

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE SCHALM E DE CLAUSS NA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DO FIBRINOGÊNIO EM EQUINOS HÍGIDOS E COM CÓLICA

PAULA ALESSANDRA DI FILIPPO,¹ ÁUREO EVANGELISTA SANTANA² E LIA G. REZENDE³

1. Pós-graduanda do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV, UNESP. E-mail: paula_difilippo@yahoo.com.br

2. Professor doutor do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV, UNESP

3. Residente do Laboratório de Patologia Clínica da FMVZ, UNESP

RESUMO

Foram comparadas, em oito diferentes momentos, duas técnicas de determinação da concentração plasmática do fibrinogênio em equinos hígidos (GI=20) e com cólica (GII=10): a técnica de Schalm, fundamentada na precipitação térmica do fibrinogênio a 56°C, e a técnica de Clauss, que envolve a polimerização da molécula de fibrinogênio. Em ambos os grupos e em todos os momentos de avaliação os valores médios obtidos por intermédio da técnica de Schalm foram superiores ($P<0,05$) àqueles obtidos pela técnica de Clauss. A diferença observada entre os dois métodos avaliados deve-se à interferência de inúmeros fatores inibidores do processo cinético atuantes no procedimento de Clauss. A

hiperfibrinogenemia apresentada pelos animais com cólica (GII) entre o segundo e o quinto dias pós-operatório deve-se não somente ao trauma cirúrgico, mas também ao processo inflamatório e infeccioso da ferida cirúrgica. A análise seriada do fibrinogênio contribui de forma positiva e precoce no diagnóstico de processos inflamatórios e infecciosos em equinos com cólica. Diante de tais observações, recomenda-se o método de Schalm na determinação do fibrinogênio em equinos hígidos e com cólica, por ser de um procedimento simples, de fácil execução, baixo custo e com resultados coerentes.

PALAVRAS-CHAVES: Cólica, comparação de técnicas, equinos, fibrinogênio.

ABSTRACT

COMPARATIVE STUDY BETWEEN PLASMA FIBRINOGEN CONCENTRATIONS DETERMINED BY SCHALM AND CLAUSS TECHNIQUES IN COLIC AND HEALTHY HORSES

Two different techniques for the determination of fibrinogen plasma concentration were compared during eight time points. Twenty healthy horses (GI) and ten horses with colic (GII) were included in this study. The Schalm's technique was compared to the Clauss's technique. The first one is based on the thermal precipitation of the fibrinogen at 56°C. The second involves the polymerization of the fibrinogen molecule. Both groups of horses during all time points had mean values of plasmatic fibrinogen higher using Schalm's technique compared to the values obtained with Clauss technique ($p<0.05$). This difference can be due to the

several inhibitor factors that interfere with the kinetic process at the Clauss's technique. The hyperfibrinogenemia seen in GII, between the 2nd and 5th day post-surgery occurred not only due to the surgical trauma, but also to the infection process at the surgical wound. With these finding it is recommended the use of Schalm's technique for fibrinogen determination in healthy and colic horses. This technique is then considered to be the simplest, of easy execution, low cost and coherent. The seriated analysis of fibrinogen contributes in a positive and precocious manner during the diagnoses of inflammatory and infectious processes in colic horses.

KEY WORD: Colic, equine, fibrinogen, techniques comparison.

INTRODUÇÃO

O fibrinogênio é uma glicoproteína dimérica composta por três pares de cadeias polipeptídicas ($A\alpha$, $B\beta$, e γ). Em condições normais, menos de 70% das moléculas de fibrinogênio possuem ambas dessas cadeias $A\alpha$ intactas e de alto peso molecular (fibrinogênio-HMW). As demais moléculas possuem uma porção C-terminal e uma molécula de fibrinogênio de baixo peso molecular (fibrinogênio-LMW), ou ambas de pesos moleculares ainda mais baixos (fibrinogênio-LMW¹), resultando em prejuízo na polimerização do fibrinogênio (CARAPETO et al., 2006).

