado segundo a técnica de Forbes e Neale² (produto pouco purificado, injetado como suspensão, sendo que 1 cc. corresponde a 60 grs. de fígado), a intoxicação foi menor, evidenciando maior eficiência do produto. Apesar disso, a proteção exercida não foi satisfatória. Além disso, ao se observar a curva de pêso dos animais durante o decurso da experiência, verificamos que logo após o início da administração dêste extrato, ela começou a cair progressivamente, o que não sucedeu com os produtos *A*, *B*, *C* e *E*.

A maior proteção oferecida por êste produto *D*, talvez possa ser explicada pelo fato de êle não ser tão purificado quanto os outros, confirmando portanto a opinião de Villella¹¹, de que a purificação prejudica a eficiência dos extratos. Por outro lado, poderíamos talvez explicar a maior proteção, por existir neste extrato uma quantidade maior de xantinato de sódio, que foi o produto que protegeu totalmente os animais de experiência. Essa explicação talvez seja a mais plausível, pois também com xantinato de sódio obtivemos uma acentuada queda da curva de pêso dos animais de experiência.

Entretanto, apesar do produto *D* ter se mostrado um pouco mais eficiente, seu emprêgo está sujeito aos mesmos reparos feitos para os produtos *A*, *B* e *C*; além disso êle apresenta dois graves

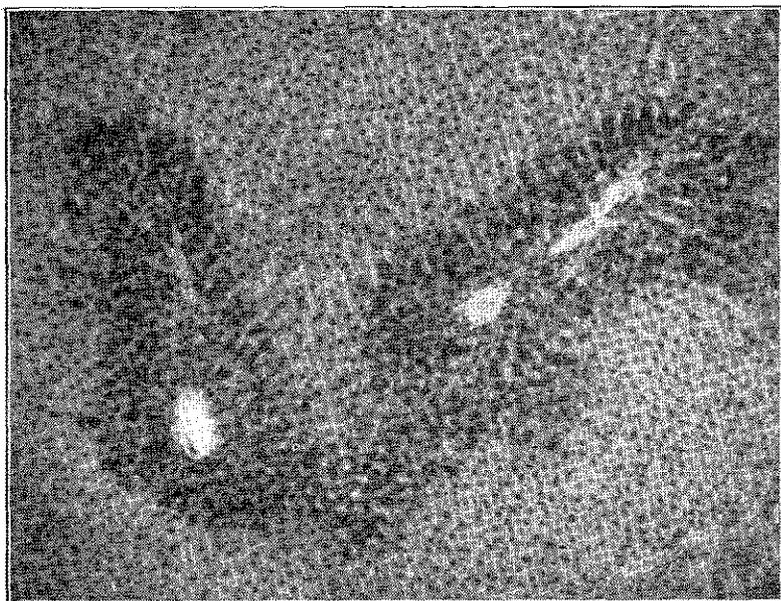


A

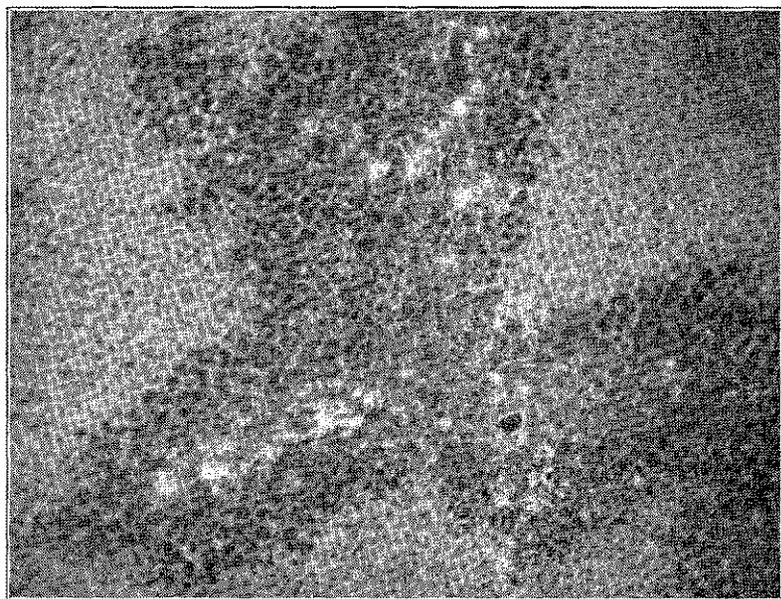


B

Fígado de ratos protegidos com o produto F. A lâmina A está normal.
A lâmina B é do fígado mais intoxicado do grupo.



