

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA

Diretor: Prof. Dr. Antonio Guimarães Ferri

## COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA EM CAVALOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE SÔRO ANTIBOTRÓPICO \*

(BLOOD COAGULATION IN HORSES EMPLOYED FOR THE  
PRODUCTION OF THE ANTIBOTROPIC SERUM)

L. F. MARTINS  
Prof. Assistente

R. GRECCHI  
Instrutor

S. FERRI  
Instrutor

Há longo tempo são conhecidos os efeitos dos venenos de algumas serpentes sobre o fenômeno da coagulação sangüínea<sup>8, 26</sup>.

A ação coagulante, anticoagulante ou fibrinolítica tem sido largamente estudada em venenos provenientes de diferentes espécies<sup>3, 8, 10, 22</sup> e tem-se conseguido hoje a dissociação das várias frações responsáveis pelos diferentes efeitos<sup>3, 10, 12, 22</sup>.

O veneno de *Bothrops jararaca* apresenta, ao lado de uma fração necrosante, outra que é tipicamente coagulante<sup>9, 11, 22</sup> e tem sido inclusive empregada com fins terapêuticos na prevenção ou tratamento de síndromes hemorrágicas<sup>20</sup>. Foi já assinalado que animais picados por serpentes deste gênero podem apresentar alterações no quadro da coagulação sangüínea<sup>21</sup>.

A finalidade deste trabalho é verificar se eqüinos, que são empregados na produção de sôro antibotrópico, portanto, apresentando anticorpos contra o veneno, mostram, ao se iniciar, uma nova fase de imunização, alterações do fenômeno da coagulação que, embora não sejam perceptíveis clinicamente, possam ser detectáveis pelo emprêgo de provas de laboratório.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregados 4 eqüinos machos, castrados, sem raça definida, com idade superior a 10 anos. Todos os animais estavam em serviço de produção de sôro antibotrópico há mais de 3 anos e pesavam menos de 400 kg.

\* Trabalho realizado no laboratório de Hematologia, do Instituto Butantan.

Após completar um ciclo de imunização, foram os animais sangrados. Permaneceram sete dias em repouso, receberam 400 mg de veneno e foram novamente sangrados. Após repouso de sessenta dias, os experimentos foram iniciados. Com intervalo de três dias, por três vezes, foi colhido sangue da veia jugular e realizadas as seguintes provas: tempo de coagulação, tempo de recalcificação, contagem de plaquetas, retração do coágulo, consumo de protrombina, geração de tromboplastina. A média desses resultados foi considerada normal para estas condições.

Receberam então os animais, subcutaneamente, 60 mg de veneno botrópico polivalente e sangue para as diferentes provas foi coletado 2 e 24 horas após a inoculação. Dois deles foram controlados ainda às 96, 144 e 288 horas após a injeção do veneno.

Os animais apresentaram durante toda sua vida como produtores de soro, sempre que testados, títulos altos de anticorpos. Após o encerramento do ciclo de imunização que antecedeu o experimento, o título foi de 1 mg/ml de soro.

As provas foram realizadas de acordo com as normas que se seguem:

*Tempo de coagulação* — Técnica de LEE e WHITE<sup>13</sup> modificada por ROSENFELD e col.<sup>21</sup>.

*Tempo de recalcificação ou tempo de HOWELL* — Técnica de QUICK<sup>18</sup>.

*Contagem de plaquetas* — Método de FEISSLY e LUDIN<sup>7</sup> modificado por SPANOUDIS e col.<sup>25</sup>.

*Retração do coágulo* — Método de ROSENFELD<sup>19</sup>.

*Tempo de protrombina* — Método de um estágio de QUICK<sup>15</sup>. A tromboplastina empregada foi obtida de cérebro de coelho de acordo com a técnica de QUICK<sup>16</sup>.

*Consumo de protrombina* — Técnica de QUICK<sup>17</sup> modificada por ROSENFELD<sup>23</sup>.

*Geração de tromboplastina* — Técnica de BIGGS e DOUGLAS<sup>1</sup>.

A adsorção do plasma utilizado nas duas últimas provas foi feita com sulfato de bário, lavado segundo a técnica de BIGGS e MACFARLANE<sup>2</sup>.

