

## VARIAÇÃO CIRCADIANA DOS LEUCÓCITOS, FIBRINOGÊNIO E PLAQUETAS NO SANGUE DE CÃES SUBMETIDOS A PROCESSO INFLAMATÓRIO, TRATADOS COM ESCINA<sup>1</sup>

LEUCOCYTES, FIBRINOGEN AND PLATELETS CIRCADIAN VARIATION IN DOGS  
EXPOSED TO AN INFLAMMATORY PROCESS AND TREATED WITH AESCIN

Maria Vargas dos Santos<sup>2</sup>

Cláudio Baptista de Carvalho<sup>3</sup>  
Hilton Machado Magalhães<sup>5</sup>

Luis Carlos Ribeiro Fan<sup>4</sup>

### RESUMO

Foram utilizados 20 cães machos, sem raça definida, divididos em dois grupos de 10 para análise da variação circadiana dos leucócitos, fibrinogênio e plaquetas. Todos os cães foram submetidos a um processo inflamatório subcutâneo induzido pela administração de Terebentina. Após 24 horas os animais do grupo I foram tratados com duas doses de 1,3mg/kg de escina com intervalos de 12 horas e os cães do grupo II mantidos como testemunha. Coletas de sangue foram feitas em todos os animais às 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas do dia para determinação dos leucócitos, fibrinogênio e plaquetas. A escina determinou nos animais do grupo I monocitose às 0, 8, 12, 16 e 24 horas, linfopenia às 12, 16 e 24 horas, leucocitose às 0, 20 e 24 horas, aumento da taxa de fibrinogênio às 16 e 24 horas e uma diminuição das plaquetas durante todo o dia. Conclui-

se que a escina determina variações circadiana instáveis do número de leucócitos, plaquetas e quantidade de fibrinogênio em cães com processo inflamatório.

**Palavras-chave:** escina, variação circadiana, leucócitos, fibrinogênio, plaquetas, processo inflamatório, cães.

### SUMMARY

To analyse the circadian variations of the leucocyte, fibrinogen and platelet 20 mongrel male dogs were used divided into two groups of ten animals. The first group was exposed to an inflammatory process induced by the administration of turpentine and after 24 hours the animals were treated with Aescin 1.3mg/kg from 12 to 12 hours.

<sup>1</sup>Trabalho retirado da Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 1992.

<sup>2</sup>Médico Veterinário, MSc, Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Campus Universitário II, Caixa Postal 143, 97500-970, Uruguaiana, RS. Autor para correspondência.

<sup>3</sup>Médico Veterinário, Doutor, Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM, 97119-900, Santa Maria, RS.

<sup>4</sup>Médico Veterinário, MS, Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM.

<sup>5</sup>Médico Veterinário, Doutor, Rua Vale Machado, 1210, apto. 12, 97100, Santa Maria, RS.

The second group was only exposed to the inflammatory process. Blood samples were performed in all the animals at 0,4am, 8am, 12am, 4pm, 8pm and 12pm hours of the day to examine the parameters. Aescin has determined monocytose at 0, 8am, 12am, 4pm and 12pm; linfopenia at 4pm and 12pm; leucocitosis at 0, 8pm and 12 pm, as well as an increase in the amount of fibrinogen at 4pm and 12pm; and a decrease in the platelets during all day. Aescin determines unstable circadian variations in the number of leucocyte, platelet and in the amount of fibrinogen in dogs with inflammatory process.

**Key words:** aescin, circadian variation, leucocyte, fibrinogen, platelet, inflammatory process, dogs.

## INTRODUÇÃO

Os ritmos dos sistemas biológicos associados aos ciclos geofísicos são os ritmos circadianos que compreendem um ritmo biológico entre 20 e 28 horas, permitindo aos organismos adaptarem-se aos eventos recorrentes do mundo externo (PITTENDRIGH, 1981).

