

## HEMOGLOBINA INATIVA (NÃO COMBINÁVEL AO OXIGÊNIO) NO SANGUE DO CÃO E DO HOMEM (\*)

POR J. LEAL PRADO

(Do Laboratório de Endocrinologia, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

Reconhecidamente, a determinação precisa da hemoglobina (Hb) é medida de grande significação biológica.

Estudando a ação anemiante do benzoato de estradiol (9) tive a oportunidade de encontrar no sangue do cão uma fração de Hb não combinável ao oxigênio. A quantidade era suficientemente grande para tornar imprecisos os resultados obtidos pela capacidade fixadora de oxigênio. Anteriormente esta forma de Hb tinha sido encontrada na espécie humana, em quantidades variáveis intraindividualmente, por Ammundsen (1) que a denominou "Hb inativa". A principal finalidade do presente artigo é a de chamar a atenção para a existência desta forma de Hb. Tendo sido encontrada na espécie humana, nos ofídios (6), no cavalo (7) e, agora, nos cães, é bem provável que exista em outras espécies animais. Em vista destes achados a capacidade fixadora de oxigênio do sangue não pode mais ser considerada como método padrão para dosagem de Hb porque não determina a fração inativa cuja quantidade pode ser maior do que 20% da Hb total mesmo no homem.

Relato aqui a maneira pela qual se verificou a existência de Hb inativa em cães e também em onze casos humanos, apresentando os valores de Hb total e inativa encontrados em 22 cães normais e em 3 anêmicos.

### MATERIAL E MÉTODOS

Empregaram-se 25 cães (Tab. I), adultos ou subadultos, de 3.6 a 10.8 kg. Havia 15 cães normais, (6 ♂, grupo A e 9 ♀, grupo D) e 10 animais castrados, (7 ♂ e 3 ♀) tratados ou não, com propionato de testosterona ou com benzoato de estradiol. Dos 10 animais castrados, 3 ficaram anêmicos (grupo F) em virtude do tratamento estrogênico. Os 7 restantes, que não ficaram

(\*) Trabalho em parte subvencionado pelos drs. Alberto Alves Filho e Alcino R. Lima por intermédio dos Fundos Universitários de Pesquisas.

Recebido para publicação em outubro de 1945.

anêmicos, fazem com os 15 normais um grupo de 22 cães, aparentemente em boas condições de saúde, cujas taxas de Hb no sangue podem ser consideradas como normais.

TABELA I  
*Condições experimentais dos cães examinados*

Grupos	Cão No.	Sexo	Peso kg	Condições
A	1	M	—	Normal. Sem tratamento
	2	M	7.1	Normal. Sem tratamento
	3	M	7.3	Normal. Sem tratamento
	4	M	6.8	Normal. Sem tratamento
	5	M	5.9	Normal. Sem tratamento
	6	M	6.6	Normal. Sem tratamento
B	7	M	8.2	Castrado. Sem tratamento
	8	M	6.2	Castrado. Sem tratamento
	9	M	6.3	Castrado. Sem tratamento
C	10	M	9.3	Castrado. Tratado com propionato de testosterona.
	11	M	6.6	Castrado. Tratado com propionato de testosterona.
D	12	F	10.8	Normal. Sem tratamento
	13	F	7.5	Normal. Sem tratamento
	14	F	7.0	Normal. Sem tratamento
	15	F	5.9	Normal. Sem tratamento
	16	F	10.1	Normal. Sem tratamento
	17	F	5.6	Normal. Sem tratamento
	18	F	4.5	Normal. Sem tratamento
	19	F	7.6	Normal. Sem tratamento
	20	F	10.5	Normal. Sem tratamento
E	21	F	3.6	Castrada. Tratada com propionato de testosterona
	22	F	4.4	Castrada. Tratada com propionato de testosterona
F	23	F	7.8	Castrada. Tratada com benzoato de estradiol. Anêmica
	24	M	5.4	Castrado. Tratado com benzoato de estradiol. Anêmico
	25	M	6.1	Castrado. Tratado com benzoato de estradiol. Anêmico

A alimentação consistiu de vísceras de boi cozidas, polenta e verdura suplementada com mistura salina e óleo de fígado de peixe.

