

ESTUDO RADIOISOTÓPICO DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA.

II. MASSA ERITROCITÁRIA E VOLUME SANGÜÍNEO DE CAVALOS PURO SANGUE INGLÊS DETERMINADOS PELO ^{51}Cr ¹

CARMELINDO MALISKA²

SINOPSE.- Foi determinada a massa eritrocitária circulante e o volume sangüíneo em 16 cavalos puro sangue inglês, sendo 11 normais e 5 com anemia infecciosa equina, naturalmente adquirida, empregando-se eritrócitos marcados com ^{51}Cr . Os animais normais apresentaram massa eritrocitária de 40,64 ml e volume sangüíneo de 102,32 ml por kg de peso, e os portadores de anemia infecciosa equina, massa eritrocitária e volume sangüíneo de 21,13 e 107,71 ml/kg de peso. A diferença entre as médias das massas eritrocitárias dos dois grupos é estatisticamente significativa.

A massa eritrocitária apresentou correlação significativa com o peso corporal ($r = 0,89$), nos animais sãos.

INTRODUÇÃO

Desde a publicação da técnica de marcação dos eritrócitos pelo ^{51}Cr e de sua utilização para determinar a massa eritrocitária circulante por Gray e Sterling (1950a, b) e Sterling e Gray (1950), esse método vem sendo empregado na determinação da massa eritrocitária e da volemia, não obstante trabalhos recentes terem revelado que outros radioisótopos podem marcar eritrócitos eficientemente (Fischer *et al.* 1967). Os glóbulos vermelhos do sangue são marcados pelo $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, *in vitro*. O íon cromato atravessa a membrana eritrocitária, é reduzido à sua forma trivalente e une-se à fração globínica da molécula de hemoglobina de forma suficientemente irreversível.

As determinações do volume sangüíneo de cavalos, a partir da massa eritrocitária determinada pelo ^{51}Cr , não ultrapassam de 20, segundo dados de que dispomos (Marcilese *et al.* 1964). Barry *et al.* (1970) realizaram esse estudo em cães, Wade e Sasser (1970) na ovelha, Fowler *et al.* (1964) em um bovino com policitemia vera, e Huser *et al.* (1967) em macacos.

Vários autores calcularam o volume sangüíneo a partir do volume plasmático e do hematócrito venoso, em diversas espécies (Courtice 1943, Reynolds 1953, Cronin 1954, Howes *et al.* 1963, Simpson *et al.* 1970). Essa maneira de calcular o volume sangüíneo pelo corante T-1824 (azul de Evans) ou albumina marcada com ^{125}I , considerando o hematócrito venoso como sendo igual ao hematócrito corporal, pode levar a erros apreciáveis.

O presente trabalho visou a determinar a massa eritrocitária³ e o volume sangüíneo em cavalos com anemia infecciosa equina (AIE), tal como é encontrada em nosso meio, e compará-los aos valores normais, bem como verificar a correlação entre a massa eritrocitária e o peso corporal nos animais sãos.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em 11 cavalos puro sangue inglês (PSI) normais e em 5 com anemia infecciosa equina⁴.

O método de marcação foi descrito previamente (Maliska 1973). Empregamos o $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, em solução isotônica e livre de pirogênio⁵, com atividade específica de 253 mCi/mg Cr. Os glóbulos foram marcados, em frascos esterilizados (de 75 ml), na proporção de 40 ml de sangue para 10 ml de ACD⁶. Foi empregada a dose de 2 μCi por kg de peso. Após a marcação dos glóbulos foram adicionados 100 mg de vitamina C⁷, para reduzir o $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ não incorporado aos glóbulos vermelhos, evitando-se assim a marcação de eritrócitos circulantes em proporção capaz de determinar erro no cálculo da massa eritrocitária (Mundschenk & Fischer 1962).

