

Contribuição ao estudo da coagulação

**III Nota. — Modificação do plasma e do soro sob a
influência do processo de immunisação**

Pelos Drs. VITAL BRASIL E J. VELLARD.

(Trabalho do Instituto de Butantan — S. Paulo — Brasil)

J. Lemaynter

Separata da Revista de Biologia e Hygiene
Vol. I 1927 Fasc. I

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA COAGULAÇÃO

III Nota. — Modificação do plasma e do soro sob a influencia do processo de immunisação.

Pelos Drs. VITAL BRASIL E J. VELLARD.

(Trabalho do Instituto de Butantan — S. Paulo — Brasil)

CONSIDERAÇÕES GERAES

Em precedentes communicações (*) demonstrámos que, dentro da mesma especie animal, verificam-se variações individuaes do poder coagulante do soro e da coagulabilidade do plasma. Estes dois phenomenos não dependem apenas das modificações quantitativas dos agentes directos da coagulação no sangue e no plasma, thrombina, fibrinogeno ou seus componentes, mas ainda da presença ou ausencia de outros elementos que podem favorecer ou embaraçar a acção d'estes ultimos. Assim é bem conhecido que os saes de calcio favorecem a coagulação, enquanto que certas substancias, taes como a heparina de Howell ou outros corpos de acção semelhante, verdadeiros fermentos anti-coagulantes, existem normalmente no sangue ou apparecem em certas circumstancias, podendo diminuir ou mesmo inhibir completamente a acção dos fermentos coagulantes. Alem d'isso, sabe-se igualmente que certos factores de outra ordem, taes como a temperatura, a reacção, a concentração do meio, etc. podem igualmente modificar as condições da coagulação sanguinea.

Não sendo possivel fazer depender o phenomeno da coagulação da simples reacção quantitativa da thrombina sobre o fibrinogeno, é claro que todas as causas que possam perturbar as condições normaes do sangue ou modificar-lhe de qualquer modo a composição, tragam como consequencia modificações mais ou menos profundas na coagulação normal.

Entre as causas capazes de modificar profundamente

Recebido para publicação em 8-3-927.

(*) Duas communicações feitas á Sociedade de Biologia e Hygiene a primeira publicada no *Brazil Medico* de 1.º de Maio de 1926, e a segunda no *Boletim do Instituto Brasileiro de Sciencias*.

o estado physico-chimico do sangue, podemos considerar o processo de immunisação e como corollario necessario os diferentes estados pathologicos. N'um, como n'outro caso, o meio circulante passa por alterações mais ou menos accentuadas, que estudadas com o auxilio das modificações da coagulação normal, não só offerecem um interesse theorico, como fazem prever pontos de vista de ordem pratica do mais alto valor, applicadas a estudos de immunologia e de clinica medica.

Proseguindo no programma que traçámos, occupar-nos-emos, na presente nota, das variações do poder coagulante do soro e da coagulabilidade do plasma sob a influencia do processo da immunisação, reservando para a proxima communicação o estudo das variações do poder coagulante do soro humano no curso dos diferentes estados pathologicos.

O meio sanguineo, durante a immunisação dos animaes, passa por modificações sensiveis, conhecidas de modo incompleto, dada a insufficiencia da analyse chimica. Entre as modificações assignaladas, resalta a que se refere ás variações proporçionaes das diferentes fracções proteinicas do sangue.

Desde os trabalhos de Atkinson, Ledingham, Seng e Joachin, de Gibson e Banzahf, admitte-se que, durante o processo de immunisação, ha augmento consideravel das globulinas e mais particularmente da pseudo-globulina, com diminuição das outras fracções. Assim o soro normal do cavallo contem em media 42 % de pseudo globulina, 18 % de euglobulina e 40 % de soro albumina, emquanto que no cavallo immunisado a media seria de 78 % de pseudo-globulina, 10 % de euglobulina e 12 % de soro albumina, podendo em certos casos, segundo Banzahf, a pseudo-globulina attingir a proporção de 95 % mais alta do que seu titulo normal.

As variações dos componentes proteinicos do sangue, durante a immunisação, traduzindo-se principalmente pelo augmento da pseudo-globulina e diminuição da euglobulina, fracção esta mais coagulante do que as duas outras, segundo as experiencias de Hess, repetidas por O. Veiga, podem explicar até certo ponto a diminuição do poder coagulante do soro durante o periodo de immunisação.

