

ORIGINALES

Instituto de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Lisboa
(Director: Prof. Toscano Rico)

Sobre o mecanismo das alterações do quadro hemático produzidas pela manipulação do rato branco

R. IRIARTE PEIXOTO (*), A. ROSARIO DIAS (**) e DAVID FERREIRA (***)

Nos últimos anos têm surgido numerosos trabalhos clínicos e experimentais sobre a avaliação da capacidade funcional do sistema hipófiso-suprarrenal, pelo estudo do comportamento de certos elementos do sangue (linfócitos, eosinófilos) sob a acção de determinados estímulos (ACTH, adrenalina, insulina, etc.) (4).

Tais trabalhos tendem a demonstrar que uma enorme variedade de estímulos desencadeia, por mecanismo ainda pouco esclarecido, a libertação de hormona hipofisária corticotrófica, a qual, por sua vez, provoca a secreção de esteroides corticais do tipo glicocorticoide que vão actuar sobre a fórmula hemática, produzindo linfopenia e eosinopenia.

No intuito de contribuir para um melhor conhecimento de alguns dos aspectos mal elucidados desta complexa cadeia de reacções biológicas, iniciámos há algum tempo uma série de experiências no Rato branco e, paralelamente, o estudo clínico da prova de Thorn, nas suas várias modalidades.

A presente nota dá conta dos resultados obtidos numa primeira série de trabalhos experimentais, no Rato branco.

1. Material e métodos

a) *Animais de experiência:* Utilizaram-se Ratos brancos, obtidos no comércio. Durante o período de cada observação os animais foram mantidos em jejum.

b) *Métodos hematológicos:* As amostras de sangue foram obtidas cortando a ponta da cauda com uma lâmina muito afiada.

O sangue foi aspirado, sempre que possível, sem expressão e a pipeta de contagem de glóbulos brancos (pipeta automática de

(*) Médico dos Hospitais Cívicos de Lisboa.

(**) Interno dos Hospitais Cívicos de Lisboa.

(***) Assistente livre do Instituto de Histologia da Faculdade de Medicina de Lisboa. Bolseiro do Instituto de Alta Cultura.

Trenner) cheia até à marca 0,5 e, depois, acabada de encher até à marca 1,5, após o que se agitava 50 vezes.

Utilizou-se o líquido preconizado por RANDOLPH (3), com a seguinte fórmula: *Soluções «stock»*: A. Soluta de azul de metileno a 0,1 % em propileno glicol. — B. Soluta de floxina a 0,1 % em propileno glicol.

Soluções de trabalho: Soluta A, mais igual porção de água destilada. Soluta B, mais igual porção de água destilada.

Misturar número igual de gotas dos dois solutos, obtendo assim o diluente para a contagem de glóbulos brancos.

Com este diluente, os glóbulos rubros são completamente destruídos, os linfócitos, monocitos e neutrófilos coram-se de azul e os eosinófilos destacam-se perfeitamente, pela sua intensa coloração rósea.

As contagens foram feitas na Câmara de Fuchs-Rosenthal de 0,2 mm. de espessura, com pequena ampliação. Para os eosinófilos contaram-se duas câmaras, isto é, quatro campos para cada determinação. A fórmula usada foi a seguinte: Contagem média por campo $\times 100 : 16 =$ eosinófilos por mm. c.

Além da contagem directa dos eosinófilos, objectivo fundamental dos nossos ensaios, procedeu-se também à contagem dos leucócitos totais, também na Câmara de Fuchs, e ao estudo da fórmula leucocitária por esfregaço em lâmina e coloração pelo Leishmann.

No decurso de experiências anteriores confirmámos a opinião, já expressa por RANDOLPH, de que a contagem directa dos eosinófilos é um método mais exacto do que a sua determinação por contagem na lâmina.

O número de neutrófilos e de linfócitos por mm. c. foi calculado a partir do número total de leucócitos e da percentagem dos referidos elementos, determinada no esfregaço.

