

Cláudio Fonseca de Freitas

Plasmaferese na Produção de Soros Hiperimunes Anti-*Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) em Equinos.

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Medicina
Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva
Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira
Leite

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
1997

F866p Freitas, Cláudio Fonseca de, 1956-

Plasmaferese na produção de soros hiperimunes anti-*Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) em equinos/Cláudio Fonseca de Freitas. - Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 1997.

57 p.:il

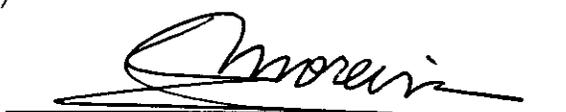
Dissertação (mestrado)

1. Sorologia veterinária - Teses. 2. Plasmaferese - Teses. 3. Soro antiofídico - Produção - Teses. I. Título.

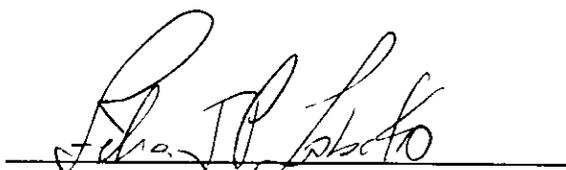
CDD - 636.089

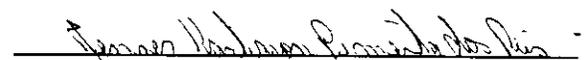
Dissertação defendida e aprovada em 28/05/97 pela
Comissão Examinadora constituída por:


Prof. Rômulo Cerqueira Leite


Prof. Élvio Carlos Moreira


Dr. David Toledo Velarde


Profª. Zélia Inês Portela Lobato


Prof. Jenner Karlinson Pimenta dos Reis

Dedico este trabalho:
Aos meus pais pelo que sou,
À minha mulher e aos meus filhos pelo que são.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite, cujas considerações técnicas, apoio, confiança, estímulo, convivência e exemplo profissional, tornaram-no mais que um orientador, um amigo.

Ao Prof. Élvio Carlos Moreira, com quem, durante estes anos, pude trocar idéias de grande valor técnico que tanto enriqueceram este trabalho.

Ao Dr. David Toledo Velarde, Coordenador da Divisão de Imunobiológicos da Fundação Ezequiel Dias por incentivar-me e liberar-me para a realização deste curso.

À Dra. Zélia Inês Portela Lobato e ao Dr. Jenner Karlinson Pimenta dos Reis pelas valiosas observações e sugestões na elaboração deste trabalho.

À colega Wany Selena Maria, que com grande desprendimento assumiu a responsabilidade pelo Serviço de Produção de Plasma da Fundação Ezequiel Dias substituindo-me para que eu realizasse este curso.

Ao Sr. Guilherme Bao pelo exemplo sempre presente de profissionalismo e lealdade.

À equipe do Serviço de Produção de Plasma da Fundação Ezequiel Dias: Cláudio Márcio, Elizete de Souza, João Diniz,

José Fernandes, Marcus Vinícius, Maria de Jesus e Suzana Fernandes, cuja dedicação e esforço foram imprescindíveis à realização deste trabalho.

Aos funcionários do Serviço de Controle Biológico da Fundação Ezequiel Dias, em especial à Dra. Célia de Fátima Barbosa, responsáveis pelos "Ensaio Biológicos" de titulação de potência dos "pools" de plasmas.

À Evenilde Picardi Faria e demais funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária da UFMG, que tanto me ajudaram na realização dos exames hematológicos e bioquímicos pertinentes ao experimento.

Ao Prof. Rubens Antônio Carneiro, que colocou-se à disposição e de quem recebi valiosas informações na área de Patologia Clínica Animal.

À Marluce, Guilherme e Rodrigo, agradecimentos especiais pela compreensão pelos vários e longos momentos de ausência do convívio familiar, pelas demonstrações constantes de amor e pelo apoio estimulante de cada dia.

Aos meus pais e irmãos, que tanto confiaram quanto apoiaram-me em cada desafio profissional.

À minha avó Maria, que sempre pediu pelo meu sucesso em suas orações.

Ao Djalma e à Marigene, que também confiaram e incentivaram-me a vencer mais este desafio.

À amiga Marília de Oliveira Cavaliere, que tão carinhosamente ajudou-me na reta final deste trabalho.

À Paula Aryane Brito Alves, pessoa tão recente, porém, ímpar, no meu círculo de amigos, pela ajuda incansável, tendo tornado possível o término deste trabalho em tempo hábil.

Aos amigos, pelo estímulo, e, em especial ao Prof. Antônio Neves de Carvalho Júnior do Departamento de Engenharia e Materiais de Construção da Escola de Engenharia da UFMG, que tanto me assessorou nos primeiros passos em informática, como também incentivou-me de forma incondicional.

Aos colegas de mestrado pela convivência saudável e oportunidade de descobrir novos amigos nesses anos de curso.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG pela ajuda, atenção e boa vontade demonstrada no dia a dia.

Aos colegas e funcionários da Fundação Ezequiel Dias pelo constante apoio e incentivo, em particular ao Dr. Luiz Guilherme Heneine pelas enriquecedoras trocas de idéias e sugestões técnico-científicas, e, também, à amiga Andréia Cristina Souza Ferreira, que tão gentilmente colocou o Serviço de Biotério à minha disposição para a realização dos "Ensaio Biológicos".

Ao Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação da Escola de Veterinária da UFMG, em especial à Nilda Lucas Laurindo

pela prontidão e carinho com que cuidou dos assuntos a mim pertinentes.

À Escola de Veterinária da UFMG pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), cujo apoio financeiro foi fundamental à execução deste curso.

À todos aqueles, cujos nomes não foram aqui incluídos, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu profundo respeito a todos os animais que direta ou indiretamente são utilizados pelo homem em prol do desenvolvimento científico e da saúde humana.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	15
RESUMO	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 LITERATURA CONSULTADA	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÕES	52
SUMMARY	53
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
TABELA 1	39
Valores das taxas de hematócrito, concentrações de hemoglobina, concentrações de proteínas totais e volumes de plasma coletados de seis equinos hiperimunizados com veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> , submetidos a quatro sangrias com plasmaferese, por quatro ciclos.	
TABELA 2	44
Valores dos volumes de plasma coletados de seis equinos hiperimunizados com veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> , submetidos a duas sangrias sem plasmaferese, por quatro ciclos.	
TABELA 3	47
Valores comparativos dos volumes de plasma coletados, em litros, de seis equinos hiperimunizados com veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> , submetidos a quatro sangrias com plasmaferese e de seis equinos submetidos a duas sangrias sem plasmaferese, por quatro ciclos.	

