

## PESQUISAS ENDOCRINOLÓGICAS

---

### 52. Acção das altas doses de estrina sobre a hypophyse in situ ou enxertada na camara anterior do olho do rato

POR

THALES MARTINS

---

O lobo anterior da hypophyse, embora seja a glandula princeps do systema endocrinico, é tambem controlado pelos órgãos subordinados; em vez de motor geral, é elle um *primus inter pares*. Entre outras influencias reguladoras, no sentido de uma inibição do seu funcionamento, é das melhor estudadas a exercida pelas grandulas sexuaes, facto hoje bem estabelecido (Kallas, Martins, Morse, Hohlweg e muitos outros). Assim, as injecções da estrina ou do hormonio testicular deprimem a função gonadotropica da prehypophyse, traduzindo-se por uma involução das gonadas. Hohlweg (1934) pôs em evidencia o facto interessante de que a injecção do hormonio follicular ovarico (estrina), em dose alta, causa alterações histologicas na prehypophyse e um estimulo inicial á sua actividade, de sorte que em animaes infantis pode haver formação de corpos amarellos. Mas isto representa um resultado que se poderia chamar de pharmacologico, por ser obtido, como dissemos, com doses elevadas; corresponde a um "golpe" na hypophyse, que não tem equivalente provavel nas condições physiologicas normaes. Quando esse tratamento intensivo é mantido por longo prazo, a hypophyse entra em hypertrophia consideravel, sem signaes de correspondente hyperfuncção. Desde Hohlweg, que primeiro o demonstrou, tem sido o facto confirmado por innumerous auctores. Alguns, como Cramer e Horning (1936), McEwen, Selye e Collip (1936), Zondek (1936) classificaram de adenomas as formações obtidas; McEwen et al., e Zondek especificaram ainda como chromophobos os typos de tumores assim provocados. Não nos deteremos sobre esta face importantissima do problema, qual a da obtenção de tumores — ou pelo menos, de cousa muito pa-

recida — numa glandula endocrinica, pela introduccão, embora em dose elevada, de uma substancia normalmente presente no organismo.

Passemos a um outro dado, necessario á comprehensão do espirito das experiencias aqui relatadas. E' sabido que, nos animaes castrados, occorrem alterações cytologicas no lobo anterior; no rato e muito provavelmente no homem, dos elementos cellulares constituintes — chromophobos, acidophilos e basophilos — são sobretudo estes ultimos os attingidos, no sentido de augmento do numero e modificações individuaes, apparecendo as chamadas cellulas de castração. O enxerto de gonadas ou as injecções de hormonios sexuaes corrigem esses defeitos.

Conforme foi dito na nota anterior, Hohlweg e Junkmann (1932) enxertaram hypophyses no rim de ratos castrados; as glandulas enxertadas, ao contrario das *in situ*, não demonstraram alterações de castração. Do mesmo modo, uma hypophyse retirada de um rato castrado, e já profundamente modificada, voltava ao "normal", embora fosse mantida no rim de um portador castrado.

Os auctores referidos interpretaram essa experiencia, admittindo a existencia de um centro nervoso, regulador e estimulante da hypophyse: os hormonios gonadaes exerceriam sua acção inhibidora, não directamente sobre a glandula, mas por intermedio de tal centro. Livre desta influencia nervosa estimulante, a prehypophyse, fóra das connexões normaes, não soffreria as modificações cytologicas que são, no fundo, o substracto da sua hyperfuncção.

Os resultados obtidos por Hohlweg e Junkmann estão bem estabelecidos e confirmados, como tambem a existencia de um centro nervoso regulador da hypophyse, segundo decorre de experiencias de numerosos auctores e que no momento não podem ser desenvolvidas. O que queremos discutir é a interpretação proposta. Em primeiro logar, necessario se torna definir bem o que é aspecto "normal" do lobo anterior; no caso, "normal" significa, *a grosso modo*, ausencia da basophilia e das cellulas caracteristicas da castração. Ora, uma hypophyse enxertada não está em condições optimas de meio; nem todos os orgãos são dotados de tal tolerancia. Si o ovario, por exemplo, cresce e funciona normalmente em varios pontos do corpo, o mesmo não succede com o testiculo, que, enxertado no rim ou qualquer região intrabdominal, logo demonstra degeneração de toda a parte seminal. Cousa semelhante poderia succeder á hypophyse; mas, a admittir isso, como explicar, que, justamente em condições anormaes, ella fique "normal", ao passo que a outra, *in situ*, fique alterada? A apparente contradicção ficará, porém, clara si attentarmos para o facto de que a hypophyse de castração é uma hypophyse em hyperfuncção: desde que um nivel supranormal de actividade não possa ser mantido, a glandula não apresentará aquellas anormalidades.

