

ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS DURANTE A IMUNIZAÇÃO E APÓS A SANGRIA E PLASMAFERESE EM EQUINOS DE PRODUÇÃO DE SORO HIPERIMUNE ANTICROTÁLICO

ANDREA CRISTINA PARRA,¹ JUAREZ PINTO FERNANDES TÁVORA,² RONALDO AZEVEDO FERREIRA,³
PATRÍCIA STOCCO BETIOL⁴ E EDUARDO HARRY BIRGEL⁵

1. Doutoranda em Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ –USP) E-mail: acparra@usp.br

2. Médico veterinário da Fazenda São Joaquim do Instituto Butantan (São Paulo)

3. Médico veterinário da Fazenda São Joaquim do Instituto Butantan (São Paulo)

4. Doutoranda em Clínica Médica da FMVZ –USP

5. Professor titular aposentado na FMVZ – USP.

RESUMO

Para o estabelecimento do quadro sanguíneo de equinos durante a imunização para produção de soro hiperimune anticrotálico e após as sangrias de produção e a plasmaferese, realizou-se avaliação hematológica para determinar a eficácia da plasmaferese na recuperação do quadro hematimétrico dos animais. Foram utilizados vinte animais, submetidos às normas do protocolo de imunização do Instituto Butantan, sendo colhidas amostras antes das inoculações do antígeno (veneno crotálico), antes e depois das sangrias de produção, após as plasmafereses e quinze, trinta e quarenta e cinco dias após a última sangria, totalizando 340 colheitas, realizadas em dezessete momentos, para realização do hemograma.

Significativas variações no quadro hematológico dos equinos foram observadas na fase de imunização, caracterizando anemia normocítica normocrômica, sem alterações significativas do leucograma. Nas fases de sangrias, observaram-se evidentes variações no quadro hematológico, demonstrando uma anemia normocítica normocrômica pós-sangrias, sem variações nos valores do leucograma. No período de repouso, foi evidente a eficácia da plasmaferese, com pronta, mas parcial, recuperação do hemograma, facilitando o rápido retorno para normalidade hematológica, tornando-os aptos à nova produção de soro hiperimune.

PALAVRAS-CHAVES: Anticrotálico, equinos, hematologia, imunização, plasmaferese.

ABSTRACT

HAEMATOLOGY CHANGES DURING THE IMMUNIZATION AND AFTER THE BLEEDING AND PLASMAFERESE IN HORSES USED FOR HYPERIMUNE ANTI-CROTALIC SERUM PRODUCTION

Twenty animals were used to assess the blood profile of horses during immunization for anticrotalic hyperimmune serum production and after the bleedings and the plasmapheresis, according to the protocol schedule of Instituto Butantan in order to evaluate efficacy of plasmapheresis. The samples were obtained before the antigen inoculations (crotalic venom), before and after the bleedings, right after the plasmapheresis and 15, 30 and 45 days after the last one, making a total of 340 collections in 17 moments. Samples were submitted to hemogram. Significant variations were

observed on the blood profile of the horses throughout the immunization, showing normocytic, normochromic anemia, without significant alterations on leukogram. During the bleedings phases, evident variations were observed on the blood profile showing normocytic normochromic anemia after bleeding without changing the leukogram values. During rest periods, the efficacy of plasmapheresis was evident with a rapid, partial recovery of hemogram, making easier the fast return to hematologic normality, making them capable to a new hyperimmune serum production.

KEY WORDS: Anticrotalic, equine, hematology, immunization, plasmapheresis.

INTRODUÇÃO

Os primeiros registros sobre imunização de animais para fins terapêuticos foram feitos na França por SEWALL (1887, apud CHIPPAUX & GOYFFON, 1998), que imunizou um pombo contra o veneno de *Sistrurus catenatus* (cascavel-anã), usando repetitivas inoculações do veneno tratado com glicerina. O protocolo experimental foi vago, mas os pombos resistiram ao desafio com seis doses letais do veneno. ROUX & YERSIN (1888, apud CHIPPAUX & GOYFFON, 1998) mostraram que o sangue do animal imunizado contra toxina diftérica protegia animais não imunizados contra difteria. Von BERING & KITASATO (1890, apud CHIPPAUX & GOYFFON, 1998) confirmaram a transferência de imunidade passiva contra difteria e tétano.