Foram separados 10 ml de sangue marcado para servir de amostra padrão (AP), reinjetando-se no animal 40 ml. A amostra AP foi lavada por três vezes com solução salina (centrifugando-se durante 5 minutos a 2.000 rpm e pipetando-se o sobrenadante), para eliminar o ^{51}Cr não unido aos eritrócitos, e hemolisada com saponina. Vinte minutos após a injeção dos glóbulos marcados, uma amostra de 5 ml de sangue foi retirada da jugular oposta à da injeção, lavada com solução salina e hemolisada. Segundo Hahn *et al.* (1941) e Smith *et al.* (1956), o equilíbrio entre eritrócitos marcados e não marcados se dá de 10 a 20 min. após a injeção e segundo Huggins *et al.* (1966), aos 10 min., em cães esplenectomizados, e aos 30 min., em cães intactos. Foram colhidas amostras aos 10, 20 e 30 min. em quatro cavalos e verificou-se que as atividades das amostras de 20 e das de 30 min. eram perfeitamente comparáveis, sendo as das amostras de 10 min. um pouco maiores. Passou-se então a considerar somente as amostras retiradas aos 20 min.

¹ Aceito para publicação em 23 mai. 1973.

Realizado no Laboratório de Radioisótopos da Escola de Medicina e Cirurgia da Federação das Escolas e Faculdades Isoladas do Estado da Guanabara e no Hospital Octavio Dupont do Jockey Club Brasileiro, com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

² Pesquisador Assistente do CNPq (3011/71). Endereço: Caixa Postal 3043, ZC-00, Rio de Janeiro, GB.

³ Essa denominação, já consagrada, evita confusão com outros valores hematológicos, como valor globular, etc.

⁴ O diagnóstico da AIE foi baseado em exames clínicos, laboratoriais, de soro-precipitação em gelose e anátomo-patológico (Maliska 1973).

⁵ Sodium Chromate CR 101, Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt.

⁶ ACD Solution modified, E.R. Squibb & Sons, Inc., N. Jersey.

⁷ Redoxon injetável, Roche.

A atividade das amostras AP e a retirada aos 20 min. (A_{20}) foi contada em cintilador de poço, de cristal de NaI (Tl) e escalímetro com eletrônica associada^a.

A massa eritrocitária foi calculada pela fórmula

$$\text{massa eritrocitária} = \left(\frac{aAP}{aA_{20}} - 1 \right) v,$$

em que aAP é a atividade específica da amostra dos glóbulos vermelhos injetados, em contagens por minuto (cpm), aA_{20} é a atividade específica da amostra retirada aos 20 min., e v o volume da amostra injetada.

^a Elscint, Haifa, Israel.

Foi empregado o fator de correção $F_{H_0} = 0,92$, do hematócrito venoso (Marcilese *et al.* 1964), para o cálculo do volume sanguíneo total:

$$\text{Volume sanguíneo} = \frac{\text{massa eritrocitária}}{\text{hematóc. venoso} \times F_{H_0}}$$

RESULTADOS

A massa eritrocitária dos 16 cavalos PSI estudados está demonstrada no Quadro 1. A diferença entre as médias da massa eritrocitária dos dois grupos é estatisticamente significativa ($P < 0,01$), em face da aplicação do teste t de Student.

QUADRO 1. *Massa eritrocitária dos 16 cavalos PSI estudados*

Animal n.º	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Hematócrito (%)	Massa eritrocitária	
					Volume (ml)	Relação massa/peso (ml/kg)
<i>Cavalos PSI normais</i>						
01	M	3	350	38	13.013	37,18
02	M	5	450	47	18.792	41,76
04	M	4	420	43	16.788	39,95
05	M	4	500	44	21.136	42,27
06	F	3	370	47	14.937	40,37
09	M	2	340	42	13.528	39,79
10	M	4	300	41	11.732	39,11
11	M	4	480	45	20.912	43,56
12	M	5	445	40	17.859	40,11
13	M	6	420	49	17.384	41,39
14	F	5	405	46	16.294	40,23
Média	—	4	407	44	16.181	40,64
Desvio padrão		1,27	82,73	3,03	2.560	1,55
<i>Cavalos PSI com anemia infecciosa equina</i>						
15	M	5	300	23	7.108	23,89
16	M	2	210	19	3.812	18,15
17	M	5	350	25	8.348	23,85
18	F	3	260	22	6.207	23,88
19	M	5	280	19	4.448	15,80
Média	—	4	280	21,6	5.098	21,13
Desvio padrão		1,41	40,65	2,01	1.876	3,83

Nos animais hígidos foi constatada correlação significativa ($r = 0,89$) entre a massa eritrocitária e o peso corporal (Fig. 1).