Um dos meios de ataque ao problema seria a verificação dos effeitos da estrina sobre o hypophyse enxertada; a prova da correcção das alterações de

castração ficaria prejudicada pela inexistência destas últimas, mas restaria um outro efeito a indagar: a acção hyperplasiante das doses grandes e repetidas do hormônio follicular, conforme dados já constantes de publicação nossa preliminar (Martins, 1936).

### METHODO

De um estudo comparativo entre o rim e a câmara anterior do olho, esta última séde pareceu-nos a preferível. Primeiro, porque a hypophyse ali se conserva com aspecto histológico muito melhor do que no rim. Segundo, e razão também relevante, porque, como num mostruário, através da córnea transparente, o órgão pode ser visto dia a dia, examinado sob o microscópio binocular, desenhado, photographado, tudo isso em vida do animal, de sorte a tornar a experiência mais instructiva e agradável.

A technica é simples: retirada do rato doador, a glandula é introduzida na extremidade de um tubo metálico, provido de um embolo. Com a faca de Graefe, pratica-se uma pequena incisão, de uns 2 mm., próximo ao limbo corneano, e, introduzindo-se o tubo por esta incisão, recalca-se a hypophyse por meio do embolo. O enxerto permanece inalterado durante meses, ou, e é o caso mais frequente, entra em atrophia.

Em nossas experiências, o hormônio follicular injectado foi o estradiol (ou dihydrofolliculina), sob a forma de ester benzoico (\*), em soluto oleoso. Cada animal recebeu 2 injectões semanaes, variando a quantidade, conforme os casos, de 2.000 a 10.000 unidades internacionaes, por injectão.

### RESULTADOS

A incomparavel vantagem da visibilidade do enxerto permittiu, logo de inicio, a demonstração de um effeito da estrina sobre a hypophyse, e que seria inapreciavel por outro qualquer processo experimental. Já dentro das primeiras 24 horas, observava-se uma notavel *hyperemia*, modificando-se muito apreciavelmente a coloração do órgão, que de amarello pallido passava para roseo ou vermelho, mais ou menos intenso. Dada a rapidez da manifestação, via-se que é um effeito functional, agudo, precedendo as acções morphogenicas. O augmento de tamanho já era perceptivel dentro da 1.<sup>a</sup> semana de tratamento e progredia até chegar ao limite permittido pelo espaço disponivel na câmara anterior. São resultados absolutamente constantes e apparentes em todos os 15 animaes injectados.

---

(\*) *Progynon B.* Agradecemos á Casa Schering Kahlbaum o ter posto á nossa disposição grande quantidade desta substancia.

Eis alguns exemplos dos protocollos:

*Rato 3A* — Enxertado com uma hypophyse de rato em 20-I-36; peso 75 gs.. Castrado em 8-V-36. Até 30-VI-36, o enxerto permaneceu estacionario. A primeira silhueta da Fig. 1 foi desenhada no dia em que se iniciou o tratamento, constituido por 2 injeccões semanaes de 5.000 unidades. Hyperemia no dia seguinte ao da 1.<sup>a</sup> injeccão, e crescimento gradual do enxerto. Na Figura estão representadas as silhuetas no 8.<sup>o</sup>, 49.<sup>o</sup> e 104.<sup>o</sup> dias de tratamento. Nesta ultima phase, a hypophyse enche completamente toda a camara anterior e apresenta varios focos hemorragicos iniciaes na superficie. Necropsia feita 104 dias após inicio do tratamento: total de estrina injectada — 367.300 unidades. Peso corporal — 225 gs.

Hypophyse *in situ* — muito augmentada, pesando 30 mgs.

Peso das 2 suprarenaes — 59 mgs.

" " 2 thyreoides — 8 mgs.

" " 2 vesicuias seminaes — 106,5 mgs.

*Rato 4A* — Macho normal, pesando 74 gs.. Tratamento iniciado seis meses após o enxerto: 8 injeccões em 21 dias, totalizando 55.000 unidades. Hyperemia da hypophyse enxertada, visivel 24 horas após a 1.<sup>a</sup> injeccão. Augmento de tamanho e desenvolvimento progressivo da vascularização. Necropsia 21 dias após o começo do tratamento. Peso corporal — 237 gs.