Posteriormente, numa terapia com antivenenos, CALMETTE (1894, apud CHIPPAUX, 1998) estudou a ação de três protocolos de imunizações, observando que o soro hiperimune tinha uma atividade terapêutica. Assim, CALMETTE (1894) foi considerado pesquisador pioneiro na idealização e produção de antiveneno contra picada de cobras indianas. A produção de soro antiofídico, no Brasil, iniciou-se em 1901, quando o ilustre cientista brasileiro Vital Brasil Mineiro da Campanha, em São Paulo, em modesto laboratório, de forma pioneira, produziu o soro hiperimune antibubônico, para ser utilizado no controle de epidemia que se propagava em várias regiões do mundo e no Brasil, particularmente em São Paulo. No início da década de 1990, o Instituto Butantan foi considerado responsável pela produção de 70% dos antivenenos no Brasil, sendo os demais 30% produzidos pelo Instituto Vital Brasil (situado no Rio de Janeiro, RJ, também fundado por Vital Brasil) e pela Fundação Ezequiel Dias, FUNED, em Belo Horizonte, MG (RAW et al., 1991).

Os envenenamentos por serpentes descritos na América Central e América do Sul foram determinados principalmente pelos gêneros de serpentes causadores da maioria dos acidentes ofídicos, a saber, *Agkistrodon*, *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, sendo o maior número de acidentes notificados no Ministério da Saúde relacionados

às serpentes do gênero *Botrops*. Com o gênero *Crotalus*, notifica-se um número menor de acidentes em relação ao gênero *Botrops*, mas apresentando uma gravidade maior de suas reações oriundas do veneno. O gênero *Crotalus* é representado por duas espécies de serpentes – *Crotalus durissus* e *Crotalus vegrandis* – na América Central e do Sul. Neste grupo de serpentes, existem algumas subespécies: *Crotalus durissus durissus*; *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus cascavella* (HARRIS & SIMMONS, 1976-1977).

O veneno crotálico das cascavéis sul-americanas possui três princípios tóxicos ativos, com ações neurotóxicas, miotóxicas e coagulantes. A ação neurotóxica é determinada, principalmente, pela fração crotoxina (neurotoxina), indutora de bloqueio neuromuscular (paralisia motora). A ação miotóxica produz lesões de fibras musculares estriadas (rabdomiólise) com liberação de enzimas musculares e mioglobina no sangue, que posteriormente serão excretadas pela urina. A ação coagulante decorre de atividade semelhante à trombina, coagulando o fibrinogênio e originando a fibrina.

Ressalte-se que o excessivo consumo de fibrinogênio determina a ocorrência de hipofibrinogenemia e, portanto, a incoagulabilidade sanguínea (THOMAZINI & BARRAVIERA, 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). No envenenamento crotálico, causado pelas subespécies *Crotalus atrox* e *Crotalus molossus molossus*, predominantes no hemisfério norte do continente americano, foram descritas atividade agregatória de plaquetas, ausência de ação de coagulação do fibrinogênio e severas e intensas lesões necróticas (CORRIGAN et al, 1983; THOMAZINI & BARRAVIERA, 1994). A magnitude das lesões causadas pelo envenenamento crotálico e a severidade das manifestações clínicas observadas nos animais acidentados exigem medidas terapêuticas específicas e urgentes, tornando-se necessária a imediata utilização de soroterapia específica, com doses adequadas e seguindo um protocolo específico de repetições.

A produção do soro antiofídico utilizando equinos (para produção de soro anticrotálico) inicia-se com a extração do veneno das serpentes

e preparação do antígeno (consiste na mistura de diferentes venenos de subespécies do gênero de ofídio), preparação do equino (avaliação clínica), inoculação do antígeno no equino, realização de sangria exploratória (para titulação dos anticorpos específicos), sangrias de produção e plasmafereses.

A plasmaferese em equinos, de igual forma, foi recomendada para colheita de sangue e produção de imunoglobulinas, a serem utilizadas no controle de algumas enfermidades dos animais domésticos. Como exemplo, deve-se ressaltar que o plasma assim produzido teria adequada indicação nos casos de risco eminente de doenças hemorrágicas, deficiência da transferência passiva de imunoglobulinas das éguas para seus potros ou em doenças que determinem severa hipoproteinemia. Um dos fatores limitantes para o uso terapêutico da plasmaferese refere-se à taxa de substituição do plasma do animal doador do sangue (PHILLIPS et al., 1974; McVEY & LOAN, 1980; VON BERING & KITASATO, 1890; BROOK, 1989; MAGDESIAN et al., 1992; MCLURE et al., 2001).

