

ESTUDOS BIOCHIMICOS SOBRE OS VENENOS DAS SERPENTES DO GENERO *BOTHROPS*

IV. Acção da substancia coagulante *in vivo*

POR

D. VON KLOBUSITZKY & P. KÖNIG

Historico

Na publicação anterior (1) communicámos a separação duma substancia coagulante dentre a Bothropotoxina e outros componentes de secreção. As nossas experiencias mostraram que é possivel, por meio de fraccionamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, seguido de desalbuminização com acetato de chumbo basico, obter da secreção natural das glandulas veneniferas da *Bothrops jararaca* uma substancia coagulante, em forma de soluto aquoso, completamente livre de albuminas e de acção neurotoxica, a qual é, pelo menos, tão coagulante como a optima concentração da substancia de partida.

Esta substancia coagulante tem uma acção therapeutica nas hemorragias intensas e na coagulação deficiente do sangue.

Sabe-se que os venenos naturaes capazes de reduzir o tempo de coagulação do sangue, foram, ha tempos, applicados nestes casos (2-8). Parece-nos muito importante, do ponto de vista puramente theorico, conhecer tambem o seu effeito em experiencias sobre animaes. Esta prova, baseada na alteração do poder coagulante do sangue por meio de injecção, em animaes vivos, do veneno de diferentes espécies de *Bothrops*, foi feita sómente por Houssay e Sordelli (9), que injectaram solutos de venenos naturaes em quantidades differentes nos cães e coelhos por via intravenosa ou subcutanea, retirando depois sangue desses animaes e observando-lhe o tempo de coagulação. Segundo estas experiencias, grandes quantidades (2mg. por 10 kg. de cão) provocam uma coagulação intravascular durante um tempo curto. Quantidades menores (1mg. por 10 kg. de

ção), depois de passageira diminuição do tempo de coagulação (“phase positiva do efeito de veneno”) precipitam o fibrinogenio, de modo que o sangue não coagula mais (“phase negativa do efeito de veneno”). (*)

Nestas experiencias de Houssay e Sordelli, foram usados venenos naturaes e parece-nos que as doses injectadas eram grandes demais e o tempo de observação (nos casos dos venenos do genero Bothrops, no maximo 2 horas) muito curto para servir de base a conclusões applicaveis á therapeutica. Porisso, resolvemo-nos a examinar esta questão sob outras condições, usando a substancia coagulante purificada.

Parte experimental

Como material experimental usámos o soluto da substancia coagulante preparado pelo methodo por nós anteriormente descripto (1) e contendo quantidades pequenas de albumina. Nossas observações mostraram, com clareza, que os solutos completamente livres de albumina e de saes perdem depressa a sua acção, mesmo quando conservados em frigo. Este soluto, chamado T-IB nos nossos protocollos, continha 0,0242% de residuo secco, sendo 0,0150% de corpos albuminosos (Micro-Kjeldahl). A dóse letal ou D. M. L. (10) para os pombos adultos, em injectão intravenosa, era de 2,5 cc.: quer dizer, que 0,61 mg. do residuo secco, e 1 cc. deste soluto, coagulavam completamente, em 3', 5 cc. do sangue de cavallo com o teor de 0,3% de $(\text{COONa})_2$. Consideravamos uma coagulação completa quando o sangue attingia uma consistencia tal, que, ao ser virado o tubo com o fundo para cima, elle não escorria. Os solutos foram isotonzados com NaCl e esterilizados pela addição de phenol (0,2%). A prova de esterilidade confirmou a ausencia de germes. (**)

As experiencias foram feitas nos pombos em 2 formas: na primeira, o sangue foi tirado por punção venosa 1' e 20' depois de administrado o soluto coagulante; na segunda forma de experiencia, fizemos a punção venosa 20' e 24 horas depois de injectado o soluto T-IB. O soluto coagulante foi sempre injectado em diluições differentes, porém em volumes iguaes (1 cc.). As nossas experiencias preliminares em que procurámos saber o tempo normal da coagulação do sangue do pombo, revelaram encontrar grandes differenças individuaes nos tempos de coagulação; por isso, sangramos sempre o animal antes da injectão. Para determinação do tempo de coagulação usámos 2 cc. de sangue. Todos os animaes supportaram bem a injectão, como tambem as 3 sangrias. Ao todo foram usados 62 pombos.

As sangrias, em geral, não causaram difficuldades; porém, depois da injec-

(*) A primeira observação sobre coagulação biphaseica do sangue, provocada por venenos ophidicos, foi feita provavelmente por Heidenschild, ao trabalhar com venenos da cobra e cascavel (These de dout. Dorpat. 1886).

(**) Não os filtrámos por meio de velas ceramicas ou de membrana de Seitz porque estas adsorvem a substancia coagulante.

ção de soluto concentrado (até a diluição 1:20) appareceram vasoconstricções bastante fortes.

Os dois quadros seguintes mostram os resultados das experiencias.

QUADRO I

Sangria 1' e 20' depois da injecção.