A



B

Figado de rato protegidos com o produto B. A lâmina A é do figado menos intoxicado e a lâmina B, do mais intoxicado do grupo.

inconvenientes, quais sejam o de ser empregado em suspensão e o de produzir baixa de pêso.

Com o produto *E*, xantinato de sódio em dose pequena, os resultados podem ser comparados aos dos produtos comerciais, sendo ainda menos satisfatórios.

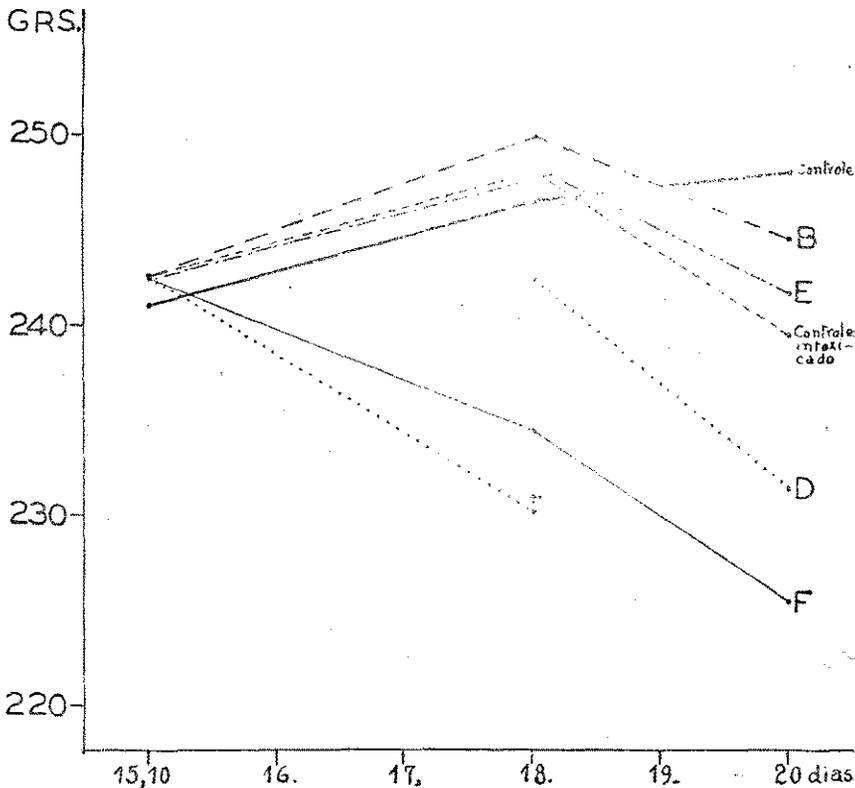


GRAFICO n.º 2 — Curva de pêso dos animais durante o decurso da experiência. A curva do grupo *D*, sofre uma variação brusca, por ter morrido um dos ratos do grupo. Representamos apenas uma curva para os produtos *A*, *B* e *C*, pois seus valores eram praticamente idênticos, dessa maneira simplificando o quadro. No dia 18 foi feita a intoxicação.

Uma proteção total foi obtida com o produto *F*, xantinato de sódio em suspensão, onde a dose administrada era de 100 mgrs. de substância ativa por 100 grs. de pêso; êstes resultados estão perfeitamente de acôrdo com os obtidos pelos autôres americanos já citados. Entretanto, como já dissemos, as injeções de xantinato de sódio nesta dôse alta, produzem uma acentuada queda de pêso.

Não conhecemos explicação para êste fato, mas aliado ao fato de ser a substância empregada em suspensão, consiste um obstáculo ao uso corrente.