A cronoterapia tem como objetivo aplicar os princípios cronobiológicos no tratamento das doenças, desenvolvendo padrões rítmicos para a administração dos medicamentos de forma a melhorar a eficácia e reduzir os efeitos indesejáveis (HALBERG et al., 1980).

JERMSTAB & WAALER (1953) extraíram a saponina da semente da árvore cavalo castanho (*Aesculus hippocastanum L.*) através da adsorção da saponina ao óxido de alumínio e posterior diluição, sendo purificada através de eletrodialise, onde seus componentes foram estudados pela cromatografia sendo identificada como: Hexose Glicose, Pentose Xilose e Ácido glicurônico. PATT & WINKLER (1960) e WAGNER et al. (1970) comprovaram através da cromatografia a existência de uma substância com atividade hemolítica e efeito farmacológico antiedematoso, a qual foi identificada com Escina saponina.

A Escina (escigenin-(-metil-3-acetoxibutirato)-(2-xilosideo-4-glicosideo glicuronidase) é uma mistura de vários ácidos triterpenóides saponina glicosídeos, encontrada no extrato da semente da árvore *Aesculus hippocastanum L.* conhecida na Europa como *Horse Chestnut Tree* (WULFF & TSCHESCHE, 1969).

A Escina possui um efeito seletivo antiinflamatório e antiedematoso, sendo usada no tratamento do edema traumático difuso ou localizado do cérebro, com sintomatologia hipertensiva (RIVANO & ROSADINI, 1970) e danos musculares (FINI et al., 1977; PABST & KLEINE, 1986) nos seres humanos.

A Escina é administrada em formulações gel nas terapias percutâneas (GREIFENSTEINER, 1966; LANG, 1974, 1977), oral (EISEMBURGER et al. 1976; PIRARD et al. 1976) e venosa (MINGRINO & SCANARINI, 1978).

A importância do estudo da cronoterapia bem como a carência de publicações em relação ao uso da Escina na clínica médica veterinária de pequenos animais, motivaram a realização da presente pesquisa, cujo objetivo é determinar as variações circadianas leucocitária, do fibrinogênio e das plaquetas em cães submetidos a processo inflamatório e tratados com Escina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 cães machos, sem raça definida, com peso médio de 12kg, idade aproximada de 6 anos e sadios. Os animais foram divididos em dois grupos de dez e reunidos cinco a cinco, em local medindo 3x4x2m, na temperatura entre 19-24°C, com 15 horas luz e 9 horas escuro e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Nos animais do grupo I foi provocado um processo inflamatório pela administração de Terebentina<sup>a</sup> via subcutânea na região sub-escapular na dose de 0,2ml. Decorridas 24 horas foi administrado 1,3mg/kg de Escinato de sódio<sup>b</sup>, via venosa, com intervalo de 12 horas. Nos animais do grupo II foi provocado somente o processo inflamatório.

Foram colhidos de todos os animais 2,5ml de sangue da veia cefálica em anticoagulante EDTA e realizados hemogramas, medida do fibrinogênio e contagem de plaquetas nas horas 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 do dia.

A contagem total dos leucócitos foi realizada através de contador eletrônico de células modelo Coulter Counter<sup>c</sup>, a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaços de sangue corados pelo método Panótico e a leitura feita através da microscopia óptica com objetivas de imersão aumento de 100x.

O fibrinogênio foi medido segundo técnica descrita por KANEKO & SMITH (1967) e as plaquetas pela técnica citada por COLES (1986).

Para a análise estatística considerou-se que o experimento bifatorial (2 grupos e 7 tempos) em 10 repetições no delineamento experimental inteiramente casualizado, não possui os valores conjuntamente independentes. Os dados para os diferentes tempos foram tomados dos mesmos indivíduos (cães). Neste caso, a falta de independência sugere a "análise de perfil" uma análise multi-variada com hipóteses adequadas para os objetivos do experimento.

Para os cálculos usou-se o programa de computador SIMUL e para a análise, considerou-se o modelo de SINGER & ANDRADE (1986).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para os cães do grupo I estão na Tabela 1 e para os do grupo II na Tabela 2.

