

## REDUÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NO CÉREBRO DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PACIENTES COM ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

J. M. GODOY \* — M. SKACEL \*\* — J. M. B. LIMA \*\*\* — C. M. ANDRADE \*\*\*\*

---

**RESUMO** — Os autores analisam, por técnica cromatográfica, as concentrações de glicose no cérebro de camundongos inoculados com LCR de 4 pacientes com ELA. Foi encontrada redução na concentração do carboidrato no material estudado, sugerindo a presença de fator extrínseco veiculado pelo LCR.

**Reduction in levels of glucose in the brain of mice inoculated with CSF of patients with amyotrophic lateral sclerosis.**

**SUMMARY** — Using chromatographic analysis the authors studied glucose concentration in the brain of Swiss mice inoculated with CSF of four patients with amyotrophic lateral sclerosis. They found reduction in the levels of glucose, suggesting the existence of an exogenous factor transferred by CSF.

---

Doença do neurônio motor (DNM) constitui grupo de enfermidades bem caracterizadas do ponto de vista clínico. Não obstante certas discordâncias quanto aos limites nosológicos, a esclerose lateral amiotrófica (ELA), sendo a entidade mais importante do grupo, confunde-se, costumeiramente, com este. Apesar da relativa facilidade na realização de seu diagnóstico, os fatores desencadeadores e seu mecanismo etiopatogênico permanecem desconhecidos. Essa falha de conhecimento básico se reflete na falta de qualquer tratamento racional para a DNM. A despeito da existência de variantes infantis<sup>25</sup>, juvenis<sup>11</sup>, familiares<sup>4</sup> e regionais<sup>6</sup>, a DNM é caracteristicamente doença do adulto, com predileção pelo sexo masculino e atingindo, com maior frequência, pessoas a partir da quinta década de vida. Entretanto, os autores têm observado dramática redução na faixa etária dos enfermos na cidade do Rio de Janeiro. Nas últimas décadas, busca-se, incessantemente, a causa da DNM. Seguindo a linha de raciocínio defendida por Kurland, citado por Müller e Hilgenstock<sup>21</sup> e de outros autores<sup>24,31</sup>, a DNM seria um «complexo sindrômico» de múltiplas etiologias possíveis. São as variantes esporádicas, citadas por Emery e Holloway<sup>4</sup>, que poderiam ser provocadas por mecanismos distintos<sup>20</sup>: infecções virais lentas; distúrbios endócrinos, metabólicos ou tóxicos; fenômenos imunológicos, para citar os mais importantes.

Levando-se em conta o poder de «sedução» da etiologia viral da ELA, neste estudo são analisadas as concentrações de glicose no cérebro de camundongos inoculados com líquido cefalorraquidiano (LCR) de 4 pacientes com a doença.

---

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ): \* Professor Adjunto de Neurologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ); \*\* Professor Assistente de Neurologia da UERJ; \*\*\* Professor Adjunto de Neurologia da UFRJ; \*\*\*\* Professor Titular de Microbiologia da UFRJ.

## MATERIAL E MÉTODOS

I. MATERIAL — (A) LCR: Foram colhidas amostras de LCR de 4 pacientes com diagnóstico de ELA e acompanhados no Instituto de Neurologia Deolindo Couto (INDC-UFRJ). As referidas amostras foram diluídas em solução salina fosfatada (PBS) e classificadas conforme se segue: SCM, registro no INDC 48710 (Solução P1); CSR, registro no INDC 52732 (Solução P2); LMA, registro no INDC 49611 (Solução P3); JMPE, registro no INDC 50230 (Solução P4). (B) Animais: Foram utilizados 21 lotes de 6 camundongos suíços brancos, recém-nascidos, procedentes do biotério do Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (RJ). (C) Soluções: A solução de PBS foi preparada com a seguinte composição:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,56 g);  $\text{NaCl}$  (0,85 g);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,14 g); água destilada q.s.p. 1000 ml. Em seguida, foi autoclavada a 120°C durante 20 minutos e utilizada para inoculação no grupo controle (Solução C).

