

Estudos sôbre a anemia produzida em cães por benzoato de estradiol (*)

por

W. O. Cruz, R. Pimenta de Mello e E. M. da Silva

(Com 4 figuras no texto)

A anemia produzida em cães por injeção de substâncias estrogênicas, foi descoberta por Arnold e colaboradores(1), quando no decurso de pesquisas tendentes a verificar possível relação entre o hormônio sexual feminino e as glândulas paratiróides, encontraram, por casualidade, nestes animais submetidos a fortes doses de estrogênicos, o aparecimento de anemia rapidamente mortal.

O mecanismo desta anemia foi interpretado por ação direta do hormônio sôbre a medula óssea, diminuindo a formação de plaquetas e hematias e excitando a produção de leucocitos. Alguns casos foram explicados como provocados por hemorragias abundantes, enquanto outros por destruição intra-orgânica da hemoglobina, evidenciada pelo teor de hemosiderina verificado histologicamente nos órgãos. TYSLOWITZ (2) não vê nas hemorragias abundantes a causa da anemia porque assinala serem as mesmas, em alguns casos, muito escassas. BAREUTHER e SCHABEL (3) assinalam uma ação exclusiva sôbre a trombogênese na medula óssea, sem se referir em especial sôbre a causa da anemia. SCHRAGE (4) escreve: "A doença experimental se apresenta como uma perturbação na função medular de formação sanguínea; há uma reação mieloide, uma anemia de caracter aplástico e uma diatêse hemorrágica que se segue à trombocitopenia". TYSLOWITZ e DIGEMANSE (5), verificaram medula óssea hiperplástica na série branca e paralizada quanto à série vermelha; consideram que a anemia aplástica é produzida diretamente pelas substâncias estrogênicas impedindo a produção de sangue.

De nossas observações em 60 cães ficou evidenciado que quando se administra benzoato de estradiol diariamente em grandes doses (dose total de 0.8 a 4.5 mg. por quilo de corpo) aparecem caracteristicamente os seguintes fenômenos: trombocitopenia, anemia normocrômica, normocítica aguda e acentuada que sobrevem repentinamente após um período preliminar em que

(*) Trabalho da Secção de Hematologia auxiliada por benemerência do dr. Guilherme Guinle.

* Recebido para publicação a 24 de julho de 1944 e dado à publicidade em agosto de 1944.

as cifras hemáticas permanecem normais ou diminuem ligeiramente (fig. 1), disfunção da medula óssea evidenciada pelo aspecto arregenerativo do sangue em tôdas as fases da anemia, hemorragias no tractus intestinal, lesões hemorrágicas observadas à autopsia, principalmente na mucósa intestinal do jejuno, prostração e morte geralmente entre 1 e 3 semanas. Todos os outros fenômenos