A colheita do sangue foi feita por punção da veia safena externa com o mínimo de estase possível; o sangue era oxalatado a 0.2 g %.

Empregaram-se os seguintes métodos para determinar a Hb.

1. Capacidade de fixação do oxigênio do sangue; método de Van Slyke & Stadie (10). Aproximadamente 3 ml de sangue eram aerados em funis separadores de 250 a 300 ml de capacidade durante 5 minutos no mínimo. A extração dos gases era feita, durante 10 minutos, em um aparelho volumétrico de Van Slyke agitado a motor.

2. Determinação do ferro total do sangue. Foi usado o método de Ponder (1942) com uma pequena modificação introduzida anteriormente (6).

Todo o material volumétrico utilizado, inclusive a haste graduada do aparelho de Van Slyke, foi verificado previamente.

#### EXPERIMENTAÇÃO

A verificação da existência de Hb inativa dependeu, em última análise, do fato já conhecido que 1 grama de ferro da Hb ordinária se combina a  $400 \pm 5$  ml. de oxigênio. Determinando-se simultaneamente o ferro total e a capacidade fixadora de oxigênio na mesma amostra de sangue, fica fácil calcular a quantidade de oxigênio fixada por 1 grama de ferro. Si esta quantidade for menor do que 400 ml., será possível calcular a porcentagem de Hb total que deixou de fixar oxigênio. A capacidade de oxigênio de um sangue que contenha, por exemplo, 50 mg % de ferro deverá ser de 20 ml de oxigênio, desde que toda sua Hb esteja ativa. Si a capacidade for menor do que 20, a diferença terá sido motivada pela existência de Hb inativa em porcentagem assim determinável.

Baseado neste raciocínio, fiz determinações do ferro total e da capacidade fixadora de oxigênio nas mesmas amostras de sangue dos vinte e cinco cães. (Tab. II). Nas colunas 5 e 7 calculei a Hb a partir da concentração de ferro total no sangue e da capacidade de oxigênio, respectivamente. Usei como constantes para a Hb do cão os valores 0,338 mg % de ferro e 1.36 ml de oxigênio por grama de Hb, determinados por Morrison & Hisey (4). Na coluna 8 estão as quantidades de oxigênio que se combinaram a 1 g de ferro e na coluna 9 as porcentagens de Hb inativa, considerando  $400 \pm 5$  ml de oxigênio por grama de ferro como 100% de Hb ativa.

Várias vezes, durante o trabalho, repetiam-se as dosagens na mesma amostra de sangue. As diferenças entre duas determinações da capacidade de oxigênio nunca foram maiores do que 0.5 volume % e as dosagens duplas de ferro no mesmo material diferiam no décimo de miligrama. Baseado nestes dados desprezei os valores de Hb inativa abaixo de 3.5%.

Dosei Hb inativa duas vezes. Na primeira série de determinações foi encontrada Hb inativa em 23 de 25 cães. Nos vinte e dois normais, o teor

TABELA II

Hemoglobina do sangue de cães. Determinações comparativas pelo Fe total (Ponder) e pela capacidade de O<sub>2</sub>. Relações O<sub>2</sub>/Fe (\*). Porcentagens de Hb inativa.

