

ACÇÃO DOS EXTRATOS DE CORTEX SUPRARRENAL SOBRE O QUADRO LEUCOCITÁRIO E SOBRE O TEOR DE ANTICORPOS DO SANGUE PERIFÉRICO DO COELHO

SYLVIO SOARES DE ALMEIDA
JOSÉ ROBERTO CARNEIRO NOVAES
JOSÉ LOPES NETTO

Médicos do Inst. Adolfo Lutz

A relativa constância na composição quantitativa dos elementos celulares do sangue periférico, tem levado à suposição de uma possível regulação endócrina da hematopoiese. Os argumentos de ordem experimental e clínica em que se baseava essa suposição eram passíveis de sérias críticas, mas de alguns anos para cá, novas perspectivas foram abertas com a demonstração de que o baço exerce uma acção de natureza hormonal sobre a medula óssea, e de que a cortex da suprarenal atua sobre os órgãos linfopoiéticos.

Em 1943 Dougherty e White¹ verificaram que a administração a camundongos de hormônio córtico-trópico hipofisário puro, determinava uma redução apreciável do volume dos órgãos linfáticos; posteriormente² os mesmos autores demonstraram, em camundongos e ratos, que a administração sub-cutânea de uma única dose de hormônio corticotrópico hipofisário ocasionava notáveis alterações na distribuição quantitativa dos leucócitos do sangue circulante. Essas alterações, que já eram evidentes ao fim de três horas e que atingiam o máximo ao fim de nove horas após a injeção do hormônio, consistiam essencialmente em: 1.º diminuição do número total de leucócitos; 2.º diminuição do número total de linfócitos; 3.º aumento do número total de polimorfonucleares. A acção do hormônio córtico-trópico era exercida através das cápsulas suprarenaes, pois não se manifestava nos animais previamente adrenalectomizados; por outro lado, os mesmos efeitos do hormônio-

hipofisário eram obtidos com a injeção de extratos aquosos da cortex suprarenal em animais normais ou adrenalectomizados. Estudando diversos hormônios esteroides da cortex, *Dougherty* e *White*³ demonstraram que somente os compostos dotados de atividade neoglicogênica (hormônios do grupo S, com oxigênio em C₁₁) eram capazes de produzir as alterações hematológicas quantitativas obtidas com o hormônio córtico-trópico hipofisário ou com os extratos aquosos ou oleosos da cortex suprarenal. Verificaram além disso que, dos elementos celulares do sangue periférico, apenas os linfócitos eram controlados pelo mecanismo hormonal hipofisário-cortical, sendo inespecíficas as modificações numéricas dos polinucleares pois ocorriam também em animais adrenalectomizados nos quais eram injetadas substâncias diversas.

A existência destes efeitos hormoniais sobre os leucócitos do sangue circulante tem sido confirmada, não somente nos animais de laboratório,^{4, 5, 6} mas recentemente também no homem.⁷

Estudando o aspecto histológico dos órgãos linfopoieticos (ganglios, baço, timo e placas de Peyer) nos animais tratados com hormônio córtico-trópico hipofisário ou com extratos corticais, *White* e *Dougherty*⁸ e *Dougherty* e *White*⁹ observaram alterações degenerativas evidentes nas células linfáticas, que sugeriam uma dissolução citoplasmática, e que se associavam a um aumento das proteínas do sêro. Baseados nestas observações, e também no conhecimento de que os linfócitos do sangue circulante intervêm na produção de anticorpos,¹⁰ *Dougherty* e col.^{11, 12} e *Chase* e col.¹² estudaram a produção de anticorpos em animais de laboratório submetidos a tratamento com extratos da cortex suprarenal. Estes AA. verificaram que a administração dos extratos corticais em doses repetidas, durante o período de imunização, favorecia a produção de anticorpos. Verificaram também que em animais hiperimunizados, o teor de anticorpos do sêro — que não mais podia ser influenciado por repetidas injeções de antígeno — era suscetível de novos aumentos pela administração de uma única injeção de extrato cortical; além disso, uma única dose dos hormônios corticais era capaz de condicionar o aparecimento de uma reação anamnésica nos animais anteriormente imunizados, mas cujo sêro não mais revelava a presença de anticorpos. Estas pesquisas que estabeleciam um papel destacado da cortex suprarenal nos fenô-

menos imunitários, através da ação dos corticosteroides sobre a liberação dos anticorpos linfocitários, não têm sido confirmadas por outros autores.