Foi realizada análise de variância para determinar a significância das diferenças entre os intervalos de tempo para cada uma das provas.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos encontram-se expressos na tabela I. Os valores assinalados antes da inoculação do veneno representam a

TABELA I — Resumo dos resultados obtidos para eqüinos em produção de sôro antibotrópico, quando da inoculação do veneno, em função das provas de coagulação realizadas e tempo decorrido da inoculação

Provas	Tempo Coagulação (minutos)		Recalcificação segundos	Plaquetas 13 mm <sup>2</sup>	Retração do coágulo %	Tempo Protrombina		Consumo de Protrombina %	Geração Trombopl.	
	1 <sup>o</sup>	2 <sup>o</sup>				seg.	5		min. máx. ger.	atv. máx. t. c.
antes	7,0	9,1	190,0	167,7	47,5	10,6	67,4	68,5	2,7	27,8
2 h	7,7	11,2	225,0	132,0	45,7	10,0	67,0	83,4	2,5	27,5
24 h	7,5	11,0	195,0	138,5	48,7	10,2	64,5	87,4	2,5	27,4
96 h	6,5	9,5	210,0	135,0	41,5	9,0	83,5	75,3	2,5	29,0
144 h	8,5	13,0	180,0	140,5	52,0	9,5	74,0	66,3	2,5	28,0
288 h	7,0	10,0	165,0	131,0	45,5	10,0	67,0	76,2	2,5	26,5

média dos 4 animais com três verificações para cada um deles, o mesmo ocorrendo às 2 e 24 horas após a inoculação, enquanto que, os valores para 96-144 e 288 horas, representam a média de apenas 2 eqüinos.

Nas várias provas feitas não se encontrou diferenças antes e após a inoculação do veneno, a não ser para o consumo de protrombina que foi maior nas 24 horas que se seguiram à injeção do veneno. As diversas análises de variâncias realizadas indicaram significância apenas para esta prova ( $F=6,65$ ). Realizado então o teste de DUNNET<sup>6</sup>, observou-se que as diferenças estatisticamente significantes eram as verificadas entre as médias de antes e 2 horas após a inoculação do veneno, bem como entre as médias de antes e 24 horas após ( $t=3,61$  e  $4,61$ , respectivamente).

#### DISCUSSÃO

Do veneno bruto de *B. jararaca* pode ser separada uma fração que tem ação coagulante<sup>11</sup> capaz de converter diretamente fibrinogênio em fibrina, agindo, portanto, à semelhança da trombina. É empregada na terapêutica de moléstias hemorrágicas<sup>20</sup> tendo sido recentemente aconselhado também seu emprego como neutralizante da ação anticoagulante da heparina<sup>21</sup>.

A incoagulabilidade do sangue, conseqüente à picada dessa serpente, parece ser devida à fração coagulante do veneno, que desfibrina o sangue do animal.

As doses de veneno inoculadas em animais para obtenção de soros com títulos altos, se o forem em animais que não apresentem prévia resistência específica, certamente acarretam alterações na coagulação sangüínea.

Pelo exame dos resultados aqui apresentados, pode-se concluir que a imunidade desenvolvida no animal submetido a inoculações periódicas de veneno é de tal ordem que doses altas do mesmo não introduzem modificações no processo de coagulação que possam ser detectáveis através da maioria das provas empregadas em laboratório para análise do fenômeno.

Quanto ao consumo de protrombina, houve aumento. Se o veneno labilizasse as plaquetas e estas fôsse utilizadas no mecanismo de coagulação no momento da injeção do veneno, seria compreensível o aumento do consumo. Porém, o número de plaquetas e a geração de tromboplastina não sofreram alterações, não se encontrando, assim, explicação para o fato.

#### SUMMARY

In this work we have studied the effect on the blood coagulation of 60 mg of *B. jararaca* poison injected subcutaneously in

serum-producer horses. Tests of coagulation time, coagulation time of recalcified plasma, platelet counts, clot retraction, prothrombin time, consumption of prothrombin and thromboplastin generation were carried out with samples collected before the poison inoculation and 2, 24, 96, 144 and 288 hours after it. A difference statistically significant was found only from the test of prothrombin consumption until 24 hours after, which was greater, when compared with the results obtained before the inoculation.

#### AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Dr. Gastão Rosenfeld, chefe da Seção de Hematologia do Instituto Butantan, a orientação recebida e à Dra. Lidia Rosenberg Aratangy, do Departamento de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina Veterinária, a análise estatística.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIGGS, R. — DOUGLAS, A. S. — 1953 — The thromboplastin generation test. *J. clin. Path.*, 6 (1): 23
2. BIGGS, R. — MACFARLANE, R. G. — 1957 — Human blood coagulation and its disorders. 2nd ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, p. 388
3. BRAZIL, V. — VELLARD, J. — 1928 — Action coagulante et anticoagulante des venins. *Ann. Inst. Pasteur*, 42: 403
4. CÉSARI, E. — BOQUET, P. — 1937 — Recherches sur les antigènes des venins et les anticorps des sérums antivenimeux (Quatrième mémoire). Action d'un sérum antivenimeux bivalent (*Bitis arietans* + *Sepeidon haemachafes*) sur les deux venins homologues et divers venins hétérologues. *Ann. Inst. Pasteur*, 58: 6
5. DIDISHEIM, P. — LEWIS, J. H. — 1956 — Fibrinolytic and coagulant activities of certain snake venoms and proteases. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 93: 10
6. DUNNET, C. W. — 1955 — A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. statist. Ass.*, 50: 1096-1121
7. FEISSLY, R. — LUDIN, H. — 1949 — Microscopie par contrastes de phases. III. Applications à l'hématologie. *Rev. Hémat.*, 4: 481
8. FONTANA, F. — 1781 — Traité sur le venin de la vipère. Vol. I. Florence
9. GRASSET, E. — SCHWARTZ, D. E. — 1955 — Fractionnement par électrophorèse sur papier du venin de *Vipera russellii*. Propriétés et dosages des fracteurs coagulant et anticoagulant de ce venin. *Ann. Inst. Pasteur*, 88: 271

10. HENRIQUES, O. B. — LAVRAS, A. A. C. — FICHMAN, M. — 1956 — Partial purification and some properties of the blood-clotting factor from the venom of *Bothrops jararaca*. *Ciênc. e Cult.*, 8: 240
11. HENRIQUES, O. B. — FICHMAN, M. — HENRIQUES, S. B. — 1960 — Atividade proteolítica do veneno de *B. jararaca*. *Biochem. J.*, 75: 551
12. HOUSSAY, B. A. — NEGRETE, J. — 1918 — Estudios sobre venenos de serpientes. III. Acción de los venenos de serpientes sobre las substancias proteicas. *Rev. Inst. bact.*, B. Aires, 1: 341
13. LEE, R. I. — WHITE, P. D. — 1913 — A clinical study of the coagulation time of blood. *Amer. J. med. Sci.*, 145 (4): 495
14. NOC, F. — 1904 — Sur quelques propriétés physiologiques des différents venins de serpents. *Ann. Inst. Pasteur*, 18: 387
15. QUICK, A. J. — 1935 — The prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice. *J. biol. Chem.*, 109
16. QUICK, A. J. — 1940 — The thromboplastin reagent for the determination of prothrombin. *Science*, 92 (2379): 113
17. QUICK, A. J. — 1947 — Studies on the enigma of the hemostatic dysfunction of hemophilia. *Amer. J. med. Sci.*, 214 (3): 272
18. QUICK, A. J. — 1957 — Hemorrhagic diseases. Philadelphia, Lea & Febiger
19. ROSENFELD, G. — 1941 — Retração do coágulo sanguíneo. *Rev. clín. S. Paulo*, 10 (2): 43
20. ROSENFELD, G. — CILLO, D. M. — 1958 — Influence of snake venom on the bleeding time in hemorrhagic diseases. *Rev. clín. S. Paulo*, 34 (3): 51-56
21. ROSENFELD, G. — KELLEN, E. M. A. — NAHAS, L. — 1958 — Regeneration of fibrinogen after defibrination by bothropic venom in man and in dogs. Relationship with clotting and bleeding time. *Rev. clín. S. Paulo*, 34 (2): 36-44
22. ROSENFELD, G. — HAMPE, O. G. — KELLEN, E. M. A. — 1959 — Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms. Determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mem. Inst. Butantan*, 29: 143-163
23. ROSENFELD, G. — 1963 — Problemas do diagnóstico diferencial nas síndromes hemorrágicas. *J. bras. Med.*, 7 (4): 695
24. ROSENFELD, G. — MARTINS, L. F. — GRECCHI, R. — Neutralização do efeito anticoagulante da heparina, em cães, pelo veneno de serpentes *Bothrops jararaca* WIED 1824. Em publicação
25. SPANOUDIS, S. — EICHBAUM, F. — ROSENFELD, G. — 1955 — Inhibition of the local Schwartzman reaction by dicumarol. *J. Immunol.* 75 (3): 167
26. STEPHENS, J. W. W. — MYERS, W. — 1898 — The action of cobra poison on the blood; a contribution to the study of passive immunity. *J. Path. Bact.*, 5: 279