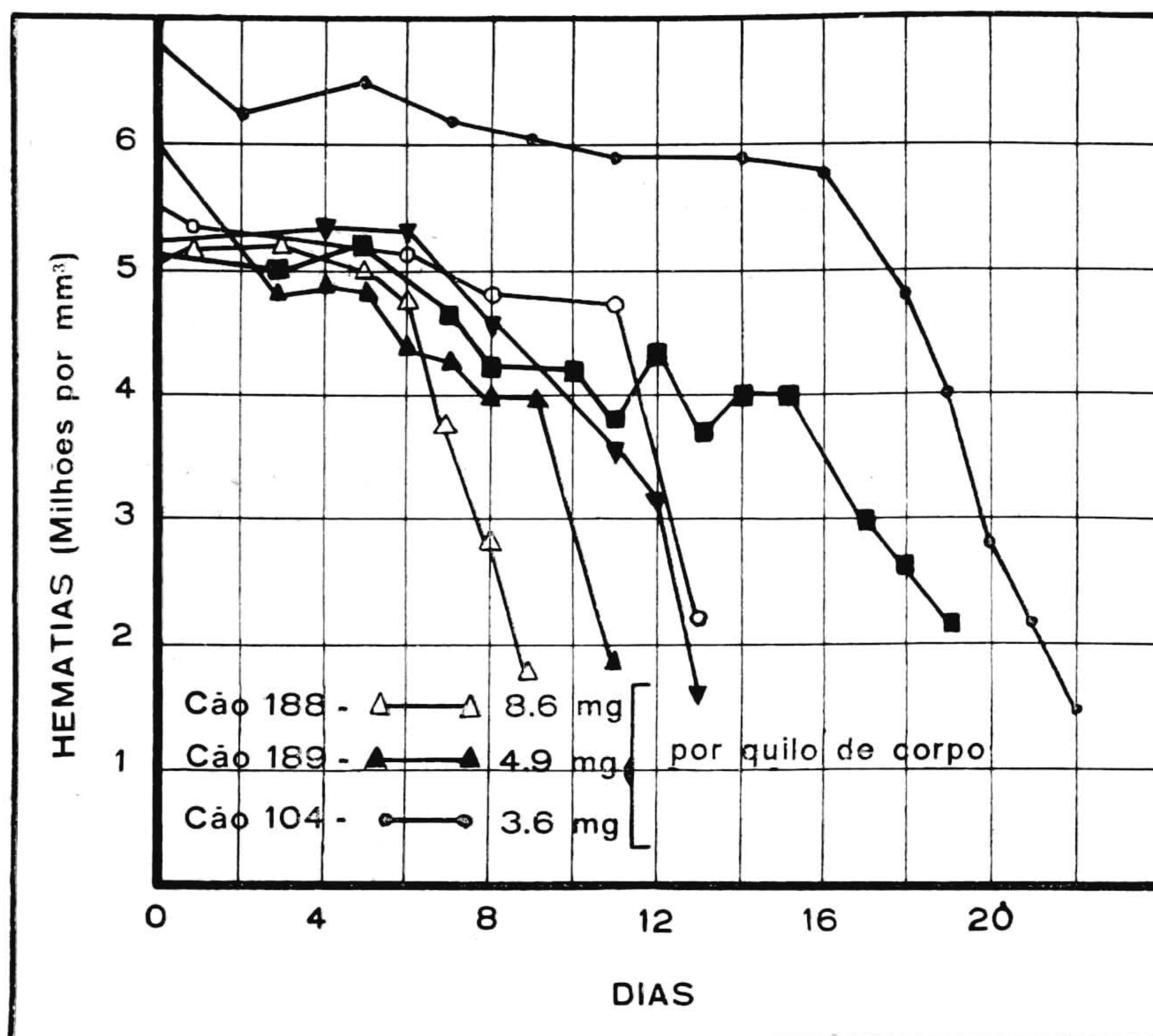


Fig. 1 — Processo anemiante em cães submetidos à fortes doses de benzoato de estradiol.

Cães nos quais foram injetadas sub-cutaneamente doses variáveis de benzoato de estradiol (1.2 a 8.6 mg por quilo de corpo) dissolvidos em óleos vegetais, apresentando o quadro habitualmente encontrado: a um período de latência em que as cifras hemáticas permanecem normais, segue-se uma queda rápida de hemácias, coincidindo com acentuadas hemorragias intestinais. Variações individuais quanto ao tempo necessário ao aparecimento da anemia são bem visíveis nos cães 104, 188 e 189.

descritos na literatura do assunto podem faltar mais ou menos raramente: lesões purpúricas na pele, petequias nos órgãos internos, leucocitose elevada, medula óssea de aspecto pioide, parecendo estes sintomas dependerem do modo de administração, do veículo de dissolução e da variabilidade individual dos cães. Os mais comumente encontrados são as lesões hemorrágicas da pele, pulmão, epicárdio e endocárdio (músculos papilares) (Fig. 1).

O trabalho aqui apresentado, refere-se à experiências realizadas com o fim único de verificar a importância relativa dos seguintes agentes causais da anemia: A) perdas hemáticas por hemorragia; B) destruição hemática intra-orgânica; C) disfunção da medula óssea.

A) — DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA HEMORRAGIA INTESTINAL E DETERMINAÇÃO DA HEMOGLOBINA TOTAL CIRCULANTE NOS ANIMAIS EM PROVA