CONCLUSÕES

1 — Para os ratos empregados, a dose de 0,2 cc. de tetracloreto de carbono por 100 grs. de pêso não é mortal, produzindo no fígado dos animais, lesões que vão desde a esteatose ligeira até a esteatose e degeneração hidrópica intensas, sendo que o máximo de intensidade das lesões era observado 48 horas após a administração do tóxico.

2 — Os produtos *A*, *B* e *C*, empregados na dose de 4 cc. por 100 grs. de pêso e a xantina-sódio na dose de 16 mgrs. por 100 grs. de pêso, oferecem proteção muito pouco satisfatória, apesar da dose alta em que são empregados, das boas condições nutritivas dos ratos e do fato de ser a intoxicação não muito intensa.

3 — O produto *D*, extrato preparado segundo a técnica de Forbes e Neale, revelou-se ligeiramente mais protetor que os produtos anteriormente citados, sendo empregado na dose de 4 cc. por 100 grs. de pêso; entretanto, produz uma evidente queda no pêso dos animais.

4 — O xantinato de sódio na dose de 100 mgrs. por 100 grs. de pêso, protege totalmente os ratos contra a intoxicação pelo tetracloreto de carbono, produzindo todavia, acentuada queda de pêso nos animais de experiência, além do grave inconveniente de precisar ser empregado em suspensão.

RESUMO:

Os autôres fazem um estudo comparativo da ação de várias substâncias antitóxicas, verificando que a única que protegeu eficientemente os animais contra a intoxicação pelo tetracloreto de carbono, foi o xantinato de sódio, na dose de 100 mgrs. por 100 grs. de pêso. Ao lado disso, verificaram, também, que o xantinato de sódio, quando empregado nesta dose, produz uma acentuada queda de pêso nos animais de experiência.

BIBLIOGRAFIA:

1 — VARAY, A. — 1936 — *Presse Médicale*, 105: 2118.

2 — FORBES, J. C. e NEALE, R. C. — 1936 — *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 34: 319.

- 3 — FORBES, J. C., NEALE, R. C. e SCHERER, J. H. — 1936 — *Jour. Phar. Exp. Ther.*, 58: 402.
- 4 — FORBES, J. C. e MCCONNELL, J. S. — 1937 — *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 36: 539.
- 5 — NEALE, R. C. e WINTER, H. C. — 1938 — *Jour. Phar. Exp. Ther.*, 62: 127.
- 6 — BARRET, H. M., MCLEAN, D. L. e MCHENRY, E. W. — 1938 — *Jour. Phar. Exp. Ther.*, 64: 131.
- 7 — FITZHUGH, O. G. — 1939 — *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 40: 11.
- 8 — FORBES, J. C. — 1939 — *Jour. Phar. Exp. Ther.*, 65: 287.
- 9 — VARS, H. M., RAVDIN, I. S. e GOLDSCHMIDT, S. — 1939 — *Am. Jour. Phys.*, 126: 646.
- 10 — VILLELA, G. — 1942 — *O Hospital*, 21: 2.
- 11 — VILLELA, G. — 1942 — *Ata Med. Rio de Janeiro*, 9: 88.
- 12 — VILLELA, G. — 1942 — *Rev. Bras. Biol.*, 2: 365.
- 13 — CAMERON, G. R. e KARUNARATNE, W. A. E. — 1936 — *Jour. Path. Bact.*, 42: 1.
- 14 — MINOT, G. R. — 1931 — *Jour. Phar. Exp. Ther.*, 43: 295.
- 15 — DAVIS, N. C. e WHIPPLE, G. H. — 1919 — *Arch. Int. Med.*, 23: 612.
- 16 — MESSINGER, W. J. e HAWKINS, W. B. — 1940 — *Am. Jour. Med. Sc.*, 199: 216.
- 17 — MILLER, L. L. e WHIPPLE, G. H. — 1940 — *Am. Jour. Med. Sc.*, 199: 204.
- 18 — MILLER, L. L., ROSS, J. F. e WHIPPLE, G. H. — 1940 — *Am. Jour. Med. Sc.*, 200: 739.