A análise destes dados permite afirmar a existência de uma variação circadiana dos diferentes constituintes sanguíneos. Este fato sugere um cuidado maior na interpretação dos exames hematológicos quando realizados em diversas horas do dia.

A ocorrência de eosinopenia, diminuição do número de neutrófilos não segmentados e segmentados, monocitose e linfopenia nos animais do grupo I (Tabela 1), evidenciados na presente pesquisa, podem ser explicados pelos achados obtidos por PREZIOSI & MANCA (1964) os quais demonstraram possuir a Escina uma atividade estimuladora da córtex suprarrenal, determinando a liberação de glicocorticóides (corticosterona), causado pelo aumento de ACTH. Sendo portanto os hormônios corticais os responsáveis indiretos de tais eventos.

O aumento da concentração de fibrinogênio se faz necessário para auxiliar a atividade dos fibroblastos que

ocorre durante o processo inflamatório (DUNCAN & PRASSE (1982) e FENNER (1985)). Este aumento que foi verificado às 16 e 24 horas, justifica a medição da concentração do fibrinogênio como rotina hematológica nos animais doentes, conforme recomendam SUTTON & JOHNSTONE (1977).

A inexistência de dados a respeito das variações que podem ocorrer na concentração de fibrinogênio durante as 24 horas do dia, reforçam as recomendações anteriores, principalmente por ter a presente pesquisa demonstrado a existência de uma variabilidade circadiana desses parâmetros, permitindo a recomendação de que este exame hematológico seja feito com regular frequência.

A diminuição do número de plaquetas observadas nos animais do grupo I (Tabela 1) pode ser explicado pelos achados de BERTI et al. (1977) e LONGIAVE et al. (1978), os quais demonstraram que a Escina possui habilidade para estimular a produção e liberação de prostaglandinas através dos pulmões. Segundo demonstrou KLOEZE (1967) as prostaglandinas possuem uma potente ação inibitória sobre agregação plaquetária. Por outro lado a diminuição do número de plaquetas pode ser também devido a seu sequestro em órgão retículo-endotelial de acordo com as afirmações de DAVENPORT et al. (1982). Isto pode ocorrer e ser justificada pela atividade da prostaglandina liberada pela Escina que é capaz de produzir vasodilatação em algumas regiões do organismo.

Ao examinar-se as médias (Tabela 1 e 2), pode-se observar os seguintes aspectos em relação às variações que ocorrem durante o período de luz e de noite. Todos os parâmetros medidos durante o período de luz e de noite, diminuíram, sendo que durante o dia a diminuição predominou sobre a noite. Estes achados demonstram uma atividade farmacológica da Escina, potencializadora da atividade biológica que ocorre de forma mais intensa durante o período diurno, conforme demonstraram vários autores citados por CIPOLLA et al. (1988).

Tabela 1 - Variação circadiana das médias de leucócitos, de fibrinogênio e de plaquetas em cães com processo inflamatório tratados com Escina.

Parâmetros	HORAS DO DIA						
	Noite		Dia			Noite	
	0	4	8	12	16	20	24
Eosinófilos/mm <sup>3</sup>	1464,6	491,0	316,4*	436,6*	52,4	521,4	119,8
Neutrófilos NS/mm <sup>3</sup>	186,6*	925,6	67,8*	247,8*	1057,4	819,9	358,2
Neutrófilos Seg/mm <sup>3</sup>	13791,8*	19244,6	20357,4	19369,2	19265,6	19528,5*	17827,7*
Monócitos/mm <sup>3</sup>	2147,2*	2235,0	3903,8*	2927,0*	2814,1*	2566,8	2055,7*
Linfócitos/mm <sup>3</sup>	1350,8	1214,8	823,8	850,9*	272,9*	1493,4	1588,6*
Leucócitos/mm <sup>3</sup>	18944,0*	24111,0	25469,2	23831,5	23462,4	24930,0*	21950,0*
Fibrinogênio g/l	5,8	6,2	5,0	5,0	5,9*	5,0	5,9*
Plaquetas/mm <sup>3</sup>	223,5*	240,5*	192,1*	189,5*	184,9*	177,5*	226,1*

\* P ≤ 0,05

Tabela 2 - Variação circadiana das médias de leucócitos, de fibrinogênio e de plaquetas em cães com processo inflamatório.