Métodos: As determinações do volume total de sangue foram executadas pelo método de coloração do plasma empregando o vermelho vital de acordo com a técnica descrita por HEILMEYER (6), usando-se o espectrofotômetro de PULFRICH para medida da intensidade da coloração. De acordo com o trabalho de SMITH, ARNOLD e WHIPPLE (7) o volume total de hemácias calculado na suposição de que o hematócrito do sangue retirado da jugular represente o hematócrito médio do sangue total, dá em 80% dos resultados um valor maior de 28% \pm 8% que o encontrado pelo método de perfusão segundo técnica de WELCKER (8). Recentemente HAHN, BALFOUR, ROSS, BALE e WHIPPLE (9) encontraram semelhante resultado empregando o método de determinação de volume de sangue por injeções de hemácias contendo ferro radioativo. Baseados nestes trabalhos corrigimos o volume total de hemácias diminuindo de 28% o resultado indicado pelo método corante. Como nenhum trabalho neste sentido fôra feito em cães anêmicos, preferimos determinar o segundo volume de sangue, sacrificando o animal por perfusão sanguínea além de prévia determinação pelo método corante. A hemoglobina total, perdida pelos animais foi calculada subtraindo-se da hemoglobina total circulante encontrada pelo método corante (corrigida de menos 28%) a hemoglobina total encontrada no fim da prova pelo método da perfusão mais a hemoglobina retirada diariamente para as provas hematológicas.

A determinação da quantidade de hemoglobina eliminada nas fezes pelas hemorragias intestinais foi obtida pela técnica de WÚ (10), usando da ação peroxidásica da hemoglobina em presença de água oxigenada e benzidina. Uma porção de fezes frescas é pesada e colocada em grál com ácido acético glacial, repetidas vezes até completa extração da hematina. Após centrifugação toma-se um determinado volume do sobrenadante, adicionando 2 cm³. de solução a 0,5% de benzidina em uma parte de ácido acético glacial para 9 partes de álcool absoluto e 4 cm³. de água oxigenada a 0.6 volumes % segundo aconselha BING e BAKER (11). A cor desenvolve-se em 100 minutos, sendo a leitura feita no espectrofotômetro de PULFRICH. O resultado é obtido

por comparação à uma curva padrão conseguida com resultados provenientes de mistura de fêzes a quantidades conhecidas de sangue. Segundo HAURWITZ (12), o poder peroxidásico da hemoglobina determinado por este método diminui na passagem pelo intestino pela ação dos sucos digestivos; além disso nas fêzes normais existem substâncias de origem vegetal com poder peroxidásico. Considerando este fato tivemos de padronizar os cães em experiência, eliminando de início por vermífugos repetidos todos os helmintos capazes de produzir pequenas hemorragias e administrando em seguida, por sonda estomacal uma quantidade conhecida de sangue (tabela 1), recuperando nas fêzes cerca de 85% da hemoglobina ingerida. O fator da correção encontrado nesta prova ($K = 1.16$) é, em ordem de grandeza, semelhante ao encontrado por HAURWITZ (12), incubando "in vitro" durante certo tempo na estufa, sangue e sucos digestivos ($K = 1.33$).

TABELA 1

RECUPERAÇÃO DE SANGUE INTRODUZIDO POR SONDA ESTOMACAL					
CÃO	DIAS DE PROVA	HEMOGLOBINA INTODUZIDA (g)	HEMOGLOBINA RECUPERADA NAS FEZES (g)	PERCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO	FATOR DE CORREÇÃO
254.....	3	12	10.8	90.0	1.11
257.....	3	22	18.2	82.7	1.21
250.....	3	40	34.3	85.7	1.17
				Média 86.0	Média 1.16

Usamos para esta prova 9 cães (tabela 2) nos quais administramos subcutâneamente benzoato de estradiol na dose de 0.1 mg. por quilo de corpo, dissolvido em óleo de patauá (óleo muito semelhante ao óleo de oliva). O peso dos animais variou entre 5.2 e 13.5 quilos; a hemoglobina circulante entre 41 e 141 g. As fêzes eram colhidas diariamente e imediatamente dosada a hematina. Quando os cães se apresentavam clinicamente doentes, com anemia muito acentuada, uma segunda determinação do volume total de sangue era feita pelo método do vermelho vital e o animal sacrificado por sangria a branco seguida de perfusão segundo a técnica de WELCKER (8). O material da luz do intestino era colhido para determinação de hematina. Foram assim obtidas as quantidades de hemoglobina desaparecidas da circulação e a quantidade de hematina e hemoglobina eliminada nas fêzes durante todo o período de prova.

A recuperação variou de 30 a 70% da hemoglobina circulante perdida, pela dosagem semi-quantitativa da hematina nas fêzes pelo método da ben-

zidina, (Tabela 2). Este resultado mostra que a anemia se processa em parte pelo extravasamento do sangue pela luz do intestino. Considerando hemorragias observadas nos órgãos e as perdas durante a colheita de fezes nas gaiolas de metabolismo, se poderá afirmar que a hemorragia é fator importante na formação do quadro anêmico.

