

# CONCENTRAÇÃO DO FIBRINOGENO NO PLASMA SANGÜÍNEO DE EQUINOS DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR POR DIFERENTES MÉTODOS

Maria Verônica de Souza<sup>1</sup>  
Patrícia Coutinho de Souza<sup>1</sup>  
Bernardo de Lima Rodrigues<sup>1</sup>  
José Ivo Ribeiro Júnior<sup>2</sup>  
Rachel Rodrigues Cordeiro<sup>1</sup>

## RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram determinar e comparar a concentração do fibrinogênio por duas técnicas distintas em 120 equinos clinicamente saudáveis, da raça Mangalarga Marchador. A concentração do fibrinogênio variou de 200 a 400 mg dL<sup>-1</sup> pelo método da precipitação pelo calor e de 129 a 424 mg dL<sup>-1</sup> pelo método cronométrico. Embora os métodos utilizados tenham fornecido médias diferentes ( $p < 0,05$ ), os valores obtidos em ambos os casos estiveram entre aqueles considerados normais para a espécie equina. Além disso, quando a concentração do fibrinogênio, pelo método de precipitação pelo calor, foi de 200 mg dL<sup>-1</sup>, pelo método cronométrico a média variou de 140 a 150 mg dL<sup>-1</sup>. Já quando o valor do fibrinogênio foi de 400 mg dL<sup>-1</sup>, a variação da média no método cronométrico foi de 280 a 310 mg dL<sup>-1</sup>.

Palavras-chave: fibrinogênio, equinos, cronometria, precipitação pelo calor.

## ABSTRACT

### PLASMA FIBRINOGEN CONCENTRATION IN MANGALARGA MARCHADOR HORSES DETERMINED BY DIFFERENT METHODS

The objective of this work was to determine and to compare the plasma fibrinogen concentration using two different techniques in 120 clinically healthy Mangalarga Marchador horses. The fibrinogen concentration was 200 to 400 mg dL<sup>-1</sup> (heat-precipitation method) and 129 to 424 mg dL<sup>-1</sup> (chronometric method). Although the methods used resulted in different average values ( $p < 0.05$ ), the values obtained with both methods were among those considered as normal for the equine. Furthermore, when the fibrinogen concentration by the heat-precipitation method was 200 mg dL<sup>-1</sup>, in the chronometric method it ranged from 140 mg dL<sup>-1</sup> to 150 mg dL<sup>-1</sup>. However, when the value was 400 mg dL<sup>-1</sup>, the range in the chronometric method was 280 mg dL<sup>-1</sup> to 310 mg dL<sup>-1</sup>.

Key words: fibrinogen, horses, chronometric method, heat-precipitation method.

<sup>1</sup>Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. E-mail: msouza@ufv.br (autor para correspondência)

<sup>2</sup>Departamento de Informática. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. E-mail: jivo@dpi.ufv.br

## INTRODUÇÃO

A capacidade de reconhecer o início e a gravidade de um processo inflamatório é fundamental na escolha do tratamento e de sua monitorização. O fibrinogênio é uma importante glicoproteína de fase aguda, produzida em maior quantidade pelo fígado na presença de afecções inflamatórias (Auer *et al.*, 1989; Cotran *et al.*, 1989; Mills *et al.*, 1998) e infecciosas (McSherry *et al.*, 1970; Schalm, 1970). Encontra-se livre no sangue e dentro dos grânulos plaquetários (Handagama *et al.*, 1990) e constitui aproximadamente 5% da proteína plasmática total (Kaneko, 1997), sendo espécie específica (Stormorken, 1957; Dodds, 1997).

O fibrinogênio atua como substrato para a trombina na cascata da coagulação (Andrews *et al.*, 1994), resultando na formação de monômeros de fibrina. Há várias formas de se determinar o fibrinogênio plasmático. Historicamente, os dois métodos mais utilizados são a precipitação pelo calor e a mensuração pela completa conversão da fibrina na presença da trombina (método do coágulo de fibrina) (Ratnoff & Menzie, 1951). A precipitação pelo calor (Schalm *et al.*, 1975), apesar de não ser um método tão acurado quanto o do coágulo de fibrina, é mais comumente utilizado em medicina veterinária. Essa técnica baseia-se no fato de que o fibrinogênio se precipita seletivamente frente as demais proteínas plasmáticas, em temperatura de 55° a 58°C (Coles, 1984).