Grupos	Cão No.	Data do exame	Fe mg %	Hb g % Ponder	Capacidade oxigênio	Hb g % Capacidade	Relação O <sub>2</sub> /Fe	Hb inativa %
1	2	3	4	5	6	7	8	9
MACHOS								
A.	1	24.X.44	44.6	13.2	16.1	11.9	361	9.8
	2	3.XI.44	59.3	17.6	21.3	15.7	359	10.2
	3	8.XI.44	61.7	18.3	21.6	15.9	350	12.5
	4	8.XI.44	49.5	14.6	19.1	14.0	386	3.5
	5	8.XI.44	48.8	14.4	19.1	14.0	391	2.2
	6	9.XI.44	57.5	17.0	22.2	16.3	386	3.5
B.	7	24.X.44	61.3	18.2	21.1	15.5	344	14.0
	8	24.X.44	55.6	16.4	20.0	14.7	360	10.0
	9	24.X.44	61.7	18.3	19.8	14.6	321	19.8
C	10	24.X.44	55.6	16.4	20.0	14.7	360	10.0
	11	24.X.44	57.5	17.0	20.6	15.2	358	10.5
FÊMEAS								
D.	12	3.XI.44	65.6	19.4	23.4	17.2	357	10.8
	13	3.XI.44	51.9	15.4	19.7	14.5	380	5.0
	14	8.XI.44	50.8	15.0	18.4	13.5	362	9.5
	15	9.XI.44	64.5	19.1	22.6	16.6	350	12.5
	16	9.XI.44	64.9	19.2	24.7	18.2	381	4.8
	17	9.XI.44	57.2	16.9	20.1	14.8	351	12.2
	18	9.XI.44	49.8	14.7	17.1	12.6	343	14.2
	19	16.XI.44	63.3	18.7	23.4	17.2	370	7.5
	20	23.XI.44	68.7	20.3	26.8	19.7	390	2.5
	E.	21	24.X.44	55.9	16.5	17.8	13.1	318
22		24.X.44	55.6	16.4	18.2	13.4	327	18.2
ANÊMICOS								
F.	23	24.X.44	41.5	12.3	13.8	10.2	333	16.8
	24	24.X.44	36.8	10.9	11.2	8.2	304	24.0
	25	24.X.44	42.0	12.4	12.3	9.0	293	26.8

(\*) ml de O<sub>2</sub> combinados com 1 g de Fe.

mais baixo, o mais alto e a média, foram, respectivamente, 3.5, 20.5 e 11.7%. Depois de 8 a 30 dias as determinações foram repetidas em onze cães. (Tab. III). Em quatro animais (Nos. 6, 8, 10 e 11) não havia, agora, Hb inativa.

TABELA III

*Hemoglobina do sangue de cães. Determinações comparativas pelo Ferro total (Ponder) e pela capacidade de oxigênio. Relações  $O_2/Fe$ . Porcentagens de Hb inativa.*

Cão No.	Data do exame	Fe mg %	Hb g % Ponder	Capacidade oxigênio	Hb g % Capacidade	Relação $O_2/Fe$	Hb inativa %
3	16.XI.44	62.9	18.6	21.8	16.0	347	14.2
6	18.XI.44	56.6	16.8	23.2	17.1	410	0.0
8	28.XI.44	68.5	20.3	26.8	19.7	391	2.2
9	17.XI.44	66.3	19.5	24.4	17.9	360	10.0
10	28.XI.44	55.6	16.5	21.9	16.1	394	1.5
11	21.XI.44	58.7	17.4	23.2	17.1	395	0.1
12	16.XI.44	68.0	20.1	24.2	17.8	356	11.0
14	16.XI.44	58.7	16.6	20.5	15.1	349	12.8
16	18.XI.44	70.7	20.9	26.5	19.5	375	6.2
23	23.XI.44	49.4	14.6	17.0	12.5	344	14.0
25	21.XI.44	49.4	17.6	14.0	10.3	283	24.2

Houve um aumento da porcentagem de Hb inativa em quatro cães (Nos. 3, 12, 14 e 16) e uma diminuição em sete (Nos. 6, 8, 9, 10, 11, 23 e 25). A média nesta segunda série de determinações, considerando somente os animais não anêmicos, foi de 10.8%.