Alem d'essa explicação, outros factores podem ser invocados para comprehensão do phenomeno, entre os quaes conven: lembrar o augmento de anti-coagulinas normaes sob a influencia da acção estimulante dos diferentes antigenos e a formação de anti-coagulinas especificas nos casos de immunisação contra certas substancias.

Estes factos que nos auxiliam a comprehensão do phenomeno, são apresentados debaixo de toda reserva, sem a

minima pretensão de exprimir uma interpretação definitiva, que o estado actual da sciencia não comporta.

Preoccupa-nos, principalmente, n'este trabalho, a apresentação dos factos, acompanhados das deducções logicas que os n'esmos autorisam e de algumas explicações de valor pratico.

Pesquisas

De posse da technica simples e precisa, descripta em nota anterior, para estudar o poder coagulante do soro e a coagulabilidade do plasma, examinámos um certo numero de animaes immunisados contra o veneno ophidico, tendo encontrado grandes differenças de dosagens não só nos differentes individuos, como no mesmo individuo, conforme o periodo de immunisação, em que era examinado, emquanto que essa variação do poder coagulante do soro e da coagulabilidade do plasma não se observava nos animaes não submettidos ao processo de immunisação.

Para melhor estudar estas variações tomámos animaes que ainda não haviam soffrido tratamento algum e antes de começar a immunisal-os, dosamos-lhes o soro e o plasma por duas vezes, a curtos intervallos, afim de verificar a fixidez das respectivas dosagens. Submettidos ao processo de immunisação, acompanhámos cautelosamente, as modificações, que se operavam no sangue, fazendo dosagens successivas, duas a trez vezes por semana e mesmo mais, acompanhando ao mesmo tempo pelos methodos habituaes a formação de anti-corpos.

Variámos, n'estas experiencias, não só elementos que n'elles tomavam parte, como as circumstancias que poderiam influir sobre o resultado final. Assim foram tomadas varias especies animaes, de algumas das quaes mais de uma serie; foram empregados differentes antigenos, pertencentes a typos diversos. Entre as especies animaes estudadas podemos mencionar o cavallo, o muar, o boi e o cão. Dos antigenos, ensaiámos os venenos das serpentes, a toxina diphterica, e os germens *B. C. G.*, o meningococcus e o paratyphico, sendo que os experimentos com os dois ultimos germens, foram realisados, a nosso pedido, pelo distincto bacteriologista Dr. Arlindo de Assis, a quem nos confessamos muito gratos, pelos resultados que nos foram communicados.

No curso da immunisação, qualquer que seja o antigeno empregado, peçonha, toxina microbiana ou germens, o poder coagulante do soro soffre, n'uma primeira phase, fortes oscillações irregulares, ficando quasi sempre abaixo da normal, podendo, algumas vezes, por tempo limitado e curto exceder o titulo normal; n'um segundo periodo, quando os anti-corpos começam a apparecer na circulação, o poder

coagulante diminúe bruscamente e depois de algumas variações, menos accentuadas do que as primeiras, tende a se estabilisar abaixo da normal, não baixando mais a medida que a immunisação progride. Terminado o processo de immunisação, quando o título de anti-corpos começa a baixar, o poder coagulante eleva-se rapidamente, fixando-se ao nível do normal e algumas vezes mesmo pouco acima. Esta ascensão é muito mais rapida do que a diminuição de anti-corpos.

A coagulabilidade do plasma é influenciada de modo muito mais irregular, não parecendo obedecer a uma lei fixa. Suas variações, de pequena amplitude, acompanham algumas vezes as do poder coagulante do soro, mas quasi sempre a coagulabilidade tende a augmentar ligeiramente no começo da immunisação e se estabilisar em seguida ao nível da normal, quer um pouco acima, quer um pouco abaixo, não soffrendo no segundo periodo senão modificações pouco importantes; depois da immunisação volta a normal ou fica um pouco superior.

Estas variações do poder coagulante do soro e da coagulabilidade do plasma são mais ou menos fortes, segundo os individuos, emquanto que a especie animal não parece exercer grande influencia. O poder coagulante, em certos casos, baixa de metade, emquanto que as modificações do plasma soffrem apenas pequenas oscillações.

