

NOTA SÔBRE A HEMATOLOGIA DOS OFÍDIOS
ÍNDICES DE WINTROBE DA *BOTHROPS JARARACA*

POR

J. R. VALLE & J. LEAL PRADO

(Do Laboratório de Endocrinologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Em 1934, WINTROBE (1) determinou as variações de tamanho e o teor de hemoglobina dos eritrocitos de vários vertebrados partindo do número de glóbulos vermelhos por mm^3 de sangue, da taxa de hemoglobina em gramas por cento e da relação percentual plasmoglobular. Os valores, hoje conhecidos por índices de WINTROBE, expressam: 1.º) o volume médio da hematia em micra cúbicas chamado volume corpuscular médio (V.C.M.); 2.º) o teor de hemoglobina do eritrocito em micromicrogramas, ou hemoglobina corpuscular média (H.C.M.) e 3.º) a concentração média percentual de hemoglobina em cada glóbulo vermelho ou concentração média de hemoglobina corpuscular (C.M.H.C.).

Dentre os ofídios, examinou aquele autor o sangue de 2 *Heterodon contortrix*, 2 *Eutania sirtalis* e 1 *Natrix sipedon*, encontrando de 500 a 1390 mil hematias por mm^3 , 3.7 a 11.3 g % de hemoglobina, 13.3 a 37 % para a relação percentual plasmoglobular, 266 a 465 μ^3 para o V.C.M., 74 a 131 micromicrogramas para o teor de hemoglobina corpuscular e, finalmente, 28 a 31% para a concentração média de hemoglobina no glóbulo, sem a correção devida ao volume ocupado pelo núcleo.

No decurso de experiências usando serpentes colubrídeas e crotalídeas como material de estudo, tivemos ocasião de dosar a hemoglobina no sangue da jararaca e aproveitamos, então, a oportunidade para calcular aqueles índices e verificar si nestes vertebrados os valores encontrados apresentavam diferenças ligadas ao sexo.

MATERIAL E MÉTODOS

Empregamos 26 exemplares adultos de *Bothrops jararaca*, 12 machos e 14 fêmeas, em condições de saúde aparentemente boas e recém-chegados ao serpentiário do Instituto. Dentro dos primeiros 10 dias de permanência no Laboratório colhia-se o sangue por punção da aorta, acessível depois de incisão ventral na

união do terço médio com o terço posterior do animal. Não se empregou anestesia; a serpente era fixada com os devidos cuidados, distendida numa prancha de cortiça, e, depois da colheita, sacrificada por decapitação. O vaso era alçado por meio de um fio de linha e a agulha introduzida contra a corrente sanguínea. Colhiam-se de 2 a 3 cm³ de sangue, que eram transportados imediatamente para um tubo de vidro contendo oxalato de potássio na diluição final, após conveniente agitação, de 0.2 g %.

Todos os exames foram feitos dentro dos tempos recomendados por OSGOOD, HASKINS & TROTMAN (2).

a) *Hematócrito*. Utilizamos segmentos de 10 cm de pipetas usadas de 0.1 ml. Aspira-se o sangue bem misturado até á altura aproximada de 7 cm e fecha-se o aparêlho com uma laçada de borracha flexível que obtura simultaneamente as duas extremidades. Depois de 45 minutos de centrifugação a 2500 r.p.m., a leitura é feita contra papel milimetrado e o resultado expresso em volume globular por cento.

b) *Hemoglobina*. A determinação de hemoglobina foi feita a partir da dosagem do ferro total em 1 ml de sangue pelo processo de PONDER (3) ligeiramente modificado.

c) *Contagem dos eritrócitos*. Foi feita a contagem em câmara de BUERKER com o sangue diluído a 1/200 ou 1/100 em solução de cloreto de sódio a 0.6 g%. A contagem era direta ou indireta em cópia microfotográfica do retículo, seguindo-se para isto, em linhas gerais, o processo descrito por LIDA & GOLBERG (4).

d) *Volume corpuscular médio*. Conhecidos o número de eritrócitos por mm³ e a relação plasmoglobular é fácil calcular o volume eritrocítico médio.

e) *Hemoglobina corpuscular média*. O teor de hemoglobina em gramas por cento e o número de glóbulos vermelhos no mesmo volume de sangue são os dados para se calcular o teor médio de hemoglobina corpuscular.

f) *Concentração média percentual de hemoglobina corpuscular*. É encontrada multiplicando por 100 o teor de hemoglobina em gramas por cento e dividindo o produto pela relação plasmoglobular.

O grau de dispersão dos valores em torno da média e o erro padrão foram calculados por meio das conhecidas fórmulas $\sigma = \sqrt{\sum d^2 / n-1}$ e $E = \sigma / \sqrt{n-1}$.