Em cavalos saudáveis a concentração do fibrinogênio pode variar entre 200 e 400 mg dL<sup>-1</sup> (Stormorken, 1957), com limites mínimo e máximo aceitáveis de 100 a 500 mg dL<sup>-1</sup>, respectivamente (Coles, 1984). Entretanto, uma concentração de 500 a 600 mg dL<sup>-1</sup> pode ser decorrente de processo inflamatório em fase aguda, enquanto valor igual ou superior a 1.000 mg dL<sup>-1</sup> indica inflamação em estágio mais avançado e de pior prognóstico (Campbell *et al.*, 1981).

O valor médio do fibrinogênio plasmático em equinos da raça Puro Sangue Inglês, submetidos à lesão de tecido mole, foi de 660±120 mg dL<sup>-1</sup> (Mills *et al.*, 1998). Allen & Kold (1988) estimaram a concentração do fibrinogênio em equinos após trauma tecidual cirúrgico, utilizando técnica de pesagem do coágulo descrita por Allen & Blackmore (1984). Os valores médios encontrados no pré-operatório foram de 413 e de 409 mg

dL<sup>-1</sup> nos animais com cisto ósseo subcondral e osteocondrose, respectivamente. Após a cirurgia, houve elevação nos níveis dessa glicoproteína, o que, na opinião dos autores, se deveu ao aumento na síntese hepática, maior do que a demanda necessária à cicatrização da ferida, à perda ou ao consumo.

Campbell *et al.* (1981) compararam a concentração do fibrinogênio plasmático em equinos das raças Puro Sangue Inglês, Percheron, Trote Americano e mestiços das duas últimas, mediante a utilização do método de precipitação pelo calor (Millar *et al.*, 1971; Schalm *et al.*, 1975) e a técnica do coágulo de fibrina, descrita por Ratnoff & Menzie (1951), que serviu como valor de referência. Segundo os autores, o método de Millar foi mais preciso e acurado, evidenciando correlação positiva com a técnica de Ratnoff.

A relação entre a proteína plasmática total (PPT) e a concentração do fibrinogênio (F) auxilia a interpretação dos níveis desta glicoproteína (Schalm *et al.*, 1970), seja quando o equino apresenta hipoproteinemia marcante ou hiperproteinemia, já que nessas situações os valores do fibrinogênio podem ser subestimados ou superestimados, respectivamente (Andrews *et al.*, 1994). Para isso, utiliza-se a seguinte fórmula:

$$PPT/F = \frac{[\text{proteína plasmática total (g dL}^{-1}\text{)}] - [\text{fibrinogênio (mg dL}^{-1}\text{)}]}{[\text{fibrinogênio (mg dL}^{-1}\text{)}]}$$

Adicionalmente, a proporção PPT/F permite distinguir as possíveis causas da hiperfibrinogenemia, já que, durante a hemoconcentração, ocorre um relativo aumento em todos os componentes das proteínas plasmáticas, incluindo o fibrinogênio. Porém, maior síntese do fibrinogênio em geral não está associada à elevação dos níveis das demais proteínas (Jain, 1993). A relação PPT/F acima de 15 é considerada normal. Já valor entre 10 e 15 demonstra significativa elevação no fibrinogênio plasmático e sugere processos inflamatórios (Allen & Kold, 1988; Latimer *et al.*, 2003).