Nos animaes que soffreram immunisação anterior, quer com o mesmo antigeno, quer com antigenos differentes, principalmente si as duas immunisações são assaz approximadas, as modificações são menos accentuadas.

A natureza do antigeno parece ficar extranha ás modificações assignaladas, nas curvas do poder coagulante ou da coagulabilidade, durante o periodo de immunisação, porquanto tanto os antigenos que exercem poder coagulante sobre o plasma, in vitro, (as peçonhas), como os que são completamente destituidos d'esta acção (toxina diphterica), determinam as mesmas alterações no poder coagulante do soro e na coagulabilidade do plasma.

As modificações que se operam, no sangue dos animaes, durante o processo de immunisação, sob o ponto de vista da coagulação normal, não dependem da natureza do antigeno e por consequencia não são especificos; guardam, entretanto, como vimos, anteriormente, uma certa relação com a formação de anti-corpos, tanto assim que nos traçados indicadores do apparecimento de anti-corpos na circulação, coincide a elevação d'estes com a queda da curva indicadora do poder coagulante; a linha recta denunciadora da conservação da mesma dosagem do poder anti-toxico, com a recta do poder coagulante. Depois de um certo gráo de immunidade, porem, as curvas do poder coagulante do soro e da coagulabilidade do plasma se fixam, emquanto continua subir a curva

do poder anti-toxico. Não ha paralellismo entre um e outro phenomeno, havendo tão somente uma relação constante inicial indicadora de alterações physico-chimicas do meio circulante.

29

**Seleccção dos animados destinados a producção de soros
Anti-Toxicos, pelo exame previo do poder
coagulante dos respectivos soros.**

Uma das questões de grande interesse pratico em immunologia é conhecer-se previamente o animal bom productor de soro anti-toxico. Até o presente não foi possível estabelecer-se um methodo capaz de indicar a distincção entre os bons e os maus productores de soro. Sabe-se, ao contrario, que tomando-se uma grande turma de cavallos e immunisando-os ao mesmo tempo e exactamente pelo mesmo processo contra a toxina diphterica, ao apurar-se as respectivas dosagens, chega-se quasi sempre aos mais dessemelhantes resultados. Emquanto que, em alguns cavallos, o soro attinge ao mais elevado valor anti-toxico, em outros as dosagens só alcançam valores medios ou titulos tão insignificantes que não podem ser aproveitados. E' indubitavel, que a differença, d'estes resultados, só pode estar nos animaes empregados na immunisação.

Com o estudo, que vinhamos fazendo do sangue, sob o ponto de vista da coagulação, tivemos a idéa de achar uma solução para este problema, procurando uma indicação no valor coagulante do soro, dada as profundas differenças individuaes do meio circulante.

Examinámos, para isto, grande numero de animaes antes de tomal-os para o processo de immunisação com diferentes antigenos toxicos e comparámos, posteriormente, as dosagens do poder coagulante dos soros dos diferentes animaes, com os valores anti-toxicos por estes alcançados. Os resultados obtidos nos levam a estabelecer, pelo menos provisoriamente, que os animaes possuidores de soros muito coagulantes são os melhores productores de anti-toxina.

Como documento d'este modo de ver, citaremos, entre muitos, apenas a seguinte experiencia feita com o prestimoso auxilio do Dr. Lemos Monteiro, encarregado, no Instituto de Butantan, do preparo do soro anti-diphterico: Tomámos dez cavallos e dosamos-lhes, cautelosamente, pela nossa technica, o poder coagulante dos respectivos soros, passando-os em seguida ao Dr. Lemos Monteiro, que os immunisou ao mesmo tempo, pelo mesmo methodo, empregando a mesma technica. Ao fim da immunisação chegou-se ao seguinte resultado, comparando-se o poder coagulante dos diferentes soros, com os respectivos valores anti-toxicos.