O presente trabalho foi realizado com a finalidade de observar as alterações quantitativas dos leucócitos sanguíneos e as possíveis modificações no teor de anticorpos do soro, produzidas no coelho pela administração de extratos de cortex suprarenal.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 11 coelhos machos, com peso aproximado de 2,5 quilos, da criação do Instituto Adolfo Lutz. Antecedendo o período propriamente experimental foram realizadas em cada coelho 2 ou 3 contagens globais e específicas em dias sucessivos, de modo a afastar a possibilidade de que as modificações numéricas, por ventura encontradas, pudessem depender de modificações quantitativas, que é sabido ocorrem espontaneamente nos coelhos.¹⁴ Entre 8 e 9 horas da manhã procedeu-se em cada animal a uma contagem global e a feitura de esfregaços para a contagem diferencial. O sangue foi obtido da veia marginal da orelha, evitando-se condições de estase. Uma vez retirado o material necessário, injetava-se por via sub-cutânea 10 centímetros cúbicos de extrato aquoso de cortex suprarenal; foram utilizados dois preparados comerciais,* contendo de 50 a 65 unidades-cão por centímetro cúbico. Decorridas aproximadamente 7 horas após a injeção do extrato, repetiam-se as contagens global e específica; no caso dos animais imunizados retirava-se também sangue para aglutinação e avaliação do teor de anticorpos do soro. As contagens foram realizadas segundo os métodos usuais em hematimetria; os esfregaços foram efetuados em lâmina e corados pelo Wright, sendo contadas 200 células. Para avaliação dos efeitos dos hormônios corticosteroides sobre a produção de anticorpos foram imunizados 7 coelhos, tendo sido empregados os seguintes antígenos: *Shigella paradysenteriae*, tipo Z (3 coelhos); *Sh. paradysenteriae*, tipo Boyd D19 (1 coelho); *Salmonella oranienburg* (1 coelho); antígeno

(*) Os produtos empregados foram fornecidos pelos laboratórios Laborerápica S. A., por intermédio do Sr. Álvaro O. A. Lima, e Parke, Davis & Cia., a quem agradecemos.

somático de salmonela (1 coelho); antígeno flagelar de salmonela (1 coelho). Os animais foram imunizados de acôrdo com os processos habitualmente usados no preparo de sôros aglutinantes. Não se procurou obter um título máximo, de modo que as aglutinações foram suspensas assim que foi verificada a existência de títulos habitualmente considerados satisfatórios para os sôros aglutinantes diagnósticos; os animais foram então conservados no laboratório até desaparecimento ou redução apreciável do teôr de anticórpos do sôro, o que foi determinado por aglutinações repetidas periòdicamente, em intervalos de duração variável (algumas semanas a alguns mêses). As aglutinações foram feitas em tubo, pelo processo habitual das diluições sucessivas em múltiplo de 2; as leituras foram efetuadas a olho nú, após 24 horas na estufa a 56°.

RESULTADOS

As modificações do quadro leucocitário do coelho, determinadas pela injeção sub-cutânea de 10 cc de extrato aquoso de cortex suprarenal, estão representadas no quadro 1. O número total dos leucócitos não sofreu alterações dignas de nota em 3 animais (n.^{os} 5, 7 e 9); nos 8 restantes houve modificações significativas, representadas por aumento dos glóbulos brancos em 7 animais e por diminuição em 1 (n.^o 4). Independentemente do sentido da variação do número total de leucócitos sempre houve aumentos dos neutrófilos (pseudo-eosinófilos), compreendido entre mais 17% e mais 398%, e diminuição dos linfócitos, que variou desde o mínimo de — 18% até o máximo de — 82%. O número de eosinófilos não se alterou em 7 animais; nos 4 restantes houve redução de 100%. Os basófilos e os monócitos, ao contrário dos outros três tipos celulares acima referidos não mostraram modificações com tendência constante para um determinado sentido, havendo variações muito amplas tanto para mais como para menos, em relação ao número anterior à injeção do extrato.

