

AÇÃO DA ESCINA SOBRE A VARIAÇÃO CIRCADIANA DOS LEUCÓCITOS, FIBRINOGÊNIO E PLAQUETAS EM SANGUE DE CÃES SADIOS

LEUCOCYTES, FIBRINOGEN AND PLATELETS CIRCADIAN VARIATION IN DOGS TREATED WITH AESCIN

**Maria Vargas dos Santos¹
Luis Carlos Ribeiro Fan³**

**Cláudio Baptista de Carvalho²
Hilton Machado Magalhães⁴**

RESUMO

Para analisar a variação circadiana dos leucócitos, fibrinogênio e plaquetas, foram utilizados 20 cães machos, sem raça definida, os quais foram divididos em dois grupos de 10 animais. Os cães do grupo I foram tratados com 1,3mg/kg de escina de 12 em 12 horas e os do grupo II sem nenhum tratamento. Coletas de sangue foram feitas em todos os animais às 0 (zero), 4, 8, 12, 16, 20 e 24h do dia para exame dos leucócitos, fibrinogênio e plaquetas. A escina determinou eosinopenia às 8 e 12 horas, monocitopenia às 24h e linfocitose em relação aos animais sadios às 8, 16 e 20h. Na taxa de fibrinogênio houve aumento às 20 e 24h e nas plaquetas diminuição às 0 (zero), 8, 12, 16 e 20h. Pode-se concluir que a escina determina variações circadianas

instáveis do número de alguns tipos de leucócitos, plaquetas e quantidade de fibrinogênio em cães sadios.

Palavras-chave: Escina, variação circadiana, leucócitos, fibrinogênio, plaquetas.

SUMMARY

Twenty mongrel male dogs were used to analyse the circadian variations of leucocyte, fibrinogen and platelet values. They were divided into two groups of ten animals. The first group was treated with 1.3mg/kg of Aescin every 12 hours while the second group was left without treatment. Blood samples were

¹Médico Veterinário, Mestre, 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.

²Médico Veterinário, Doutor, Departamento de Clínica de Pequenos Animais (DCPA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97119-900, Santa Maria, RS.

³Médico Veterinário, Mestre, DCPA, UFSM.

⁴Médico Veterinário, Doutor, Rua Vale Machado, 1210, apto. 12, 97010-530, Santa Maria, RS.

collected in all animals at 0 (zero), 4am, 8am, 12am 4pm, 8pm and 12pm hours of the day to determine leucocyte and platelet count and to evaluate fibrinogen. Aescin produced: eosinopenia at 4am, 8am, 12am and 4pm hours; neutrophilia at 8am, 12am, 8pm, and 12pm hours; monocytopenia at 12pm hour and lymphopenia at 8am, 4am, 8pm and 12pm hours. There was an increase in fibrinogen level at 8pm and 12pm and a decrease in the platelet number at 0 (zero), 8am, 12am, 4pm and 8pm hours. Aescin determines unstable circadian variations in the number of leucocytes, platelets and in the amount of fibrinogen in health dogs.

Key words: Aescin, circadian variation, leucocytes, fibrinogen, platelets.

INTRODUÇÃO

A cronobiologia é o estudo sistemático da organização temporal da matéria viva.

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 cronofarmacologia pode ser conceituada como o ramo da cronobiologia que envolve a investigação do efeito das drogas sobre as características (período, amplitude e fase) dos ritmos biológicos; e padrões rítmicos para administração das drogas, visando melhorar a eficácia e reduzir sua toxicidade (REINBERG, 1982).

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. Seus componentes foram estudados pela cromatografia onde foi identificada como: hexose glicose, pentose xilose e ácido glicurônico, sendo que PATT & WINKLER (1960) e WAGNER et al. (1970) comprovaram através da cromatografia a existência de uma substância com atividade hemolítica e efeito farmacológico anti-edematoso, a qual foi identificada como escina saponina.

VOIGTLANDER & ROSENBERG (1963) observaram que os mesmos metabólitos da escina eram obtidos através da prosaponina-B sendo, portanto, uma composição da α -escina e β -escina em proporções iguais.

A escina (escigenin-(-metil-3-acetoxibutirato)-(2-xilosideo-4-glicosideo glicuronidase) é uma mistura

de vários ácidos triterpenóides saponina glicosídeos (WULFF & TSCHESCHE, 1969).

O glicosídeo é um composto no qual o triterpeno aglicona proescigenina é esterificado com ácido angélico e ácido acético ligado ao C₃ do ácido glicurônico, o qual é adicionado a duas moléculas de glicose unidas aos C₂ e C₄ (WAGNER et al., 1970).