N.º do cavallo	Poder coagulante do soro antes da immunisação	Poder anti-toxico
23	0,17 c. c.	300 u. a.
31	0,20 c. c.	800 u. a.
37	0,23 c. c.	500 u. a.
39	0,24 c. c.	600 u. a.
29	0,25 c. c.	700 u. a.
30	0,25 c. c.	300 u. a.
42	0,45 c. c.	5 u. a.
41	0,46 c. c.	200 u. a.
43	0,48 c. c.	150 u. a.
38	0,51 c. c.	150 u. a.

Vê-se, por estes dados, que não ha verdadeira proporcionalidade entre o poder coagulante do soro e capacidade de formar anti-corpos; há, entretanto, uma relação constante que nos permite chegar ao fim colimado, isto é, seleccionar o cavallo bom productor. Assim é que nessa turma de dez cavallos, encontramos seis cavallos bons, dosando entre 300 e 800 unidades e quatro mãos productores que ficaram entre 5 e 200 unidades. Pois bem, na turma dos bons, o poder coagulante do soro variou entre 0,17 c.c. e 0,25 c.c., enquanto que nos mãos o poder coagulante oscillou entre 0,45 c.c. e 0,51 c.c.

Este estudo comparativo continúa no intuito de firmar em mais abundante documentação, os factos adquiridos.

Formação de anti-coagulinas especificas no sôro e no plasma dos animaes immunisados contra as peçonhas.

Si as modificações do sôro e do plasma no phenomeno da coagulação physiologica normal, durante o curso de immunisação, foram apenas assignaladas, a acção anti-coagulante especifica do sôro de animaes immunisados contra as peçonhas, tem sido objecto de estudos dignos de serem registados.

N'uma primeira nota tratamos longamente do poder coagulante de um grande numero de veneno de thanatophidios, principalmente de nossas especies Sul americanas de *Crotalinae*. Sendo estes venenos extremamente complexos, possuindo a um tempo propriedades neuro-toxicas, hemolyticas, hemorrhagicas, coagulantes e proteolyticas, uma questão se apresentava de saber-se si estas differentes acções eram neutralisadas, no mesmo gráo, pelos sôros therapeuticos, preparados contra estes venenos, e bem assim de conhecer-se si esta neutralisação era especifica.

Os primeiros trabalhos sobre a acção anti-coagulante dos sôros anti-peçonhentos, foram os de Lamb (1904), que assignalou a especificidade do sôro anti-vipera *Russelii*, em relação ás coagulinas do veneno desta especie. Quasi ao mesmo tempo, Noc trabalhando sob a direcção de Calmette (1905), não conseguia neutralisar a acção coagulante do veneno de diversas *Lachesis*, pelo sôro anti-venoso de Calmette, o que era natural, por tratar-se do sôro anti-naja, a despeito da explicação deste ultimo autor, para este insucesso, de haver empregado como antígeno, venenos aquecidos a 75°.

Martin (1905), observou que um sôro *anti-Notechis scutatus* neutralisava a acção coagulante do veneno desta especie e em menor gráo o de outras especies visinhas, mas era completamente sem acção sobre o das *Viperadæ*. Um de nos (Vital Brazil) em 1906, seguindo a technica de Noc, verificou que os sôros anti-ophidicos de Butantan, depois de contacto de 15 minutos com os venenos correspondentes, impediam estes de coagular o plasma citratado do coelho, emquanto que o contacto de sôro e plasma, não impediam os venenos de exercerem sua acção. Verificou, alem disto, que esta acção impiedente era especifica, isto é, que o sôro anti-bothropico não neutralisava a acção coagulante do veneno crotalico e vice-versa que o sôro anti-crotalico nenhuma acção exercia sobre a coagulante do veneno bothropico. Mais tarde Arthus e seus collaboradores (1911), empregando sôros e veneno de Butantan, confirmaram a acção anti-coagulante especifica dos sôros. Houssay e Sordelli (1918) assignalam, entretanto, que as propriedades anti-coagulantes dos soros dos animaes immunisados contra as peçonhas, são especificas até certo ponto, mas não de um modo absoluto, indicando, alem d'isto, que o plasma destes animaes coagula difficilmente pelos venenos, empregados na immunisação dos mesmos.