Durante as reações de fase aguda, como as que ocorrem após a maioria dos procedimentos cirúrgicos, a concentração de fibrinogênio aumenta rapidamente no plasma, principalmente pelo aumento da síntese do fibrinogênio-HMW. Depois disso, o aumento da fração HMW diminui gradativamente até atingir o normal, ao passo que a concentração total de fibrinogênio permanece elevada por um longo período de tempo (JENSEN et al., 2000).

Outros marcadores da resposta inflamatória aguda tais como a proteína C reativa, haptoglobina, ceruloplasmina e a $\alpha 1$ -glicoproteína ácida, além de não estarem completamente validados ou padronizados para a espécie equina, não são facilmente determinados na rotina clínica. Assim, apesar da falta de especificidade diagnóstica, a determinação do fibrinogênio, segundo TAMZALI et al. (2001), torna-se especialmente conveniente, desde que possa ser facilmente mensurada, mesmo que por técnicos pouco treinados.

Diante dessas observações, o presente estudo objetivou comparar as técnicas de Schalm e de Clauss na determinação da concentração plasmática do fibrinogênio em equinos hípidos e com cólica, bem como correlacionar os achados às possíveis causas e consequências, e ainda investigar se tais procedimentos podem auxiliar no diagnóstico de processos inflamatórios e infecciosos.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se vinte equinos hípidos, sete machos (castrados) e treze fêmeas (não gestan-

tes), quatorze Brasileiros de Hipismo, um Anglo Árabe, um Mangalarga Marchador e quatro sem raças definidas, com idades entre dois e vinte anos (média= 11.35 anos), os quais constituíram o grupo GI (controle), e dez equinos com cólica, submetidos à laparotomia exploratória, os quais constituíram o grupo GII (Quadro 1).

Nenhum dos animais ensaiados apresentou alterações nos valores dos biomarcadores sanguíneos da função hepática, quais sejam, aspartato aminotransferase, gamaglutamiltransferase e fosfatase alcalina.

As amostras de sangue foram obtidas por venipunção jugular, com agulhas 25x8, acopladas em seringas plásticas descartáveis, em oito diferentes momentos, antes da laparotomia (M0) e, diariamente (às 8 horas), a partir da cirurgia, até o sétimo dia pós-operatório.

Para a realização da técnica de precipitação térmica descrita por SCHALM (1970), foram utilizadas amostras de sangue colhidas em frascos contendo ácido etilenodiaminotetracetato dissódico (1 mg/mL^{-1}). Ato contínuo, preencheram-se dois tubos de micro-hematócrito com a amostra de sangue, até atingir aproximadamente 75% de sua capacidade, com subsequente vedação de uma de suas extremidades. Posteriormente, foram centrifugados por cinco minutos a 12000G e, a partir do sobrenadante, determinou-se em um dos tubos a concentração proteica plasmática total por refratometria.¹ Sequencialmente, o segundo tubo foi submetido à temperatura de 56°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) por três minutos e recentrifugado por cinco minutos a 12000G. Após o que mensurou-se novamente a concentração proteica plasmática total. A diferença entre a concentração proteica inicial (tubo um) e final (tubo dois) ensejou a obtenção da concentração do fibrinogênio presente na amostra em mg/dL^{-1} .

No procedimento cronométrico descrito por CLAUSS (1957), utilizaram-se amostras de sangue colhidas em tubos contendo citrato de sódio ($0,13 \text{ mol/L}$) na razão de 9:1. Ato contínuo, as amostras foram centrifugadas a 5000G por cinco minutos e, em seguida, diluíram-se $200\mu\text{L}$ do plasma citratado em uma solução tampão contendo

1. Biosystems, 301.

barbital sódico, na razão de 1:10. Posteriormente, essa solução foi acrescida de 100µL de trombina (100 NIH U/mL), responsável pela polimerização do fibrinogênio.² O tempo de formação do coágulo foi determinado a 37°C, por meio de um analisador específico.³ O tempo obtido foi então convertido em concentração de fibrinogênio por meio de uma tabela específica fornecida pelo fabricante. Analisou-se cada amostra quatro vezes e utilizou-se a média das observações na elaboração da concentração final de fibrinogênio. As amostras de

sangue dos animais-controle foram similarmente colhidas e analisadas.