A escina possui um efeito seletivo antiinflamatório e antiedematoso, sendo usada no tratamento do edema traumático difuso ou localizado, no cérebro, com sintomatologia hipertensiva (RIVANO & ROSADINI, 1970) e danos musculares (FINI et al., 1977; PABST & KLEINE, 1986) nos seres humanos. É administrada em formulações gel nas terapias percutâneas (GREIFENSTEINER, 1966; LANG, 1974/77), oral (EISEMBURGER et al., 1976; PIRARD et al., 1976) e venosa (MINGRINO & SCANARINI, 1978).

As possíveis variações que sofrem os constituintes sanguíneos durante o período de 24 horas, a importância do estudo cronofarmacológico, bem como a carência de publicações em relação ao uso terapêutico da escina na clínica médica veterinária de pequenos animais, motivaram a realização da presente pesquisa, cujo objetivo é determinar as variações circadianas dos leucócitos, do fibrinogênio e das plaquetas em cães saudáveis tratados com escina.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 cães machos, sem raça definida, com peso médio de 12kg, com aproximadamente 6 anos de idade e saudáveis.

Os animais foram divididos em dois grupos (I e II) de 10 e reunidos cinco a cinco, em local medindo 3x4x2m, com temperatura entre 19 e 24°C, com 15 horas luz e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

Foram colhidos 2,5ml de sangue, em EDTA, da veia cefálica e realizados hemogramas antes do início do experimento e nas horas 0 (zero), 4, 8, 12, 16, 20 e 24 do dia. Para a contagem de plaquetas teve-se o cuidado de manter o vidro com o sangue sem a tampa para evitar a adesão de plaquetas na mesma.

Nos animais do grupo I foram administrados, por duas vezes, 1,3mg/kg de escina sódica^a, via venosa, às 0 (zero) e 12 horas. Os animais do grupo II não sofreram tratamento (testemunhas).

A contagem total dos leucócitos foi realizada através de contador eletrônico de células modelo Coulter Counter^b; a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaços de sangue corados pelo

método Panótico e a leitura feita através da microscopia óptica com objetiva de imersão em aumento de 100x.

O fibrinogênio foi medido segundo técnica de KANEKO & SMITH (1967) e as plaquetas contadas pela técnica descrita 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 referentes tempos foram tomados dos mesmos indivíduos (cães). Neste caso, a falta de independência sugere a "análise de perfil", uma análise multivariada com hipóteses adequadas para os objetivos do experimento.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 1 e 2 demonstram os resultados obtidos na presente pesquisa.

Embora não tenha sido o objetivo primeiro da presente pesquisa, convém antes de mais nada discutir as variações circadianas observadas nos parâmetros medidos nos cães saudáveis (grupo II, Tabela 1), uma vez que nada existe na literatura médico

veterinária sobre este assunto. Observou-se nestes animais uma variação no número de eosinófilos, sendo que o valor máximo ocorreu à 0 (zero) hora do dia e o mínimo às 24h.

Os neutrófilos não segmentados mantiveram-se constantes durante todo o período, exceto às 16 horas, sendo que nos neutrófilos segmentados não houve variação.

Os números de monócitos tiveram variação durante o dia e a noite, e o valor máximo ocorreu às 12 e 24h do dia, nos demais parâmetros observados: eosinófilos, bastonetes, neutrófilos segmentados estão de acordo com MEYER et al. (1992). Segundo os autores citados os granulócitos renovam-se duas e meia a três vezes por dia no "pool" circulante, o que justifica a diferença de contagem nos diferentes horários.

A monocitose encontrada às 24 horas pode estar associada à possível liberação de corticóide endógeno, uma vez que ocorreu linfopenia e eosinopenia no mesmo período, embora não tenha ocorrido leucocitose com neutrofilia o que caracteriza o hemograma de estresse (COLES, 1986; MEYER et al., 1992).

Na concentração de fibrinogênio ocorreu uma ligeira elevação às 12 e 16 horas, sendo que as plaquetas tiveram uma variação numérica, sendo mínima às 12 horas e máxima às 8 horas.

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

Nos animais tratados com escina (Tabela 2) observou-se uma variação no número de eosinófilos, ocorrendo uma diminuição significativa às 8 e 12 horas. Estes achados podem ser explicados pela atividade da escina em liberar ACTH, descrito por HAI et al. (1981). Segundo DUNCAN & PRASSE (1982), COLES (1986) e MEYER et al. (1992) os corticóides diminuem os números de eosinófilos circulantes, produzindo eosinopenia.