Não fazemos referência às flutuações dos monocitos e dos basófilos, porque nos pareceu que a variação destes elementos, pela escassez do seu número, só poderia ser estudada com rigor por métodos de contagem directa.

c) *Suprarrenalectomia*: Realizámos as suprarrenalectomias no Rato branco pela técnica preconizada por RECAN (4). Os ratos abaixo de 80 grs. mostraram-se extremamente sensíveis à suprarrenalectomia, morrendo em insuficiência suprarrenal no espaço de uma a duas semanas, mesmo quando mantidos com a alimentação normal adicionada de água salgada a 1 %. Os ratos de maior peso tendem a sobreviver indefinidamente, pela vicariação por suprarrenais acessórias, mas, nas duas primeiras semanas após a opera-

ção, estão em nítida insuficiência suprarrenal, demonstrada, sobretudo, pela alta percentagem de mortes poucas horas depois de serem submetidos a estímulos mínimos (manipulação, colheita de sangue, injeção intraperitoneal de soro).

Os ratos que utilizámos pesavam entre 130 e 200 grs. e eram submetidos a ensaio dentro do espaço de duas semanas após a operação.

2. Resultados das experiências de manipulação simples

Experiências preliminares levaram-nos a supor que, no grupo de ratos com que trabalhamos, a simples manipulação e as manobras para a colheita de sangue seriam capazes de, sem alterar o número total de leucocitos, baixar o número de eosinófilos e de linfócitos e elevar o número dos neutrófilos.

Para sujeitar estas hipóteses a uma verificação, levámos a cabo as experiências a seguir referidas.

A fim de nos colocarmos em condições «standard» para o estudo do efeito, no quadro hemático, de injeções intraperitoneais de vários fármacos, juntámos aos inevitáveis estímulos das colheitas de sangue o de uma injeção intraperitoneal de soro glucosado isotónico (0,1 cc. por cada 100 grs. de peso do animal).

CUADRO 1.

Número de eosinófilos (por mm. c.) antes e depois dos estímulos.

“Colheita do sangue + injeção intraperitoneal de soro glucosado isotónico”
(Contagem directa na Câmara de Fuchs-Rosenthal)

Rato	Antes	Quatro horas depois	Decréscimo absoluto	Decréscimo relativo (em percentagem)
M ♂	656	294	362	55
T ♂	381	144	237	62
C ♂	238	119	119	50
Z ♂	794	269	525	66
L ♂	688	531	157	24
S ♂	1543	663	880	57

Conclusão: Os decréscimos absolutos, todos positivos, e os decréscimos relativos, à volta dos 50% — tudo isto no sentido previsto pela hipótese — parecem corroborá-la. A análise estatística mostra que os resultados são significantes a 5%; a possibilidade de obter um decréscimo médio tão grande ou maior, por azares de amostragem, anda à volta de 1%.

Verifica-se que o número de eosinófilos cai de 52%, pelo simples estímulo da colheita de sangue, adicionado de injeção intraperitoneal de soro glucosado isotónico.

CUADRO 2
Número de leucocitos, neutrófilos e linfocitos (por mm. c.),
antes e depois dos estímulos
“Colheita de sangue + injeção intraperitoneal de soro glucosado isotónico”,
(Os números obtidos foram arredondados para a meia centena mais próxima)

Rato	Antes	Depois
T	Leucocitos 9.050	Leucocitos 11.450
♂	Neutrófilos — 2.800	Neutrófilos — 6.950
	Linfocitos — 5.700	Linfocitos — 4.350
C	Leucocitos 5.750	Leucocitos 7.750
♂	Neutrófilos — 1.650	Neutrófilos — 3.650
	Linfocitos — 3.750	Linfocitos — 3.950
Z	Leucocitos 18.500	Leucocitos 17.700
♂	Neutrófilos — 3.150	Neutrófilos — 8.300
	Linfocitos — 12.400	Linfocitos — 9.050
L	Leucocitos 10.900	Leucocitos 11.350
♂	Neutrófilos — 4.150	Neutrófilos — 3.750
	Linfocitos — 6.200	Linfocitos — 7.050
S	Leucocitos 10.300	Leucocitos 11.000
♂	Neutrófilos — 1.350	Neutrófilos — 4.600
	Linfocitos — 7.750	Linfocitos — 5.600

Conclusão: Neste caso o padrão geral das variações, que deixam de se verificar sempre no mesmo sentido, não tem a clareza do caso dos eosinófilos. A análise estatística não dá essas variações como significantes; para os leucocitos este resultado apoia a nossa presunção de que os pequenos estímulos não produzem leucocitose.