TABELA 4	Potência dos pools de plasma de seis equinos hiperimunizados com veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> , em miligrama/mililitro (mg/ml), submetidos a quatro sangrias com plasmaferese, por quatro ciclos.	48
GRÁFICO 1	Sequência dos percentuais médios das taxas de hematócrito de seis equinos hiperimunizados com veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> , submetidos a quatro sangrias com plasmaferese, por quatro ciclos.	49
GRÁFICO 2	Sequência dos percentuais médios das concentrações de hemoglobina de seis equinos hiperimunizados com veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> , submetidos a quatro sangrias com plasmaferese, por quatro ciclos.	50
GRÁFICO 3	Sequência dos percentuais médios das concentrações de proteínas totais de seis equinos hiperimunizados com veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> , submetidos a quatro sangrias com plasmaferese, por quatro ciclos.	51

RESUMO

Seis equinos foram hiperimunizados com veneno de *Crotalus durissus terrificus* por quatro ciclos consecutivos. Ao final de cada ciclo os cavalos foram sangrados individualmente por quatro dias seguidos e sete litros de sangue foram coletados em cada sangria. Um total de 28 litros de sangue foi obtido de cada cavalo ao final de cada processo de sangria. A potência do plasma diminuiu no decorrer das sangrias mas manteve um título de anticorpos acima do mínimo requerido. A técnica de plasmaferese utilizada nestes equinos para a produção de soro antiofídico, anticrotálico, permitiu o aumento de 102% no volume de plasma hiperimune produzido em comparação com o volume obtido pelo método padrão de apenas duas sangrias sem reinfusão das hemácias no equino doador. A técnica permitiu a coleta de grandes volumes de plasma sem interferir significativamente no estado clínico dos animais. Os resultados mostram que o procedimento de plasmaferese utilizado é altamente recomendável na produção de soros hiperimunes.

Palavras-chave: plasmaferese, equinos, plasma hiperimune, estado clínico.

1 INTRODUÇÃO

A produção de imunobiológicos no Brasil é extremamente complexa, passando por um intricado percurso onde as dificuldades técnico-científicas e financeiras opõem-se ao objetivo primordial de se atender à demanda nacional por este tipo de medicamento.

Na área de produção de vacinas, quando não é possível a produção no país pelas instituições públicas ou privadas, pode-se resolver a questão através da importação do produto e sem comprometimento dos programas de prevenção.

Porém, no campo dos soros hiperimunes, em particular os soros antiofídicos, a importação torna-se inviável, uma vez que, nossas serpentes apresentam peçonhas diferentes das toxinas produzidas por ofídios de outros países, sendo, portanto, restritas ao ambiente doméstico. Dessa forma é impossível tratar vítimas de ofidismo no Brasil com soros antitóxicos oriundos de países cujas serpentes apresentam venenos com características bioquímicas e imunológicas diferentes das nossas.

Então, implantou-se no Brasil, em 1985, o " Programa Nacional de Auto-Suficiência em Imunobiológicos", financiado em sua maior parte pelo Ministério da Saúde. Com isto a produção de soros hiperimunes saiu, no decorrer

desses anos, de níveis mínimos para atingir patamares que realmente atendem à demanda nacional. Apesar deste grande salto produtivo, a questão do custo de produção merece especial atenção neste país onde as dificuldades econômicas se impõem, constituindo-se em um obstáculo de fundamental importância. Este fator atinge toda a linha de produção e merece atenção especial na produção de plasma hiperimune, matéria prima do soro antitóxico.

Com isto, várias medidas para diminuição dos custos de produção de plasma foram implantadas, sendo que, uma merece atenção especial pois incide diretamente na diminuição desses custos: o aumento da produtividade animal. As técnicas de produção sofreram, portanto, algumas modificações, dentre elas, a diminuição do período de descanso pós-sangria, aumento do número de sangrias por animal, aumento do volume de sangue extraído por sangria e mudanças nos protocolos de imunização visando aumento significativo dos títulos de anticorpos dos animais.

Dentre todas, a plasmaferese, que etimologicamente origina-se do grego e significa "supressão do plasma", acenou como sendo altamente promissora, já que, permite aumento da produtividade animal acima de 100% através de maior número de sangrias em um intervalo de tempo reduzido.

Conseqüentemente, esta técnica também permite diminuição do número efetivo de animais produtores e preservação de um melhor estado clínico dos mesmos, caracterizando preocupação com o bem estar de animais que são utilizados a serviço da saúde humana.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a plasmaferese como uma técnica que permite aumentar o volume de

plasma coletado de um equino doador, de forma quantitativa e qualitativa, ou seja, com título satisfatório de anticorpos, mantendo-o em condições clínicas normais.

2 LITERATURA CONSULTADA

Hemafereze é o processo de separação do sangue total em seus principais componentes - granulócitos, linfócitos, plasma, plaquetas e/ou hemácias, sendo que, o componente de interesse é, então, coletado e as frações remanescentes são reinfundidas no doador (Gordon, 1984). Assim, segundo Morin et al. (1983), plasmaferese é a separação e coleção de plasma do sangue total com o retorno intravenoso dos componentes celulares do doador.

Segundo Jones (1977), esta idéia surgiu em 1914, quando Abel et al. tentavam desenvolver um rim artificial para verificar os efeitos de repetidas remoções de quantidades consideráveis de sangue. Já nesta época os mesmos autores usaram o termo plasmaferese para descrição do processo e sugeriram o seu uso na preparação de soros antitóxicos em equinos.

Inicialmente implantada em Barcelona nos anos 1950 por Grifols-Lucas, a plasmaferese passou a ser largamente utilizada após 1965. Segundo Grifols-Lucas (1952) era um desperdício desprezar as hemácias que são, precisamente, a porção de sangue que requer mais tempo e material para sua regeneração. O referido autor exemplifica que para regenerar 100 mililitros de sangue total o organismo necessita de material para repor cerca de 16 gramas de hemoglobina, quatro gramas de proteínas plasmáticas e a

quantidade de ferro correspondente, dentre outros. Porém, para regenerar a quantidade de plasma extraída de 100 mililitros de sangue total, apenas o material para a reposição de quatro gramas de proteínas é requerido.

A partir de 1967, a técnica passou a ser utilizada pelo instituto Mérieux, em Ardèche, França, para produção de soro antilinfocitário, e, em equinos, na linha de produção de soroterápicos a partir de 1972, verificando-se um aumento de 95,3 para 230,8 litros de plasma por animal/ano (Vellut & Truchot, 1978).

Além do aumento do volume de plasma produzido, a plasmaferese é importante para manter um nível de hematócrito conveniente, o que é uma das condições para manutenção de um bom estado clínico (Vellut & Truchot, 1978), pois segundo os mesmos autores, o limite crítico, abaixo do qual a saúde do equino doador está ameaçada é de 25%, sendo que um hematócrito ótimo para produção de plasma se situa na faixa de 35%, permitindo obter um rendimento de 4,5 litros de plasma para um volume de sete litros de sangue. Já, Morin et al. (1983), observaram que o melhor rendimento de plasma foi obtido de animais cujo hematócrito era de aproximadamente 30%.