TABELA IV

*Presença e teor de Hemoglobina inativa no sangue humano normal.*

Casos	Sexo	Idade	Fe mg %	Hb g % Ponder	Capacidade oxigênio	Hb g % Capacidade	Relação $O_2/Fe$	Hb inativa %
1. H. V. K.	M	26	58.3	17.2	22.4	16.5	384	4.0
2. L. P. C.	M	26	56.8	16.7	21.8	16.0	384	4.0
3. M. S.	M	21	59.0	17.4	22.6	16.6	383	4.2
4. B. S.	M	47	54.6	16.2	20.6	15.2	377	5.6
5. J. B. F.	M	26	54.5	16.0	20.6	15.2	378	5.5
6. B. R.	M	41	55.3	16.3	22.4	16.5	405	0.0
7. J. F.	M	48	54.0	15.9	21.9	16.1	405	0.0
8. L. M. P.	M	27	60.4	17.8	22.8	16.6	378	5.5
9. C. B.	M	33	54.0	16.0	21.9	16.1	466	0.0
10. N. P.	F	30	49.2	14.6	20.1	14.8	408	0.0
11. M. P.	F	29	50.2	14.8	19.5	14.3	388	3.0

Para controle das condições experimentais, foi seguido o mesmo processo em onze amostras de sangue humano normal (Tab. IV). Não havia Hb inativa

em cinco e foi encontrada uma quantidade de 4.0 a 5.6% nas seis restantes. A média foi de 4.8%. Para a Hb humana foram usadas as constantes determinadas por Bernhart & Skeggs (2).

#### DISCUSSÃO

Ammundsen (1) determinou a quantidade de Hb inativa em sangue humano normal baseando-se na diferença encontrada na capacidade de fixação do monóxido de carbono antes e depois de redução da Hb pelo hidrosulfito de sódio. Ela estudou oitenta e duas amostras de sangue, obtidas de cinquenta e três indivíduos normais; foram encontrados de 2 a 12% de Hb inativa em 40% das amostras sanguíneas. Foi observado também que a porcentagem de Hb inativa variava intraindividualmente, às vezes de maneira rápida; uma segunda determinação podia diferir da anterior de 5 a 10%.

Ramsay (7) determinou a quantidade de ferrihemoglobina (Hb inativa) em sangue de cavalo por processo gazométrico: a Hb ativa (ferrohemoglobina) era determinada pela capacidade de oxigênio e a "Hb total" pela capacidade de oxigênio depois de redução com solução fracamente alcalina de sal de titânio.

No presente trabalho usei um princípio diferente de determinação da quantidade de Hb inativa, mas acredito que os dados obtidos são comparáveis aos apresentados por Ammundsen e Ramsay.

No cão, como no homem, houve igual variação intraindividual na porcentagem de Hb não combinável ao oxigênio. A segunda série de determinações foi feita com a finalidade de permitir esta verificação e mostra as diferenças registradas em onze cães.

Num total de trinta e uma amostras de sangue obtidas de 22 cães normais, encontrei Hb inativa em vinte e cinco, isto é, em 82% das amostras e na quantidade média de 10.9% da Hb total. Parece, pois, que o sangue de cão contém Hb inativa em maior quantidade e mais frequentemente do que o sangue humano. Ramsay (7) estudou o sangue de dezessete cavalos e encontrou Hb inativa em quatorze, isto é, em 82% dos animais e na quantidade média de 8.4%, resultado bem parecido ao que encontrei para o cão. Cox & Wendel (3) trabalhando com método espectroscópico, negam a existência de metahemoglobina (Hb inativa) no sangue do cão normal mas Ramsay (7) não dá muito valor a este achado negativo dada a pequena sensibilidade do método usado. O melhor estudo que encontrei na literatura sobre a capacidade de fixação de monóxido de carbono da Hb de cão foi o de Morrison & Hisey (4). Estes autores determinaram a capacidade de monóxido de carbono de 10 amostras de Hb recristalizada de cão e só registraram Hb inativa em duas. Ammundsen

