ANALISE DA CROTAMINA NO VENENO INDIVIDUAL DE CASCA-VÉIS RECEBIDAS PELO INSTITUTO BUTANTAN (**)

S. Schenberg. *

Laboratório de Fisiologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

A constatação da existência das variedades crotamino-positiva e crotaminonegativa de Crotalus durissus terrificus (1, 2, 3, 4, 6) tornou necessária a verificação da concentração dessa toxina nos venenos crotálicos empregados para a preparação de sôro anticrotálico.

A crotamina sendo tóxica e só sendo secretada por certos espécimens crotálicos, pode condicionar a gravidade do acidente crotálico e sua terapêutica à variedade de cascavel comprometida no acidente. O sôro anticrotálico, por sua vez, deve ser rico em anticorpos específicos para a crotamina, uma vez que, nos acidentes por cascavéis crotamino-secretoras, a alta concentração dessa toxina requer quantidade maior de anticorpos anticrotamina, e um sôro com tais características deve ser preparado a partir de venenos contendo alta concentração dessa toxina. Este problema é de interêsse para o Instituto Butantan, e a determinação da concentração de crotamina de seu "pool" de veneno crotálico, constitui o motivo principal do presente trabalho.

A avaliação aproximada da concentração de crotamina de um "pool" de veneno crotálico pode ser obtida, conhecendo-se a proporção de cascavéis croatmino-positivas que contribuiram para a formação do referido "pool". Este será tanto mais rico em crotamina quanto maior fôr a percentagem de veneno proveniente da variedade crotamino-secretora. Morfològicamente ainda não é possível distinguir estas duas formas biológicas. Métodos bioquímicos e farmacológicos têm que ser empregados para a discriminação dessas duas variedades, o que constitui dificuldade para a sua diferenciação. Outro fator que se acrescenta às dificuldades do processo de discriminação destas duas formas biológicas é o hibridismo em que elas se encontram na natureza. São

^{*} Bolsista do C. N. Pesq.

Trabalho realizado com auxílio do F. P. I. B. Desejo agradecer os auxílios técnicos prestados por Cavalheiro, D. e Mendes da Silva, U.

extensas as regiões onde se encontram as duas variedades. Neste caso, o ensaio do veneno de uma cascavel não determina a variedade a que pertençam as demais componentes do grupo, pois no mesmo poderão estar presentes espécimens das duas formas biológicas. O ensaio torna-se dispensável, quando a cascavel se origina da região crotamínica (4).

A demonstração anteriormente feita, de que a crotamina, em tôdas as extrações de uma mesma cascavel, ou sempre estará presente ou nunca será encontrada, facilita o estudo de "pools" de venenos crotálicos (4). O ensaio de uma única extração classifica uma cascavel; e o veneno de um mesmo espécimen será sempre ou crotamínico ou não crotamínico, mantendo constante a proporção com que cada variedade contribuirá para formar o "pool".

Material acumulado em trabalho anterior (4) foi utilizado para o estudo da composição do "pool" de veneno erotálico do Butantan. Procurou-se organizar, de modo sistematizado, em tabelas e mapa, os dados anteriormente colhidos, tendo-se em vista facilitar futuras investigações nos vários setores da ofiologia e do envenenamento crotálico.

O presente trabalho resulta do estudo individual do veneno de 531 cascavéis, colhidas ao acaso, em tôdas as estações do ano. Diminuiram-se assim, possíveis influências externas sôbre a secreção da peçonha. O número de serpentes utilizadas é significativo e pode-se considerá-lo como uma amostra representativa do total de cascavéis recebidas pelo Instituto Butantan, cujas extrações fornecem o veneno que constitui o "pool" crotálico, habitualmente empregado para fins experimentais e industriais. Considerando-se que normalmente a proporção de cascavéis enviadas ao Butantan, pelas diferentes regiões, mantem-se constante, deve-se admitir que a concentração de crotamina dêsse "pool" permanece pràticamente inalterada, por longos intervalos de tempo, uma vez que estas duas variedades crotálicas obedecem a uma distribuição geográfica.