Os neutrófilos segmentados apresentaram uma variação caracterizada por neutrofilia às 16, 20 e 24 horas. Este fato talvez possa ser explicado por uma ação antiinflamatória da escina semelhante aos corticóides. Segundo COLES (1986) estes diminuem a diapedese dos neutrófilos, muito embora tenha sido evidenciado linfopenia somente às 16 horas. Nos de-

Tabela 1 - Variação circadiana de leucócitos, de fibrinogênio e de plaquetas em cães saudáveis.

Parâmetros	Horas do dia						
	Noite 0	4	8	Dia 12	16	20	Noite 24
Eosinófilos/ mm ³	1652,0	1293,6	1464,0	1492,8	920,0	1015,2	564,4
Neutrófilos NS/ mm ³	94,4	41,8	0	0	265,6	149,8	230,8
Neutrófilo S/ mm ³	7654,0	8683,8	8542,6	8236,4	9953,6	9083,6	8252,8
Monócitos/ mm ³	440,8	266,6	181,6	894,0	521,2	641,6	1782,6
Linfócitos/ mm ³	176,0	119,2	120,6	121,4	133,0	127,6	133,4
Leucócitos/ mm ³	10017,2	10405,0	10308,8	10744,6	11793,4	11017,8	10946,0
Fibrinogênio (g/l)	3,4	1,8	2,2	3,6	3,6	2,4	2,6
Plaquetas/ mm ³	333,2	334,8	336,2	314,8	324,8	331,4	333,2

Tabela 2. Variação circadiana das médias de leucócitos, de fibrinogênio e de plaquetas em cães sadios tratados com escina.

Parâmetros	Horas do dia						
	Noite		Dia			Noite	
	0	4	8	12	16	20	24
Eosinófilos/ mm ³	1496,1	879,9	592,5*	713,4*	840,3	1263,5	446,7
Neutrófilos NS/ mm ³)	152,4	353,6	307,2*	246,7*	240,2	212,7	33,7
Neutrófilos S/ mm ³	6351,3	9203,5	9360,8	10501,6	11484,8	12941,7	11501,7
Monócitos/ mm ³	416,6	232,6	653,8	483,6	439,7	308,5	587,2*
Linfócitos/ mm ³	1949,1	1609,9	1100,9*	1042,8	942,8*	1203,0*	1370,7
Leucócitos/ mm ³	10365,5	12279,6	12015,2	12988,1	13947,8	15929,4	13940,0
Fibrinogênio g/l	1,6*	2,2	3,1	2,9	3,6	3,2*	4,4*
Plaquetas/ mm ³	225,5*	311,5	281,5*	195,4*	94,7*	188,6*	263,5

* Difere do grupo controle ($P \leq 0,05$).

mais horários as variações encontradas nos linfócitos permaneceram dentro dos limites normais, o mesmo ocorrendo para os monócitos (DUNCAN & PRASSE, 1982; COLES, 1986 e MEYER et al., 1992).

Pode-se observar variações no número de leucócitos o que está de acordo com MEYER et al. (1992) os quais citam que os granulócitos têm uma estadia curta na circulação (aproximadamente 10 horas).

Como explicar os mecanismos pelos quais a escina foi capaz de aumentar a concentração de fibrinogênio nos animais do grupo I? Seria a droga estimuladora da atividade microsomal hepática para o aumento da síntese protéica? Seria ela mesma por si só causadora de um estado inflamatório, uma vez que o aumento da concentração de fibrinogênio se faz necessário para suprir a atividade dos fibroblastos que, de acordo com DUNCAN & PRASSE (1982) e FENER (1985), ocorre durante o processo inflamatório? Somente pesquisas adicionais poderão responder estes questionamentos.

A diminuição do número de plaquetas observada nos animais tratados com escina 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 prostaglandi-

nas possuem uma potente ação inibitória sobre agregação plaquetária. Por outro lado a diminuição do número de plaquetas pode ser também devido a seu seqüestro em órgão retículo-endotelial, de acordo com as afirmações de DAVENPORT et al. (1982). Isto pode ocorrer e ser justificado pela atividade da prostaglandina liberada pela escina que é capaz de produzir vasodilatação em algumas regiões do organismo.

Nos animais tratados com escina todos os parâmetros medidos diminuíram durante o período de luz e de escuro, sendo que durante o dia a diminuição predominou sobre à noite. Estes achados demonstraram 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).