A massa eritrocitária e o volume sanguíneo por kg de peso, nos animais sãos e nos portadores de AIE, estão demonstrados no Quadro 2.

QUADRO 2. Valores hematológicos dos 16 cavalos PSI estudados

Determinações	Cavalos normais (média \pm desvio padrão)	Cavalos com AIE (média \pm desvio padrão)
Idade (anos)	4 \pm 1,27	4 \pm 1,41
Peso corporal (kg)	407 \pm 82,73	280 \pm 40,65
Hematócrito venoso (%)	44 \pm 3,03	21,6 \pm 2,61
Massa eritrocitária (ml/kg)	40,64 \pm 1,55	21,13 \pm 3,83
Volume plasmático (ml/kg)	61,7 \pm 5,79	86,1 \pm 6,97
Volume sanguíneo (ml/kg)	102,3 \pm 5,62	107,7 \pm 9,90

DISCUSSÃO

Nossos resultados estão satisfatoriamente de acordo com os obtidos por Julian *et al.* (1956) em 6 cavalos de corrida, pelo método do ^{32}P , e com os calculados por Marcilese *et al.* (1964), em 31 PSI, pelo ^{56}Fe e ^{51}Cr , sendo 18 as determinações realizadas com eritrócitos marcados com ^{51}Cr (Quadro 3).

QUADRO 3. Massa eritrocitária e volume sanguíneo do cavalo, determinados com radioisótopos (segundo dados da literatura)

Autor	Método	Mas. erit. (ml/kg)	Vol. sang. (ml/kg)	N.º de animais
Julian (1956)	32P	47,1	109,6	6 PSI
		28,5	71,7	5 Percheron
Obara (1961)	T-1824	19,9	59,8	10 cavalos mestiços
	^{51}Cr	18,2	61,4	2
	^{59}Fe	22,3	65,5	3
Marcilese (1964)	^{51}Cr e ^{59}Fe	39,8	103,1	31 PSI
		25,3	77,5	6 cav. de sela
		18,2	61,4	14 cav. tração

De todas as espécies animais estudadas, o cavalo PSI apresenta o maior volume sanguíneo por unidade de peso corporal (Gray & Sterling 1950b, Georgi & Hertzendorf 1964, Huggins *et al.* 1966, Huser *et al.* 1967, Simpson *et al.* 1970, Schalm 1961). Somente o cão galgo apresentou valores comparáveis aos do cavalo de corrida (Courtice 1943), porém, essa determinação foi baseada no volume plasmático (pelo T-1824), em que o hematócrito venoso foi considerado como representativo da relação plasma/massa eritrocitária circulante. Sendo o hematócrito venoso maior que o hematócrito corporal (Gibson *et al.* 1946, Chaplin *et al.* 1953, Comar 1955), o volume sanguíneo, calculado a partir do volume plasmático dividido por 100 menos o hematócrito venoso, apresenta erros apreciáveis. Por outro lado, Courtice não levou em consideração o plasma retido na coluna de células do hematócrito ("trapped plasma"). E ainda Wade e Sasser (1970) verificaram, em ovelhas, que o volume plasmático não apresenta correlação significativa com o peso corporal. Por esses motivos, não con-

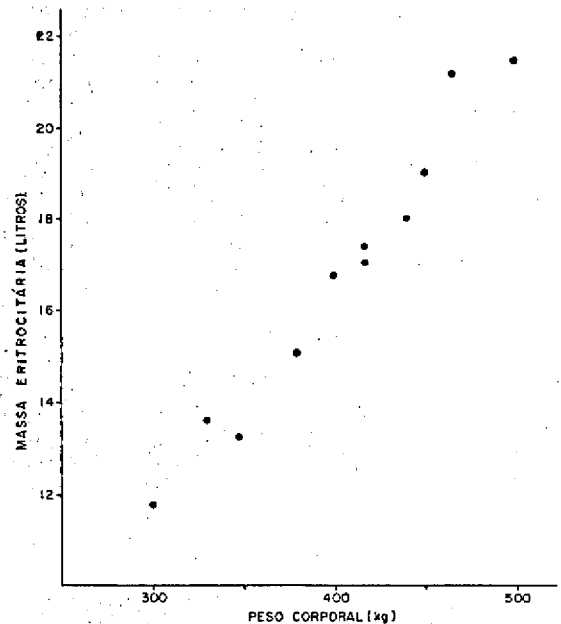


Fig. 1. Diagrama de dispersão dos valores da massa eritrocitária e do peso corporal dos animais hígidos.

sideramos comparáveis os presentes resultados com os calculados por Courtice em quatro galgos, em que a massa eritrocitária foi de 60 ml/kg, e o volume sanguíneo, de 114 ml/kg.