PARTE EXPERIMENTAL

Venenos, extraídos individualmente, foram secados no vácuo, em temperatura ambiente. Para cada ensaio empregaram-se dois camundongos, que foram injetados por via subcutânea com 0,5 de veneno sêco, dissolvido em 1 ml de salina. Considerou-se como positivo o aparecimento de paralisia nas patas posteriores dos dois animais nos primeiros 30 minutos subseqüentes à injeção do veneno. O ensaio foi repetido sempre que a paralisia não se manifestava nitidamente em um dos camundongos.

Os dados das observações foram registrados em mapa geográfico. As características do veneno individual foram assinaladas, provisòriamente, na cidade de origem da cascavel, correspondente ao local de sua captura. Poste-

riormente, a cidade foi confirmada pela verificação da residência do remetente e pela estrada de ferro pela qual fôra transportada a cascavel.

RESULTADOS

As 531 cascavéis, cujos venenos individuais foram estudados, em sua maior parte provinham dos estados de São Paulo (437), Minas Gerais (54) e Paraná (28). Também foram examinados venenos de 12 exemplares de: Mato Grosso (5), Bahia (3), Ceará (3) e Pará (1). Últimamente recebemos 16 cascavéis da Ilha de Marajó, o veneno das quais foi investigado em conjunto e não individualmente, razão pela qual não foram incluidas entre as demais 531. Nos ensaios do veneno dessas 16 cascavéis empregou-se a dose de 2 mg de veneno para cada camundongo, dose esta quatro vêzes superior à empregada nos ensaios habituais, mesmo assim, não foi possível obter-se ensaios positivos. Estas cascavéis possuem características morfológicas que as diferenciam das demais cascavéis encontradas no estado do Pará e parecem constituir uma nova subespécie.

Uma apreciação, em conjunto, da distribuição das cascavéis crotaminosecretoras no Brasil, parece indicar que sua freqüência é maior nos estados do Sul. Essa constatação baseia-se nos poucos exemplares examinados no presente trabalho, como também em publicação de vários pesquizadores (1, 2, 3, 4, 5, 6). Nos estados situados acima de São Paulo e a seu oeste, diminui a freqüência com que são encontradas cascavéis crotamino-positivas, sendo mesmo possível que nestes estados venha a ser delimitada uma região não-crotamínica.

Foram analisados venenos de 3 cascavéis do Ceará. O veneno de duas delas mostrou conter crotamina em apenas algumas de suas extrações. Moura Gonçalves (comunicação pessoal) demonstrou, por eletroforese em papel, a presença de crotamina em tôdas as extrações destas duas cascavéis. Aumentando a dose de veneno de 0,5 para 1 mg, Moura Gonçalves verificou que os ensaios das extrações, anteriormente negativos em camundongos, tornavam-se positivos. Este fato parece provar que também nos estados do Norte é possível detectar-se crotamina nos venenos de suas cascavéis, mas que a concentração da toxina nêsses venenos é menor que a encontrada nos venenos do Sul. Deve-se pois relegar o conceito anterior de que o veneno crotálico do Norte brasileiro pertence ao tipo não-crotamínico.

As Tabelas I, II e III e o mapa da fig. 1, demonstram com maiores minúcias, a distribuição das variedades crotamínica, não-crotamínica e cascavéis que secretam veneno amarelo, nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná.

Em São Paulo, predominam as cascavéis de veneno branco. Apenas 3,89% das 437 cascavéis observadas secretavam veneno amarelo (círculos brancos do mapa). Quanto às cascavéis crotamínicas (círculos prêtos do mapa), é em São Paulo onde se encontra sua maior concentração, tanto que, 64,98% das 437 eram crotamino-positivas. Éste fato é de grande importância na composição do "pool" de veneno crotálico do Butantan. Considerando-se que a quase totalidade das cascavéis extraídas no Butantan provêm de São Paulo, tem-se uma explicação para a elevada concentração de crotamina nêsse "pool". Em São Paulo foi possível delimitar a região crotamínica, na qual só podem ser encontradas cascavéis crotamino-positivas. Esta região acha-se a oeste do