TABELA 2

CÃO	PESO (quilos)	DIAS DE EXPERIENCIA	HEMOGLOBINA CIRCULANTE (g)		PERDA DE HEMOGLOBINA CIRCULANTE (g)	HEMOGLOBINA RETIRADA POR SANGRIA (g)	PERDA DE HEMOGLOBINA NA ANEMIA (g)	HEMOGLOBINA RECUPE-RADA (g)	PERCENTAGEM DE RECUPE-RAÇÃO
			* Antes da próva	** Depois da próva					
260....	5.3	20	41	10	31	7	24	12	50
252....	7.6	29	58	20	38	11	27	13	48
257....	8.0	15	66	22	44	7	37	17	46
254....	9.1	15	93	25	68	8	60	22	37
256....	9.7	17	80	18	62	7	55	28	51
251....	10.5	29	80	48	32	11	21	17	81
259....	10.6	15	83	17	66	6	60	17	29
262....	12.2	11	97	25	72	6	66	47	71
258....	13.4	15	122	27	95	7	88	34	39

* Determinada pelo método vermelho vital com correção de menos 28% segundo 80% dos resultados apresentados no trabalho de Smith, Arnold e Whipple.

** Determinada pelo método de perfusão segundo Welcker.

B) — DETERMINAÇÃO DA DESTRUÇÃO HEMATICA INTRA-ORGÂNICA

Determinação da destruição hemática intra-orgânica foi obtida pelo estudo de três cães nos quais se praticou uma fístula colicisto-renal segundo a técnica de KAPSINOW, ENGLE e HARVEY (18). O cuidado com os cães e o

TABELA 3

ELIMINAÇÃO DE PIGMENTOS BILIARES PELA URINA EM CÃES COM FISTULA COLICISTO-RENAL					
CÃO	SUBSTANCIA INJETADA	ANTES DA PROVA		DEPOIS DA PROVA	
		Dias	Média de bilirubina por dia (mg)	Dias	Média de bilirubina por dia (mg)
163	Benzoato de estradiol..... (5 mg diário)	10	117	13	63
171	Benzoato de estradiol..... (1 mg diário)	16	55	12	59
172	Acetilfenilhidrazina..... (43 mg por quilo de corpo)	7	93	19	371

método para determinação dos pigmentos biliares na urina foi descrito detalhadamente em publicações prévias (14,15).

Como mostra a tabela 3, os cães injetados com benzoato de estradiol excretaram igual ou menor quantidade diária de bilirubina que as observadas no período controle. Um terceiro cão foi injetado com acetilfenilhidrazina (43 mg por quilo de corpo), substância que ocasiona grave anemia por