Parâmetros	HORAS DO DIA						
	Noite		Dia			Noite	
	0	4	8	12	16	20	24
Eosinófilos/mm <sup>3</sup>	436,4	474,4	385,3	460,3	240,4	275,6	142,5
Neutrófilos NS/mm <sup>3</sup>	2525,4	1259,2	1454,9	1488,5	1486,2	578,0	530,3
Neutrófilos Seg/mm <sup>3</sup>	20545,8	18510,5	19500,3	16747,9	15674,8	13886,6	12727,3
Monócitos/mm <sup>3</sup>	3143,6	2482,1	2457,5	2438,5	1988,0	2170,8	664,5
Linfócitos/mm <sup>3</sup>	1121,2	1063,8	1045,9	1108,7	1038,3	1183,7	3890,0
Leucócitos/mm <sup>3</sup>	27772,4	23790,0	24843,9	22243,9	20427,7	18095,0	17954,6
Fibrinogênio g/l	5,9	6,1	4,9	4,9	4,7	5,4	4,6
Plaquetas/mm <sup>3</sup>	394,2	337,8	401,5	466,9	481,0	502,0	416,5

## CONCLUSÕES

A Escina determina em cães submetidos a processo inflamatório produzido pela Terebentina:

- 1 - diminuição dos neutrófilos às 0 e 20 horas, bem como monocitose às 0, 8, 12, 16 e 24 horas;
- 2 - linfopenia às 12, 16 e 24 horas e leucocitose às 20 e 24 horas;
- 3 - aumento da concentração da taxa de fibrinogênio plasmático às 16 e 24 horas e,
- 4 - diminuição constante no número de plaquetas durante o ciclo circadiano.

## AGRADECIMENTO

A Dra. Sonia T.A. Lopes do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário/UFSM, pelo auxílio.