É clara, porém, a alteração da relação neutrófilos/linfocitos;

os primeiros têm um acréscimo médio de cerca de 2.800 (por milímetro cúbico) e os segundos um decréscimo médio de cerca de 1.200 (por mm. c.). A análise estatística desta alteração de proporções (nas condições indicadas no apêndice) mostra que se pode considerar como significativa além de qualquer dúvida.

3. Influência da anestesia leve pelo Nembutal sobre as alterações hematológicas devidas à manipulação simples *

Seguindo uma sugestão de RECANT e colaboradores (4), que trabalharam com uma estirpe muito sensível à manipulação, tentámos estabilizar o quadro hemático dos nossos Ratos, submetendo-os a uma anestesia pelo Nembutal.

Usámos a dose de 30 mgrs. por grama de peso, por via intra-peritoneal. Segundo aquele autor, a anestesia leve pelo Nembutal estabiliza o nível dos eosinófilos dentro de duas horas após injeção e mantêm-nos estáveis ainda após quatro horas de experiência.

Recordamos os resultados discordantes de R. HOUSSAY, que trabalhou com uma estirpe de ratos muito mansos, pouco susceptíveis à manipulação, e que verificou que o Nembutal, longe de estabilizar o quadro hemático, era capaz, por si próprio, de alterá-lo (2).

Os quadros seguintes mostram os nossos resultados.

CUADRO 3

Rato	Antes	Quatro horas depois	Decréscimo absoluto	Decréscimo relativo (em per centagem)
T	631	350 (baixa de 45 %)	281	45
C	588	337 (baixa de 43 %)	251	43
Z	1.581	919 (baixa de 42 %)	662	42
L	481	175 (baixa de 64 %)	306	64
S	675	525 (baixa de 22 %)	150	22

(*) O Nembutal usado nas nossas experiências foi amavelmente cedido pela Casa Abbott.

Conclusão: O padrão dos resultados é claramente o do Quadro I; o anestésico não evitou a alteração do número de eosinófilos, que a análise estatística revela até um pouco mais significativa do que a daquele quadro.

CUADRO 4

Alteração do número (por mm. c.) dos neutrófilos e dos linfócitos, sob a acção de pequenos estímulos, em ratos levemente anestesiados pelo Nembutal.

(Colheita de sangue + injeccção intraperitoneal de soro glucosado isotónico). (Os números obtidos foram arredondados para a meia centena mais próxima).

Ratos	1.ª Contagem	2.ª Contagem
T ♂	Leucocitos 10.950	Leucocitos 10.900
	Neutrófilos - 6.950	Neutrófilos - 6.150
	Linfócitos - 3.500	Linfócitos - 4.400
C ♂	Leucocitos 10.700	Leucocitos 7.750
	Neutrófilos - 4.600	Neutrófilos - 3.250
	Linfócitos - 5.6000	Linfócitos - 4.100
Z ♂	Leucocitos 20.300	Leucocitos 12.800
	Neutrófilos - 10.450	Neutrófilos - 7.100
	Linfócitos - 4.800	Linfócitos - 5.000
L ♂	Leucocitos 16.000	Leucocitos 11.200
	Neutrófilos - 7.450	Neutrófilos - 5.750
	Linfócitos - 7.300	Linfócitos - 5.250
S ♂	Leucocitos 12.750	Leucocitos 12.300
	Neutrófilos - 4.900	Neutrófilos - 5.700
	Linfócitos - 7.300	Linfócitos - 6.050

Conclusão: Os números mostram com clareza que a injeccção de Nembutal em dose sedativa (ou, possivelmente, até só a manipulação) provocou, como pequeno estímulo, a alteração da proporção entre neutrófilos e linfócitos (vide Quadro II). No momento em que se espera que o Nembutal estabilize o quadro hemático já a alteração está produzida e fixada. Com efeito, quatro horas depois da primeira colheita, isto é, seis horas depois da injeccção de Nembutal não há variações significantes em relação à primeira contagem.