RESULTADOS

Os resultados obtidos vêm sumariados na Tabela I e referidos conforme o sexo dos exemplares examinados. Na última coluna horizontal figuram os valores médios gerais e o grau de dispersão de cada um. A média geral para a relação

TABELA 1

Sexo	Número	Pêso em gramas	Hematócrito %	Hemoglobina gramas %	Gl. vermelhos (milhares) por mm ³	V. corp. médio μ ³	Hb. corp. média %	C.M.Hb.C. %
♂	3	255	25	7.4	550	454	135	30
	4	185	27	7.2	575	470	125	27
	9	160	20	5.3	315	635	168	26
	10	145	24	7.9	430	558	184	33
	18	167	31	12.1	825	376	147	39
	24	100	26	9.3	800	325	116	36
	25	132	24	7.5	615	390	122	31
	26	115	18	6.2	550	327	113	34
	27	110	20	5.9	500	400	118	29
	28	118	32	9.7	800	400	121	30
	29	135	27	8.4	665	406	126	31
	30	118	31	9.9	650	477	152	32
n=12	m	145	25	8.1	606	434	135	31
	σ σ	± 43	± 4.6	± 1.9	± 155	± 91	± 22	± 3.6
♀	1	380	30	9.4	575	522	163	31
	6	445	30	9.0	550	545	164	30
	7	144	24	9.0	400	600	225	37
	8	200	29	8.8	650	446	135	30
	11	170	28	7.0	550	509	127	25
	12	175	27	9.2	625	432	147	34
	13	175	27	8.9	550	491	162	33
	14	355	19	5.8	390	487	149	30
	15	370	19	5.2	400	467	130	28
	16	190	21	7.2	575	357	125	34
	19	140	19	6.7	600	311	112	35
	20	180	27	8.0	590	458	136	30
	22	300	18	5.7	435	414	131	32
	23	490	22	7.4	540	408	137	34
n=14	m	265	24	7.7	530	460	145	31
	σ σ	± 120	± 4.5	± 1.4	± 88	± 75	± 28	± 3.2
♂ e ♀ N=26	M	209	24	7.9	566	449	141	32
	σ σ	± 116	± 4.6	± 1.7	± 128	± 86	± 25	± 3.3

plasma-globular foi de 24% com um desvio de $\pm 4.6\%$. O teor de hemoglobina variou de 5.2 a 12.1 gramas %, sendo a média e o desvio de 7.9 ± 1.7 g %. O número de glóbulos vermelhos nos dois sexos variou de 315 a 825 mil, sendo a média e o desvio de 566 ± 128 mil eritrocitos por mm^3 de sangue.

Os valores para os índices de WINTROBE foram: volume corpuscular médio, de 311 a 635 μ^3 , média 449 ± 86 μ^3 ; hemoglobina corpuscular média, de 112 a 225 $\gamma\gamma$, média 141 ± 25 $\gamma\gamma$; e concentração média de hemoglobina corpuscular de 26 a 39%, média $32 \pm 3.3\%$.

COMENTÁRIOS

Para facilidade de comparação damos na Tabela II as médias dos valores encontrados por WINTROBE nos 5 exemplares de ofídios que estudou e aquelas que obtivemos nas 26 jararacas examinadas.

TABELA 2

GRUPOS	Hematócrito %	Hemoglobina g %	Gl. vermelhos (milhares) por mm^3	V.C.M. μ^3	H.C.M. $\gamma\gamma$	C.M.H.C.* %
Valores médios segundo os dados de Wintrobe	25.8	7.7	800	330	98	30
Valores médios encontrados para a <i>Bothrops jararaca</i>	24.0	7.9	566	449	141	32

* Sem a correção devida ao volume do núcleo.

As médias que mais se afastam são as relativas ao número de glóbulos vermelhos, ao volume corpuscular médio e à hemoglobina corpuscular média; as duas últimas, conseqüentes da primeira. Em experiências anteriores, LEAL PRADO e MILLER DE PAIVA (5) fizeram contagens de eritrocitos no sangue de 25 jararacas e de 10 parelheiras (*Philodryas* sp.) encontrando os extremos de 240 e 965 e a média de 516 mil glóbulos vermelhos por mm^3 , com um desvio padrão de 188 mil. Embora examinando exemplares de duas famílias distintas — crotalídeas e colubrídeas — a média referida é mais próxima da encontrada no presente estudo do que da calculada a partir dos dados de WINTROBE.

A dosagem de hemoglobina feita de maneira sistemática, ao que nos consta, pela primeira vez nestes vertebrados, dado o interesse das observações registradas, constituirá trabalho a parte de um de nós.