De acordo com Jain (1986), a rápida perda de sangue pode levar à morte por choque hipovolêmico, sendo que um animal saudável pode tolerar mais de 20% na redução de seu volume de sangue, porém, sinais de choque podem aparecer quando este animal perde sangue a partir de 60% de seu volume normal. Como exemplo, pode-se citar o trabalho realizado por Walcott (1945), que em um estudo realizado com 23 cães submetidos a uma hemorragia maciça aguda, observou que 13 morreram quando

sangrados em uma média de 51,9% do sangue total. Entre os dez cães que sobreviveram a perda média de sangue foi em torno de 47,6% do sangue total.

Por outro lado, Baxter et al. (1972) submetendo uma ovelha a 18 seções de plasmaferese de quatro em quatro dias, observaram que a mesma manteve-se em bom estado de saúde, não apresentando evidência de anemia ou perda de peso.

Green & Ward (1974) também obtiveram ótimos resultados com a plasmaferese, não observando nenhuma reação de hipersensibilidade resultante de reinfusão de hemácias no doador, e que o volume de plasma era restaurado em poucas horas após a sangria. Da mesma forma, Bhardwaj et al. (1977) depois de utilizarem a técnica por cinco anos em 200 equinos, defendem a sua utilização como forma de aumentar a produção de plasma em laboratórios produtores de soros hiperimunes, utilizando-se um programa quinzenal de plasmaferese, e relatam que os casos de choque sanguíneo devido à transfusão, neste período, foram insignificantes.

Lundström & Ramgren (1958) usando plasmafereses semanais, durante dez semanas, em humanos, com reestímulo imunológico a cada quatro semanas, obtiveram plasma com títulos satisfatórios de anticorpos contra *Haemophilus pertussis*, sendo que, o estado de saúde dos doadores não pareceu prejudicado e os títulos de anticorpos mais baixos corresponderam às últimas plasmafereses.

Segundo Estrada et al (1991) há uma clara relação entre o desenvolvimento da resposta humoral e o aumento da concentração de proteínas totais em animais

hiperimunizados para a produção de soros antitóxicos, sendo que, este aumento se deve, possivelmente, à síntese de anticorpos. O mesmo autor observou que nas semanas que se seguem às extensivas sangrias de produção, há um aumento significativo na taxa de hematócrito e concentração de hemoglobina.

Já Ugalde (1995) constatou que os níveis de proteínas totais aumentaram conforme se incrementou a dose de veneno inoculado, provavelmente devido a um aumento de IgG, tendo observado também que a taxa de hematócrito e concentração de hemoglobina tendem a cair conforme acontecem as sangrias de produção.

Euler et al. (1985) trabalhando com ratos, realizaram plasmaferese utilizando a técnica de circulação extra corpórea (artéria-veia) para remoção de plasma, observando que há um aumento nos títulos de anticorpos num período de descanso após a plasmaferese.

Segundo Friedman et al. (1975) é difícil definir com certeza os níveis normais de imunoglobulinas em um doador de plasma submetido à plasmaferese e a significância da flutuação nos níveis de proteínas e imunoglobulinas.

A execução dos procedimentos de plasmaferese, com a técnica do processador automático de sangue (circulação extra corpórea), aumentou enormemente a eficiência no uso de animais, e, com isto, reduziu-se o número de doadores, resultando também na diminuição do tempo de trabalho (Morin et al., 1983).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Animais:

Foram utilizados seis equinos machos, sem raça definida, na faixa etária de seis a onze anos, pesando entre 350 e 400 Kg, compreendidos entre o 4^o e o 8^o ciclo de produção, no período de junho a novembro de 1995, selecionados aleatoriamente do plantel de produção de plasma hiperimune, anticrotático, da Fundação Ezequiel Dias, e mantidos na fazenda da Instituição localizada em Betim-MG.

Antes do início do experimento, estes animais foram examinados clinicamente. Após este procedimento os mesmos foram, então, colocados em um piquete de três hectares, onde permaneceram por cinco meses, em um período de repouso, para que os parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados antes e durante o experimento se estabilizassem. Dosou-se volume globular conforme Ferreira Neto et al. (1978), concentração de hemoglobina¹ e concentração de proteínas totais¹. Objetivou-se também, com este descanso, uma redução máxima dos níveis de anticorpos anticrotáticos destes equinos. Durante o experimento também foram realizados testes de potência dos pools de plasmas dos seis animais em cada sangria, durante os quatro ciclos de produção estudados, através de

¹ Kit Comercial Analyza Diagnóstica

ensaio biológico "in vivo", numa reação de soro neutralização em camundongos (European Pharmacopeia, 1982). Além disso foi considerado o volume de plasma produzido por cada animal, à cada sangria, com o objetivo de se conhecer o volume total de plasma obtido e o ganho adicional com as terceiras e quartas sangrias. Paralelamente, considerou-se o volume de plasma produzido por outros seis animais anticrotáticos, do mesmo plantel de produção da Fundação Ezequiel Dias, machos, nas mesmas faixas de peso, idade e ciclo de produção, escolhidos também aleatoriamente e mantidos com o mesmo padrão nutricional que o grupo em estudo, durante os mesmos quatro ciclos de produção. Estes animais também foram submetidos a exame clínico, ao mesmo período de descanso e ao mesmo método de imunização, porém, sangrados conforme o protocolo padrão da Instituição, que consiste de duas sangrias, no 23^o e 24^o dias do ciclo, sem a devida reinfusão de hemácias.

Ainda durante o período de repouso os doze animais também foram submetidos a controle de endo e ectoparasitos. Para o controle ectoparasitário foi utilizado o produto CYPER 1000², na diluição de 200 mililitros/100 litros de água, usando-se aproximadamente sete litros de solução por animal. E, para o controle endoparasitário foi utilizado EQUALAN PASTA³, na dose de 6,42 gramas de ivermectin por animal.

Todos os animais foram também submetidos a exame para anemia infecciosa equina no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da

² Laboratório Ouro Fino Ltda

³ Laboratório Prodome

Universidade Federal de Minas Gerais, através da técnica de "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA), método indireto segundo Reis & Leite (1994).

Ao final deste período todos os equinos foram reavaliados clinicamente e considerados aptos para o experimento durante o qual foram mantidos no mesmo piquete, sendo cada um alimentado diariamente com 20 quilos de capim *camerum* picado e quatro quilos de ração comercial para equinos, Corcelina 200⁴. Água e Suplemento Mineral 80⁴, de uso comercial, foram colocados à disposição.