Diante do significado dos acidentes ofídicos em humanos para a Saúde Pública e da importância econômica dessas ocorrências em animais criados com função de exploração econômica, houve extrema necessidade da produção de soros antiofídicos, para que os centros de saúde e instituições responsáveis pela saúde animal tivessem sempre à disposição soros hiperimunes, em quantidade e qualidade suficientes para amenizar ou inibir a ação das toxinas dos venenos de serpentes. Todavia, foi considerado como de extrema importância cuidar da manutenção da saúde e recuperação orgânica dos equinos sorodadores ou produtores de soro hiperimune, por meio da utilização da plasmaferese. Para tanto, procurou-se alcançar pleno conhecimento da fisiopatologia do processo de indução da produção maciça de imunoglobulinas específicas durante o processo de imunização de equinos contra venenos ofídicos. Nas pesquisas realizadas, além de considerar o quadro de sintomas locais e sistêmicos determinados pelas inoculações de antígenos e das lesões externas ou de órgãos internos deveriam

ser avaliadas as alterações sanguíneas, incluindo as variações do hemograma.

O trabalho objetivou a análise do quadro hematológico dos equinos, assim como a avaliação da eficácia da plasmaferese realizada no protocolo de hiperimunização de equinos sorodadores do Instituto Butantan, São Roque, SP, utilizando o momento 1 (colheita efetuada antes do início do protocolo de imunização, antes da 1ª inoculação do antígeno crotálico) como grupo-controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento da presente pesquisa, foram utilizados vinte equinos produtores de soro hiperimune anticrotálico da Fazenda São Joaquim do Instituto Butantan, machos, com idade entre 5 e 15 anos, clinicamente sadios, totalizando 340 amostras de sangue. Colheram-se as amostras segundo o protocolo de imunização anticrotálico do Instituto Butantan (que consiste em cinco inoculações do antígeno crotálico a cada sete dias), uma sangria exploratória (para titulação dos anticorpos específicos) após sete dias da última inoculação, três sangrias de produção (sangria propriamente dita, num volume de 8 a 9 litros de sangue total com ACD (1,47g de dextrose, 4,8g de citrato de sódio, 1,47g de ácido cítrico, água q.s.p. – 100mL), em bolsa dupla de circuito fechado) no intervalo de dois dias e duas plasmafereses (procedimento de reinjeção da fração celular para o doador, desprovida do plasma hiperimune, previamente retirado). Procedeu-se à coleta das amostras em dezessete momentos, conforme apresentado no Quadro 1.

QUADRO 1. Descrição das colheitas de amostras segundo cada momento

Momentos	Descrição das atividades
1 a 5	Antes de cada inoculação de antígeno crotálico
6	Antes da sangria exploratória
7, 9, 12	Antes de cada sangria de produção
8, 10, 13	Após cada sangria de produção
11, 14	Após cada plasmaferese
15	Após quinze dias da última sangria de produção
16	Após trinta dias da última sangria de produção
17	Após quarenta e cinco dias da última sangria de produção

A colheita das amostras foi feita por punção da veia jugular externa, com a utilização do sistema de colheita a vácuo vacuntainer® (Becton Dickinson) com EDTA (para obtenção de sangue total). Para realização do hemograma (que consiste em número de eritrócitos, volume globular, teor de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), número de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos), utilizou-se um contador automático celular – “Animal Blood Counter” – ABC – VET (ABX – Diagnostics).

O cálculo dos valores da média aritmética, do desvio-padrão e a variação dos resultados obtidos para os parâmetros hematológicos avaliados nesta pesquisa, bem como os testes estatísticos, comparando as médias obtidas nos grupos experimentais, foram determinados pelo programa de computador SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 1985). Inicialmente, na avaliação das variáveis estudadas, os resultados foram submetidos à análise de variância, e os contrastes entre médias determinadas pelo teste de Duncan, ambos com níveis de significância igual ou menor que 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados dos hemogramas apresentados no Quadro 2, a seguir, demonstrou que, durante o período de imunização, correspondente aos momentos 1 a 5 e referente às inoculações do antígeno crotálico, houve diminuição dos elementos mensuráveis do eritrograma, demonstrando, nessa fase, a ocorrência de insuficiência eritrocitária. A diminuição foi proporcional, de forma a caracterizar uma anemia normocítica normocrômica, isto é, sem alterações significativas dos índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), relacionados com o valor referido da amostra obtida antes do momento 1, utilizada como grupo-controle para a presente pesquisa. Esses resultados assemelham-se aos referidos por VAZ & ARAUJO (1949) e ESTRADA et al. (1992), que verificaram serem maiores os valores da taxa de hemoglobina e do volume globular antes da imunização dos animais.