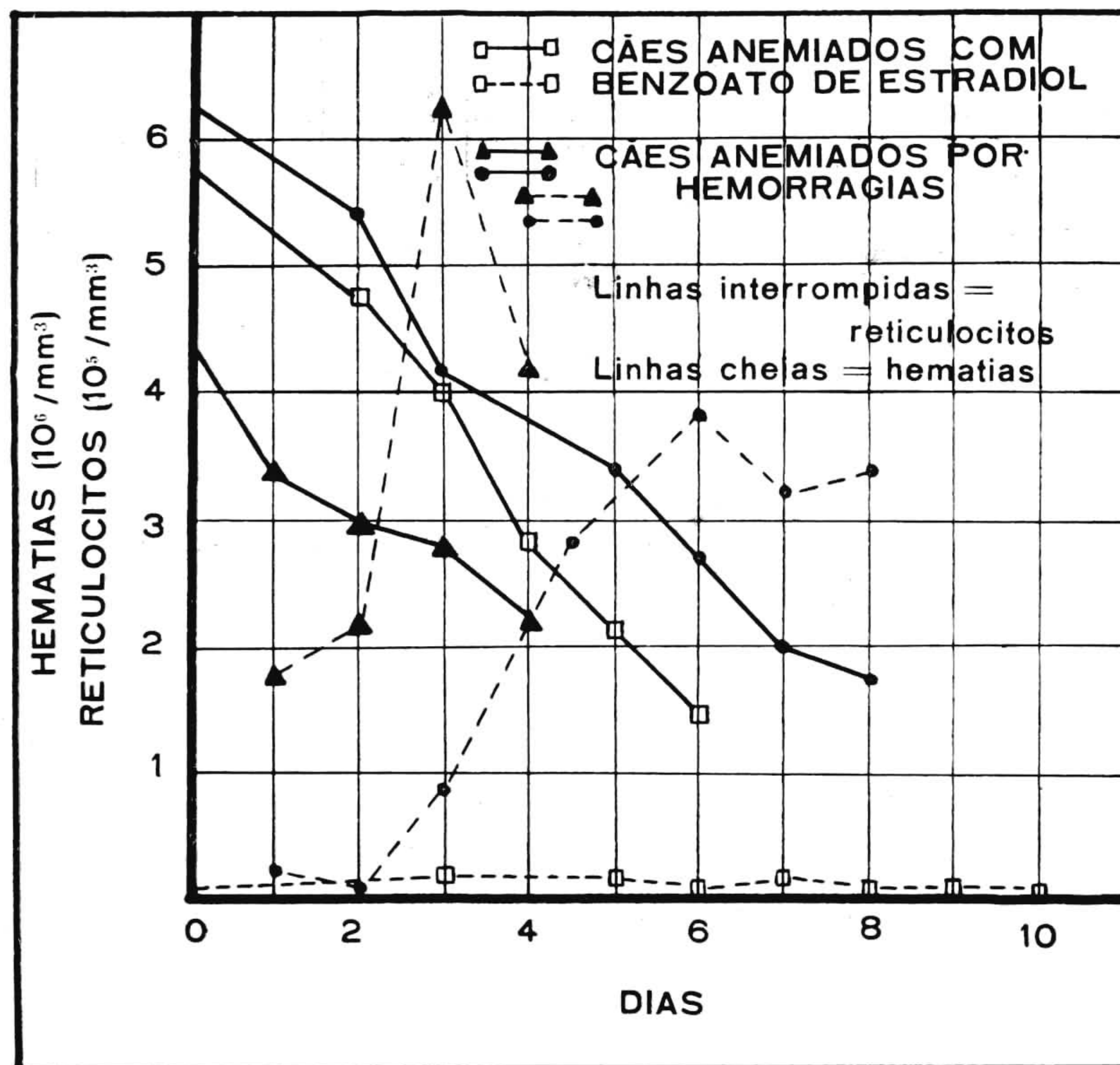


Fig. 2 — Influência paralizante do benzoato de estradiol sobre a medula óssea. Hemorragias praticadas em dois cães (Cães 110 e 113) de tal modo a se produzir queda de hematias comparavel à observada no período crítico da anemia por estradiol, provocaram intensos fenomenos regenerativos (reticulocitose, representada pelas linhas interrompidas elevadas) em contraste com a aplasia verificada nos cães submetidos a fortes doses de estrogenico (linha interrompida rasteira).

destruição intra-orgânica, para servir como controle dos resultados acima. Este cão excretou pigmentos em quantidade quatro vezes maior que a do período controle.

Em conclusão verifica-se que não há, por este método, a mais leve destruição intra-orgânica quando se administra grandes doses de benzoato de estradiol em cães.

c) — DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE DISFUNÇÃO DA MEDULA ÓSSEA

Para determinar o estado de disfunção da medula óssea praticamos duas sortes de experiências.

a) Para determinar se grandes hemorragias na luz do intestino, como se observa em cães com grandes doses de estradiol, teria efeito paralizador sobre a capacidade regenerativa da medula óssea.