A dosagem do poder anti-toxico, *in vivo*, geralmente empregada para julgar do valor dos sôros anti-peçonhentos, é, indubitavelmente, o methodo que fornece os resultados mais uteis e mais exactos. Apresenta, entretanto, algumas desvantagens, entre as quaes convem notar, o tempo, ás vezes, um tanto longo, exigido para obtenção dos resultados, o preço relativamente elevado do custo, pelo sacrificio de animaes em experiencia, não facilitando, porisso, dosagens multiplas e repetidas, finalmente a sensibilidade limitada, não permitindo acompanhar desde o inicio, o progredimento do processo immunitario, controlando a marcha da formação de anti-corpos.

Os methodos que, até agora, têm sido propostos para

remediar estes inconvenientes baseados principalmente nas propriedades anti-hemolyticas, anti-coagulantes ou precipitantes dos sôros, que deram resultado satisfactorios. Resolvemos, por isso, procurar, baseados na technica, que estabelecemos para o estudo da coagulação, um methodo para dosagem *in vitro* dos sôros anti-peçonhentos.

Começamos por determinar de modo preciso a acção coagulante dos differentes venenos, procurando eliminar todas as causas de erro, que pudessem perturbar ou fazer avariar os respectivos resultados. Tentamos, então, dois procedimentos differentes. N'um primeiro, semelhante ao que empregamos para estudar a acção anti-coagulante normal de certos sôros, procuramos directamente a quantidade de veneno, cuja acção coagulante, fosse neutralisada por um volume fixo de soro; a 1cc. de soluções de veneno a titulos variaveis, juntavamos 1cc. do sôro a estudar e em seguida mais 1cc. do plasma padrão; a leitura era feita depois de uma hora de permanencia no banho-maria a 37°.

No segundo procedimento, procuramos avaliar, em unidades anti-coagulantes, a dosagem do sôro, tendo determinado previamente o valor coagulante do veneno e tomado por unidade coagulante dez vezes a minima coagulante, considerada esta, a dose de veneno capaz de determinar a coagulação completa, no espaço de uma hora, 1cc. do plasma padrão; a actividade do sôro era indicada pelo titulo de diluição, que na dose de 1cc., no espaço de uma hora e dentro das mesmas condições de volume e temperatura, impedisse a coagulação.

Afim de julgar do valor respectivo destes dois methodos, dosamos simultaneamente, por um e outro, a intervallos, o sôro de uma série de animaes immunisados contra peçonha, verificando ao mesmo tempo o valor anti-toxico *in vivo*. O primeiro methodo foi rapidamente abandonado, por não fornecer resultados regulares, com o segundo methodo tivemos ao contrario, resultados assaz constantes, quando se tratava do sôro do mesmo animal, indicando em differentes intervallos, modificações de actividade confirmadas pelo estudo do poder anti-toxico; o exame simultaneo, de varios animaes nos dava resultados por vezes contradictorios, não permitindo, comparar por esse methodo, o valor do sôro de diversos animaes; um sôro muito anti-toxico, revelava-se não raro, menos anti-coagulante do que um outro de fraco valor anti-toxico. Além disto, o methodo não permittia estudar os soros de fraca dosagem, porque, neste caso, se verificava a coagulação em todos os tubos.

A analyse minuciosa destes resultados nos demonstrou que estas irregularidades deviam ser attribuidas a acção coagulante formal dos differentes sôros, sobre o plasma padrão. acção esta, variavel, segundo o animal e que vinha sobrepôr-

se ás coagulinas das peçonhas, influindo de modo variavel sobre o phenomeno da coagulação, conforme o titulo da solução de veneno empregada. O aquecimento do sôro a 55°, durante uma hora, mesmo quando repetida quatro ou cinco vezes, se bem que destrua, quasi por completo, o seu poder coagulante, não attenua, senão parcialmente, esta propriedade de ser activada pelos venenos.

Dosagem dos soros anti-peçonhentos, pelo valor da anti-coagulabilidade do plasma dos animaes immunisados.

Abandonados os dois methodos anteriores, pelas razões acima expostas, tratamos de verificar, se pela apreciação das anti-coagulinas contidas no plasma dos animaes immunisados, seria possivel, encontrar a solução do nosso problema. Eis a technica de que nos utilizamos: em uma série de tubos, colloca-se um cc. de diluições progressivamente crescentes de veneno, ao qual junta-se em seguida 1cc. do plasma a estudar, fluoretado a 3 $\frac{0}{100}$; depois de haver por movimentos brandos, procurado homogenisar a mistura, são levados os tubos ao banhomaria a 37°; é feita a leitura ao cabo de uma hora. O primeiro tubo que apresente um começo de coagulação, indica o limite do poder anti-coagulante do sôro.