Diferenças hematológicas existentes entre cavalos descendentes do árabe e cavalos de outras origens foram descritas por vários autores (Macleod & Ponder 1946, Marcilese *et al.* 1964). Em 1961, Obara e Nakajima determinaram a massa eritrocitária, pelo ^{51}Cr , em dois cavalos mestiços, obtendo valores que correspondem a 50% dos determinados em cavalos PSI no presente trabalho e por outros autores (Quadros 2 e 3). Diferenças hematológicas desse tipo foram observadas, em bovinos, por Howes *et al.* (1963), em que a massa eritrocitária e o volume sanguíneo do zebu foram de 25 e 57 ml/kg, e a massa eritrocitária e o volume sanguíneo do Hereford, de 20 e 49 ml/kg de peso.

Nos animais com AIE, os resultados revelaram estado de anemia, em que o volume sanguíneo total é perfei-

tamente comparável aos valores normais, registrados no presente estudo (Quadro 2) e aos publicados anteriormente (Julian *et al.* 1956 e Marcilese *et al.* 1964).

Face à correlação significativa ($r = 0,89$) entre a massa eritrocitária e o peso corporal nos animais sãos, consideramos que a determinação do volume sanguíneo do cavalo PSI a partir da massa eritrocitária determinada com eritrócitos marcados pelo ^{51}Cr , empregando-se o fator de correção para o hematócrito venoso, constitui o método mais prático e que apresenta resultados mais precisos depois dos obtidos pela determinação simultânea da massa eritrocitária e do volume plasmático.

ACRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. Paulo Dacorso Filho, que nos orientou, encorajou a empreender essa pesquisa e nos apoiou durante a realização da mesma. Ao Prof. Antônio Fernando Gonçalves da Rocha, por nos ter possibilitado e apoiado na realização desse trabalho no laboratório que dirige. Ao Dr. Homero Assis Brasil e ao treinador Carlos Morgado, que nos puseram à disposição cavalos sob sua responsabilidade.