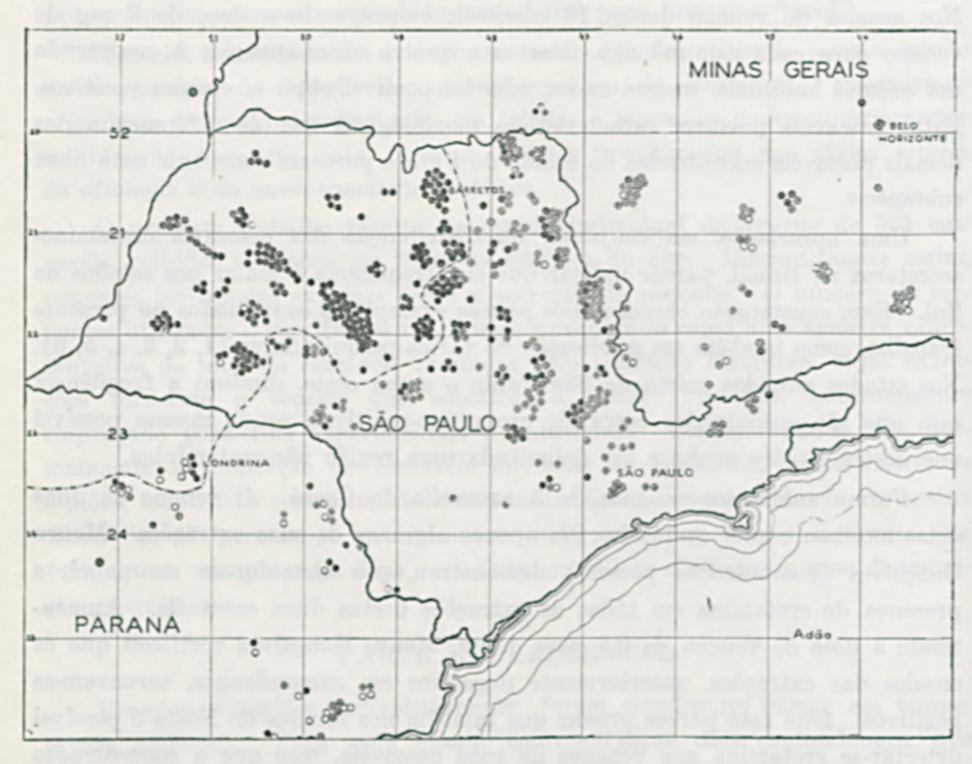


Fig. 1 — Distribuição geográfica de cascavéis Crotamino-positivas (círculos prêtos), Crotamino-negativas (círculos eruzados) e cascavéis que secretam veneno amarelo (círculos brancos) em estados do Sul.

Estado, e no mapa é delimitada por uma linha pontilhada. A distribuição dessas duas variedades crotálicas nos estados do Sul é predominantemente mista. Em uma mesma localidade podem ser encontrados os dois tipos de veneno, crotamínico e não-crotamínico, constituindo formas híbridas. Apenas

TABELA I — CASCAVÉIS DE SÃO PAULO

CIDADES	Cascavéis N.º	Crotamina		Côr do veneno	
		Pos.	Neg.	Branco	Amarelo
Agua Vermelha	2	1	1	2	-
	4	4	_	4	-
	1	-	1	1	100
Agudos	2	2	_	2	-
Altair	13	5	8	13	la serie
Altinópolis	1	_	1	1	and the last
Amparo	3	3	_	3	
Andradina	0	2	_	2	-
Anhangaí	10	10	_	10	-
Araçatuba	10	10		1	-
Araraquara	1	1	1	i	-
Arcadas	1	1	1	-	1
Aracanguá	1	1	0	9	-
Atibaia	2	-	2	9	and I
Avaf	2	1	1	1	
Avanhandava	1	1		10	
Bariri	10	10		10	1
Barretos	8	8		0	
Bastos União	1	1	_	1	
Bauru	1	1	_	1	September 1
Bebedouro	3	3	_	3	1
Bento Quirino	1	-6	1	-	1
Bernardino de Campos	1	-	1	1	100000
Bôa Esperança do Sul	3	3	_	3	A POST TOLI
Bôa Sorte	2	-	2	2	NAME OF TAXABLE
Bocaina		1	-	1	
Bragança Paulista	2	-	2	2	A STATE OF
Brauna		3	-	3	100000
Brigadeiro Tobias		1	-	1	Contract of the last
Brotas	1	-	1	1	The second second
Cabrália Paulista	1	-	1	1	100
Cafelándia	3	3	-	3	O Istal
	4	4	-	4	
Cambaratiba	10	7	3	10	North Total
Campinas		-	1	1	100
Campo Limpo		-	1	1	A committee
Candiá	3	3	-	3	-
Castilho		-	2	2	-
Chapadão		8		8	III ordi
Colina		_	3	3	-
Comendador Guimarães	(3	3	_	3	111-0
Coroados		3	2	5	and the second
Coronel Leite		3	11	14	-
Coronel Quito		0	2	2	_
Corumbatai	2	1	-	1	_
Cruzeiro	1	9		2	_
Domingos Vilela	2	2	1	1	_
Engenheiro Hermilo	1		1	i	-
Faz. Sta. Albertina	1	-	1	1	
Faz. S. João da Colina	1	1		1	
Faz. S. Joaquim		1		1	
Fernão Dias		1	-	1	
Ferraz		-	1	1	