Para comparar os diferentes métodos dentro de cada grupo, foi aplicado o teste t de Student pareado para amostras dependentes. Para confrontar as médias dos diferentes grupos em cada método, empregou-se o teste t de Student para amostras independentes. Para ambos os métodos estatísticos, considerou-se o nível de probabilidade de 5%. Procedeu-se a um estudo de correlação entre as variáveis dependentes por intermédio do cálculo dos coeficientes de correlação de Pearson por meio do programa Statistical Analysis of System (SAMPAIO, 2002).

2. Kit Comercial Wiener, Rosário Argentina.

3. Quick timer, Drake.

QUADRO 1. Equinos do grupo II

Nº	Raça	Idade (anos)	Sexo	Duração dos sinais antes da apresentação	Achados clinicocirúrgicos
1	West-Fallen	10	MNC	6 horas	Encarceramento nefroesplênico de cólon maior
2	Brasileiro de Hipismo	3	MC	10 horas	
3	Paint-Horse	13	F	48 horas	Compactação de cólon maior
4	Brasileiro de Hipismo	9	F	6 horas	Compactação de íleo
5	Puro Sangue Lusitano	9	MNC	5 horas	
6	Puro Sangue Inglês	13	MNC	9 horas	Compactação de jejuno
7	Brasileiro de Hipismo	10	F	8 horas	Deslocamento de cólon maior
8	Quarto de Milha	8	MC	10 horas	
9	Puro Sangue Inglês	10	MNC	10 horas	Hérnia inguinoescrotal
10	Paint-Horse	6	MNC	8 horas	

F= fêmea; MC= macho castrado; MNC= macho não castrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das concentrações plasmáticas de fibrinogênio, com as respectivas médias, desvios-padrão e estatística calculada estão expressos na Tabela 1.

Na Tabela 1, observa-se que os valores médios obtidos por intermédio da técnica de Schalm foram superiores ($p < 0,05$) aos obtidos pela técnica de Clauss, em todos os momentos de avaliação, nos animais dos grupos GI e GII. Ademais, constata-se

que os valores médios apresentados pelos animais hípidos (GI) encontram-se dentro da faixa dos valores de referência para a espécie equina (200-400 mg/dL⁻¹) apenas quando obtidos pela técnica de Schalm. Resultados semelhantes foram encontrados por DINTENFASS & KAMMER (1976), CAMPBELL et al. (1981), HENRY & MOORE (1991) e por TAMZALI et al. (2001), os quais obtiveram valores de fibrinogênio 30% mais baixos quando fizeram uso da técnica cronométrica, em comparação à técnica de precipitação térmica.

TABELA 1. Média \pm desvio-padrão da concentração plasmática de fibrinogênio obtida por intermédio da técnica de Schalm e de Clauss de vinte equinos hígidos (GI) e de dez equinos com cólica, submetidos à laparotomia exploratória (GII)

Momentos	Grupos	Técnica de Schalm (mg/dL ⁻¹)	Técnica de Clauss (mg/dL ⁻¹)
0	GI	275,0 \pm 61a	186,5 \pm 73b
	GII	277,1 \pm 71a	187,1 \pm 55b
1º dia	GI	298,0 \pm 75a	188,5 \pm 62b
	GII	389,1 \pm 78a	204,3 \pm 27b
2º dia	GI	255,0 \pm 89Ba	171,5 \pm 37Bb
	GII	571,6 \pm 58Aa	240,0 \pm 40Ab
3º dia	GI	250,0 \pm 10Ba	166,5 \pm 73Bb
	GII	617,43 \pm 63Aa	258,57 \pm 28Ab
4º dia	GI	245,0 \pm 76Ba	161,0 \pm 23Bb
	GII	557,1 \pm 51Aa	242,8 \pm 58Ab
5º dia	GI	310,0 \pm 77Ba	171,5 \pm 65Bb
	GII	454,3 \pm 86Aa	250,0 \pm 75Ab
6º dia	GI	305,0 \pm 22a	188,5 \pm 62b
	GII	400,0 \pm 59a	212,8 \pm 32b
7º dia	GI	300,0 \pm 56a	171,0 \pm 37b
	GII	405,7 \pm 54a	214,3 \pm 30b