	Injectado	Testemunha
Peso da hypophyse <i>in situ</i> . . . . .	20 mgs.	7 mgs.
" das suprarenaes . . . . .	72 "	34 "
" " thyreoides . . . . .	11 "	14,5 "
" de 1 testiculo . . . . .	324 "	1109 "
" das vesiculas seminaes e prostata .	541 "	1477 "

*Rato 5A* — Femea, pesando 111 gs. no momento do enxerto. Dois meses e meio depois, inicio do tratamento. Efeitos macroscopicos, seguidos no vivo, analogos aos anteriores. Durante o periodo experimental varios pontos hemorragicos, e mesmo hematomas, appareciam na superficie da glandula. Com o correr do tempo, o animal tornava-se apathico, e parecia mesmo cego, em consequencia da enorme hypertrophia da hypophyse *in situ*, comprimindo os nervos opticos.

37 injeccões, totalizando 500.900 unidades.

Necropsia 131 dias depois de iniciado o tratamento.

- Peso da hypophyse — 305 mgs. Enorme, bossulada, com hemorragias.  
" das 2 suprarenaes — 63 mgs.  
" do ovario direito — 9 mgs.  
" do utero — 864 mgs.

*Rato 2B* — Macho de 80 gs., enxertado com uma hypophyse doada por macho. Um mês depois, tratamento bisemanal com 2 injeções de 10.000 unidades, mantidas durante 139 dias. Total de estrina injectada, 380.000 unidades. Nos ultimos tempos, apresentava perturbações motoras das patas posteriores e estados convulsivos. Peso corporal — 116 mgs.

Peso de 2 suprarenaes — 50 mgs.. Thyreoides — 6 mgs.

Hypophyse *in situ* — 200 mgs.

Testiculos atrophiados.

### EXAME HISTOLOGICO DAS HYPOPHYSES IN SITU E ENXERTADAS

Num e noutro caso, o aspecto do lobo anterior é praticamente o mesmo; caracteriza-se pela grande baixa, quasi desaparecimento, das cellulas chromophilas; as basophilas podem mesmo ser consideradas inexistentes. A textura cellular é constituída por cellulas mal coraveis, semelhantes ás chromophobas normaes, porém maiores do que o habitual. O protoplasma é vacuolado, o nucleo pobre em chromatina. Alem de uma vascularização intensa, ha suffusões sanguineas com infiltração pelo parenchyma. Uma interessante modificação das propriedades tinctoriaes foi observada; esses elementos chromophobos e que tomam mal os corantes habituaes, adquirem pela pyronina uma affinidade maior do a de qualquer dos typos cellulares de hypophyse normal. Assim, coradas pela pyronina-verde methyla, as hypophyses dos injectados com estrina coram-se muito mais intensamente, tomando o protoplasma uma coloração vermelha mais ou menos intensa. Parte nervosa cheia de colloide; cellulas da parte intermedia finamente vacuoladas.

Pelo aspecto e arranjo das cellulas, não se pode deixar de pensar em adenoma chromophobo do lobo anterior, mas no momento não discutiremos este ponto.

Apesar da tremenda hyperplasia da hypophyse, os symptomas geraes são no sentido de uma accentuada hypofunção da glandula, com gonadas atrophiadas, thyreoide de peso reduzido e com alterações histologicas. Apenas as suprarenaes parecem manter um certo nivel funcional.

Ficam, assim, bem dissociados os dois phenomenos — hyperplasia anatomica e depressão funcional.

O augmento ponderal da hypophyse in situ é monstruoso, si compararmos os pesos aqui citados, de 305 e 220 mgs., com os normaes — 7 a 10 mgs..

### DISCUSSÃO

Relativamente ao ponto directamente visado pelas experiencias, podemos dizer que ellas vêm tornar muito plausivel que a acção da estrina sobre a hypophyse seja directa, e não se processe por intermedio do centro regulador.

Alem disso, novos dados são adquiridos para a analyse do mecanismo intimo da influencia do hormonio. Fica bem claro que a acção da estrina consiste em estimular a proliferação das chromophobas, inhibindo ao mesmo tempo a differenciação destas em chromophilas. Ora, desde que os elementos secretores dos hormonios (pelo menos, para a maioria delles) do lobo anterior sejam os chromophilos, segue-se que, controlando-se a differenciação cytologica, está *ipso facto* controlada a actividade endocrinica da glandula.