^{*}Cidade situada na região erotaminica.

TABELA I - CASCAVÉIS DE SÃO PAULO

(continuação)

CIDADES	Cascavéis N.º	Crotamina		Côr do veneno	
		Pos.	Neg.	Branco	Amare
* Guaimbé	1	1		1	
* Guarantã	5	5		1	
* Guararapes	3	2	The second	9	
Ibaté	1	1		3	
Itacaré	1	1		1	-
Itaiguara	1		1	1	
Itapé	2		1	1	-
Itanina	3	_	3	3	
Itápolis	3	2	1	3	
	1	1	-	1	-
	1	-	. 1	1	-
Ituverava	2	1	1	1	1
Jadas	1	1	-	1	
Jaboticabal	6	6	_	6	
Jaies	2	2	-	2	_
Jardinópolis	5		5	5	
Jaú	3	3		3	-
Java	3	2	1	3	
Laranja Doce	1	1		1	
Laranjal Paulista	7	4	3	7	
Lençois Paulista	3		3	2	
Lins	. 0	9	0	0	-
Lorena	9	0	0	8	1
Louveiras	ĩ		1	2	-
Machado de Melo	6	6	1	1	-
Maracanã	1	0	-	0	-
Marilia	-	0	1	1	-
Matão	0	2	3	5	-
Mirandópolis	9	3	1	3	1
11	0	3	_	3	-
Mori des Cruses	2	-	2	2	-
Mogi das Cruzes	1	-	1	1	-
Mogi Guaçu	1	1		1	
Monjolinho	1	1	-	1	
Monlevade	2	2	-	2	-
Monte Aprazível	4	4	-	4	-
Morro Agudo	1	1	-	1	11
Muritinga	2	2	-	2	-
Nova Europa	3	3	-	3	1000
Novo Horizonte	3	3	-	2	1
Orlândia	1	-	1	1	-
Osvaldo Cruz	2	2	-	2	
Ourinhos	6	1	5	5	1
Paraíso	1	-	1	1	-
Parapuã	1	1	_	1	
Parnafba	1	1		1	-
Passagem	1	_	1	1	
Pederneiras	1	1	_	i	
Pedregulho	4	_	4	4	
Pedreira	5		5	2	
Perus	1	L. Links	1	1	
Pinhal.	2	9	1	1	-
Piracicaba	13	5	0	10	1
	10	0	8	12	1

TABELA I — CASCAVÉIS DE SÃO PAULO

(continuação)