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna, indicam diferenças significativas entre os grupos dentro de cada técnica e momento ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras minúsculas distintas, na mesma linha, indicam diferenças significativas entre as técnicas dentro de cada grupo e momento ($p < 0,05$).

Essas diferenças, segundo TAMZALI et al. (2001), guardam estreita relação com a grande diversidade de técnicas laboratoriais utilizadas na quantificação do fibrinogênio, propiciando que os valores dessa glicoproteína, tanto em equinos hígidos como naqueles com cólica, variem amplamente entre autores e métodos de determinação. Entretanto, para JENSEN et al. (2000), as diferenças originam-se principalmente no fato de que as técnicas em questão se baseiam em princípios distintos.

A técnica de Schalm determina a quantidade total de glicoproteína precipitada pelo calor a 56°C. A de Clauss mensura a porção funcionalmente ativa do fibrinogênio, que é a molécula coagulável e, nesse sentido, muitos fatores tais como a viscosidade do plasma, a concentração de proteínas anormais como as crioglobulinas e

possíveis produtos de degradação da fibrina podem interferir com o processo cinético e contribuir para a diferença observada entre os dois métodos.

O estímulo à síntese de fibrinogênio, segundo JAIN (1993), ocorre seis a oito horas após a injúria, sendo os valores máximos obtidos entre dois a cinco dias. À semelhança do obtido por DATT & USENIK (1974), JENSEN et al. (2000) e por FEIGE et al. (2003), constatou-se neste ensaio que os valores máximos de fibrinogênio apresentados pelos animais com cólica foram obtidos entre o segundo e o quinto dias pós-operatório. Entretanto, permaneceram dentro da faixa dos valores de referência quando obtidos pela técnica de Clauss.

O aumento na concentração plasmática de fibrinogênio em equinos com cólica, segundo DATT & USENIK (1974), deve-se à desidratação, com consequente aumento das proteínas plasmáticas totais na corrente sanguínea. Para outros pesquisadores, a elevação dessa proteína de fase aguda indica muito mais a existência de uma resposta inflamatória estimulada pelo ato cirúrgico ou decorrente da própria afecção intestinal, do que derivado da desidratação (FAGLIARI & SILVA, 2002; FEIGE et al., 2003; SOUTHWOOD, 2006). Equinos com cólica frequentemente apresentam-se desidratados e hipovolêmicos, o que decorre, principalmente, do movimento de água para o terceiro espaço, como foi descrito por BOSCAN & STEFFEY (2007). Neste ensaio, verificou-se que apenas os animais com cólica (GII) encontravam-se desidratados, porém somente no momento zero.

A hiperfibrinogenemia apresentada pelos animais do GII foi associada não somente ao trauma cirúrgico, como também a um processo inflamatório e infeccioso da ferida cirúrgica apresentado por sete dos dez animais avaliados. Esse processo culminou com o desenvolvimento de hérnias incisionais e com a necessidade de reintervenções cirúrgicas. Entretanto, dois desses animais não apresentavam alteração na concentração plasmática do fibrinogênio, no estágio inicial do processo inflamatório. Segundo CAMPBELL et al. (1981), nesse estágio a quantidade de fibrinogênio produzido pode não ser suficiente para acarretar sua alteração plasmática.