QUADRO 2. Valores médios do eritrograma (número de hemácias, volume globular, teor de hemoglobina) no sangue de equinos produtores de soro antiveneno crotálico durante as várias fases de produção, a cada momento de colheita, Instituto Butantan – SP, 2008

Momentos de colheita	Nº de hemácias (x 10 ⁶ /mm ³).	Volume globular (%)	Teor de hemoglobina (g/dL)
1	10,19	46,1	16,55
2	9,33	41,7	15,27
3	9,62	42,4	15,18
4	9,49	42,2	15,32
5	9,61	41,9	14,92
6	9,35	40,8	15,58
7	9,14	40,2	15,16
8	8,63	38,1	14,48
9	7,45	32,0	12,55
10	7,1	30,6	11,99
11	8,19	35,5	13,75
12	7,64	33,1	13,24
13	7,33	31,7	12,42
14	8,06	35	13,48
15	8,83	40,8	15,51
16	10,07	46,7	15,64
17	10,35	47,6	16,05

O início do declínio desses valores foram atingidos no momento 6, referente à colheita efetuada antes da sangria exploratória, no final do processo de imunização e no início dos processos de sangrias. Essa diminuição foi acentuada após as sangrias de produção, referentes aos momentos 7 e 8, 9 e 10, e 12 e 13, com colheitas efetuadas antes e após a sangria, respectivamente. Evidencia-se, assim, a ocorrência de anemia, caracterizada de origem hemorrágica, como as que acontecem imediatamente após as hemorragias com perda de grande volume de sangue. Segundo índices hematimétricos de classificação das anemias, elas caracterizaram-se como normocíticas e normocrômicas, após avaliação feita dos índices hematimétricos absolutos, na evolução da fase de sangria exploratória e da sangria de produção, porém antes de se fazer a plasmaferese, pois as oscilações dos valores do VCM; HCM e CHCM variaram, respectivamente, entre $43,20 \pm 0,62$ fl e $44,30 \pm 0,63$ fl; $16,60 \pm 0,18$ pg e $16,98 \pm 0,27$ pg; $37,84 \pm 0,78$ % e $39,45 \pm 0,89$ %.

Destaque-se que as diferenças entre esses resultados não foram estatisticamente significativas. Os resultados obtidos na fase de sangrias concordaram, na essência, com os referidos por THOMAZINI & BARRAVIERA (1994). Esses autores observaram que, na fase de sangria dos equinos utilizados para produção de soro hiperimune antiveneno crotálico, havia decréscimo do número de hemácias e do teor de hemoglobina. Os resultados descritos nesta pesquisa também estão de acordo com aqueles observados por ANGULO et al., (1997), que detectaram significativa diminuição dos valores do volume globular e do teor de hemoglobina dos equinos produtores de soro hiperimune antiveneno de serpentes, após sangrias de produção.

Apesar das significativas diminuições dos valores ($p < 0,05$) dos elementos mensuráveis do quadro eritrocitário caracterizando um quadro de anemia pós-sangria (momentos 8, 10 e 13), observou-se recuperação pronta, porém parcial, com as plasmafereses (momento 11 e 14), sendo que as variações dos índices hematimétricos absolutos não foram significativas, pois os resultados obtidos mantiveram-se constantes e as variações não apresentaram valor biológico ou diferenças estatisticamente significativas, relacionadas com o momento 1 (grupo-controle). Os resultados obtidos nessa fase endossaram o efeito benéfico da plasmaferese na recuperação hematológica dos equinos produtores de soros hiperimune e recomendam sua utilização rotineira, para ser alcançada uma rápida e melhor recuperação da saúde desses animais.

O delineamento experimental proposto nesta pesquisa permitiu avaliar a recuperação do quadro hemático de equinos produtores de soro hiperimune antiveneno crotálico durante 45 dias (momentos 15, 16 e 17). Os resultados demonstraram que o protocolo estabelecido pelo Setor de Produção de Soros do Instituto Butantan permitiu rápida recuperação eritropoiética dos animais de produção. Não foi detectada variação significativa do número total de leucócitos, apesar de alguns animais apresentarem reação inflamatória no local das inoculações dos antígenos. De forma idêntica, não se observaram variações marcantes na distribuição do número

absoluto de polimorfonucleares neutrofilicos (com núcleo em bastonete ou segmentado), polimorfonucleares eosinofilicos e basofilicos e dos leucócitos mononucleares, tanto de linfócitos típicos, pequenos, grandes, e dos linfócitos atípicos, bem como de monócitos. Os resultados apresentados nesta pesquisa concordam com os obtidos por MAGDESIAN et al. (1992), que não demonstraram a existência de variações entre os valores obtidos na contagem diferencial dos leucócitos de equinos submetidos a repetidas inoculações, sangrias e plasmafereses.