Imunizações, sangrias, plasmaferese e coleta de amostras:

Para a realização deste experimento eram preparados dois tipos de inóculos utilizando-se como antígeno veneno crotálico bruto liofilizado, crotamina positivo, produzido pelo Serviço de Serpentário da Fundação Ezequiel Dias. Um inóculo era preparado utilizando-se 7,5 miligramas de veneno diluídas em cinco mililitros de solução salina a 0,85% e adsorvidas em cinco mililitros de Adjuvante de Freund Incompleto⁵. Esta emulsão, utilizada sempre no primeiro dia de cada ciclo de imunização, era inoculada em quatro pontos da região dorso-lombar do animal, 2,5 mililitros por ponto, utilizando-se sempre a via subcutânea. O outro inóculo era preparado utilizando-se 2,5 miligramas de veneno diluído em doze mililitros de solução salina a 0,85%, sendo as inoculações realizadas em seis pontos da região dorso-lombar do animal, dois mililitros por ponto, no 8^o, 10^o e 12^o dias do ciclo, utilizando-se sempre a via subcutânea.

⁴ Purina Nutrimentos Ltda

⁵ Perstorp Biotec Company

Uma vez preparados os inóculos em cada ciclo, os seis animais do grupo tratado foram submetidos aos seguintes protocolos de imunização, sangria, plasmaferese e coleta de amostras:

- 1^o dia: Cinco ml Adjuvante de Freund Incompleto + cinco ml solução salina a 0,85% + 7,5 miligramas de veneno
- 8^o dia: 12 ml solução salina a 0,85% + 2,5 miligramas de veneno
- 10^o dia: 12 ml solução salina a 0,85% + 2,5 miligramas de veneno
- 12^o dia: 12 ml solução salina a 0,85% + 2,5 miligramas de veneno
- 22^o dia: Sangria de produção + coleta de dados
- 23^o dia: Sangria de produção + plasmaferese + coleta de dados
- 24^o dia: Sangria de produção + plasmaferese + coleta de dados
- 25^o dia: Sangria de produção + plasmaferese + coleta de dados
- 26^o dia: Plasmaferese
16 dias de descanso e retorno ao 1^o dia do ciclo

Todas as sangrias finais foram realizadas na veia jugular do animal, após garroteamento, tricotomia e assepsia do local, sendo colhidos volumes aproximados de sete litros por sangria, em bolsas descartáveis EQ-Jet⁶ esterilizadas, já adicionadas de 400 mililitros de solução anti-coagulante (ácido acético, citrato de sódio, dextrose) equipadas com bolsa anexa para separação de plasma. Durante os procedimentos de sangria as bolsas eram levemente

⁶ JR Indústria e Comércio de Produtos Hospitalares Ltda

massageadas para uma completa homogeneização de sangue e anti-coagulante.

Após a sangria, as bolsas eram colocadas em repouso, na posição vertical, durante 24 hs, à temperatura ambiente, visando uma perfeita hemossedimentação. Em seguida cada bolsa era levada a um aparelho de separação de plasma com o objetivo de transferir o plasma sobrenadante para a bolsa anexa, tendo-se o cuidado de preservar a camada de leucócitos depositada sobre a papa de hemácias. À cada bolsa de plasma, independente do volume coletado, era adicionada uma quantidade de 20 mililitros de solução de éter-fenol como conservante. As bolsas de plasma eram pesadas e calculado o volume de plasma obtido. Após a separação, à cada bolsa de sangria contendo hemácias e leucócitos era adicionada uma quantidade de dois litros de solução salina a 0,85% para ressuspensão dos elementos celulares, e o seu conteúdo era integralmente reinfundido no respectivo animal imediatamente após a sangria do dia, exceto no 26^o dia do ciclo, quando era realizada apenas a reinfusão.

Imediatamente antes de cada sangria, eram coletadas amostras de sangue, em tubos de ensaio de 10 mililitros com cinco gotas de solução de EDTA a 10%, com agulha descartável 40x16, para determinação dos parâmetros hematológicos já citados, no 22^o, 23^o, 24^o e 25^o dias, e, também, 10 mililitros de sangue em tubos de ensaio com tampa rosqueável, que eram colocados em repouso, em uma inclinação de aproximadamente 45^o, durante cerca de três horas. Em seguida eram levados à geladeira, onde ficavam a 4^o C até o dia seguinte, para uma completa dessoração. Este soro era, então, utilizado no 23^o, 24^o, 25^o

e 26^o dias para a determinação da concentração de proteínas totais, conforme citado anteriormente.

Análise estatística:

Durante um período de cinco meses, os seis animais do grupo tratado foram submetidos a quatro ciclos periódicos de quatro sangrias cada. Assim, um total de 96 observações foram coletadas para cada uma das características de interesse. A coleta de dados se deu de forma ordenada e sistemática, isto é, em cada um dos ciclos realizou-se quatro sangrias, uma subsequente à outra. Sendo assim, o delineamento mais adequado para o experimento em estudo foi o "Split-Plot" (Montgomery, 1991), onde a sangria é o fator de "plot" (fator A), o ciclo é o fator "subplot" (fator B) e o animal é o fator de bloco (fator C). Os dados foram tratados pelo método ANOVA, sendo considerado significativo $p < 0,05$ (Snedecor & Cochran, 1989), objetivando identificar se o efeito de pelo menos um fator de interesse (sangria ou ciclo) era significativo ou não. Caso o efeito de um fator fosse significativo, utilizou-se o teste de Duncan (Montgomery, 1991) de comparações múltiplas, para identificar qual ou quais níveis deste fator diferiram dos demais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos seis equinos do experimento foram realizadas quatro sangrias, divididas em quatro ciclos, num total de 96 sangrias, obtendo-se em média 5,127 litros (TAB. 1 e TAB. 3) de plasma/animal/sangria. O volume total acumulado de plasma obtido pela realização do experimento foi de 492,2 litros (TAB. 1 e TAB. 3). Se o experimento tivesse sido feito somente até a segunda sangria, o volume total seria de 242,6 litros (TAB. 3). Isso significa que a utilização da plasmaferese proporcionou um ganho de 103% no volume total de plasma coletado, em relação às duas primeiras sangrias (TAB. 3). Este resultado está de acordo com Vellut & Truchot (1978), que observaram um aumento de 141% no volume de plasma produzido com a implantação da técnica de plasmaferese, no Instituto Mèrieux, França, e com Jones (1977), que também observou um grande aumento no volume de plasma coletado.

Comparando-se o volume total de plasma acumulado do grupo submetido à plasmaferese com o volume acumulado obtido do grupo sangrado conforme protocolo padrão, observa-se que houve um aumento de 102% no volume total de plasma coletado (TAB. 3), já que, o segundo grupo produziu um total de 244,0 litros nos quatro ciclos observados (Tab. 2 e TAB. 3). Os animais do grupo padrão produziram uma média de 5,083 litros de

plasma/animal/sangria (TAB 2 e TAB. 3), não diferindo estatisticamente do grupo tratado.

Os valores encontrados em ambos os grupos, em relação ao volume total de plasma, reforçam a viabilidade deste procedimento que permite a obtenção de grandes quantidades de plasma do mesmo doador, conforme observado por Lundström & Ramgren (1958). Bhardwaj et al. (1977) também obtiveram excelentes resultados com relação ao volume de plasma produzido, trabalhando com 200 equinos submetidos à plasmaferese durante um período de cinco anos.