O quadro 2 mostra os resultados das aglutinações realizadas com os sôros dos animais previamente imunizados e submetidos a uma única injeção de extrato cortical.

QUADRO I

Coelhos	Cont. global	Neutrófilos		Eosinófilos		Basófilos		Linfócitos		Monócitos		% de modificação		
		%	Global	%	Global	%	Global	%	Global	%	Global	Neutrófilos	Eosinófilos	Linfócitos
1	8500 *	34,5	2932	0	0	1,0	85	63,5	5397	1,0	85	+ 339	0	- 19
	17500 **	73,5	12899	0	0	0	0	25,0	4387	1,5	263			
2	10500	47,0	4935	0	0	0,5	52	50,5	5302	2,0	210	+ 79	0	- 18
	13500	65,5	8842	0	0	0,5	67	32,5	4387	1,5	202			
3	11200	53,0	5939	0	0	2,0	224	42,5	4760	2,5	280	+ 94	0	- 47
	14500	79,5	11527	0	0	1,5	217	17,5	2537	1,5	217			
4	22300	30,5	6954	0	0	0	0	66,5	15162	3,0	684	+ 17	0	- 82
	11050	74,0	8177	0	0	0,5	55	25,5	2817	0,5	55			
5	11300	48,0	5424	0,5	56	4,5	508	46,5	5254	0,5	56	+ 55	- 100	- 61
	11450	73,5	8415	0	0	6,5	744	18,0	2061	2,0	229			
6	6850	60,5	4144	0	0	2,5	171	32,0	2192	5,0	342	+ 74	0	- 31
	9000	80,5	7245	0	0	0,5	45	17,0	1530	2,0	180			
7	13900	51,0	7089	0	0	1,0	139	46,0	6394	2,0	278	+ 73	0	- 76
	14400	85,5	12312	0	0	2,5	360	11,0	1584	1,0	144			
8	7900	47,5	3752	1,0	79	2,0	158	49,0	3871	0,5	39	+ 245	- 100	- 33
	16400	79,0	12956	0	0	3,5	574	16,0	2024	1,5	246			
9	11400	55,0	6270	0,5	57	0,5	57	44,0	5016	0	0	+ 33	- 100	- 54
	11000	76,0	8360	0	0	0	0	21,0	2310	3,0	330			
10	16750	57,0	9547	0	0	1,0	167	41,0	6867	1,0	167	+ 68	0	- 40
	20700	77,0	16042	0	0	1,5	310	20,0	4140	1,0	207			
11	6700	20,0	1340	1,5	100	1,5	100	76,5	5125	0,5	33	+ 398	- 100	- 17
	11050	60,5	6685	0	0	1,0	110	38,5	4254	0,0	0			

* - contagem inicial

** contagem 7 horas após a administração do extrato cortical

QUADRO II

COELHOS	TÍTULO ANTERIOR		Título posterior	Antígeno
	Título obtido	Título presente		
1	1/12500	1/6400	1/6400	Sh. paradysenteriae tipo Z
2	1/12800	1/3200	1/3200	Sh. paradysenteriae tipo Z
3	1/3200	1/200	1/400	Salmonella Cranienburg
8	1/12800	1/1600	1/3200	Sh. paradysenteriae tipo Z
9	1/2600	0	0	Salmonella "O"
10	1/3200	0	1/200	Salmonella "H"
11	1/1600	0	0	Sh. paradysenteriae tipo Boyd D19

Na coluna assinalada "Título anterior" estão representados os títulos obtidos pela imunização, e, a seguir, os títulos presentes no dia da injeção dos extratos da córtex; a coluna "Título posterior" refere-se aos valores encontrados 7 horas após a administração dos corticosteróides. Verifica-se que em nenhum dos animais houve aumento do título até os valores obtidos no período final das imunizações. Relativamente aos títulos existentes no dia da injeção dos extratos não houve nenhuma alteração em 4 coelhos (ns. 1, 2, 9, 11); nos 3 restantes (ns. 3, 8 e 10) notam-se elevações discretas.