4. Influência da suprarrenalectomia sobre as alterações produzidas no quadro hemático do rato, pela manipulação

Parece, à primeira vista, que as alterações hematológicas anteriormente referidas são a expressão miniatural das alterações hematológicas profundas, descritas por Selye, como resposta a estímulos violentos (injecções de formalina, exposição ao frio, exercício muscular intenso, etc.) (1).

No intuito de averiguar se as alterações que encontramos correspondem, efectivamente, a um mecanismo em que intervenha a suprarrenal, empreendemos o estudo da resposta hematológica a pequenos estímulos em Ratos suprarrenalectomizados.

O seguinte quadro mostra-nos os resultados obtidos nesses animais.

CUADRO 5

Número de eosinófilos (por mm. c.) antes e depois dos estímulos
“ Colheita de sangue + injeccção intraperitoneal de soro glucosado isotónico ”
 em ratos suprarrenalectomizados

Rato	Antes	Quatro horas depois
C ₁	1 731	1.187
T ₁	994	881
R ₁	2.125	2.361
P ₁	887	856
M ₁	1.475	1.231
P ₂	713	993

Verifica-se, conforme se previa, a ausência de baixa estatisticamente significativa dos eosinófilos, como reacção à manipulação nos Ratos suprarrenalectomizados.

CUADRO 6

Alteração do número (por mm. c.) dos neutrófilos e dos linfócitos sob a acção de pequenos estímulos em ratos suprarrenalectomizados.

(Colheita de sangue + injeção intraperitoneal de soro glucosado isotónico)

Ratos	Antes	Quatro horas depois
T ₁	Leucocitos 14.150	Leucocitos 15.950
	Neutrófilos - 4.150	Neutrófilos - 7.800
	Linfocitos - 9.000	Linfocitos - 7.250
R ₁	Leucocitos 27.100	Leucocitos 26.600
	Neutrófilos - 11.800	Neutrófilos - 14.500
	Linfocitos - 12.450	Linfocitos - 10.000
P ₁	Leucocitos 14.700	Leucocitos 13.800
	Neutrófilos - 2.400	Neutrófilos - 4.750
	Linfocitos - 11.550	Linfocitos - 8.200
M ₁	Leucocitos 15.300	Leucocitos 12.750
	Neutrófilos - 1.850	Neutrófilos - 4.550
	Linfocitos - 12.600	Linfocitos - 6.750
P ₂	Leucocitos 16.800	Leucocitos 17.800
	Neutrófilos - 1.750	Neutrófilos - 5.800
	Linfocitos - 14.350	Linfocitos - 11.300

Conclusão: Os números apresentam-se como no Quadro II, quanto aos pontos de variações, significância, etc. A suprarrenalectomia não impediu a modificação da proporção entre neutrófilos e linfócitos produzida pelos pequenos estímulos.

Discussão

No estudo das reacções do quadro hemático do Rato branco à administração de fármacos existe uma dificuldade fundamental, que é a da sensibilidade dos animais a pequenos estímulos, como sejam a simples operação de tirar sangue e a introdução parentérica das substâncias.

Logo nos nossos primeiros ensaios deparámos com essa dificuldade, confirmando, assim, as afirmações de RECANT e colaboradores.

A sensibilidade à manipulação varia de estirpe para estirpe, como demonstram os resultados de R. HOUSSAY, cujos Ratos se

mostraram insensíveis, no ponto de vista hematológico, às pequenas manobras.

Nos animais com que trabalhamos, observámos, pelo simples facto de colher sangue, alterações hemáticas, das quais a mais constante e evidente, foi a queda dos eosinófilos.

As alterações do número global de glóbulos brancos não são significativas. Em contrapartida, verificou-se, com regularidade, uma alteração das proporções entre os neutrófilos e os linfócitos, no sentido de neutrofilia com certo grau de linfopenia.

Dado que as alterações referidas foram desencadeadas por estímulos inespecíficos, parece-nos admissível interpretá-las como reacções de alarme em miniatura.

Com efeito, SELYE, trabalhando com estímulos violentos (injecção de formalina, trabalho muscular intenso, exposição ao frio, etcétera), obteve modificações hemáticas, consistindo em leucocitose, neutrofilia, linfopenia e eosinopenia (1). À parte a ausência de leucocitose, as modificações por nós verificadas são do mesmo sentido das que foram descritas por aquele investigador.