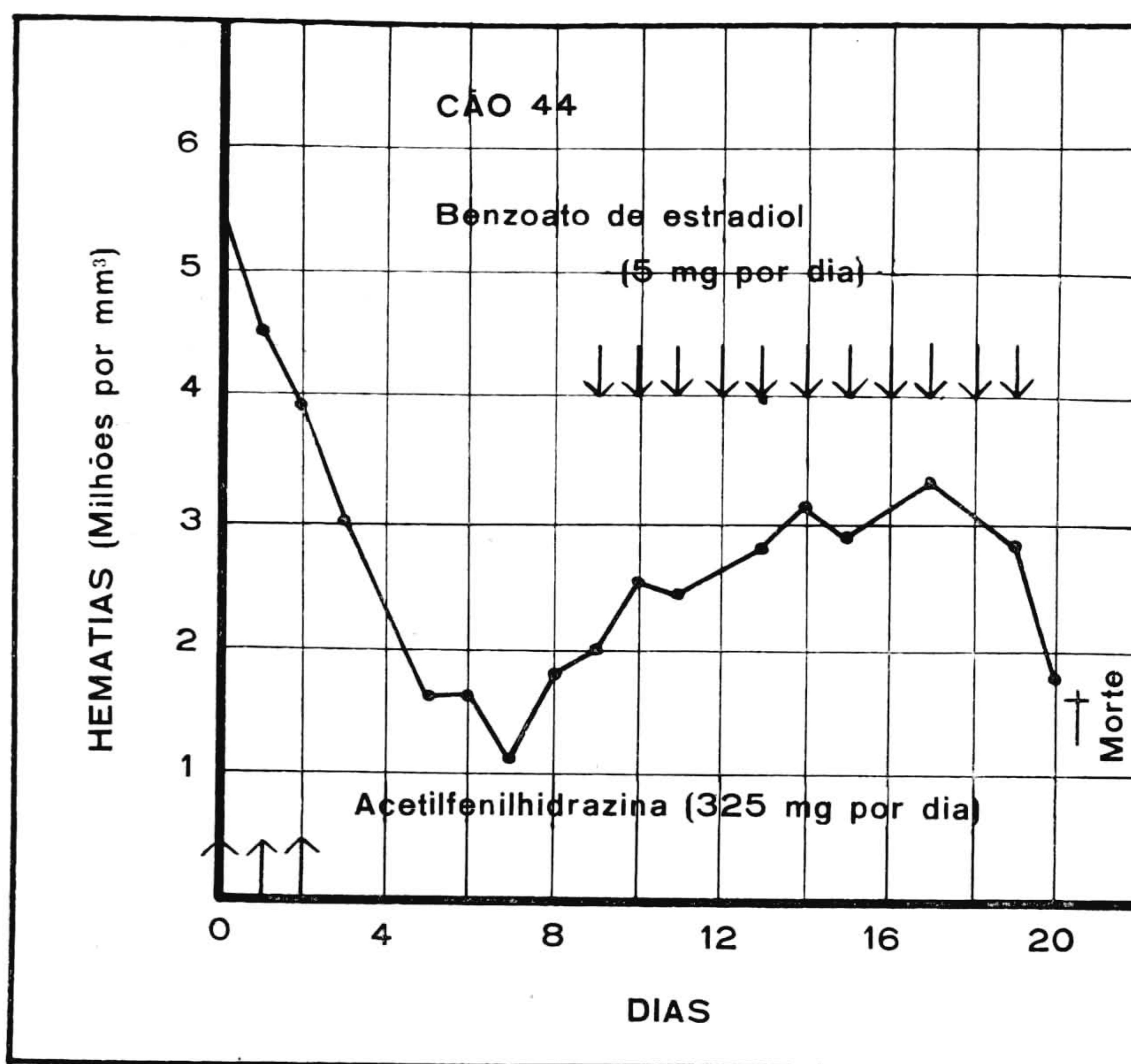


Fig. 3

Sangramos dois cães (Cães 110 e 113) retirando diariamente uma quantidade tal de sangue, de modo a se processar uma anemia tão rápida quanto aquela provocada com a administração do estrogênico. Em seguida era este mesmo sangue administrado por sonda estomacal. (Fig. 2).

O exame da figura 2 demonstra uma intensa regeneração nestes animais, evidenciada por alta cifra de reticulocitos, contrastando com o diminuto número de reticulocitos observado nos cães submetidos aos estrogênicos. Ficou

visto por estas experiências não ser a presença de grandes quantidades de sangue no intestino a causa da insuficiência de regeneração na anemia pelo estradiol.

b) Para determinar qual a ação do estradiol durante um período de intensa regeneração hemática provocada por substância destruidora de hematias.