CIDADES	Cascavéis	Crotamina		Côr do veneno	
	N.º	Pos.	Neg.	Branco	Amarelo
The state of	14	14		14	
Pirajuí		2	1	3	-
Pompeia	1	_	1	1	
Pôrto Feliz Presidente Alves	3	3		3	
Presidente Aives	1	1	_	1	-
Presidente Epitácio	14	14	_	14	-
Quatá	1	1	_	1	-
Rancharia	2	2	-	1	1
Rancho Carioca	2	1	1	1	1
Ribeira	1		1	-	1
Ribeirão Prêto	2	2	1	1	-
	1	1	_		1
Rio Claro	1	1	-	1	_
Rio das Pedras	2	-	2	2	-
Rubiácea	1	1	-	1	-
Sampaio Moreira	5	1	4	5	-
Santa Adélia	8	8	-	8	-
Sta. Cruz do Rio Pardo	4	1	3	4	-
San Martín	2	2	-	2	
Santana do Parnaíba	1	1	_	1	-
Santo Anastácio	9	9	-	9	
S. Carlos	4	3	1	4	-
S. Joaquim.		-	1	1	
S. Joaquim da Barra	3	1	2	3	1
S. João da Bôa Vista	2	1	1	2	-
* S. José do Rio Prêto	1	1		1	1700
S. José do Rio Pardo	9	2	7	9	-
S. Pedro		3	2	5	The last
Sarapui	1		1	1	100
Serra Azul	1		1	1	DOT TO
Sertãozinho	2	2	-	2	444
Silvânia	- 2	1	2	3	
Suzano	4	-	1	1	ALC: NO
* Taiúva		1	-	1	
* Taquaritinga	1	1	-	1	
Taubaté		_	2	_	2
Toriba		4	-	4	-
Trabiju		-	1	_	1
* Tupā		5	_	5	
* Universo		2		2	
* Urania	2	2	_	2	1
Vargem	1	_	1	10	1
Vargem Grande do Sul		2	8	10	
Venerando	1	1		1	
Total	. 437	284	153	420	17
		64,98%	35,01%	96,10%	3,899

^{*}Cidade situada na região crotaminica.

na região crotamínica se encontra uma dessas variedades sob forma genèticamente pura. Não foi possível delimitar uma região não crotamínica nos estados examinados. Sua demonstração, baseada no estudo individual de venenos, ainda não foi descrita.

No mapa da fig 1 e na Tabela II, pode ser observado que em Minas Gerais, um dos três estados estudados com maior minúcia, predominam as cascavéis

TABELA II - CASCAVÉIS DE MINAS GERAIS

CIDADES	Cascavéis N.º	Crotamina		Côr do veneno	
		Pos.	Neg	Branco	Amarelo
Brasópolis	1		1	1	Tab all
Campanha	1	-	1	1	_
Campo Belo	3	-	3	2	1
Carmo de Minas	2	1	1		2
Caxambú	2	2	-	2	10 40
Congo Fino	3	_	3	1	2
Conselheiro Lafaiete	1	-	1	1	-
Lima Duarte	1	07	1	-	1
Guaxima	3	1	2	3	DOM: LO
Jacutinga	-1	_	1	_ mi	1
Oliveira	5	3	2	5	1
Orvalho	6	-	6	5	1
Passos	12	2	10	11	1
Pedralva	1	-	1	10 10	1
Pedro Leopoldo	1	1	-	- 1	
Perdões	2	1	1	-	2
Poços de Caldas	1	1	1	1	1
S. Sebastião do Rio Verde	1		1	1	1220
Três Corações	2	1	1	2	The state of
Uberlândia	3	-	3	2	1
Vermelho Velho	2	2	-	2	Tarrett.
Total	54	14	40	41	13
Percentagem	22	25,92%	74,07%	75,92%	24,07%

erotamino-negativas (círculos cruzados do mapa): 74,07% das 54 cascavéis examinadas, pertenciam a esta variedade. Todavia, em Minas Gerais, a percentagem (25,92%) da variedade crotamino-positiva ainda é grande, e os dois tipos de veneno têm uma distribuição difusa. Pode-se encontrar cascavéis crotamino-secretoras em tôda a área daquêle Estado incluida na presente investigação.

Os espécimens analisados do Paraná (Tabela III), mostram que é no mesmo que se encontra a maior concentração de cascavéis com veneno amarelo. Das 28 cascavéis dessa proveniência, 67,85%, secretavam veneno amarelo e 50% eram crotamino-positivas. No mapa da fig. 1 é possível verificar uma área entre os estados de São Paulo e Paraná, da qual não foram examinadas cascavéis. Alguns exemplares provenientes de uma região situada logo abaixo, a noroeste do Paraná, secretavam venenos crotamínicos amarelos. Apesar da