Como mencionado, há diversas técnicas para a determinação do fibrinogênio. A técnica de coagulação das proteínas (Ratnoff & Menzie, 1951), apesar de acurada e confiável, necessita de equipamento especializado, o que torna sua aplicação limitada na rotina laboratorial. O método de precipitação pelo calor (Schalm *et al.*, 1975) é considerado rápido e de simples execução, além de não necessitar de equipamentos especiais. Entretanto, há dúvidas quanto à sua eficácia,

já que na prática veterinária se observa, ocasionalmente, variação de resultados. Em medicina humana, utiliza-se com frequência a técnica cronométrica, e a concentração do fibrinogênio é mensurada mediante a formação de um coágulo pela adição de trombina em uma alíquota de plasma diluído em citrato (Clauss, 1957). Apesar da eficácia demonstrada em trabalhos realizados em humanos (Agarwal *et al.*, 1981; Tan *et al.*, 1995), é uma técnica ainda pouco utilizada em equinos, sendo importante compará-la a um método mais rotineiramente utilizado, para que essa possa ser implantada na rotina dos laboratórios clínicos veterinários. Adicionalmente, a utilização de um kit da linha humana para a determinação de valores de referência na patologia clínica veterinária tem importância prática, já que há regiões do Brasil onde os laboratórios realizam análises apenas para o homem. Nesse sentido, os objetivos deste trabalho foram determinar e comparar os valores da concentração de fibrinogênio no plasma sanguíneo de cavalos sadios da raça Mangalarga Marchador, utilizando-se as técnicas de precipitação pelo calor e a cronométrica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados um total de 120 animais da raça Mangalarga Marchador, sendo 80 fêmeas e 40 machos, com idade entre 4 e 14 anos ( $7,09 \pm 2,80$ ), pesando em torno de  $390,5 \pm 48,3$  kg e oriundos de Viçosa e microrregião, de Minas Gerais. As fêmeas eram utilizadas como reprodutoras ou para passeio. Já os machos eram utilizados como reprodutores, para passeio ou concurso de marcha.

A limitação da região de origem dos animais teve como objetivo a obtenção de uma amostra mais padronizada com respeito à alimentação (capim - elefante picado e pasto de gramínea nativa) e ao manejo (semi-extensivo).

Todos os animais estavam clinicamente sadios, não apresentando histórico de qualquer problema clínico até seis meses antes da colheita do sangue.

A concentração do fibrinogênio foi determinada mediante a utilização das técnicas descritas a seguir.

### *Técnica de precipitação pelo calor (Schalm et al., 1975)*

Amostra de sangue coletada em tubo contendo o anticoagulante EDTA tripotássico foi aspirada em dois tubos capilares, que foram fechados em uma das extremidades. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 5 minutos. Um dos tubos foi aquecido em banho-maria a  $56^{\circ}\text{C}$ , durante 3 minutos, e, então, novamente centrifugado (10.000 rpm, durante 5 minutos) para a separação do fibrinogênio das demais proteínas. Do plasma resultante, foi retirada uma alíquota composta por uma gota de cada tubo, que foi colocada sobre o prisma do refratômetro de Goldberg, para a leitura direta da concentração das proteínas. Os valores da concentração do fibrinogênio foram obtidos pela diferença entre os resultados das proteínas plasmáticas totais, obtidas a partir dos dois tubos, com e sem aquecimento. Esses valores foram expressos em  $\text{mg dL}^{-1}$ .

### *Técnica cronométrica (Clauss, 1957)*

Para esta técnica, foi utilizado o kit Hemolab Fibrinomat<sup>1</sup>. As amostras foram coletadas em tubos contendo citrato trissódico 0,11M, e centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 rpm para a obtenção do plasma. Em seguida, foi adicionado 0,9 mL da solução de trombina em 0,1 mL de plasma; o tempo necessário para a coagulação da amostra foi cronometrado. Com o auxílio de uma tabela de correlação fornecida pelo fabricante, o tempo obtido foi convertido para o valor correspondente à concentração do fibrinogênio presente na amostra.