Nesta série de experiências não pudemos verificar que o Nembutal impedisse as modificações hemáticas produzidas pela manipulação.

Os resultados que obtivemos levam-nos a interpretar de modo diferente a eosinopenia, por um lado, e a neutrofilia, por outro.

A eosinopenia produzida pela manipulação parece ser um fenómeno essencialmente ligado à libertação de hormonas corticais, pois é abolido pela suprarrenalectomia.

A neutrofilia com certo grau de linfopenia, que se verificam após os pequenos estímulos, continuam a observar-se nos animais suprarrenalectomizados, devendo, portanto, obedecer a um mecanismo diferente, cuja natureza importa investigar.

Análise estatística de alguns quadros de observações

GUSTAVO DE CASTRO

A) Quadro I

Dispõe-se de pares de observações nas condições em que se utiliza uma variável de «Student» para ensaiar a hipótese duma variação nas médias das observações em diferentes indivíduos sob a acção dum tratamento.

Utiliza-se o ensaio *unilateral* conveniente, visto que a experiência foi conduzida para ensaiar a hipótese da não alteração *contra uma diminuição* do número de eosinófilos.

Obteve-se $t = 3,25$, que é o quantilho dos 98,9% da distribuição e se deve considerar significativo, trabalhando-se a 5%, como é usual. O mesmo vai acontecer no Quadro III, em que o t obtido corresponderá a 99%.

Como se deixa ver, porém, a significância dos dois valores tomados conjuntamente ultrapassa este limiar. Utilizando a técnica usual para a combinação de ensaios obtem-se um $\chi^2 = 18,22$, que é aproximadamente o quantilho dos 0,1%; este resultado já é considerado altamente significativo quando se trabalha a 5%, como é usual.

B) Quadro II

A utilização do ensaio de «Student» para indagar da significância das variações dos números de corpúsculos nos diferentes indivíduos não permitiu afirmar essa significância para nenhum dos tipos.

Quanto à alteração da fórmula, pareceu razoável utilizar o ensaio do χ^2 para o quadro de 2×2 que se obtem totalizando os números de «neutrófilos» e «linfócitos» contados nos esfregaços «antes» e «depois». Obteve-se um χ^2 da ordem de 150 (!).

O quadro era:

	A	D
N	509	917
L	1308	1011

C) Quadro III

Veja-se A).

D) Quadro IV

Procedendo-se como para o Quadro II — veja-se B) — não se verificou, nem a significância nas variações dos números, nem a significância na alteração de fórmula. Neste último caso têm-se o quadro

	A	D
N	872	1008
L	840	918

que conduz a $\chi^2 = 0,64$.

E) Quadro V

Procedendo-se como para o Quadro I — veja-se A) — obteve-se $t = 0,58$ com 5 g. de l. As variações não podem considerar-se significantes.

F) Quadro VI

Procedendo-se como para o Quadro II — veja-se B) — chegou-se às mesmas conclusões. O quadro de 2×2 é, neste caso:

	A	D
N	448	824
L	1425	1036

Obtêm-se $\chi^2 = 172,7$.

RESUMO

Os autores estudaram as alterações hematológicas produzidas por pequenos estímulos (colheita de sangue, injeção, intraperitoneal de soro glucosado).

Verificam que no grupo de ratos com que trabalham se produz com grande regularidade eosinopenia, neutrofilia e certo grau de linfopenia sem alteração sensível do número total de leucocitos.

A injeção intraperitoneal de Nembutal em dose sedativa não impede as referidas alterações.

Dado que a suprarrenalectomia impede a eosinopenia mas não as outras alterações, os autores pensam que é necessário procurar uma explicação diferente da de uma estimulação suprarrenal, para a neutrofilia e linfopenia consecutivas a pequenos estímulos.

RESUMEN

Estudian los autores las alteraciones del cuadro hematológico producidas por pequeños estímulos (obtención de sangre, inyección interaperitoneal de suero glucosado), observando que en el grupo de ratas en los que se hizo el trabajo se produce con gran regularidad eosinopenia, neutrofilia y cierto grado de linfopenia, no habiendo con todo una alteración sensible en el número total de leucocitos.