II. MÉTODOS — (A) Inoculação: Dos 126 animais, 120 foram inoculados no dia 0 (zero) por via intracerebral, com dose de 0,03 ml, conforme a seqüência a seguir — Lotes 1 a 4, inoculados com a Solução C; Lotes 5 a 8, inoculados com a Solução P1; Lotes 9 a 12, inoculados com a Solução P2; Lotes 13 a 16, inoculados com a Solução P3; Lotes 17 a 20, inoculados com a Solução P4. Os animais pertencentes ao lote 21 não foram inoculados a fim de determinar o nível de glicose padrão. (B) Colheita dos cérebros: Os cérebros dos animais foram coletados após sangria branca por punção cardíaca, utilizando-se o método de abertura da calota craniana. Os animais foram sacrificados conforme o esquema a seguir: Dia 0 (zero), Lote 21; 45º dia, Lotes 1, 5, 9, 13 e 17; 90º dia, Lotes 2, 6, 10, 14 e 18; 135º dia, Lotes 3, 7, 11, 15 e 19; 180º dia, Lotes 4, 8, 12, 16 e 20. Após a coleta, os cérebros foram colocados em banho de gelo até o início da extração do carboidrato. (C) Extração e dosagem de glicose: Para extração e dosagem da glicose, seguimos o método utilizado por Alviano et al.<sup>1</sup> e descrito em detalhe por Godoy<sup>9</sup>.

## RESULTADOS

Após injeção das 21 amostras no cromatógrafo gasoso, obtivemos as curvas de glicose de cada solução. Aplicando o método já mencionado, chegamos à concentração do referido açúcar, constando seus valores absolutos (em mm de altura) da tabela 1.

Solução	Dia	45º	90º	135º	180º
C		0,63	7,82	0,77	0,02
P1		0,60	1,90	1,05	1,82
P2		3,82	3,28	2,16	3,36
P3		6,40	1,14	1,81	3,90
P4		3,84	0,47	0,78	1,43

Tabela 1 — Valores da glicose em mm de altura. Glicose Padrão = 0,16.

Transportamos os valores para papel milimetrado, utilizando o fator de multiplicação 2,5, já que alguns acusaram índices abaixo de 1 mm. O gráfico foi montado comparando as curvas de glicose das soluções P1, P2, P3 e P4 com a solução C (Fig. 1). Todas partem da concentração de glicose padrão (tempo 0), obtida a partir do sacrifício dos animais do lote 21.

## COMENTÁRIOS

Mackenzie et al.<sup>18</sup> detectaram aumento significativo na concentração de determinadas enzimas em tecido cerebral de camundongos infectados pelo agente do scrapie. Conseqüente acúmulo de material PAS-positivo foi demonstrado no cérebro e medula espinhal dos animais. As enzimas descritas fazem parte do grupo das hidrolases glicosídicas e incluem a beta-glicuronidase, a N-acetil-beta-D glicosaminidase e a beta-galactosaminidase. Hunter<sup>12</sup> estudou inúmeras enzimas em tecido nervoso infectado pelo scrapie, dividindo-as em três grupos: (A) enzimas não alteradas em suas funções — neuraminidase, alfa-glicosidase, beta-glicosidase, lipase, fosfolipase A, fos-

fatase ácida, arilsulfatase A, arilsulfatase B e glicose 6-fosfato desidrogenase; (B) enzimas com atividade aumentada no estágio clínico da doença — catepsina D, proteinase ácida, beta-galactosidase e ribonuclease ácida; (C) enzimas com atividade aumentada no período de incubação da enfermidade — desoxirribonuclease, hialuronidase, alfa-fucosidase, alfa-manosidase, N-acetil-beta-D glicosaminidase, N-acetil-beta-D galactosaminidase e beta-glicuronidase. As enzimas desoxirribonuclease, N-acetil-beta-D glicosaminidase e N-acetil-beta-D galactosaminidase mostraram ação biológica anormal na 8ª semana após a inoculação intracerebral do agente do scrapie, podendo atingir valores duas a três vezes acima dos normais no estágio clínico da moléstia<sup>12</sup>. Kim et al.<sup>13</sup>, observaram o mesmo fenômeno nos cérebros de hamsters inoculados com tecido nervoso de enfermos com doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ).