### *Análise estatística*

Os valores das concentrações do fibrinogênio obtidos pela técnica de precipitação pelo calor e pela cronométrica foram avaliados simultaneamente em 120 animais, cujas médias foram comparadas, pelo teste *t*-Student, no caso de duas amostras emparelhadas, a 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

É fundamental estabelecer valores de referência de parâmetros hematológicos para animais adaptados ao

<sup>1</sup>Biolab-Mérieux S.A., CNPJ: 33.040.635/0001-71 – Tel.: 0800-264848 – Estrada do Mapuá, 491 – Japareaguá – Rio de Janeiro – CEP.: 22710-261. (Nota de rodapé)

manejo realizado no Brasil. Um método de determinação de um parâmetro plasmático deve ser eficiente e de baixo custo. A obtenção dos valores do fibrinogênio pela técnica cronométrica é rápida e confiável, necessitando apenas da utilização de um “kit”, o que onera muito pouco o custo de execução da análise. É amplamente empregada em laboratórios clínicos humanos, possibilitando também a sua utilização para análises de animais.

A técnica da precipitação pelo calor, além da fácil execução, exige menor investimento financeiro e oferece valores muito semelhantes aos obtidos pela técnica cronométrica. Neste estudo, o valor do fibrinogênio obtido pelo método de Schalm *et al.* (1975) foi de 200 ou 400 mg dL<sup>-1</sup>, enquanto que, pelo método cronométrico, houve uma variação de 129 a 424 mg dL<sup>-1</sup> (190±70 mg dL<sup>-1</sup>). Os valores médios da concentração do fibrinogênio obtidos, em ambos os métodos, estavam de acordo com os descritos na literatura como fisiológicos para a espécie equina (Stormorken, 1957; Schalm, 1970; Coles, 1984), sendo inclusive muito próximos aos encontrados por Campbell *et al.* (1981), em equinos sadios da raça Puro Sangue Inglês e em animais de outras raças, utilizando o método de Millar *et al.* (1971). Porém, foram diferentes dos encontrados por Mills *et al.* (1998), ao estudarem animais dessa raça submetidos à lesão de tecido mole.

Apesar de os valores alcançados estarem dentro dos limites esperados para animais sadios, a média obtida pelo método de precipitação pelo calor (263 mg dL<sup>-1</sup>) foi maior ( $p < 0,05$ ) do que a obtida pelo cronométrico (190 mg dL<sup>-1</sup>). Nesse sentido, considerou-se o resultado obtido pelo método cronométrico como o mais preciso em função de aspectos técnicos ligados aos dois métodos. Como no método de precipitação pelo calor, foram observados apenas os valores de 200 mg dL<sup>-1</sup> (82 animais) e de 400 mg dL<sup>-1</sup> (38 animais), então foram estimados os intervalos com 95% de confiança para as médias do fibrinogênio obtidas pelo método cronométrico em função dos animais com 200 mg dL<sup>-1</sup> (140 £ m<sub>200</sub> £ 150 mg dL<sup>-1</sup>) e com 400 mg dL<sup>-1</sup> (280 £ m<sub>400</sub> £ 310 mg dL<sup>-1</sup>). Assim, é possível inferir, com maior precisão, sobre a concentração do fibrinogênio em equinos pelo método de precipitação pelo calor, que possui custo menos elevado.

Como mencionado, o valor da relação PPT/F auxilia na interpretação dos níveis da concentração do

fibrinogênio em equinos com hipoproteinemia marcante ou hiperproteinemia. Neste estudo, os valores de PPT variaram de 5,40 a 8,80 (7,23±0,60) e a relação PPT/F de 15,5 a 41 g dL<sup>-1</sup> (29,35±8,70 g dL<sup>-1</sup>). Como em todos os casos este valor foi superior a 15, considera-se que os animais do estudo não apresentavam um processo inflamatório no momento da coleta do sangue, caso contrário este seria d' 15, tal como mencionado por Latimer *et al.* (2003).

## CONCLUSÕES

A avaliação do plasma sangüíneo de equinos sadios da raça Mangalarga Marchador demonstrou que:

1. O método de precipitação pelo calor, embora simples, apresenta resultados satisfatórios, já que os valores se encontram entre aqueles considerados como de referência para a espécie equina.

2. O método cronométrico, freqüentemente utilizado em laboratórios de análises clínicas humanas, pode ser utilizado na medicina veterinária.