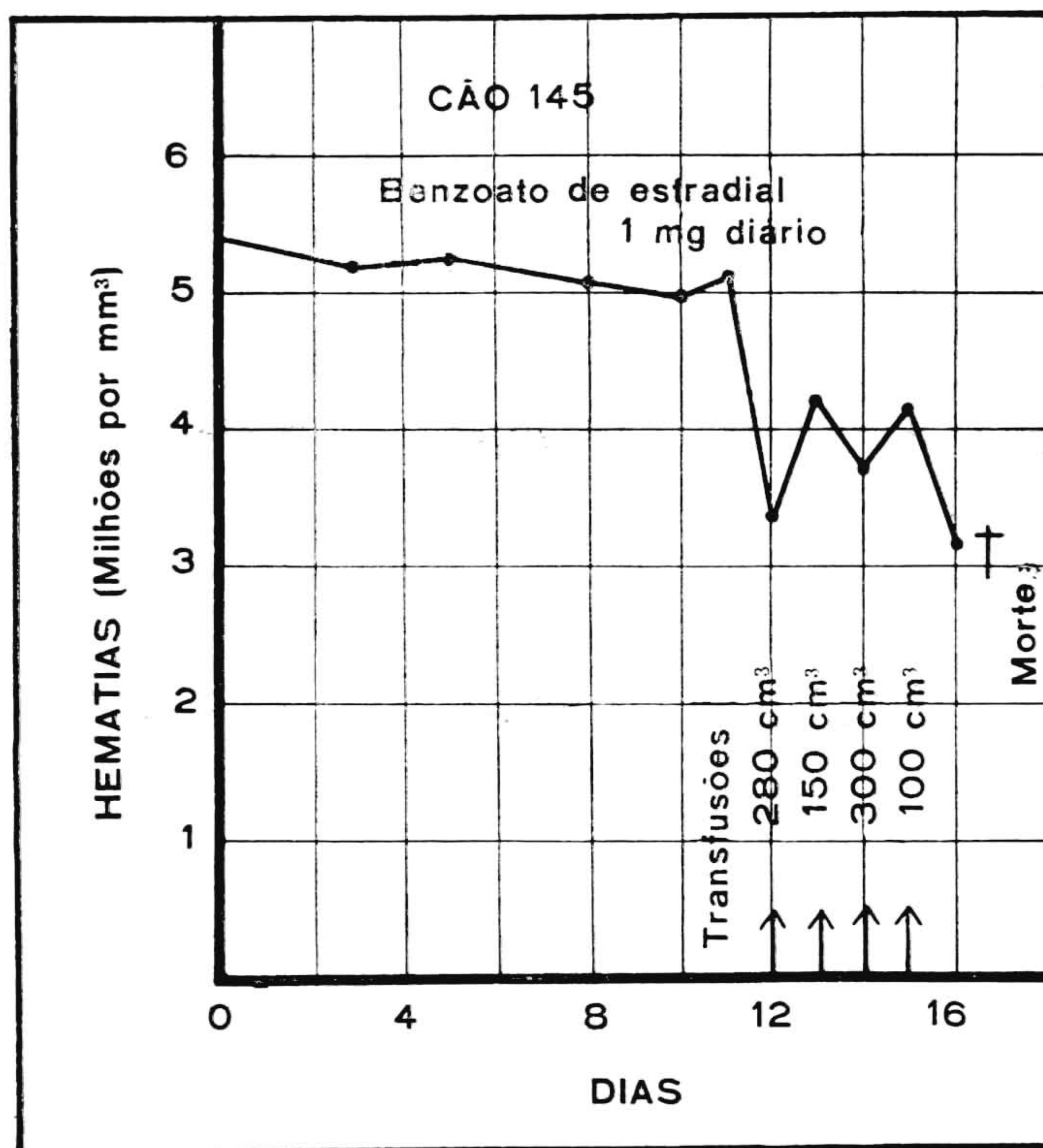


Fig. 4

Injetamos acetilfenilhidrazina (75 mg por quilo do corpo, dividido em três dias) e durante o período regenerativo 5 mg diários de benzoato de estradiol (Figura 3). Este animal mostrou uma ativa regeneração expressa por um aumento de 2 milhões de hemácias por mm³ em 9 dias, até que sobrevieram abundantes hemorragias intestinais, com conseqüente anemia aguda e morte. A ação do estradiol parece ser a de impedir o início dos processos de regeneração, não tendo apreciável influência durante um período de regeneração já em andamento.