(1), citando outros autores, diz que si as determinações eram feitas em sangue total o conteúdo de Hb, medido pela capacidade de oxigênio, era menor do que o obtido por outros métodos, mas que esta diferença não se registrava quando se usava Hb isolada pura. Por isto acredito que os resultados de Morrison & Hisey (4), com Hb recristalizada, não invalidam o achado do presente trabalho. Em dezessete amostras de Hb humana (preparadas lavando os glóbulos quatro a cinco vezes com solução fisiológica) aqueles autores não registraram também a existência de Hb inativa.

As dosagens de Hb não combinável ao oxigênio em sangue humano foram feitas para controle das condições experimentais porque a grande frequência de Hb inativa em sangue de cão levantou a hipótese de um erro sistemático. Dos onze casos estudados, seis continham 4.0 a 5.6% de Hb inativa e em cinco a Hb era totalmente combinável ao oxigênio. Em vista dos resultados, concluí pela validade das determinações feitas em cães.

Entre nós, Santos & Campos (8) já haviam observado uma grande discordância entre o método de Wong e a capacidade de oxigênio do sangue humano mas não a interpretaram como devida à Hb não combinável ao oxigênio. Ammundsen (1) foi quem chamou a atenção para a necessidade de serem abandonadas as capacidades de monóxido de carbono ou oxigênio como métodos precisos para a dosagem de Hb em sangue humano. Extendendo este conselho aos ofídios, cavalos e cães quero, entretanto, insistir na existência de Hb inativa em sangue humano normal porque a desconsideração deste fato poderá levar a erros grosseiros.

Talvez a verificação da presença de Hb inativa em sangue de cão, de cavalo e particularmente de ofídios (média de 17% de Hb inativa em 100% de 23 jararacas estudadas) possa servir como ponto de partida, quanto ao material experimental, para o esclarecimento da natureza química e significado fisiológico da Hb não combinável ao oxigênio.

Passando, agora, aos teores de Hb total encontrados para os cães, lembro e justifico a possibilidade de utilizá-los como valores normais.

Wintrobe, Shumacker & Schmidt (11) nada puderam concluir sobre a existência ou não de uma diferença sexual no teor de Hb do sangue de cães. Uma possível explicação da diferença encontrada na espécie humana seria a menstruação. Nas espécies que não têm a perda mensal sanguínea, como o cão, seria de esperar-se uma igualdade na hemoglobinemia dos dois sexos. Baseando-me no exposto, suponho que além dos 15 cães normais (6 ♂ e 9 ♀) os animais dos grupos B, C e E, embora castrados ou tratados com o hormônio masculino, podem também ser considerados normais quanto à hemoglobinemia. Só ficam excluídos os tratados com benzoato de estradiol (grupo F) nitidamente

anêmicos. Neste grupo de 3 animais a média de Hb inativa em 5 amostras de sangue foi de 21.2%, praticamente duas vezes o valor médio encontrado para os cães normais. Até que ponto e de que forma o tratamento estrogênico interfere no teor de Hb inativa do cão, é questão para ser elucidada.

Todos os animais receberam tratamento antihelmíntico (9) e foram autopsiados no final das experiências. Não havia vermes no intestino ou a quantidade era seguramente insuficiente para anemizá-los.

#### RESUMO

A dosagem comparativa de Hb pelos métodos da capacidade fixadora de oxigênio e da determinação do ferro total (5), quando se empregam constantes já bem estabelecidas, permite calcular a porcentagem de Hb não combinável ao oxigênio e chamada por Ammundsen (1) de Hb inativa. Num total de 31 amostras de sangue obtidas de 22 cães em boas condições de saúde e sem infestação helmíntica digna de registro, esta forma de Hb inativa foi encontrada em 82% das amostras e na quantidade média de 10.9% da Hb total. Em 3 cães anemiados pelo benzoato de estradiol a média de Hb inativa em 5 amostras de sangue foi de 21.2%.