Voltemos agora á hypophyse em hyperfuncção dos castrados: nella existe sempre a basophilia exaggerada, além das cellulas de castração. Livre do freio que é a gonada, sua differenciação se exaggera. Será isso decorrente de estimulos positivos vindos do centro, ou depende de um rythmo inherente á propria hypophyse?

A resposta a esta questão não pode ser dada por enquanto. A solução resultaria do estudo do comportamento morphologico e funcional de glandula, livre das connexões nervosas, mas em boas condições de meio. A simples transplantação não proporcionaria a eliminção das objecções que anteriormente formulámos.

Antes de terminarmos, convem dizer algumas palavras sobre um problema de ordem pratica, e que terá occorrido a varios leitores. Si a estrina é capaz de induzir na hypophyse alteraçoes de tal monta, perfeitamente pathologicas, e indo mesmo, como querem alguns, até á formação de adenomas, não haverá perigo no emprego clinico do hormonio follicular?

A resposta envolve uma grande responsabilidade, mas não parece que deva ser pela affirmativa.

O criterio ponderal é precario, mas pode dar uma idéa approximada da ordem de grandeza do phenomeno. Tomando a relação de peso e duração da vida, entre o rato e a especie humana, teriamos que 200.000 unidades de estrina, administradas no rato durante 2 meses, correspondem a um tratamento de perto de 50.000.000 de unidades, durante cerca de 4 annos na mulher, con-

dições estas evidentemente fóra dos limites da casuística clinica. Todavia, dada a facilidade com que apparecem em medicina idéas e methodos sem attenção aos principios physiologicos, não é impossivel que venham a surgir processos de tratamento com doses macissas e prolongadas. Neste caso, impõe-se uma attitude de precaução.

### RESUMO

Para verificar si a hypophyse transplantada reage á acção da estrina injectada, numa serie de 15 ratos, machos e femeas, foi feito o enxerto da glandula na camara anterior do olho. O tratamento consistiu em 2 injeccões semanaes de benzoato de estradiol, 2.000 a 10.000 unidades por dose; tempo da duração — de 21 dias a 4 meses. O primeiro effeito visivel no enxerto é uma hyperemia, já perceptivel nas 24 horas que se seguem á 1.<sup>a</sup> injeccão. A hypophyse enxertada cresce, augmenta progressivamente a vascularização e formam-se ás vezes hemorragias e hematomas. Apesar da enorme hyperplasia das 2 hypophyses (a enxertada e a *in situ*), as gonadas e as thyreoides mostram-se atrophiadas. Histologicamente, o lobo anterior de ambas as glandulas é composto de cellulas de typo chromophobo, corando-se mal pelos corantes normaes, mas bem pela pyronina. Os elementos chromophilos, especialmente basophilos, ficam reduzidos ou ausentes. O dado mais importante das experiencias é que, mesmo livre das connexões nervosas normaes, a hypophyse reage á estrina, pelo menos quanto ao effeito hyperplasiante.

### ABSTRACT

In a series of 15 male and female rats the hypophysis was grafted in the anterior chambre of the eye with a view to finding out whether or not the transplanted gland would react to the injection of oestrin. For this purpose, two injections of stradiol benzoate were given in the dosage of 2.000 to 10.000 units each, the treatment lasting from 3 weeks to 4 months.

The first effect on the graft consists in a hyperemia already perceptible 24 hours following the injection. The grafted hypophysis becomes progressively vascularized and sometimes shows hemorrhages and haematomata. In the animals both the gonads and the thyroid present atrophy in spite of the enormous hyperplasia of the two hypophyses (the normal and the grafted ones). Histologically, the anterior lobe of the two hypophyses is composed of chromophobe cells which take poorly the common stains but are easily stained by pyronin; the chromophile cells, particularly the basophile elements, are very reduced or absent.

The most important fact brought about by these experiments is that the hypophysis, even when free from its normal nervous connexions, reacts to oestrin, at least to its hyperplasia-inducing effect.