REFERÊNCIAS

- Barry, R.C., Heras, L.V. & Grieco, L.P. 1970. Determinación de masa eritrocítica y volemia en caninos utilizando cromo radioactivo. Valores normales. *Analecta Vet.* 3:13-18.
- Chaplin Jr., H., Hollison, P.L. & Vettel, H. 1953. The body/venous hematocrit ratio: Its constancy over a wide hematocrit range. *J. clin. Invest.* 32:1309-1319.
- Comar, C.L. 1955. *Radioisotopes in biology and agriculture*. McGraw-Hill New York, p. 11-12.
- Courtice, F.C. 1943. The blood volume of normal animals. *J. Physiol., Lond.*, 102:290-305.
- Cronin, M.T.I. 1954. The determination of plasma volume and estimation of blood volume in the horse. *Vet. Rec.* 66: 197-200.
- Fischer, J., Wolf, R. & Leon, A. 1967. Technetium-99m as a label for erythrocytes. *J. Nucl. Med.* 8:229.
- Fowler, M.E., Cornelius, C.E. & Baker, N.F. 1964. Clinical and erythrokinetic studies on a case of bovine polycythemia vera. *Cornell Vet.* 54:153-160.
- Georgi, J.R. & Hertzendorf, I.I. 1964. Simultaneous erythrocyte and plasma volume measurements in sheep using Iron-59. *Cornell Vet.* 54:510-516.
- Gibson, J.C. 2nd., Peacock, W.C., Seligman, A.M. & Sack, T. 1946. Circulating red cell volume measured simultaneously by radioactive iron and dye methods. *J. clin. Invest.* 25:838-847.
- Gray, S.J. & Sterling, K. 1950a. The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium. *J. clin. Invest.* 29:1604-1613.
- Gray, S.J. & Sterling, K. 1950b. Determination of circulating red cell volume by radioactive chromium. *Science* 112:179-180.
- Hahn, P.F., Balfour, W.M., Ross, J.F., Bale, W.F. & Whipple, G.H. 1941. Red cell volume circulating and total as determined by radio iron. *Science* 93:87-88.
- Howes, J.R., Hentges Jr., J.F. & Feaster, J.P. 1963. Blood volume of brahman and hereford cattle as measured by serum albumin. *J. Anim. Sci.* 22:183-187.
- Huggins, R. A., Smith, E. L. & Deavers, S. 1966. Cr^{51} -tagged red cell equilibration in dogs. *Am. J. Physiol.* 211:283-287.
- Huser, H.J., Rieber, E.E. & Berman, A.R. 1967. Experimental evidence of excess hemolysis in the course of chronic iron deficiency anemia. *J. Lab. clin. Med.* 69:405-414.
- Julian, L.M., Lawrence, J.H., Berlin, N.I. & Hyde, G.M. 1956. Blood volume, body water and body fat of the horse. *J. appl. Physiol.* 8:651-653.
- Macleod, J. & Ponder, E. 1946. An observation on the red cell content blood of the thoroughbred horse. *Science* 103:73.
- Maliska, C. 1973. Estudo radioisotópico da anemia infecciosa equina. I. Duração dos eritrócitos marcados com ^{51}Cr em cavalos puro sangue inglês. *Pesq. agropec. bras., Sér. Vet.* 8: 91-94.
- Marcilese, N.A., Valsecchi, R.M., Figueiras, H.D., Camberos, H.R. & Varela, J.E. 1964. Normal blood volumes in the horse. *Am. J. Physiol.* 207:223-227.
- Mundschenk, H. & Fischer, J. 1962. Zur Reaktionskinetik der Markierung normaler menschlicher Erythrocyten mit $\text{Na}^{24}\text{CrO}_4$ und ^{51}Cr Cls. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 275:46-63.
- Obara, J. & Nakajima, H. 1961. Life span of Cr^{51} -labeled erythrocytes in equine infectious anemia. *Jap. J. vet. Sci.* 23: 207-210.
- Reynolds, M. 1953. Plasma and blood volume in the cow using T-1824 hematocrit method. *Am. J. Physiol.* 173:421-427.
- Schalm, O.W. 1961. *Veterinary Hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 18-20.
- Simpson, J.G., Gilmartin, W.G. & Ridgway, S.H. 1970. Blood volume and other hematologic values in young elephant seals (*Mirounga angustirostris*). *Am. J. vet. Res.* 31:1449-1452.
- Smith, E.L., Huggins, R.A., Krantz, L., Seibert, R.A. & Deavers, S. 1956. Determination of cell volume in massive transfusions using Fe^{59} and Cr^{51} . *J. Physiol.* 186:97-100.
- Sterling, K. & Gray, S.J. 1960. Determination of circulating red cell volume in man by radioactive chromium. *J. clin. Invest.* 29:1614-1619.
- Wade Jr., L. & Sasser, L.B. 1970. Body water, plasma volume and erythrocyte volume in sheep. *Am. J. vet. Res.* 31: 1375-1387.

ABSTRACT.- Maliska, C. [Radioisotopic studies on equine infectious anemia. II. Red cell mass and blood volume of Thoroughbred horses determined with $^{51}\text{chromium}$.] Estudo radioisotópico da anemia infecciosa equina. II. Massa eritrocitária e volume sanguíneo de cavalos puro sangue inglês determinados pela $^{51}\text{Cromo}$. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* (1973) 8, 95-98 [Pt, en] Caixa Postal 3043, ZC-00, Rio de Janeiro, Brazil.

Red cell mass and blood volume of 16 Thoroughbred horses, 11 healthy and 5 with naturally acquired Equine Infectious Anemia, were determined by means of ^{51}Cr -tagged erythrocytes. The mean values obtained in healthy Thoroughbred horses were as follows: red cell mass 40,64 and blood volume 102,32 ml/kg body weight. The mean red cell mass and blood volume in anemic horses were respectively 21,13 and 107,71 ml/kg body weight.

The difference in the red cell mass values between the two groups was statistically significant ($P < 0,01$). There was significant correlation between erythrocyte mass and body weight ($r = 0,89$) in healthy horses.