A importância das lesões da mucosa intestinal e conseqüente hemorragia, é bem vista neste animal, pois o extravasamento de sangue foi de tal violência

que a medula em plena regeneração, não conseguiu impedir a rápida queda das cifras hemáticas (Figura 3). Que estas lesões intestinais representam uma verdadeira abertura no sistema circulatório, parece mostrar o fato de que repetidas e abundantes transfusões de sangue administradas no período de hemorragias intestinais (Fig. 4, cão 143), não mantem a sobrevivência senão por poucos dias.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

A anemia que se processa em cães quando se administra grandes doses de benzoato de estradiol, não parece ser produzida por processos conhecidos de destruição intra-orgânica. Esta substância paraliza os fenômenos de regeneração hemática, parece interferir por processo desconhecido na fisiologia sanguínea, produz graves lesões na rede circulatória que irriga a mucosa do intestino, principalmente jejuno, ocasionando nesse órgão extravasamento variável de sangue, fator seguramente coadjuvante na formação da anemia.

SUMMARY

The characteristic findings in the pathological picture presented by 60 dogs when administered large doses of estradiol benzoate subcutaneously in an oil vehicle are: thrombocytopenia, aplastic anemia, which follows a brief latent period, intestinal tract haemorrhages, haemorrhagic lesions occurring principally in the mucosa of the jejunum, followed by prostration and death generally within 1 to 3 weeks. Irregular findings are leucocytosis, purpuric skin lesions, visceral haemorrhages and pyoid bone marrow.

The total circulating hemoglobin was determined in 9 dogs before and after the anemia was established, thus verifying the total hemoglobin loss. The blood loss through intestinal haemorrhages during the observation period was determined by benzidine test. The quantity of hemoglobin recovered from the feces in the form of hematin varied between 30 and 70% of the total hemoglobin which disappeared from the circulation.

In order to ascertain the degree of intra-organic blood destruction the bilirubin eliminated in the urine of dogs with gall-bladder renal type of fistula was determined daily and these values compared with those obtained for normal animals. The blood destruction as measured by this method was practically nil.

An attempt was made to determine whether the presence of large quantities of blood in the intestine might exert a paralyzing effect on the regene-

ration of hemoglobin in dogs rendered anemic through haemorrhage. Negative results were obtained. Estradiol benzoate administered to dogs during the period of hematic regeneration which occurs in the recovery stage of anemia produced by acetyl-phenyl hydrazine demonstrated that the estradiol interferes but little when the regenerative processes have already begun.

Repeated transfusions given during the stage of acute anemia practically do not affect the period of survival.

The authors conclude that the main action of estradiol benzoate on the blood physiology of dogs is still obscure. The anemia is not produced by the intra-organic destruction of hemoglobin by known processes and doubtless the blood loss through the intestinal haemorrhages constitutes an important accessory factor in the mechanism of bringing out this anemia.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ARNOLD, O., HOLZ, F. & MARX, H..
1936. *Naturwissenschaften*, 24: 314.
- 2 — TYSLOWITZ, R..
1938. *Acta Brevia Neerl.*, 8: 183.
- 3 — BAREUTHER, A. & SCHABBEL, E..
1937. *Klin. Wochr.*, 16: 1 677.
- 4 — SCHRADER, W..
1938. *Fol. Hemat.*, 61: 145.
- 5 — TYSLOWITZ, R. & DIGEMANSE, E..
1941. *Endocrinology*, 29: 817.
- 6 — HEILMEYER, L..
1929. *Biochem. Z.*, 212: 430.
- 7 — SMITH, H. P., ARNOLD, H. R. & WHIPPLE, G. H..
1921. *Am. Jour. Physiol.*, 56: 336.
- 8 — WELCKER, H..
1854. *Vierteljahrschrift f. Praktische Heilkunde*, 46: 11.
- 9 — HAHN, P. F., BALFOUR, W. M., ROSS, J. F., BALE, W. F. & WHIPPLE, G. H..
1941. *Science*, 93: 87.
- 10 — WU, H..
1923. *J. Biochem., Japan*, 2: 189.

- 11 — BING, F. & BAKER, R.
1931. Jour. Biol. Chem., 92: 589.
- 12 — HAUROWITZ, F.
1931. Archiv fur Verdauungskrankheiten, 50: 33.
- 13 — KAPSINOW, R., ENGLE, L. P. & HARVEY, S. C.
1924. Surg. Gynec. & Obst. 39: 62.
- 14 — KNUTI, R. E., HAWKINS, W. B. & WHIPPLE, G. H.
1935. J. Exp. Med., 61: 127.
- 15 — CRUZ, W. O., HAWKINS, W. B. & WHIPPLE, G. H.
1942. Am. J. M. Sci. 203: 848.
-