Um aspecto a ser ressaltado é que aumentando-se a produtividade animal, conseqüentemente pode-se reduzir substancialmente os custos, através da diminuição do número efetivo de equinos doadores, como observado por Baxter et al. (1972), Bhardwaj et al. (1977), Vellut & Truchot (1978).

Além de promover maior eficiência no uso dos animais, ou seja, um aumento quantitativo, essa técnica também permite a produção de plasma de boa qualidade, no que concorda Grifols-Lucas (1952). Esta afirmativa também encontra respaldo no trabalho realizado por Lundström & Ramgren (1958), onde foram utilizados dez doadores hiperimunizados contra *Haemophilus pertussis*, submetidos à plasmaferese semanal e reestimulados a cada quatro semanas. Os referidos autores observaram que todas as amostras de plasma apresentaram títulos satisfatórios, e que os plasmas das últimas sangrias apresentavam títulos inferiores aos primeiros, antes do reestímulo imunológico.

No presente trabalho observou-se um declínio gradativo dos títulos de anticorpos entre as primeiras e quartas sangrias (TAB. 4), resultado que também foi observado por Ugalde (1995). Este declínio deve-se a uma reação fisiológica do organismo que promove um extravasamento de líquidos intersticiais para o sistema circulatório imediatamente após a sangria, numa tentativa de repor a volemia, provocando, assim, uma hemodiluição.

Apesar de observada uma diminuição gradativa da potência do plasma, a mesma situou-se sempre acima do limite mínimo determinado pelo protocolo de produção da Fundação Ezequiel Dias, de 0,5 mg/ml (miligramas/mililitro), para o plasma anticrotálico, mesmo nas terceiras e quartas sangrias (TAB. 4).

Euler et al. (1985) trabalhando com ratos imunizados com hemácias de carneiro, observaram que após a plasmáfereze de 2/3 do plasma total houve uma queda significativa do título de anticorpos, que se recuperava em 48 horas e aumentava em uma semana, sendo que esta recuperação se deve a um mecanismo de "feed-back" que regula a produção de anticorpos de acordo com os níveis circulantes. Isto não pode ser observado neste trabalho, uma vez que, o intervalo entre sangrias era de 24 horas, não havendo, portanto, tempo suficiente para recuperação do título de anticorpos.

Verificou-se neste experimento que após cinco meses de repouso, o título de anticorpos tendeu a cair ao mínimo, atingindo, no entanto, níveis elevados após cada etapa de hiperimunização (TAB. 4). A recuperação da potência do plasma entre a quarta sangria de um ciclo e a primeira do ciclo subsequente (TAB. 4) foi sempre acompanhada da

recuperação da concentração de proteínas totais (TAB. 1), sugerindo que esta se deve às hiperimunizações, como observado por Estrada et al. (1991).

Além de permitir um maior rendimento dos animais, a plasmaferese também proporciona uma melhor preservação do estado clínico dos mesmos, o que foi observado por Gordon (1984), em um experimento realizado com equinos de cinco meses a 28 anos, num total de 176 procedimentos de reinfusão, entre maio de 1983 a outubro de 1984. No presente trabalho, este estado clínico foi monitorado pela avaliação dos parâmetros: percentual de hematócrito, concentração de hemoglobina e proteínas totais, como preconizado por Estrada et al. (1991), que obtiveram variações semelhantes para estes mesmos parâmetros, em um trabalho executado com equinos em Costa Rica.

Em relação ao percentual de hematócrito, os animais apresentaram, com exceção do animal número 313, na segunda sangria do primeiro ciclo, resultados acima de 25% (TAB.1), não tendo sido observado nenhum sinal de depreciação do estado de saúde dos mesmos durante todo o experimento, em concordância com os achados de Vellut & Truchot (1978).

O rendimento médio de 5,127 litros de plasma por sangria, considerado excelente, foi obtido com os animais apresentando uma taxa média de hematócrito entre 30% e 35%, o que confere com os achados de Vellut & Truchot (1978) e Morin et al. (1983).

Numa análise global, constatou-se que as primeiras sangrias sempre apresentaram os maiores valores médios de percentual de hematócrito (Gráf. 1). Estes resultados podem

ser explicados pelo de fato de que nas semanas que se seguem às sangrias de produção, há uma tendência do hematócrito e hemoglobina aumentarem, provavelmente como uma resposta à perda aguda de sangue (Estrada et al., 1991). Entre as demais sangrias, não houve grande diferença, mas é importante ressaltar que a partir do terceiro ciclo, a terceira e quarta sangrias apresentam maiores valores médios do que a segunda, indicando que a plasmaferese tende a proporcionar aos animais maiores percentuais de hematócrito (Gráf. 1).

Assim, pode-se afirmar que a plasmaferese mantém o animal doador em condições clínicas normais, concordando com as observações de Jones (1977), uma vez que, a terceira e quarta sangrias de cada ciclo não diferem significativamente da segunda sangria. É importante salientar que o valor encontrado para a primeira sangria seria maior, independentemente do método utilizado. Além disso, o efeito do fator ciclo não é significativo, mostrando que não há alterações significativas nos percentuais de hematócritos ao longo do período de experimento. A razão pela qual os valores de hematócrito não caem consideravelmente se deve, possivelmente, ao retorno das células, quando os equinos recebem os eritrócitos extraídos no dia anterior (Ugalde, 1995) e possivelmente devido ao reflexo esplênico que faz com que o baço lance grandes quantidades de eritrócitos na circulação em graves hemorragias na maioria das espécies (Jain, 1986). Também Walcott (1945) defende a idéia de que há uma reposição rápida de líquidos e hemácias no sistema circulatório após extensas sangrias.

Quanto à concentração de hemoglobina (Gráf. 2), observou-se que o seu comportamento em função do número de

sangrias é bem semelhante ao comportamento do percentual de hematócritos (Gráf. 1), estando de acordo com os resultados encontrados por Estrada et al. (1991). A terceira e quarta sangria não diferem significativamente da segunda sangria, e a resposta da primeira sangria teria sido maior independentemente do método de coleta. Porém o efeito do fator ciclo é significativo, o que indica que há alterações no percentual de hemoglobina ao longo do experimento.

Entretanto, em nenhuma das amostras a concentração de hemoglobina situou-se abaixo do limite mínimo de 8,0 g/dl (TAB. 1), indicando que não houve uma perda substancial de hemácias durante o período de experimento. Porém, pode-se observar que em 31% das observações houve um aumento acima dos limites normais de 8,0 a 14,0 g/dl (Jain, 1986), sem contudo haver um aumento significativo do hematócrito (TAB. 1). Isto sugere a ocorrência de hemólise provavelmente resultante de uma ação do veneno nos eritrócitos, o que ainda merece maiores estudos.