## FONTES DE AQUISIÇÃO

- a - Terebentina - Aproquímica - Aparelhos e Produtos Químicos Ltda. Rua Floriano Peixoto, 1475 - 97010-030 - Santa Maria, RS.  
 b - Reparil, BYK Química e Farmacêutica Ltda, Av. Casa Grande, 2121, 09900-905 - Diadema, SP.  
 c - Coulter Counter Indústria e Comércio Ltda, 31270-900 - Rio de Janeiro, RJ.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTI, F., OMINI, C., LONGIANE, D. The mode of action of Aescins and the release of prostaglandins. *Prostaglandins*, v. 2, n. 14, p. 241-249, 1977.
- CIPOLLA, J.N., MARQUES, N., BARRETO, L.S.M. *Introdução ao Estudo da Cronobiologia*. São Paulo: Icone, 1988, 270 p.
- COLES, E.H. *Veterinary Clinical Pathology*. Philadelphia: Saunders, 1986. 486 p.
- DAVENPORT, D.J., BREITSCHNERDT, E.B., CARAKOSTAS, M.C. Platelet disorders in the dog and cat. Part I: physiology and pathogenesis. *Cont Educ*, v. 4, n. 9, p. 762-771, 1982.
- DUNCAN, J.R., PRASSE, K.W. *Patologia Clínica Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982, 271 p.
- EISENBURGER, R., HOFRICHTER, G., LINCH, H.D. et al. Zur Pharmakodynamik von L- und B-Aescin nach Applikation per os. *Arznein-Forsch*, v. 5, n. 26, p. 821-824, 1976.
- FENNER, W.R. *Manual de Prática Clínica Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985, 413 p.
- FINI, F., GRANATO, F., NUCIARI, A., et al. Impiego di um gel a base di Escina nella traumatologia minore da sport. *Medicina dello Sport*, v. 30, n. 5, p. 283-286, 1977.
- GREIFENSTEINER, H. Behandlung posttraumatischer Schwellungen mit Reparil. *Münchener Medizinisch Woch*, v. 108, p. 2172-2174, 1966.
- HALBERG, F., KABAT, H.F., KLEIN, P. Chronopharmacology, a therapeutic frontier. *Am J Hosp Pharm*, v. 37, p. 101-106, 1980.
- JERMSTAB, A., WAALER, T. Über des Zucheranteil des Robkastaniensaponins. *Pharmaceutica Acta Helvetia*, v. 28, p. 265-271, 1953.
- KANEKO, J.J., SMITH, H. The estimation of plasma fibrinogen and its clinical significance in the dog. *The California Veterinarian*, v. 21, n. 4, p. 21-24, 1967.
- KLOEZE, J. Influence of prostaglandins on platelet adhesiveness and platelet aggregation. In: *Prostaglandins* (proceedings of the and Nobel Symposium), London, edited by Bergtron & Samuelson, p. 241, 1967.
- LANG, W. Zentersuchungen zur perkutanen absorption von H<sup>3</sup>-Aescin bei Maus und Ratte. *Arznein-Forsch*, v. 24, n. 1, p. 71-76, 1974.
- LANG, W. Studies on the percutaneous absorption of H<sup>3</sup>-Aescin in pigs. *Research in Experimental Medicine*, v. 169, n. 3, p. 175-187, 1977.
- LONGIAVE, D., OMINI, C., NICOSTA, S., et al. The mode of action of Aescin on isolate veins: relationship with PGF<sub>2</sub>. *Pharmacological Research Communications*, v. 10, n. 2, p. 145-152, 1978.
- MINGRINO, S., SCANARINI, M. Effetto antiedema dell'escina a livello cerebrale. *Minerva Anestesiologica*, v. 10, n. 6, p. 355-360, 1978.
- PABST, H., KLEINE, M.W. Prävention und Therapie von Sportverletzungen, *Fortschritte der Medizin*, v. 104, n. 3, p. 44-46, 1986.
- PATT, P., WINKLER, W. Das therapeutisch Wirksame Prinzip der Robkastanie (*Aesculus hippocastanum*). *Arznein-Forsch*, v. 10, p. 273-275, 1960.
- PIRARD, P., GILLET, P., GUFFENS, J.M. et al. Étudé en double aveugle du Reparil en Proctologie. *Revue Medicale de Liege*, v. 31, n. 10, p. 343-345, 1976.
- PITTENDRIGH, C.S. Circadian systems, general perspective. In: ASCHOFF, F. *Handbook of behavioral neurobiology: Biological rhythms*, New York: Plenum Press, 1981, v. 4, p. 331-336.
- PREZIOSI, von P., MANCA, P. L'azione antiedema-antiinfiammatoria dell'escina nei rapporti con l'asse ipofisi-surrene. *Folia Endocrinologica*, v. 17, n. 5, p. 527-555, 1964.
- RIVANO, C., ROSADINI, G. L'escina nel trattamento dell'edema cerebrale. *Minerva neurochirurgica*, p. 92-94, 1970.
- SINGER, J.M., ANDRADE, D.F. Análise dos dados longitudinais. In: SIMPOSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA, 1986, Campinas, São Paulo. VII SINAPE, São Paulo, Embrapa, 1986, 210 p., 1-105 p.
- SUTTON, R.H., JOHNSTONE, M. The value of plasma fibrinogen estimations in dogs. A comparison with total leucocyte and neutrophil counts. *J Small Animal Practice*, v. 10, p. 277-281, 1977.
- WULFF, G., TSCHECHE, R. Über die Struktur der Robkastaniensaponine (Aescin) und die Aglykone verwandter Glykoside. *Tetrahedron*, v. 25, p. 415-436, 1969.