DISCUSSÃO

Os resultados reproduzidos no quadro I confirmam integralmente as afirmativas de outros autores relativamente à ação dos extratos da cortex suprarenal sobre o quadro leucocitário periférico. As alterações numéricas encontradas por nós, a saber: aumento do número dos neutrófilos e diminuição do número dos linfócitos, são inteiramente comparáveis às referidas na literatura; a constância e intensidade destas modificações não deixam dúvidas quanto à sua realidade. Relativamente ao número total dos leucócitos, a alteração mais frequente consistiu em uma leucocitose, que se manifestou em 7 dos 8 animais que mostraram modificações significativas. A ocorrência pouco frequente de uma leucopenia no coelho, ao contrário do que tem sido verificado no camundongo e no rato, deve ser atribuída às diferenças que existem normalmente nas proporções relativas dos granulócitos e dos linfócitos nessas espécies animais.

Recentemente foi demonstrado por Gorman Hills e colaboradores⁷ que o número dos eosinófilos do sangue circulante tam-

bém é controlado pela atividade hormonal hipofisário-cortical; este contrôle parece mesmo ser mais evidente do que o exercido sôbre os linfócitos. Baseados nesta demonstração Thorn e cols.¹⁵ utilizaram a contagem dos eosinófilos do sangue periférico para o diagnóstico da atividade funcional da cortex suprarenal. O método utilizado por nós não se presta para uma apreciação mais exata no que diz respeito às variações quantitativas dos eosinófilos, pois frequentemente estas células não foram encontradas no decorrer das contagens; julgamos justificável, entretanto, ressaltar a sua ausência completa nos 4 animais em que elas existiam anteriormente à injeção dos extratos corticais.

As modificações numéricas encontradas nos basófilos e nos monócitos foram muito variáveis, não sômente no sentido como também na intensidade, contrastando com a uniformidade da resposta observada nos outros três tipos de leucócitos. Esta variabilidade sugere a inexistência de qualquer ação dos corticosteróides sôbre os granulócitos basófilos e sôbre os monócitos do sangue periférico.

As provas de aglutinação realizadas com os sôros dos coelhos prèviamente imunizados, não revelaram nenhuma ação favorecedora dos extratos da cortex suprarenal sôbre a produção de anticorpos, não se confirmando, portanto, as observações anteriores de Dougherty e col.^{11,12} e de Chase e col.¹³ As pequenas elevações nos títulos, observadas em três coelhos devem ser interpretadas como não significativas, pois estão dentro dos limites de êrro inerentes ao método utilizado na feitura das aglutinações. Estes resultados concordam com os obtidos por outros autores^{16,17,18}, os quais, utilizando-se de métodos mais precisos (determinação quantitativa de precipitinas, eletroforese), não puderam demonstrar efeitos atribuíveis aos hormônios corticais, quer no que diz respeito a um aumento na concentração de anticorpos do sôro, quer relativamente a uma elevação na concentração da fração globulina do plasma.

CONCLUSÕES E SUMÁRIO

1. A injeção subcutânea de extratos aquosos da cortex suprarenal produz modificações quantitativas acentuadas na fórmula

leucocitária do coelho, caracterizadas por aumento do número dos granulócitos neutrófilos e por diminuição do número dos linfócitos.

2. O número dos granulócitos basófilos e dos monócitos, não é influenciado de modo evidente pelos hormônios corticais.

3. A administração dos extratos aquosos da cortex suprarrenal a coelhos previamente imunizados não revela nenhum efeito favorecedor dos hormônios corticais sobre a produção de anticorpos.