Esta forma de Hb inativa foi procurada também em 11 amostras de sangue humano normal e encontrada em 6 delas, na média de 4.8%. Tanto no homem como no cão pôde observar-se uma variação intraindividual no teor de Hb inativa quando se analisam amostras colhidas em datas diferentes.

A existência de Hb inativa em porcentagem apreciável no sangue do homem (1), do cavalo (7), dos ofídios (6) e agora do cão, sugere a sua procura em outras espécies e, o que é mais importante, a elucidação de seu significado fisiológico.

#### ABSTRACT

The percentage of non-oxygen-combining Hb ("inactive Hb." Ammundsen) (1) can be calculated from the respective values for the total Hb, measured by the van Slyke and Stadie's oxygen capacity method and the total blood iron content, determined after Ponder's method.

In 31 blood samples from 22 dogs, apparently in good health and without helminthic infestation, inactive hemoglobin was found in 82% of the blood samples, the mean value amounting to 10.9% of total Hb. In five blood samples obtained from 3 dogs, which had been anemized by estradiol benzoate, the average value of inactive Hemoglobin was 21.2%. In order to control the experimental

conditions, inactive hemoglobin was also determined in the blood of 11 normal persons, presence of inactive Hb was found in 6 of these cases with a mean value of 4,8% of total Hb. There is an intraindividual variation of the inactive Hb content in the blood of dogs as well as of man.

The presence of inactive Hemoglobin in the blood of man (1), horse (7), Ophidia, (6) and now in dog suggests its search also in other species for a more exact study of this intricate problem.

#### BIBLIOGRAFIA

1. *Ammundsen, E.* Estudios on the presence of non-carbon-monoxide combining (inactive) hemoglobin in the blood of normal persons, *J. biol. Chem.*, **138**:563-570, 1941.
2. *Bernhart, F. W. & Skeggs, L.* The iron content of crystalline human hemoglobin, *J. biol. Chem.*, **147**:19-22, 1943.
3. *Cox, W. W. & Wendel, W. B.* The normal rate of reduction of methaemoglobin in dogs, *J. biol. Chem.*, **143**:331-340, 1942.
4. *Morrison, D. B. & Hisey, A.* The carbon monoxide capacity, iron and total nitrogen of dog hemoglobin, *J. biol. Chem.*, **109**:233-240, 1935.
5. *Ponder, E.* The relation between red blood cell density and corpuscular hemoglobin concentration, *J. biol. Chem.*, **144**:333-338, 1942.
6. *Prado, J. L.* Hemoglobina dos offidios. Valores normais e presença de uma forma inativa no sangue da *Bothrops jararaca*, *Mem. Inst. Butantan*, **18**:55-66, 1944-45.
7. *Ramsay, W. N. M.* Ferrihaemoglobinaemia (Methaemoglobinaemia) in man and the horse, *Biochem. J.*, **38**:470-473, 1944.
8. *Santos, P. & Campos, M.* Estudo comparativo entre dois métodos indirectos de dosagem de hemoglobina, *São Paulo Medico*, **2**:449-454, 1931.
9. *Valle, J. R. & Prado, J. L.* A ser publicado.
10. *Van Slyke, D. D. & Stadie, W. C.* Citado em *Hawk, P. B. & Bergeim, O. Practical physiological chemistry*, 11.<sup>a</sup> ed., 968 pp., Philadelphia, Blakiston, 1937.
11. *Wintrobe, M. M.; Shumacker, H. B. & Schmidt, W. J.* Values for number, size and hemoglobin content of erythrocytes in normal dogs, rabbits and rats, *Amer. j. Physiol.*, **114**:502-507, 1936.