CONCLUSÕES

Em cães sadios a escina determina:

- neutrofilia, linfopenia e eosinopenia em diferentes horas do dia;
- aumento da concentração da taxa de fibrinogênio plasmático às 0 (zero), 20 e 24 horas do dia, e
- uma diminuição constante no número de plaquetas durante o ciclo circadiano.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- a - Reparil: BYK Química e Farmacêutica Ltda. Av. Casa Grande, 2121, Diadema SP.
- b - Coulter Counter Indústria e Comércio Ltda. Rio de Janeiro, RJ.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Dra. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Santa Maria pelo auxílio na fase de análise laboratorial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTI, F., OMINI, C., LONGIANE, D. The mode of action of aescins and the realese of prostaglandins. **Prostaglandins**, v. 2, n. 14, p. 241-249, 1977.
- CIPOLLA, J.N., MARQUES, N., BARRETO, L.S.N. **Introdução ao estudo da cronobiologia**. São Paulo: Icone, 1988. 270 p.
- COLES, E.H. **Veterinary clinical pathology**. 4. ed. 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. **Arzneimittelforsch**, 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 un 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.
- HIAI, S., YOKOYAMA, H., OURA, H. Effect of escin on adrenocorticotropin and corticosteron levels in rat plasma. **Chem Pharm Bull**, v. 29, n. 2, p. 490-494, 1981.
- JERMSTAB, A., WAALER, T. Über des zucheranteil des robhastaniensaponins. **Pharm Acta Helv**, v. 28, p. 265-271, 1953.
- KANEKO, J.J., SMITH, H. The estimation of plasma fibrinogen and its clinical significance in the dog. **California Vet**, v. 21, n. 4, p. 21-24, 1967.
- KLOEZE, J. **Prostaglandins**(Proceedings of the and Nobel Symposium). London: Bergtron & Samuelson, 1967. Influence of prostaglandins on platelet adhesiveness and platelet aggregation: p. 241.
- LANG, W. Zentersuchungen zur perkutanen absortion von H₃-Aescin bei maus und ratie. **Arzneimittelforsch**, v. 24, n. 1, p. 71-76, 1974.
- LANG, W. Studies on the percutaneous absortion of H₃-Aescin in pigs. **Res Exp Med**, 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 PGF₂. **Pharmacol Res Commun**, v. 10, n. 2, p. 145-152, 1978.
- MEYER, D.J., COLES, E.H., RICH, L.J. **Veterinary laboratory medicine - interpretation and diagnosis**. Philadelphia: Saunders, 1992, 350 p.
- MINGRINO, S., SCANARINI, M. Effetto antiedema dell'escina a livello cerebrale. **Minerva Anestesiol**, v. 10, n. 6, p. 355-360, 1978.
- PABST, h., KLEINE, M.W. Prävention und therapie von sportverletzungen. **Fortschr Med**, v. 104, n. 3, p. 44-46, 1986.
- PATT, P., WINKLER, W. Das therapeutisch wiksame prinzip der robhastanie (*Aesculus hippocastanum*). **Arzneimittelforsch**, v. 10, p. 273-275, 1960.
- PIRARD, P., GILLET, P., GUFFENS, J.M. et al. Étudé en double aveugle du reparil en proctologie. **Rev Med 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.
- REINBERG, A. Clinical chronopharmacology: an experimental basics for chronotherapy. In: REINBER, A., SAMOLENSKY, M.H. **Biological rhythms and medicine: celular, metabolic, physiopathologic, and pharmacologic aspects**. New York: Springer-Verlag, 1982. p. 221-263.
- RIVANO, C., ROSADINI, G. L'escina nel trattamento dell'edema cerebrale. **Minerva Neuroch**, p. 92-94, 1970.
- SINGER, J.M., ANDRADE, D.F. Análise dos dados longitudinais. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA, 1986. Campinas, SP. **Anais...** São paulo, EMBRAPA, 1986, 210 p. 1-105.
- VOIGTLANDER, H.W., ROSENBERG, W. Prosapogenin B = B-Aescin. **Arzneimittelforsch**, v. 13, p. 385-386, 1963.
- WAGNER, J., SCHLEMMER, W., HOFFMANN, H. Über inhaltstoffe des robkastaniensamens. **Arzneimittelforsch**, v. 2, n. 20, p. 205-208, 1970.
- WULFF, G., TSCHESCHE, R. Über die struktur der robkastaniensaponine (Aescin) und die aglykone verwandter glycoside. **Tetraedron**, v. 25, p. 415-436, 1969.