Tempo de coagulação

Diluição	antes da injecção	1' depois da injecção	20' depois da injecção
sem diluição	4' 30"	13'	em 24 horas,
> >	3'	11' 30"	liquido
1:20	5'	40'	2 horas
1:20	6' 30"	32'	2 > 20'
1:100	4' 30"	2'	1' 30"
1:100	5'	1' 10"	3'
1:250	7'	8'	1' 50"
1:250	5'	5'	2' 50"
1:500	12'	8'	2' 30"
1:500	4' 30"	6'	30"
1:1000	7'	8'	1' 30"
1:1000	6'	6'	1' 20"
1:2000	7' 40"	8'	4' 15"
1:2000	8'	8'	3'
1:5000	4' 30"	1'	1' 30"
1:5000	4'	8'	30"

QUADRO II

Sangria 20' e 24 horas depois da injecção.

Tempo de coagulação

Diluição	antes da injecção	20' depois da injecção	24 horas depois da injecção
sem diluição	7' 30"	em 24 hs,	1'
> >	7'	liquido	2' 30"
1:20	3' 30"	12 horas	3' 30"
1:20	3' 30"	6' 30"	30"
1:100	5'	3'	20"
1:100	4'	1'	30"
1:250	3' 30"	2'	1' 20"
1:250	4' 30"	2'	1' 10"
1:500	5' 30"	4'	1'
1:500	1' 30"	1'	30"
1:1000	7'	30"	1' 30"
1:1000	2'	3'	30"
1:2000	5'	1'	30"
1:2000	3' 30"	3' 30"	30"
1:5000	5'	1' 40"	20"
1:5000	5' 30"	1' 30"	30"

Para verificarmos o effeito das sangrias multiplas sobre a coagulação, sangramos 4 pombos, cada um 3 vezes, de maneira que a segunda sangria fosse feita 20 minutos e a terceira, 24 horas depois da primeira. Os resultados não mostraram nenhuma differença consideravel no tempo de coagulação. A maxima differença nos mesmos pombos foi de 30 segundos.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os dados das nossas experiencias mostraram, apesar das differenças individuaes, que o effeito da substancia coagulante depende de dois factores: 1) do tempo passado entre a injeccão e a sangria; 2) da concentração da substancia. A influencia destes factores manifesta-se em pequeno retardamento da coagulação logo depois da injeccão de quantidades maiores, o qual com o tempo passa a completa falta de coagulação, para, depois de 1 dia, dar logar a coagulação maior. Concentrações baixas da substancia coagulante não têm, no começo, nenhuma influencia consideravel mas, depois de curto tempo (20'), causam uma coagulação rapida e permanente por 24 horas.

Nossos dados, acima referidos, explicam-nos a razão de alguns auctores acharem nos animaes, que morreram por intoxicação natural ou artificial com venenos coagulantes das serpentes, um retardamento da coagulação, enquanto outros auctores verificaram uma coagulação accelerada ou uma coagulação intravascular (11).

A influencia da concentração do veneno natural já era conhecida de Noc (12), tendo por base as experiencias *in vitro*. Depois, foi esta influencia da concentração posta em duvida por Brazil (13) baseando-se nas suas necropsias em animaes mortos por mordeduras das serpentes das espécies de *Bothrops*, mas, finalmente, verificada por Houssay e Sordelli (9) e agora ratificada por nós (10). A influencia do tempo nas concentrações altas não foi até hoje por ninguem observada.

Não podemos, á luz do numero ainda limitado de sangrias feitas, saber quando começa e acaba o impedimento da coagulação causada por quantidades maiores e como apparece a influencia coagulante. Vamos, todavia, estudar estas relações de tempo em animaes maiores, os quaes podem supportar sem prejuizo puncções venosas mais frequentes.

A proposito, lembramos as observações de Riesser e Nagel (14), além das de Cotti e Larizza (15) que estudaram a propriedade coagulante das pectinas, acido chlorhydrico e uma série de acidos organicos. Elles verificaram tambem que estas substancias pódem sem excepção impedir a coagulação. Do ponto de vista physico-chimico não podemos dizer si o mecanismo actuante destas substancias e da nossa substancia coagulante é o mesmo ou não, pois as pectinas e os acidos não agem sobre o sangue livre de Ca. Parece-nos, porém, bem possivel

que as substancias mencionadas influam, em primeiro lugar, sobre o augmento da força expansiva dos corpos albuminosos causando por consequencia um augmento da viscosidade do sangue. Nos casos da substancia coagulante ou do veneno ophidico, como nos mostram numerosas experiencias (11), em geral é elle devido a uma influencia directa sobre os fermentos que tomam parte da coagulação, tendo a posição physico-chimica do fibrinogenio uma importancia secundaria (10).