Quanto à diferença das médias conforme o sexo vemos na Tabela I que ela é apreciável sómente em relação ao pêso dos animais. A média ponderal dos machos é bem inferior á registrada para as fêmeas e a aplicação da conhecida fórmula $m-m'/\sqrt{E^2 + E'^2}$ deu o resultado 3.4 que mostrou ser a diferença estatisticamente significativa. O mesmo não acontece, porém, com os demais elementos da tabela. Em outras palavras, os valores e os índices registrados não são significativamente diferentes conforme o sexo dos animais examinados.

Mensurações preliminares, pelo processo da ocular micrométrica, em esfregaços corados pelo LEISHMAN, de sangue de jararacas e parelheiras, deram para as hematias elípticas e nucleadas destes ofídios, as médias de 20 e 11 μ respectivamente para o maior e o menor diâmetros. A superfície de uma face do glóbulo, admitindo-se com Wintrobe que o eritrocito seja um pequeno cilindro, será de $172\mu^2$ e a espessura, dividindo o volume corpuscular médio de $449 \mu^3$ pela superfície, de 2.6 μ .

Medindo o maior e o menor diâmetros do núcleo, considerada a sua espessura igual á do glóbulo, pode WINTROBE determinar o volume nuclear e deduzi-lo do volume globular, para então calcular a verdadeira concentração média de hemoglobina corpuscular. Si empregarmos a correção média de + 5%, usada por WINTROBE nos ofídios que examinou, teremos para a C.M.H.C. na jararaca o valor de 37%. Como ficou bem assinalado pelo autor norte-americano, embora os valores e os índices hematológicos variem muito entre os vertebrados, a concentração média de hemoglobina corpuscular é muito constante desde *Cyclostomata* até *Mammalia*, inclusive na sub-ordem *Ophidia* estudada no presente trabalho com maior casuística.

É claro que os valores numéricos mencionados têm mero caráter aproximativo, representando, no entanto, os primeiros dados para o estudo da hematologia, inclusive das propriedades da hemoglobina, e a compreensão da fisiologia da respiração em tão importante grupo zoológico.

RESUMO

O sangue da *Bothrops jararaca*, examinado em 26 exemplares adultos, 12 δ e 14 φ , contém, em média, 566 mil hematias por mm^3 e 7.9 gramas de hemoglobina por cento. O volume globular em relação ao plasmático é de 24%. O volume médio de um eritrocito, a hemoglobina corpuscular média e a concentração média de hemoglobina corpuscular são, respectivamente, 449 micra cúbicas, 141 microgramas e 32%.

Não se registrou diferença estatisticamente significativa nestes valores, conforme o sexo dos animais examinados.

ABSTRACT

Hematological data of *Bothrops jararaca*

The blood of 26 *B. jararaca*, 12 males and 14 females, was examined. Red blood cells counts, hemoglobin concentration and hematocrit values were determined and from these data, according to WINTROBE, the mean corpuscular volume (C.V.) in cubic microns, the mean corpuscular hemoglobin (C.H.) in micromicrograms and the mean corpuscular hemoglobin concentration (C.C.) in percent, were calculated.

The results are summarized in the table below, where the mean and the standard deviation are given.

Groups	Average body weight g	Hematocrit %	Hemoglobin g %	R.B.C. thousand/mm ³	C.V. μ ³	C.H. γγ	C.C. (*) %
12 ♂	145 ± 43	25 ± 4.6	8.1 ± 1.9	606 ± 155	434 ± 91	135 ± 22	31 ± 3.5
14 ♀	265 ± 120	24 ± 4.5	7.7 ± 1.4	530 ± 88	460 ± 75	145 ± 28	31 ± 3.2
26 ♂♀	209 ± 116	24 ± 4.6	7.9 ± 1.7	566 ± 128	449 ± 86	141 ± 25	32 ± 3.3

(*) Without nuclear correction.

Although a statistical significant difference has been observed for the body weight depending on the sex, there is not such a correlation in regard to the hematological data here presented.

BIBLIOGRAFIA

1. Wintrobe, M. M. (1934). Variations in size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia haematol.*, 51, 32-50.
2. Osgood, E. E., Haskins, H. D. & Trotman, F. E. (1931). Uniform system of hematologic methods for use with oxalated venous blood. *J. Lab. clin. Med.*, 16, 476-481.
3. Ponder, E. (1942). Relation between red blood cell density and corpuscular hemoglobin concentration. *J. biol. Chem.*, 144, 333-338.
4. Lida, E. & Goldberg, I. (1940). Recuento de eritrocitos por la fotomicrografia. *Rev. Soc. Arg. Biol.*, 16, 523-527.
5. Leal Prado & Miller de Paiva. (1944). Nota sobre a hematologia dos ofídios. Com. à Soc. Biol. de S. Paulo, sessão de 8 de maio.

(Recebido para publicação em 14 de outubro de 1944).