TABELA III - CASCAVÉIS DO PARANÁ

CIDADES	Cascavéis N.º	Crotamina		Côr do veneno	
		Pos.	Neg.	Branco	Amarelo
Apucarana	1	ma-sa d	1	-	1
Campo Mourão	1	1	-	1	
Curitiba	2	-	2	-	2
Euzebio de Oliveira	1	Dine of	1	-	1
Ibaité	1		1	To Take	1
Jaguariaiva	1	_	1	1	_
João Eugênio	4	1	3	1	3
Londrina	3	3	-	1	2
Mafra	2	1	1	_	2
Mandaguari	1	1	00110-071	1	-
Maringá	3	2	1	-	3
Nova Restinga	1	_	1	1	-
Palmeiras	1	1	-	-	1
Ponta Grossa	1	1	-	-	1
Quatinguá	1	1	-	1	
Rolândia	1	1	-	-	1
Sanges	1	1	-	1	
S. José da Boa Vista	2		2	1	1
Total	28	14	14	9	19
Percentagem	had a roll	50%	50%	32,14%	67,85%

^{*}Cidade situada na região crotamínica.

falta de continuidade, parece que a região crotamínica, partindo de São Paulo, continua-se no noroeste do Paraná, razão por que esta pequena área também se acha delimitada dentro da região crotamínica. Nesta pequena parte da região crotamínica, ao veneno crotamínico, branco, junta-se o componente amarelo. No estado do Paraná, tanto os venenos crotamínicos como os venenos amarelos, têm uma distribuição mista. As cascavéis dêsse Estado apresentam um hibridismo quadruplo. Aí são encontrados espécimens com veneno crotamínico amarelo ou branco ou também cascavéis secretando veneno não-crota-

mínico, branco e amarelo. Estas variedades podem tôdas ser encontradas em uma pequena área, convivendo hibridamente.

Estes dados parecem indicar não existir relação entre a secreção de crotamina e a côr amarela do veneno. Geralmente, êstes dois componentes do veneno crotálico têm distribuição geográfica independente, mas, quando uma região de veneno crotamínico branco acha-se próxima de outra de veneno amarelo pode haver superposição delas e o veneno crotamínico é, então, acrescido de mais um componente, tornando-se amarelo.

A delimitação da região crotamínica parece ser bem precisa, e dois fatos ocorridos na execução do presente trabalho servem para demonstrar a precisão de seus limites. Esta região já estava pràticamente delimitada, quando foram examinados venenos de cascavéis originárias de Silvânia e Paraíso. Alguns dêsses animais eram crotamino-negativos e, procurando-se localizar estas duas cidades no mapa que vinha sendo empregado até então, verificou-se que as mesmas situavam-se na região crotamínica. Tal localização viria invalidar a existência da região em aprêço. No trabalho rotineiro de confirmação da origem das cascavéis, verificou-se, contudo, tanto com referência à estrada de ferro pela qual elas foram transportadas como pela localização da residência dos remetentes, que estas duas cidades não poderiam se situar na região crotamínica. Procurando-se então, em mapa maior e mais minucioso do Instituto Geográfico, foi possível encontrar uma cidade (Silvânia) e uma estação de estrada de ferro (Paraíso), que correspondiam às localidades de captura das cascavéis em questão. Estas duas localidades encontram-se fora da região crotamínica, na região híbrida, justificando a dualidade dos venenos nelas encontrados. A composição do veneno permitiu, assim, constatar a existência de duas localidades homônimas no estado de São Paulo. Nas Tabelas I e III, as cidades situadas na região crotamínica foram assinaladas com um asterisco. O. Vital Brazil (5) estudou, recentemente, venenos individuais de várias proveniências; seus resultados concordam com os que aqui apresentamos. Naquele artigo, tôdas as cascavéis estudadas, provenientes da região crotamínica, pertenciam à variedade crotamino-positiva. Algumas das cidades referidas encontram-se assinaladas com um asterisco na Tabela I.

Os dados da Tabela IV fornecem as percentagens das três variedades crotálicas da amostra estudada, que em última análise representam o "pool" de veneno crotálico do Butantan.

Estes dados mostram que o "pool" é essencialmente composto de veneno branco (90,01% das cascavéis da amostra secretavam veneno branco). Sua concentração em crotamina é elevada, pois 59,32% das cascavéis que contribuem para sua formação, são crotamino-positivas. Deve-se admitir pequenas oscilações nessa percentagem, mas a mesma deve variar entre 50 e 60%, indicando que pelo menos metade das cascavéis extraídas no Butantan secretam veneno

crotamínico. Estes dados justificam plenamente o alto gráu de neutralização das ações crotamínicas, pelo sôro anticrotálico do Instituto Butantan.