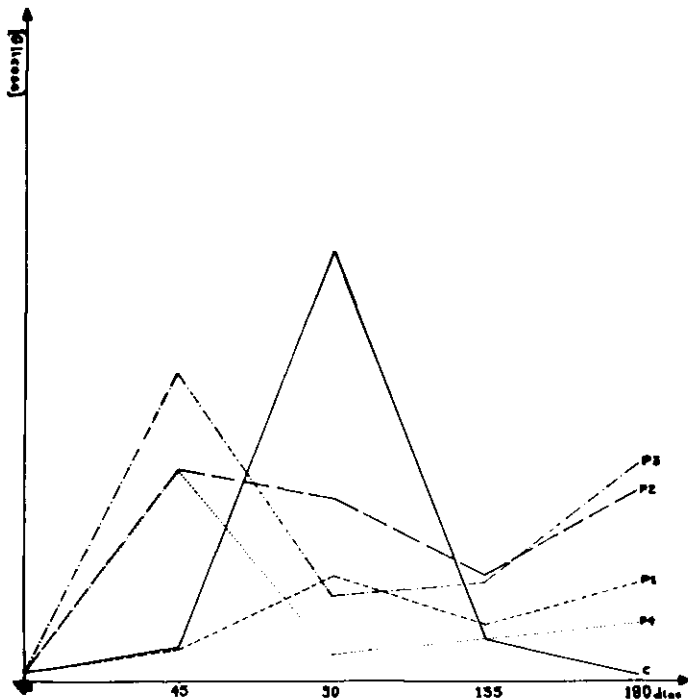


Fig. 1 — Comparação das curvas de glicose das soluções P1, P2, P3 e P4 com a solução C.

Com exceção do resultado de alguns poucos estudos<sup>7,16,32</sup>, todas as tentativas experimentais de transmitir a ELA não obtiveram êxito. Contudo, segundo Prusiner<sup>26,28</sup>, a negatividade nas pesquisas não descarta a participação de um Prion na etiologia da doença, já que o período de incubação do scrapie pode ultrapassar o tempo de sobrevivência de animais de laboratório<sup>3</sup> e nas encefalopatias espongiformes do homem atinge até 30 anos<sup>5</sup>.

A ligação entre a ELA e Prions advém da variante amiotrófica da DCJ<sup>19,22,29</sup>, bastante semelhante à primeira, com sinais de comprometimento dos motoneurônios superior e inferior e preservação do sistema sensitivo. Gibbs e Gajdusek<sup>8</sup> a descreveram, salientando que a transmissão para cobaias não é possível nesses casos e que o aspecto espongiforme, característico, é raro. Em outros estudos é feita alusão aos mesmos resultados<sup>22,29</sup>. Reforçando as informações mencionadas, é conhecido que em alguns casos de DCJ não existe vacuolização reconhecível ao microscópio óptico<sup>26,27</sup> e que esta pode ser observada no neuraxe de pacientes com ELA<sup>2,17</sup>.

Em nossa experiência, encontramos redução nas concentrações de glicose no cérebro dos camundongos inoculados com as 4 soluções, especialmente no 90º dia após a ministração do material.

A presença de um microrganismo, patogênico natural ou por contaminação, também poderia determinar perfil similar. Entretanto, tal possibilidade fica descartada, haja vista que todos os animais apresentaram comportamento normal durante os 6 meses em que foi realizado o estudo.

Alterações metabólicas nos motoneurônios alfa foram notadas após secção de nervo periférico, particularmente ligadas aos carboidratos<sup>14</sup>. Aumento na atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase é observado durante o fenômeno de cromatólise dos neurônios motores<sup>23</sup>. Porém, a ação biológica exacerbada, que se inicia precocemente, retorna ao nível normal 30 dias após o início do processo<sup>10,15,23,30</sup>. Em nosso material, o consumo de glicose foi expressivo na faixa do 90º dia, afastando a hipótese de cromatólise convencional.

Desta forma, concluímos que algum fator desconhecido reduziu os níveis de glicose nas amostras analisadas, fator este veiculado pelo LCR dos pacientes com ELA.