CONCLUSÕES

A presente pesquisa demonstrou a eficácia da plasmaferese no processo de produção de soro hiperimune anticrotálico, por promover pronta, porém parcial, recuperação do hemograma dos animais.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa para realização do presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- ANGULO, Y.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J. M. Effects of bleeding in horses immunized with snake venoms for antivenom production. **Revista de Biología Tropical**, v. 45, n. 3, p. 1215-1221, 1997.
- BROOK, D. Aspects of plasma production. **Equine Veterinary Science**, v. 8, n. 6, p. 303-306, 1989.
- CALMETTE, A. L'immunisation artificielle des animaux contre le venin des serpents et la therapeutique experimentale des morsures venimeuses. **Comptes Rendus de L'Académie Sciences**, v. 118, p. 288, 1894.
- CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms: antivenoms and immunotherapy (Review article). **Toxicon**, v. 36, n. 6, p. 823-846, 1998.
- CORRIGAN, J. J. J.; JETER, M.; FERLAN, I. *In vitro*, effects of *Crotalus molossus molossus* (Blacktail rattlesnake) venom on human platelets, fibrinolysis and fibronogen, comparison with *C. atrox* and *C. adamanteus*. **Toxicon**, Supplement 3. p. 77-80, 1983.

- ESTRADA, R.; CHAVES, F.; ROBLES, A.; ROJAS, E.; SEGURA, E.; GUTIÉRREZ, J. M.; Valores hematológicos y de enzimas séricas en caballos inoculados con venenos de serpientes para la producción de antivenenos en Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 40, n. 1, p. 95-99, 1992.
- HARRIS, H. S.; SIMMONS, R. S. A new subspecies of *crotalus durissus* (Serpentes: Crotalidae) from the Rupununi savanna of Southwestern Guyana. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 40/41, p. 305-311, 1976-1977.
- MCLURE, J. T.; DELUCA, J. L.; LUNN, D. L.; MILLER, J. Evaluation of IgG concentration and IgG subisotypes in foals with complete or partial failure of passive transfer after administration of intravenous serum or plasma. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 7, p. 681-686, 2001.
- McVEY, S.; LOAN, R. W. Total and antigen-specific serum immunoglobulin isotype concentrations in hyperimmunized cattle that have undergone plasmapheresis. **American Journal Veterinary Research**, v. 50, n. 5, p. 758-761. may 1989.
- MAGDESIAN, K. G.; BROOK, D.; WICKLER, S. J. Temporal effects of plasmapheresis on serum proteins in horses. **American Journal Veterinary Research**, v. 53, n. 7. p. 1149-1153, 1992.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 1999. 131 p.
- PHILLIPS, A. W.; COURTENAY, J. S.; RUSTON, R. D. H.; MOORE, J.; BAKER, C.; EPPSH. B. S. Plasmapheresis of horses by extracorporeal circulation of blood. **Research Veterinary Science**, v. 16, p. 35-39, 1974.
- RAW, I.; GUIDOLIN, R.; HIGASHI, H. G.; KELEN, E. M. A. Antivenins in Brazil: Preparation. In: TU, A.T. **Reptile Venoms and Toxins**, v. 5, p. 557-578, 1991.
- ROUX, P.; YERSIN, A. Contribution à l'étude de la difté-rie. **Annals Institute Pasteur**, v. 2, p. 629-649, 1888.
- SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**. Versão Cary: SAS Institute, 1985.
- SEWALL, H. Experiments on the preventive inoculation of rattlesnake venom. **Journal of Physiology**, v. 8, p. 203-210, 1887.
- THOMAZINI, I.A.; BARRAVIEIRA, B. Alterações hematológicas nos acidentes por animais peçonhentos. In: BARRAVIEIRA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. p. 81-89.
- VAZ, E.; ARAUJO, P. Sangria de animais de imunização. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 21, p. 275-298, 1949.
- VON BERING, E.; KITASATO, S. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-immunität und der Tetanus- immunität bei Thieren. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 16, p. 1113-1145, 1890.

Protocolado em: 28 jan. 2008. Aceito em: 28 abr. 2009.