Em relação às proteínas totais, os resultados mostraram que houve uma pequena tendência de variação ao longo do experimento e uma queda significativa a cada sangria realizada (Gráf. 3), concordando com os achados de Ugalde (1995). O autor observou que as proteínas séricas diminuíram durante o período de sangria, com valores significativamente diferentes entre as amostras do primeiro dia, antes de sangrar os animais e a amostra do quarto dia, um dia após a terceira e última sangria. Esta tendência a diminuir está relacionada a uma redução no nível de anticorpos conforme transcorrem as sangrias.

Por outro lado os resultados encontrados contradizem os achados de Green & Ward (1974). Estes constataram que as proteínas séricas e o equilíbrio eletrolítico mantiveram-se normais do começo ao fim do período de experimento.

O animal número 313 apresentou, normalmente, valores para as taxas de hematócrito, concentrações de hemoglobina e proteínas totais abaixo dos demais animais (TAB. 1). Isto se deve, possivelmente, a uma adaptação do organismo do mesmo em resposta aos sucessivos ciclos de produção, sem a plasmaferese, a que fora submetido antes do experimento. Deve-se salientar que esta adaptação é mediada por um mecanismo de individualidade biológica, variando, assim, entre os animais.

Segundo Friedman et al. (1975) avaliações e comparações de níveis de proteínas totais e imunoglobulinas em doadores de plasmaferese são prejudicadas pelas variáveis inerentes em cada estudo, incluindo o volume de plasma obtido de cada doador, a freqüência de doação, o volume cumulativo de plasma doado e o tempo sobre o qual o volume cumulativo é doado.

Baseado nos resultados relativos aos parâmetros produtivos, hematológicos e bioquímicos verificou-se que a técnica de plasmaferese é viável na produção de plasma hiperimune, anticrotálico.

TABELA 1 - continuação

308	05/06/95	0	0	48	17,17	8,31	0
	26/06/95	1	1	54	20,59	8,84	4,0
	27/06/95	1	2	42	15,93	8,35	4,3
	28/06/95	1	3	32	11,83	7,34	5,1
	29/06/95	1	4	41	15,70	7,30	4,3
	07/08/95	2	1	48	19,76	9,99	4,6
	08/08/95	2	2	46	16,95	8,40	4,6
	09/08/95	2	3	42	17,75	7,48	4,7
	10/08/95	2	4	39	15,27	7,63	4,6
	18/09/95	3	1	51	20,17	10,33	3,8
	19/09/95	3	2	37	12,78	8,27	4,7
	20/09/95	3	3	48	9,72	7,98	4,1
	21/09/95	3	4	39	14,61	7,20	4,7
	30/10/95	4	1	48	17,86	8,69	4,0
	31/10/95	4	2	37	14,47	7,84	4,2
	01/11/95	4	3	43	17,84	7,66	5,0
	02/11/95	4	4	42	16,68	7,97	4,6
Total Média							71,3 4,456
313	05/06/95	0	0	32	9,99	7,68	0
	26/06/95	1	1	33	10,98	9,05	5,5
	27/06/95	1	2	24	8,41	8,06	5,5
	28/06/95	1	3	27	8,99	7,53	5,9
	29/06/95	1	4	27	9,31	7,02	5,5
	07/08/95	2	1	30	12,79	8,78	5,7
	08/08/95	2	2	28	9,88	7,53	5,4

TABELA 1 - continuação

313	09/08/95	2	3	26	10,23	7,27	5,8	
	10/08/95	2	4	29	12,61	6,85	5,5	
	18/09/95	3	1	36	11,65	9,51	5,5	
	19/09/95	3	2	27	9,38	7,75	5,8	
	20/09/95	3	3	29	10,10	7,30	5,5	
	21/09/95	3	4	30	10,62	6,53	5,6	
	30/10/95	4	1	35	12,51	9,66	5,4	
	31/10/95	4	2	26	9,27	8,74	5,8	
	01/11/95	4	3	26	9,26	8,59	6,2	
	02/11/95	4	4	26	8,93	7,73	5,6	
	Total Média							90,2 5,637
	317	05/06/95	0	0	39	11,88	7,46	0
		26/06/95	1	1	43	16,72	9,78	4,6
		27/06/95	1	2	34	12,01	8,22	5,4
28/06/95		1	3	30	10,71	7,53	5,4	
29/06/95		1	4	31	11,39	6,38	4,9	
07/08/95		2	1	40	16,69	8,35	4,9	
08/08/95		2	2	32	11,56	6,77	5,1	
09/08/95		2	3	34	15,07	7,03	5,7	
10/08/95		2	4	33	12,85	6,19	5,1	
18/09/95		3	1	40	13,62	8,16	4,6	
19/09/95		3	2	30	9,93	7,02	5,0	
20/09/95		3	3	36	12,16	7,23	4,9	
21/09/95		3	4	33	11,87	8,77	5,0	
30/10/95		4	1	41	15,03	9,80	5,5	
31/10/95		4	2	25	9,01	8,08	5,8	
01/11/95		4	3	31	17,71	7,51	5,4	

TABELA 1 - continuação

317	02/11/95	4	4	30	10,72	7,53	5,5
Total Média							82,8 5,175
332	05/06/95	0	0	40	12,58	8,34	0
	26/06/95	1	1	38	14,02	9,59	4,1
	27/06/95	1	2	32	11,05	9,73	5,0
	28/06/95	1	3	33	11,46	8,46	5,1
	29/06/95	1	4	34	11,96	7,68	5,0
	07/08/95	2	1	37	14,96	8,87	5,1
	08/08/95	2	2	32	11,14	8,63	5,5
	09/08/95	2	3	32	12,24	8,41	5,0
	10/08/95	2	4	32	13,17	7,80	5,6
	18/09/95	3	1	40	12,51	9,99	5,0
	19/09/95	3	2	34	11,64	8,66	5,4
	20/09/95	3	3	32	10,59	7,96	5,2
	21/09/95	3	4	33	10,86	6,37	5,2
	30/10/95	4	1	43	15,31	9,78	4,8
	31/10/95	4	2	32	12,14	8,47	5,3
	01/11/95	4	3	38	13,46	8,19	5,0
	02/11/95	4	4	36	12,75	7,75	4,8
Total Média							81,1 5,068
334	05/06/95	0	0	32	10,73	7,59	0
	26/06/95	1	1	35	12,21	8,54	3,9

TABELA 1 continuação

334	27/06/95	1	2	25	8,31	7,36	5,9
	28/06/95	1	3	25	8,35	6,81	5,7
	29/06/95	1	4	29	11,18	6,26	5,0
	07/08/95	2	1	37	11,20	8,80	5,4
	08/08/95	2	2	36	12,75	7,75	5,7
	09/08/95	2	3	34	13,89	7,80	5,2
	10/08/95	2	4	32	13,41	6,45	4,8
	18/09/95	3	1	37	13,20	8,92	5,4
	19/09/95	3	2	27	9,62	7,54	5,5
	20/09/95	3	3	30	12,02	7,28	5,5
	21/09/95	3	4	34	12,56	8,29	5,6
	30/10/95	4	1	36	13,04	8,40	5,5
	31/10/95	4	2	29	11,12	7,59	5,5
	01/11/95	4	3	28	10,54	7,30	6,2
	02/11/95	4	4	30	10,54	6,89	5,7
Total Média							86,5 5,406
Total geral Média geral							492,2 5,127