Esta technica simples e rapida permite executar em pouco tempo grande numero de exames. Acção alguma secundaria vem perturbar-a, indicando de modo exacto o valor das anti-coagulinas contidas no plasma. Ha mais de um anno que nos utilizamos, sempre com os melhores resultados, pelo menos uma vez por semana, deste methodo para dosagem dos sôros anti-peçonhentos de todos os cavallos do Instituto. Essas dosagens correspondem as variações do poder anti-toxico, sendo de uma sensibilidade tão grande, que permite avaliar differenças de um decimo e mesmo cinco centesimos de millesimos de milligramma, o que torna possivel acompanhar-se, desde o começo a marcha da immunisação.

As anti-coagulinas do plasma dos animaes immunisados contra as peçonhas são estrictamente especificas, neutralizando em gráo elevado a acção coagulante dos venenos utilizados na immunisação e em gráo infinitamente menor ou nullo a dos venenos de outras especies mesmo muito visinhos. Numerosos exames de plasmas de cavallos immunisados simultaneamente contra o veneno crotalico (*C. terrificus*) e o veneno bothropico (diversas especies de *Lachesis*) têm mostrado a inteira independencia na formação das anti-coagulinas especificas. Demais, o plasma de um animal immunisado unicamente contra o veneno de *L. lanceolatus*, não neu-

depois abaixo da normal, sem ser sensivelmente influenciado pelos progressos posteriores da immunisação.

II — A coagulabilidade normal do plasma é modificada de modo menos sensível e regular, parecendo não obedecer a uma lei fixa.

III — Não ha relação quantitativa directa entre o abaixamento do poder coagulante do soro e a formação de anti-corpos.

IV — A medida do poder coagulante do soro antes da immunisação, parece offerecer base para um methodo de selecção dos animaes destinados á producção de sôros anti-toxicos, sendo que os possuidores de sôros mais coagulantes correspondem aos melhores productores de anti-toxinas.

V — A determinação, no plasma dos animaes immunisados contra as peçonhas, das anti-coagulinas em relação aos venenos, constitue um methodo de dosagem simples, rapido, extremamente sensível, pouco oneroso, especifico e guarda estreitas relações com o poder anti-toxico dos respectivos sôros, permitindo acompanhar desde o inicio o curso da immunisação.

VI — A dosagem do poder anti-coagulante especiiico do soro dos animaes immunisados contra as peçonhas, não dá, ao contrario, resultados seguros, por serem estes influenciados pela activação do poder coagulante normal dos sôros, mesmo quando estes são aquecidos a 55°.

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF COAGULATION

III — A note on the modification of the plasma and the serum under the influence of the immunization process.

SUMMARY

Under the influence of the immunization process, no matter the antigen used, and the way of introduction of the antigen into the organism, the coagulant power of the serum, after some irregular oscillations, decreases rapidly at the moment of the appearance of the antibodies; thereafter it maintains a permanent level, under the normal one, without being influenced any more by the continuation of the immunization.

The normal coagulability of the plasma is less modified and when this occurs, the observed modifications are quite irregular, giving the impression that it does not obey a determined law.

There is no quantitative relation between the decreasing coagulating power of the serum and the formation of antibodies.

The observation of the coagulant power of the serum, before immunization starts, may give a reliable indication for the selection of animals to be used for the production of antitoxic sera; the animals the sera of which shows a high coagulant power are, in general, the best producers or antitoxins.

The determination of the specific anticoagulins existing in the plasma of the animals immunized against coagulant snake poisons, constitutes a simple, rapid and extremely sensitive method to judge of the antitoxic power of the corresponding sera, for there exists a constant relation between the antitoxic power of the sera and the anticoagulant action of the plasma in relation to the poisons.

The dosage of the specific anticoagulant power of the serum of animals immunized against snake poisons, on the contrary, does not afford a good indication of the antitoxic power of the serum, due to the normal coagulant action of the ~~poison~~, even when the serum is previously heated to 55°C.

serum