#### REFERÊNCIAS

1. Alviano CS, Souza ET, Esteves MJG, Angluster J, Souza W — Effect of concanavalin A on the surface of *Herpetomonas Samuelpessoai*. *J Submicrosc Cytol* 13:619, 1981.
2. Brownell E, Oppenheimer DR, Hughes JT — The central nervous system in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 33:338, 1970.
3. Dickinson AG, Fraser H, Outram GW — Scrapie incubation time can exceed natural lifespan. *Nature* 256:732, 1975.
4. Emery AEH, Holloway S — Familial motor neuron diseases. In Rowland LP (ed): *Human Motor Neuron Diseases*. Raven Press, New York, 1982, pg 139.
5. Gajdusek DC — Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197:943, 1977.
6. Gajdusek DC — Foci of motor neuron disease in high incidence in isolated populations of East Asia and Western Pacific. In Rowland LP (ed): *Human Motor Neuron Diseases*. Raven Press, New York, 1982, pg 363.
7. Gardashian AM, Khondkarian OA, Bunina TL, Popova LM, Katkin SG — Experimental data on the study of the etiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Vestn Acad Med Sci* 9:80, 1970.
8. Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC — An update on long-term in vivo studies designed to identify a virus as a cause of ALS, Parkinsonism-Dementia, and Parkinson's disease. In Rowland LP (ed): *Human Motor Neuron Diseases*. Raven Press, New York, 1982, pg 343.
9. Godoy JM — Esclerose Lateral Amiotrófica e Prions. Tese para obtenção do título de Livre-Docente em Neurologia. UERJ. Rio de Janeiro, 1988.
10. Häkängren MHA, Kauffman FC — Metabolic alterations in the axotomized superior cervical ganglion of the rat: II. The pentose phosphate pathway. *Brain Res* 65:141, 1974.
11. Hausmanowa-Petrusewicz I, Borkowska J, Zaremba J — Juvenile motor neuron diseases: the sex influence in benign juvenile pseudodystrophic spinal muscular atrophy. In Rowland LP (ed): *Human Motor Neuron Diseases*. Raven Press, New York, 1982, pg 131.
12. Hunter GD — Scrapie: a prototype slow infection. *J Infect Dis* 125:427, 1972.
13. Kim JH, Manuclidis L, Manuclidis EE — Sequential changes in the activity of cerebral glycosidases in experimental Creutzfeldt-Jakob disease of hamsters. *J Neuropath Exp Neurol* 46:345, 1987.
14. Kreutzberg GW — Changes of coenzyme (TPN) diaphorase and TPN linked dehydrogenase during axonal reaction of the nerve cell. *Nature* 199:393, 1963.
15. Kreutzberg GW, Emmert H — Glucose utilization of motor nuclei during regeneration: a (14C)2-deoxyglucose study. *Exp Neurol* 70:712, 1980.
16. Lima JMB — Contribuição para o estudo da esclerose lateral amiotrófica: aspectos clínico, epidemiológico e virológico. Tese para obtenção do grau de Mestre em Neurologia. UERJ. Rio de Janeiro, 1979.
17. Lima JMB — Atrofia cortical na esclerose lateral amiotrófica: contribuição para o estudo da forma demencial. Tese para obtenção do grau de Doutor em Neurologia. UFRJ. Rio de Janeiro, 1988.
18. Mackenzie A, Wilson AM, Dennis PF — Further observations on histochemical changes in scrapie mouse brain. *J Comp Path* 78:489, 1968.
19. Matthews WB — Slow infections. In Kennedy PGE, Johnson RT (eds): *Infections of the Nervous System*. Butterworths, London, 1987, pg 227.
20. Mitsumoto H, Hanson MR, Chad DA — Amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in pathogenesis and therapeutic trials. *Arch Neurol* 45:189, 1988.
21. Müller WK, Hilgenstock F — An uncommon case of amyotrophic lateral sclerosis with isolation of a virus from the CSF. *J Neurol* 211:11, 1975.

22. Myrlianthopoulos NC, Smith JK — Amyotrophic lateral sclerosis with progressive dementia. *Neurology* 12:603, 1962.
23. Nandy K — Histochemical study on chromatolytic neurons. *Arch Neurol* 18:425, 1968.
24. Patten BM, Engel WK — Phosphate and parathyroid disorders associated with the syndrome of amyotrophic lateral sclerosis. In Rowland LP (ed): *Human Motor Neuron Diseases*. Raven Press, New York, 1982, pg 181.
25. Pearn JH — Infantile motor neuron disease. In Rowland LP (ed): *Human Motor Neuron Diseases*. Raven Press, New York, 1982, pg 121.
26. Prusiner SB — Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136, 1982.
27. Prusiner SB — Occasional notes: some speculations about Prions, amyloid, and Alzheimer disease. *N Engl J Med* 310:661, 1984.
28. Prusiner SB — Prions and neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 317:1571, 1987.
29. Salazar AM, Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr — Syndromes of amyotrophic sclerosis and dementia: relation to transmissible Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 14:17, 1983.
30. Singer P, Mehler S — 2-deoxy(14C) glucose uptake in the rat hypoglossal nucleus after nerve transection. *Exp Neurol* 69:617, 1980.
31. Tandau R, Bradley WG — Amyotrophic lateral sclerosis: Part 2. Etiopathogenesis. *Ann Neurol* 18:419, 1985.
32. Zilber LA, Bajdakova ZL, Gardashian AM, Konovalov NV, Runina TL, Barabadze EM — Study of the etiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Bull WHO* 29:449, 1963.