TABELA 2: Valores dos volumes de plasma coletados de seis equinos hiperimunizados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, submetidos a duas sangrias sem plasmaferese, por quatro ciclos:

Animal	Data	Ciclo	Sangria	Volume de plasma (litro)	
305	27/06/95	1	1	3,9	
	29/06/95	1	2	5,4	
	08/08/95	2	1	5,2	
	10/08/95	2	2	5,3	
	19/09/95	3	1	5,1	
	21/09/95	3	2	5,3	
	31/10/95	4	1	5,4	
	02/11/95	4	2	4,9	
	Total				40,5
	Média				5,062
309	27/06/95	1	1	4,1	
	29/06/95	1	2	4,7	
	08/08/95	2	1	4,9	
	10/08/95	2	2	5,2	
	19/09/95	3	1	4,9	
	21/09/95	3	2	5,1	
	31/10/95	4	1	4,9	
	02/11/95	4	2	5,0	
	Total				38,8
	Média				4,850

TABELA 2 - continuação

312	27/06/95	1	1	4,6
	29/06/95	1	2	6,0
	08/08/95	2	1	4,5
	10/08/95	2	2	5,1
	19/09/95	3	1	4,8
	21/09/95	3	2	4,7
	31/10/95	4	1	4,4
	02/11/95	4	2	4,8
Total Média				38,9 4,862
316	27/06/95	1	1	4,0
	29/06/95	1	2	6,2
	08/08/95	2	1	4,8
	10/08/95	2	2	5,4
	19/09/95	3	1	4,8
	21/09/95	3	2	5,4
	31/10/95	4	1	5,1
	02/11/95	4	2	5,7
Total Média				41,4 5,175
319	27/06/95	1	1	4,6
	29/06/95	1	2	5,9
	08/08/95	2	1	5,1
	10/08/95	2	2	5,3
	19/09/95	3	1	5,0

TABELA 2 - continuação

319	21/09/95	3	2	5,5	
	31/10/95	4	1	5,4	
	02/11/95	4	2	5,1	
Total Média				41,9 5,112	
345	27/06/95	1	1	4,9	
	29/06/95	1	2	4,9	
	08/08/95	2	1	5,3	
	10/08/95	2	2	5,7	
	19/09/95	3	1	4,7	
	21/09/95	3	2	5,7	
	31/10/95	4	1	5,5	
	02/11/95	4	2	5,8	
	Total Média				42,5 5,312
	Total geral Média geral				244,0 5,083

TABELA 3: Valores comparativos dos volumes de plasma, em litros, coletados de seis equinos hiperimunizados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, submetidos a quatro sangrias com plasmaferese e de seis equinos submetidos a duas sangrias sem plasmaferese, por quatro ciclos.

GRUPO	SANGRIAS		MÉDIA	TOTAL PRODUZIDO	GANHO %	
	1 ^a e 2 ^a	3 ^a e 4 ^a			TRATAD O	PADRÃO
Tratado	242,6	249,6	5,127	492,2	103	102
Padrão	244,0	---	5,083	244,0	---	---

TABELA 4- Potência dos pools de plasma de seis equinos hiperimunizados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, em miligrama/mililitro (mg/ml), submetidos a quatro sangrias com plasmaferese, por quatro ciclos.

Ciclo	Sangria	Potência (mg/ml)
0	0	0,11
1	1-2-3-4	1,26
2	1	2,58
2	2	1,91
2	3	1,39
2	4	0,95
3	1	2,75
3	2	2,45
3	3	1,23
3	4	1,17
4	1	1,88
4	2	1,38
4	3	0,91
4	4	0,89

Gráfico 1: Sequência dos percentuais médios das taxas de hematócrito de seis equinos hiperimunizados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, submetidos a quatro sangrias com plasmaferese, por quatro ciclos.

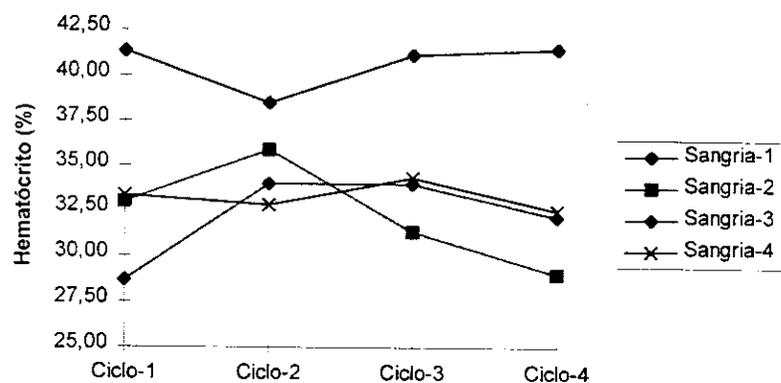


Gráfico 2: Sequência dos percentuais médios das concentrações de hemoglobina de seis equinos hiperimunizados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, submetidos a quatro sangrias com plasmaferese, por quatro ciclos.

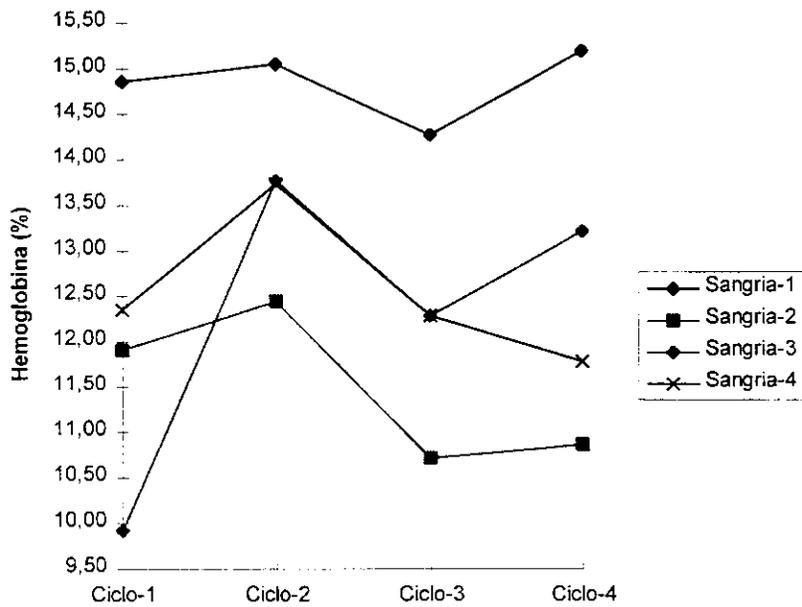
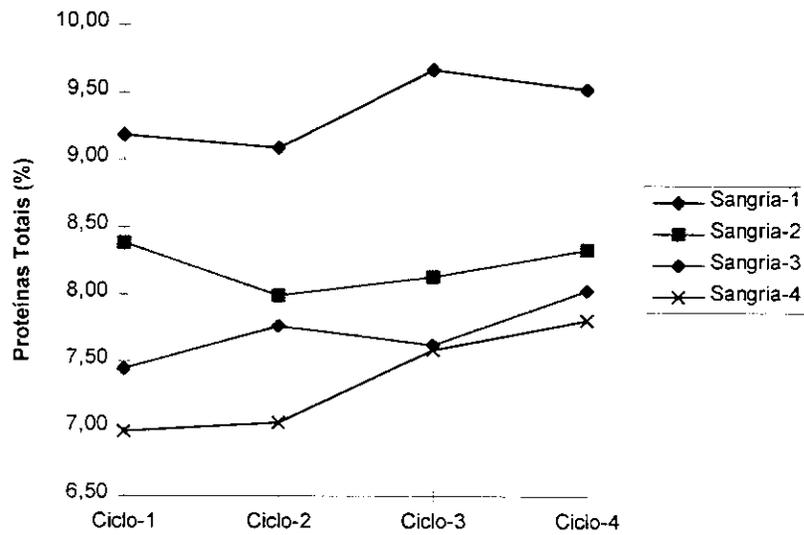