## AGRADECIMENTOS

Aos proprietários dos equinos, por permitirem a coleta do sangue, e ao CNPq, pela concessão da bolsa de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS

- Agarwal MB, Sanzgiri PS, Bhanota PC, Rao SS, Mehta BC & Shah MB (1981) Congenital disorders of fibrinogen. *Journal of Postgraduate Medicine* 27:178-183.
- Allen BV & Blackmore DJ (1984) Relationship between paired plasma and serum viscosity and plasma proteins in the horse. *Research in Veterinary Science* 36:360-363.
- Allen BV & Kold SE (1988) Fibrinogen response to surgical tissue trauma in the horse. *Equine Veterinary Journal* 20:441-443.
- Andrews DA, Reagan WJ & DeNicola DB (1994) Plasma fibrinogen in recognizing inflammatory disease. *Compendium on Continuing Education for the*

- Veterinary Practitioners 16:1349-1356.
- Auer DE, NG JC, Thompson HL, Inglis S & Seawright AA (1989) Acute phase response in horses: changes in plasma cation concentrations after localised tissue injury. *The Veterinary Record* 124:235-239.
- Campbell MD, Bellamy JEC & Searcy GP (1981). Determination of plasma fibrinogen concentration in the horse. *American Journal of Veterinary Research* 42:100-104.
- Clauss A (1957). Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des fibrinogens. *Acta Haematologica* 17:237-246.
- Coles EH (1984). *Patologia clínica veterinária*, 3 ed. São Paulo, Malone. 566p.
- Cotran RS, Kumar V & Robbins SL (1989) Robbins pathologic basis of disease, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Saunders. 1200p.
- Dodds WJ (1997) Hemostasis. In: Kaneko JJ, Harvey JW & Bruss ML (Eds.) *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5<sup>th</sup> ed. San Diego, Academic Press. p. 241-279.
- Handagama P, Rappolee DA, Werb Z, Levin J & Bainton DF (1990) Platelet -granule fibrinogen, albumin, and immunoglobulin G are not synthesized by rat and mouse megakaryocytes. *The Journal of Clinical Investigation* 86:1364-1368.
- Jain NC (1993) *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia, Lea & Febiger. 417p.
- Kaneko JJ (1997) Serum proteins and the dysproteinemias. In: Kaneko JJ, Harvey JW & Bruss ML (Eds.) *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5<sup>th</sup> ed. San Diego, Academic Press. p.117-138.
- Latimer KS, Mahaffey EA & Prasse KW (2003) *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology*, 2<sup>nd</sup> ed. Iowa, Blackwell Publishing Company. 450p.
- McSherry BJ, Horney FD & De Groot JJ (1970) Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 34:191-197.
- Millar HR, Simpson JG & Stalker AL (1971) An evaluation of the heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation. *Journal of Clinical Pathology* 24:827-830.
- Mills PC, Auer DE, Kramer H, Barry D & NG JC (1998) Effects of inflammation-associated acute-phase response on hepatic and renal indices in the horse. *Australian Veterinary Journal* 76:187-194.
- Ratnoff OD & Menzie C (1951) A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 37:316-320.
- Schalm OW (1970) Plasma protein: fibrinogen ratios in disease in the dog and horse. Part II. *California Veterinary* 24:19-24.
- Schalm OW, Jain NC & Carroll WJ (1975) *Veterinary hematology*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, Lea & Febiger. 807p.
- Schalm OW, Smith R & Kaneko JJ (1970) Plasma protein: fibrinogen ratios in dogs, cattle and horses. Part I. Influence of age on normal values and explanation of use in disease. *California Veterinary* 24:24-28.
- Stormorken H (1957) Species differences of clotting factors in ox, dog, horse, and man. *Thrombin and fibrinogen. Acta Physiologica Scandinavica* 40:167-181.
- Tan V, Doyle CJ & Budzynski AZ (1995) Comparison of the kinetic fibrinogen assay with the von Clauss method and the clot recovery method in plasma of patients with conditions affecting fibrinogen coagulability. *American Journal of Clinical Pathology* 104:455-462.

*Aceito para publicação em 05/07/2006*