TABELA IV — Análise do "pool" de veneno crotálico do Instituto Butantan

ESTADOS	Cascavéis N.º	Crotamina		Côr do veneno	
		Pos.	Neg.	Branco	Amarelo
São Paulo	437	284 *200	153	420	17
Minas Gerais	54	14	40	41	13
Paraná	28	14 *4	14	9	19
Vários Estados	12	3	9	8	4
Total	531	315	216	478	53
Percentagens	-	59,32%	40,67%	90,01%	9,98%

^{*}Total de cidades por estado situadas na região crotamínica.

Experimentalmente, o veneno do "pool" crotálico do Butantan tem suas ações crotamínicas e tóxicas neutralizadas em correspondência com a titulagem do sôro. Um veneno de "pool" de cascavéis crotamino-positivas, requer uma maior quantidade de sôro que aquela correspondente à sua titulagem, mesmo assim, obtem-se neutralização total do veneno dêsse "pool" específico, aumentando-se de pouco a quantidade de sôro que seria necessário para neutralizar o mesmo pêso de um veneno do "pool" não específico.

DISCUSSÃO

Os resultados já acumulados, constituem material abundante para substanciar a existência das variedades crotamino-positiva e negativa de Crotalus durissus terrificus. Outros dados que envolvem diretamente a secreção de crotamina, como também do estado em que ela é encontrada no veneno, ainda não estão bem esclarecidos.

A neutralização das ações paralisantes e tóxicas da crotamina dos venenos crotálicos pelo sôro anticrotálico, demonstra que o componente crotamínico tem propriedades imunogênicas.

Não nos foi possível, entretanto, verificar diferenças de composição entre venenos crotamínicos e não-crotamínicos, empregando-se placas de Ouchterlony. Na verdade, não utilizamos crotamina purificada nem investigamos a possibi-

lidade de se obter sôro preparado com a mesma, o que poderia dar resultados diferentes daqueles obtidos com venenos crotálicos e seu respectivo antiveneno. Mesmo assim, a não discriminação dêsses venenos pelo método de imunoprecipitação em gel apresenta argumentos para discussão.

A crotamina é fortemente básica, como demonstra seu processo de separação eletroforético. Essa característica permite supôr que no veneno ela se encontre associada ou combinada a uma proteína ácida. A proteína, sendo comum aos dois tipos de venenos crotálicos, dificultaria a diferenciação imunológica dos mesmos. Admitindo-se a hipótese da associação da crotamina com uma proteína ácida, implicitamente também fica admitida a possibilidade de que a crotamina, imunológicamente, possa ser considerada como um hapteno. Evidentemente, ela só poderá ser considerada como tal, se, em estado altamente purificado, conservar suas propriedades farmacológicas, perdendo, entretanto, seu poder imunogênico.

A hipótese da associação crotamina-proteína faz com que se torne necessário verificar a identidade das moléculas de crotamina, obtidas por eletroforese e por cromatografia. É possível que a cisão da crotamina-proteína não se efetue na mesma ligação, nestas duas técnicas empregadas para sua separação. Se as moléculas obtidas por êstes dois processos, ainda conservarem propriedades imunogênicas, sua diferenciação poderá, possívelmente, ser obtida pelo emprêgo de técnicas imunológicas. Neste caso, a conservação das propriedades imunogênicas implicaria no não reconhecimento da crotamina como um hapteno.

A instabilidade da crotamina purificada, quando comparada com sua estabilidade nos venenos, é mais um fator que nos leva a pensar favoràvelmente sôbre a possibilidade de sua associação com uma proteína que bem poderia ser a responsável por sua estabilidade nos venenos. É bem verdade, que proteínas purificadas freqüentemente perdem ràpidamente alguma de suas propriedades, principalmente as enzimáticas, quando não conservadas em condições especiais, junto com outras substâncias que ajudem sua não inativação. Dadas as observações feitas é possível que a associação a uma proteína, ou a presença nos venenos de uma outra substância, sejam as causas responsáveis por sua não inativação.