Gráfico 3: Sequência dos percentuais médios das concentrações de proteínas totais de seis equinos hiperimunizados com veneno de *Crotalus durissus terrificus*, submetidos a quatro sangrias com plasmaferese, por quatro ciclos.



5 CONCLUSÃO

A utilização da técnica de plasmaferese na produção de plasma hiperimune, anticrotálico, é viável, uma vez que, permite aumentar o volume coletado de cada equino doador, com potência satisfatória, através de maior número de sangrias em intervalo de tempo reduzido, mantendo-o em condições clínicas normais.

6 SUMMARY

Six equine were hyperimmunized with *Crotalus durissus Terrificus* venom for four consecutive cycles. At the end of each cycle the horses were individually bled for four consecutive days and seven litres of blood was collected in each bleeding. A total of 28 litres of blood was obtained from each horse at the end of each bleeding procedure. The potency of plasma declined throughout the bleedings but maintained an antibodies titre well above the minimal required. The plasmapheresis technique used in this equines for the production of anticrotalic antivenom sera yielded an increase of 102% in the volume of hyperimmune plasma produced in comparison to the volume obtained by the standard method of only two bleedings without reinfusion of erythrocytes in the donor horse. The technique allowed the collection of larger volumes of plasma without interfering significantly in the clinical status of the animals. The results show that plasmapheresis procedure used is highly recommendable for the production of hyperimmune serum.

Key-words: plasmapheresis, equines, hyperimmune plasma, clinic status.

2
1

2
1



7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAXTER, E.H.; WALDEN, B.; MARR, A.G. Intensive repeated plasmapheresis for maximum yields of antibodies from a sheep immunized with a valuable antigen. **Laboratory Animal Science**. v. 22, n. 1, p. 109-111, 1972.
- BHARDWAJ, K.R.; SAHAI, G.; THOMAS, A.K. Plasmapheresis in hyperimmunized horses-Technique and observations. **Indian J. Med. Res.** v. 65, n. 2, p. 260-265, 1977.
- ESTRADA, R.; ROBLES, A; ALVARADO, J.; ROJAS, E. et al. Development of antibody response and clinical and hematological alterations in horses immunized with snake venoms for the production of antivenom in Costa Rica. **Mem. Inst. Butantan**. v. 53, n.2, p. 181-190, 1991.
- EULER, H.H.; KREY, U.; SHRÖDER, O.; LÖFFLER, H. Membrane plasmapheresis technique in rats. Confirmation of antibody rebound. **J. Immunol. Methods**. v. 84, p. 313-319, 1985.
- EUROPEAN PHARMACOPEIA. 2nd edn. Maisonneuve S A, Sainte-Ruffine, France. Part II, n. 4, p. 145.1 - 145.3 (European Treaty Series, 50), 1982.

FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.S.; MAGALHÃES, L.M.
Patologia Clínica Veterinária. Segunda edição. Belo Horizonte, Rabelo e Brasil, 1978, 279 p.

FRIEDMAN, B.A.; SCHORK, M.A.; MOCNIAK, J.L.; OBERMAN, H.A. Short-term and long-term effects of plasmapheresis on serum proteins and immunoglobulins. **Transfusion**. v. 15, n. 5, p. 467-472, 1975.

GORDON, B.B. Hemapheresis in the horse. **AAEP Proc.** V. 30, p. 87-97, 1984.

GREEN, E.M. & WARD, G.M. A simple method for repeated plasmapheresis of the horse. **Laboratory Animal Science**. v. 24, n. 6, p. 948-951, 1974.

GRIFOLDS-LUCAS, J.A. Use of plasmapheresis in blood donors. **British Med. J.** n. 19, p. 854, 1952

JAIN, N.C. Schalm's Veterinary Hematology. Fourth edition. Lea & Febiger, Philadelphia, 1986, 1221 p.

JONES, J.V. Plasmapheresis: Great Economy In The Use of Horses. **The New England Journal of Medicine**. v. 297, n.21, p. 1173 - 1175, 1977.

LUNDSTRÖM, R. & RAMGREN, O. Plasmapheresis in the preparation of hyperimmune serum. **The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**. v. 10, n. 2, p. 119-121, 1958.

MONGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments. Third edition. John Wiley and sons. New York, 1991.

- MORIN, M.L.; STUART, L.D.; POOLE, J.E. Automated plasmapheresis for the horse, burro, sheep, and goat. **Plasma Ther Transfus. Technol.** v. 4, n.1, p. 47-50, 1983.
- REIS, J.K.P. & LEITE, R.C. An Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Test For The Diagnosis Of Equine Infectious Anemia In Brazil. **Prev. Vet. Med.** v. 20, p.261 - 267, 1994.
- SNEDECOR, G.M.; COCHRAN, W.G. *Statistical methods.* 8 ed., Ames, The Iowa State University Press, 1989, 580 p.
- UGALDE, Y. A. Alteraciones fisiopatológicas y desarrollo de la respuesta humoral en equinos inmunizados con veneno de serpiente para la producción de suero antiofídico. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica, 1995, 102 p (Tese, maestrado).
- VELLUT, G. & TRUCHOT, H. L' animal donneur de serum: interet de la plasmapherese. In: Congrès International L'Animal de laboratoire au Service de L'Homme, 1978, Lyon. Anais... Lyon: 1978, p.375-384.
- WALCOTT, W.W. Blood volume in experimental hemorrhagic shock. **Am. J. Physiol.** v. 143, p. 247-253, 1945.
-