#### BIBLIOGRAPHIA

- Holweg, W.* — *Klin. Wochschr.* XIII:92.1934.  
*Cramer, W. & Horning, E. S.* — *Lancet* CCXXX:247.1936.  
*McEwen, C. S.; Selye, H. & Collip, J. B.* — *Lancet* CCXXX:775.1936.  
*Zondek, B.* — *Lancet* CCXXX:776.1936.  
*Hohweg, W. & Junkmann, K.* — *Klin. Wochschr.* XI:321.1932.  
*Martins, Th.* — *C. R. Soc. Biologie* CXXIII:699, 702.1936.

(Trabalho da Secção de Physiopathologia Experimental do Instituto Butantan, recebido em dezembro de 1936. Dado á publicidade em maio de 1937).

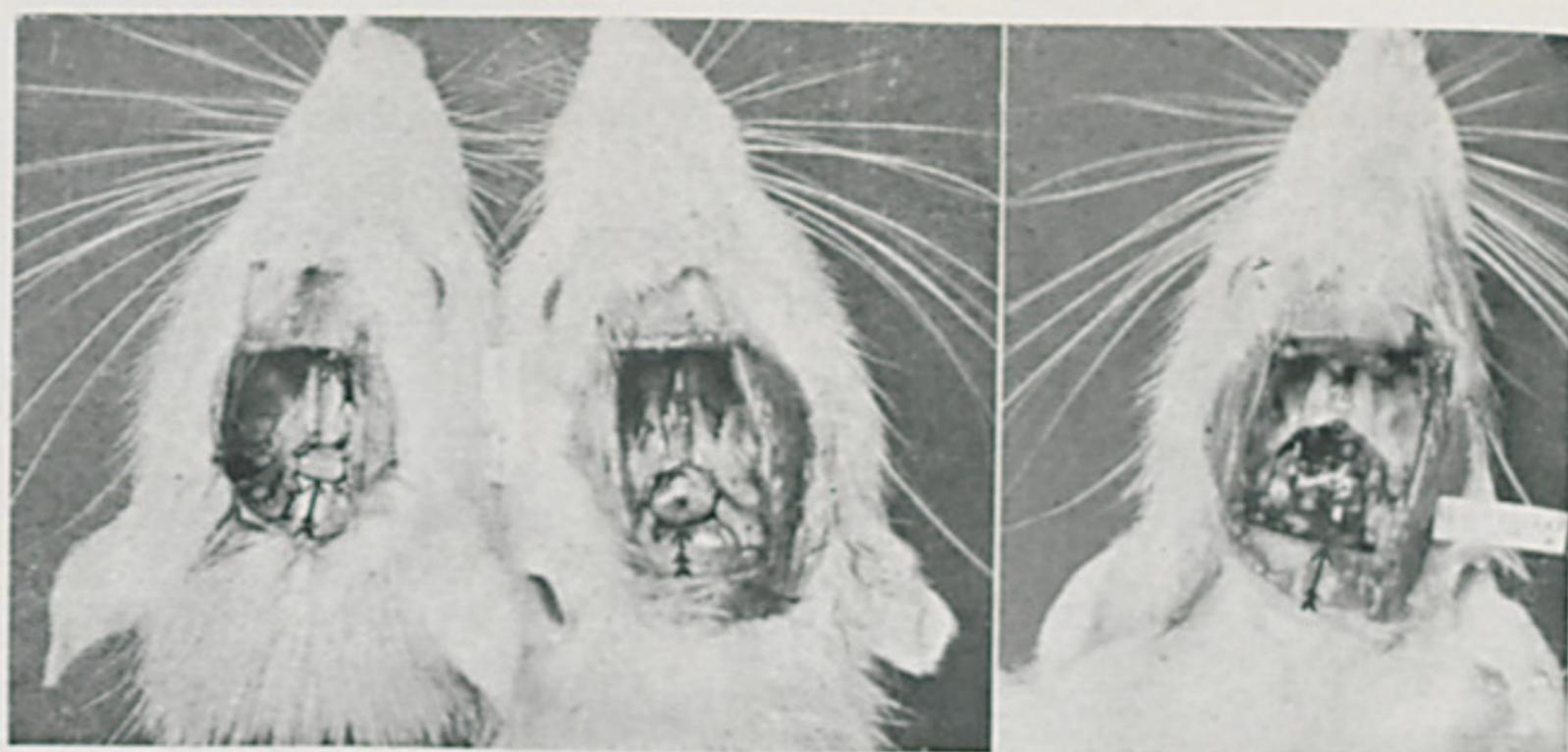


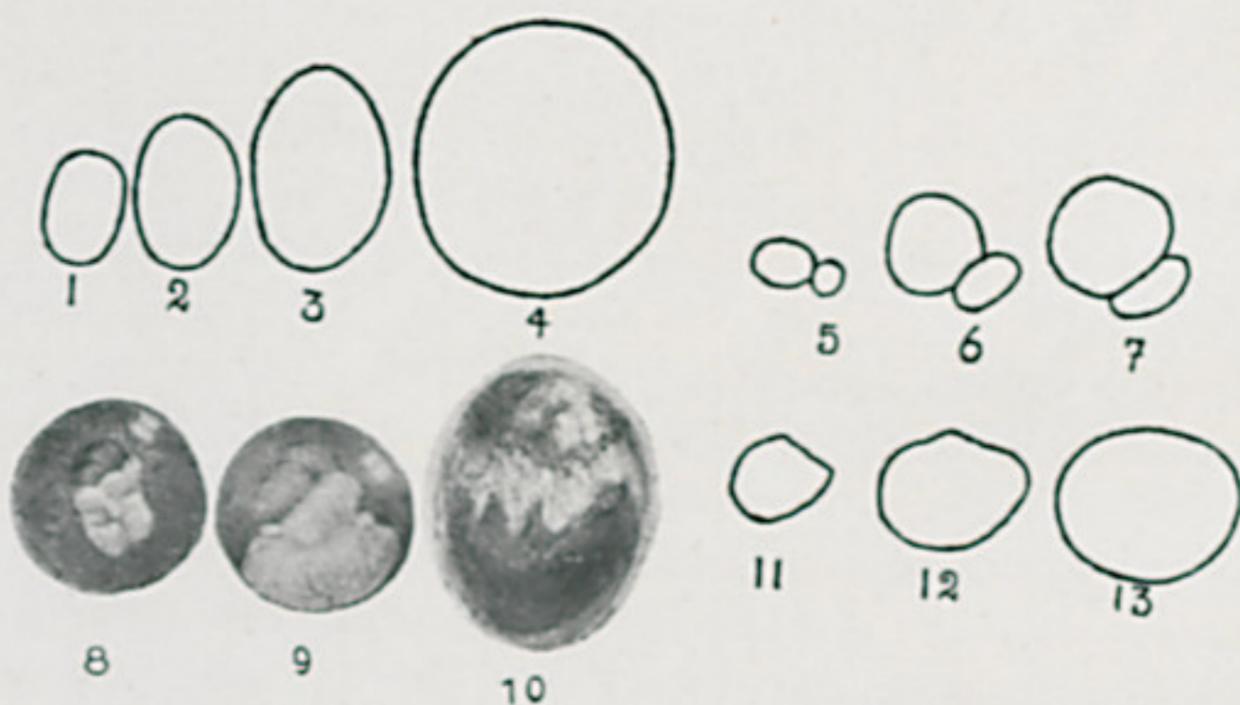
Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

A) — Abertura da cavidade craneana e retirada do encephalo, restando a hypophyse in situ, adherente á base do cranio.

Fig. 1 — Controle. Fig. 2 — Rato A3, no 104.º dia de tratamento. Fig. 3 — Rato A5, no 132.º dia de tratamento. A hypophyse, de tamanho enorme, é uma massa bossulada, repleta de focos hemorragicos.



B) — Contornos da hypophyse enxertada na camara anterior do olho do rato;  $\times 4$ .

Figs. 1, 2, 3, 4 — Rato A3; no momento de começar o tratamento, e 8, 49 e 104 dias depois.

Figs. 5, 6, 7 — Rato A4 — no momento de começar o tratamento, e 15 e 27 d'as depois.

Figs. 8, 9, 10 — Desenho, ao vivo, da camara anterior do olho do rato B9, tendo uma hypophyse enxertada;  $\times 4$ .

Figs. 11, 12, 13 — Rato A5 — no momento de começar o tratamento, e 41 e 62 dias depois.

Em Fig. 8, no dia inicial; a hypophyse, clara, contrasta com o escuro da iris.

Em Fig. 9, já se verifica notavel augmento do tamanho e da vascularização (30 dias de tratamento). Em Fig. 10, com 159 dias de tratamento, totalizando 245.000 unidades de benzoato de estradil; a hypophyse occupa toda a camara anterior, distendida e deformada; pólos escurecidos pelas suffusões sanguineas.