Concluindo, pode-se admitir, pela hipótese apresentada, que a crotamina seria encontrada no veneno sob uma forma associada de crotamina-proteína. No processo de separação, a associação crotamina-proteína seria cindida em duas moléculas, uma grande, comum aos dois tipos de venenos crotálicos, e uma menor, que ainda conservaria uma estrutura molecular capaz de provocar as ações paralisantes e tóxicas da crotamina. A molécula maior, seria a principal responsável pela resposta imunológica da qual resultam os anticorpos que neutralizam as propriedades farmacológicas da crotamina.

RESUMO

- 1) Estudou-se a composição do veneno individual de 531 cascavéis.
- Êstes venenos foram discriminados quanto ao fato de conterem ou não crotamina e de pertencerem ao tipo amarelo ou branco.
- 3) As 531 cascavéis foram consideradas como uma amostra representativa do total de cascavéis recebidas pelo Instituto Butantan. As cidades e estados de origem destas cascavéis, assim como as percentagens de cada variedade, foram organizadas, de modo sistematizado, em tabelas.
- 4) Considerando-se os resultados do estudo da amostra, e baseado nêles, foram determinadas as percentagens com que cada variedade de cascavel contribui para formar o "pool" de veneno crotálico do Instituto Butantan. Venenos dêste "pool" são empregados na fabricação do sôro anticrotálico e dêle também são fornecidas amostras para fins experimentais.
- 5) A análise dêste "pool" demonstra que êle é essencialmente constituido de cascavéis que secretam veneno branco (90,01%), e que aproximadamente metade (59,32%) das cascavéis extraídas no Butantan pertencem à variedade crotamino-secretora. Éstes dados explicam o alto poder de neutra-lização da crotamina pelo sôro anticrotálico fabricado no Instituto Butantan.
- 6) Alguns argumentos são apresentados e discutidos, e, baseado nêles, é formulada a hipótese de que a crotamina possa ser considerada, imunològicamente, como um hapteno.

SUMMARY

- The individual venom composition from 531 rattlesnakes was studied.
- 2) These venoms were discriminated according to the fact of containing or not crotamine or belonging to the white or to the yellow type.
- 3) Those 531 rattlesnakes were considered as a representative sample of all rattlesnakes received by the Instituto Butantan. The cities and states from where these rattlesnakes were received and the percentages of each variety were organized, in a systematic form, in tables.
- 4) Considering the results obtained from the sample studied, and based on them, the percentages were determined with which every rattlesnake variety contributes to form the Instituto Butantan pool of crotalic venom. From this pool venoms are employed to produce the anticrotalic serum, and samples are provided for experimental purposes.
- 5) The analysis of this pool shows that it is essentially constituted by venoms proceeding from white venom secreting rattlesnakes (90,01%), and that approximately half (59,32%) of the rattlesnakes extracted in Butantan

belongs to the crotamine-secreting variety. These data justify the high crotamine neutralizing power of the anticrotalic serum produced by the Instituto Butantan.

6) — Some arguments are presented and discussed, based on which a hypothesis is proposed that assumes the possibility of crotamine being considered, immunologically, as a hapten.

BIBLIOGRAFIA

- Gonçalves, J. M. e Vieira, L. G. Estudos sôbre venenos de serpentes brasileiras.
 I Análise Eletroforética. Anais acad. brasil. cienc., 22: 141, 1950.
- Gonçalves, J. M. Estudos sôbre venenos de serpentes brasileiras. II Crotalus terrificus crotaminicus, subespécie biológica. Anais acad. brasil. cien., 28: 365, 1956.
- Gonçalves, J. M. Purification and Properties of Crotamine, em Venoms, ed. por Buckley, E. E. and Porges, N. (AAASci. Washington, D. C.) pg. 261, 1956.
- Schenberg, S. Geographical Pattern of Crotamine Distribution in the same Rattlesnake Subspecies. Science, 129 (3359): 1361, 1959.
- Oswaldo Vital Brazil Hiperpiese provocada pela peçonha da Crotalus terrificus terrificus. Anais Fac. Med. U. S. P., 29 (2): 159, 1954.
- Barrio, A. e Vital Brazil, O. Neuromuscular Action of the Crotalus terrificus terrificus (Laur.) Poisons. Acta Physiol. Latinoamer., 1: 291, 1951.

And the state of t