Adicionalmente, tem-se que a determinação da concentração plasmática de fibrinogênio também pode ser utilizada como teste adicional na interpretação do leucograma em equinos (CAMPBELL et al., 1981). Segundo esses autores, em equinos as mudanças na contagem total ou diferencial dos leucócitos em resposta aos processos infecciosos ou toxicoinfecciosos não são tão intensas como as observadas em cães, em virtude, sobretudo, do pequeno estoque de granulócitos na medula óssea dos equinos. Corroborando tais afirmações, observou-se que os animais com cólica apresentavam leucopenia, neutropenia e linfopenia entre o segundo e o quinto dia pós-operatório, e leucocitose por neutrofilia apenas entre o sétimo e o décimo dia pós-operatório, quando as feridas cirúrgicas já demonstravam sinais clínicos característicos da evolução de um processo inflamatório e infeccioso.

CONCLUSÕES

Neste ensaio, verifica-se que a técnica de Schalm demonstra maior coerência e precisão na expressão de valores de fibrinogênio tanto em equinos hípidos quanto naqueles com cólica, devendo, portanto, ser priorizada na avaliação de tal variável, se comparada à técnica de Clauss. Ademais, apresenta facilidade e rapidez na sua execução, e menores custos.

Além disso, a determinação da concentração plasmática do fibrinogênio, de forma seriada, contribui de forma positiva e precoce no diagnóstico de estados inflamatórios e infecciosos em equinos com cólica.

AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo financiamento integral a esta pesquisa (processos nº. 03/09844-5 e 04/08662-3).

COMISSÃO DE ÉTICA

Aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA), protocolo nº 013332-07.

REFERÊNCIAS

- BOSCAN, P.; STEFFEY, E. Plasma colloid osmotic pressure and total protein in horses during colic surgery. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 34, p. 408-415, 2007.
- CAMPBELL, M. D.; BELLAMY, J. E.; SEARCY, G. P. Determination of plasma fibrinogen concentration in the horse. **American Journal Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 100-104, 1981.
- CARAPETO, M. V.; BARRERA, R.; MAÑE, M. C.; ZARAGOZA, C. Serum α -globulin fraction in horses is related to changes in the acute phase proteins. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n. 3, p. 120-127, 2006.
- CLAUSS, A. Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens. **Acta Haematologica**, v. 17, n. 2, p. 237-246, 1957.
- DATT, S. C.; USENIK, E. A. Intestinal obstruction in the horse. Physical signs and blood chemistry. **Cornell Veterinary**, v. 65, n. 2, p. 152-172, 1974.
- DINTENFASS, L.; KAMMER, S. Re-evaluation of heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation: effect of abnormal proteins and plasma viscosity. **Clinical Pathology**, v. 29, n. 2, p. 130-134, 1976.
- FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hípidos e de equinos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 6, p. 559-567, 2002.
- FEIGE, K.; KASTNER, S. B. R.; DEMPFFLE, C. E.; BALESTRA, E. Changes in coagulation and markers of fibrinolysis in horses undergoing colic surgery. **Journal Veterinary Medicine**, v. 50, p. 30-36, 2003.
- HENRY, M. M.; MOORE, J. N. Clinical relevance of monocyte procoagulant activity in horses with colic. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 198, p. 843-848, 1991.
- JAIN, N. C. The plasma proteins, dysproteinemias, and immune deficiency disorders. In: JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Saunders, 1993. p. 349-380.
- JENSEN, T.; HALVORSEN, S.; GODAL, H. C.; SANDSET, P. M.; SKJØNSBERG, O. H. Discrepancy between fibrinogen concentrations determined by clotting rate and

clottability assays during the acute-phase reaction. **Thrombosis Research**, v. 100, p. 397-403, 2000.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudos e Pesquisas em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.
SCHALM, O.W. Clinical significance of plasma protein concentration. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 157, n.11, p. 1672-1673, 1970.

SOUTHWOOD, L. Acute abdomen. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 5, n. 2, p. 112-126, 2006.

TAMZALI, Y.; GUELFY, J. F.; BRAUN, J. P. Plasma fibrinogen measurement in the horse: comparison of Millar's technique with a chronometric technique and the QBC-Vet Autoreader. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 71, n. 3, p. 213-217, 2001.

Protocolado em: 29 jan. 2008. Aceito em: 9 mar. 2009.