SUMMARY

The AA. study the effects of adrenal cortical hormones on the blood picture and on the production of antibodies, in the rabbit. The sub-cutaneous injection of 10 ml. of aqueous adrenal cortical extracts produces an increase in the number of neutrophils (pseudo-eosinophils), and a decrease in the number of lymphocytes of the peripheral blood. There was no apparent effect on the production of antibodies, as revealed by the failure of the cortical hormones to increase the titer of agglutinative sera of rabbits previously immunized with bacterial antigens.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — DOUGHERTY, T. F. e WHITE, A. — 1943 — Effect of pituitary adrenotropic hormone on lymphoid tissue. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 53:132-133
- 2 — DOUGHERTY, T. F. e WHITE, A. — 1943 — Influence of adrenal cortical secretion on blood elements. *Science* 98:367-369.
- 3 — DOUGHERTY, T. F. e WHITE, A. 1944 — Influence of hormones on lymphoid tissue structure and function. The role of the pituitary adrenotropic hormone in the regulation of the lymphocytes and other cellular elements of the blood. *Endocrinology* 53:1-14.
- 4 — REINHARDT, W. O., ARON, H., e LI, C.H. — 1944 — Effect of adrenocorticotrophic hormone on leukocyte picture of normal rats and dogs. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 57: 19-21.
- 5 — DOUGHERTY, T. F., e WHITE, A. — 1947 — An evaluation of alterations produced in lymphoid tissue by pituitary-adrenal cortical secretion *J. Lab. & Clin. Med.* 32:584-605.

- 6 — VALENTINE, W. N., CRADDOCK, C. G. e LAWRENCE, S. J. — 1948 — Relation of adrenal cortical hormone to lymphoid tissue and lymphocytes. *Blood*, 3:729-754.
- 7 — GORMAN HILLS, A., FORSHAM, P. H. FINCH, C. A. — 1948 — Changes in circulating leukocytes induced by the administration of pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in man. *Blood*, 3:755-768.
- 8 — WHITE, A. e DOUGHERTY, T. F. — 1944 — Influence of pituitary adrenotrophic hormone on lymphoid tissue structure in relation to serum proteins. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 56:26-27.
- 9 — DOUGHERTY, T. F., e WHITE, A. — 1945 — Functional alterations in lymphoid tissue induced by adrenal cortical secretion. *Am. J. Anat.* 77:81-116.
- 10 — HARRIS, T. N., GRIN, E., MERTENS, E., e EHRICH, W. E. — 1945 — The role of the lymphocyte in antibody formation. *J. Exper. Med.* 81:73-83.
- 11 — DOUGHERTY, T. F., WHITE, A., e CHASE, J. H. — 1944 — Relationship of the effects of adrenal cortical secretion on lymphoid tissue and on antibody titer. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 56:28-29.
- 12 — DOUGHERTY, T. F., CHASE, J. H. e WHITE, A. — 1945 — Pituitary-adrenal cortical control of antibody release from lymphocytes. An explanation of the anamnestic response. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 58:135-140.
- 13 — CHASE, J. H., WHITE, A. e DOUGHERTY, T. F. — 1946 — The enhancement of circulating antibody concentration by adrenal cortical hormones, *J. Immunol.* 52:101-112.
- 14 — CHENG, S. C. — 1930 — Leucocyte counts in rabbits: observations on the influence of various physiological factors and pathologic conditions. *Am. J. Hyg.* 11:449-533.
- 15 — THORN, G. W., FORSHAM, P. H., GARNET PRUNTY, F. T., e GORMAN HILLS, A. — 1948 — A test for adrenal cortical insufficiency. The response to pituitary adrenocorticotrophic hormone. *J. A. M. A.* 137:1005-1009.
- 16 — LI, C. H. e REINHARDT, W. O. — 1947 — Electrophoresis of rat plasma. II. The effect of adrenocorticotrophic hormone. *J. Biol. Chem.* 167:487-493.
- 17 — EISEN, H. N., MAYER, M. M., MOORE, D. H., TARR, R. e STOERK, H. C. — 1947 — Failure of adrenal cortical activity to influence circulating antibodies and gamma globulin. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 65:301-306.
- 18 — HARRIS, S., e HENLE, W. — 1948 — Lymphocitopenia in rabbits following intravenous injection of influenzal virus. *J. Immunol.* 59:9-20.