La inyección intraperitoneal de Nembutal en dosis sedativa no impidió las alteraciones referidas.

Dado que la suprarrenalectomia impide la eosinopenia, pero no las restantes alteraciones, piensan los autores que será necesario encontrar una explicación diferente a la de un estímulo suprarrenal para la neutrofilia y linfopenia consecutivas a los pequeños estímulos.

RÉSUMÉ

Les auteurs ont étudié les altérations hematologiques produites par des petites agressions (prise de sang, injection intraperitoneal de sérum glucosé).

Ils ont vérifié que dans le groupe de rats avec lequel ils travaillent, l'eosinopenie, la neutrophilie et un certain degré de lymphopenie se produisent avec grande régularité, sans altération sensible du numéro total des leucocytes.

L'injection intraperitoneal de Nembutal en doses modérées n'empêche pas les altérations sous référence.

Etant donné que la surrénalectomie empêche l'eosinopenie mais pas les autres altérations, les auteurs pensent qu'il est nécessaire de chercher une autre explication qui diffère de celle de la stimulation surrénale pour la neutrophilie et lymphopenie subséquents aux petites «stimuli».

SUMMARY

The authors studied the hematologic alterations produced by small «stimuli» (taking of blood, intraperitoneal injection of isotonic glucose).

They stated in the Group of rats with which they are working that Eosinopenia, Neutrophilia and a certain degree of Lymphopenia are produced without sensible alteration of the total number of leucocytes.

The intraperitoneal injection of Nembutal in sedative doses does not hinder the alterations referred to above.

Since the adrenalectomy hinders Eosinopenia but not the other alterations, the authors think that for Neutrophilia and Lymphopenia following small stimuli it is necessary to find another explanation different from that of adrenal stimulation.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Autoren studierten die hematologischen Änderungen, die durch kleine «Stimuli» hervorgerufen wurden (Blutentnahme, intraperitoneale Einspritzung mit Glucose Serum).

Sie stellten fest, dass bei der Gruppe von Ratten, mit denen sie arbeiten, sich mit grosser Regelmässigkeit Eosinopenia, Neutrophilia und ein gewisser Grad von Lymphopenia ohne beachtenswerte Änderung der Gesamtzahl der Leucocytes einstellen.

Die intraperitoneale Einspritzung von Nembutal in gemässigten Dosen verhindert die obenerwähnten Änderungen nicht.

Da die Suprarrenalectomie die Eosinopenia aber nicht die anderen Änderungen verhindert, denken die Autoren, dass es notwendig ist, eine von den suprarrenalen Reizmitteln abweichende Erklärung für die Neutrophilia und Lymphopenia die auf die kleinen «Stimuli» folgen, zu finden.

BIBLIOGRAFIA

1. DALTON, A. J. and SELYE, H. — The blood picture during the alarm reaction, *Folia haematol.* 62: 397, 1939.
2. HOUSSAY, R. H. — Las suprarrenales en la hipoxia y la intoxicación por la histamina. — Trabajo del *Instituto de Biología y Medicina Experimental*. Ed. «El Ateneo». Buenos Aires, 1951.
3. RANDOLPH, T. G. and ROLLINS, J. P. — Eosinophil observations in adenocorticotrophic hormone (ACTH) therapy in *Proceedings of the First Clinical ACTH Conference* (Ed., John R. Mote). Philadelphia, The Blakiston Co., 1950.
4. RECENT, L., HUME, D. M., FORSHAM, P. H. and THORN, G. W. — Effect of epinephrine on the Pituitary Adrenocortical System. *J. Clin. Endocrin.* 10: 187, 1950.
5. SELYE, H. — The General Adaptation Syndrome and the diseases of adaptation. *J. Clin. Endocrin.* 6: 117, 1946.

R. Iriarte Peixoto
Rua Cidade da Horta, 42, 1.º
Lisboa

A. Rosário Dias
Praça João do Rio, 5, 2.º
Lisboa

David Ferreira
Rua Bernardim Ribeiro, 45, 2.º
Lisboa