Uma outra questão que nos interessava era a concentração activa da substancia coagulante. Apesar de que o soluto por nós usado continha outros elementos além da substancia coagulante, podemos, baseando-nos em certas supposições, conhecer, pelo menos, a concentração maxima possivel. Nosso soluto apresentava por 1 ccm., conforme lembrámos, 0,242 mg. de residuo secco, sendo 0,150 mg. de albumina. Observámos tambem que 2,5 cc. continham uma quantidade de substancia neurotoxica correspondente á D. M. L.. Das nossas analyses anteriores sabiamos que a parte activa neurotoxica representava no maximo 1/3 do residuo secco. Podemos então considerar como provavel que 2,5 cc. da nossa solução contivessem 0,09 mgm. da substancia neurotoxica, dado que a D. M. L. do material da partida era igual a 0,27 mgm. Do proprio modo de preparação da substancia coagulante deduz-se logo que por substancia neurotoxica não se comprehende o bothropotoxina. Supponhamos que o soluto seja composto só de albuminas, substancias coagulantes e neurotoxicas; então, resulta dos dados communicados que a concentração maxima possivel da substancia coagulante será de 0,056 mg. As diluições por nós usadas correspondem ás quantidades seguintes de substancia coagulante para 1 pombo de 350 gs.

1:20	—	0,0028	mg.
1:100	—	0,00056	"
1:250	—	0,00022	"
1:500	—	0,00011	"
1:1000	—	0,000056	"
1:2000	—	0,000028	"
1:5000	—	0,000011	"

Suppondo-se, finalmente, que um pombo de 350 gs. tenha 20 cc. do sangue, pode-se facilmente calcular que a substancia coagulante em concentração de 0,00000055 mg. cu, por outras palavras, a dóse $5 \cdot 10^{-10}$ gs. por 1 cc. de sangue é ainda fortemente activa.

Estas pequenas quantidades, verificaveis sómente por methodos biologicos, explicam porque os venenos ophidicos coagulantes dão bons resultados como hemostaticos mesmo em grandes diluições (1:10000 — 1:30000).

Os resultados experimentaes acima mencionados, como os anteriores (10), dão-nos alguns pontos de apoio para o calculo da concentração e da redução com

o tempo, da acção da substancia coagulante da secreção natural. Pode-se determinar, baseando-se no Quadro I do trabalho mencionado de v. Klobusitzky, que a solução a 1% da secreção natural recente, numa diluição a 1:50, tem a mesma acção coagulante que o nosso soluto T-IB (1 cc. de ambos coagula em 3' 5 cc. do sangue de cavallo, livre de Ca). Por outro lado, os dados do Quadro I do nosso trabalho anterior (1) mostram que 2,7 mg. da substancia venenosa secca e guardada durante annos coagula em 3' a mesma quantidade de sangue. A D. M. L. da secreção fresca acima descripta é de 0,05 mg., ao contrario da nossa substancia da partida, que é de 0,27 mg. (*). Diminuindo, portanto, com o tempo, o poder toxico, calculado em residuo secco, de 1:5 e a propriedade coagulante de 1:13 (de 0,2 mg. para 2,7 mg.), a perda apparecida durante a conservação da propriedade coagulante é 2 vezes maior do que a da acção toxica. A maxima concentração approximada da substancia coagulante póde ser calculada do modo seguinte: 0,27 mg. do material da partida coagula com a mesma intensidade que 0,056 da substancia coagulante purificada (conforme calculos anteriores). Assim, 100 gs. da secreção natural secca pódem conter no maximo 2 gs. da substancia coagulante.

Finalizando, desejamos mencionar que procuramos verificar, no intervallo, si a lei de Fischer, recentemente modificada, sobre o tempo da coagulação em funcção da concentração dos elementos coagulantes (16) seria applicavel ao caso da nossa substancia coagulante. Concluimos que esta lei tem valor nas concentrações cujo tempo de coagulação está entre 3-20 minutos. Nas experiencias *in vivo*, naturalmente, a sua applicação não tem logar.

RESUMO

No estudo do effeito, sobre pombos, dum soluto coagulante, pobre em proteínas e em substancia neurotoxica, preparada do veneno natural da *Bothrops jararaca* por um methodo elaborado e publicado anteriormente, verificou-se que a acção da substancia mencionada depende de 2 factores: 1) do tempo entre a injecção e a sangria; 2) da sua concentração.

Tomando-se como base algumas considerações e analyses anteriormente feitas calculou-se a maxima concentração possivel da substancia coagulante no soluto usado, que é de 0,056 mg./cc., ficando demonstrado que esta substancia, mesmo em concentração de $5 \cdot 10^{-10}$ g./cc. do sangue, ainda é bem activa.

Este trabalho suggere a possibilidade da concentração dos solutos dos venenos ophidicos com poder coagulante para applicação therapeutica no homem.

(*) A acção toxica da secreção fresca das glandulas da *Bothrops jararaca* varia muito: pode-se dizer que a D. M. L. é em média de 0,03 mg./20' para o pombo. Acontece, porém, que a D. M. L. chega a 0,02 mg., e Brazil encontrou uma secreção cuja D. M. L. era de 0,01 mg. A acção coagulante conserva-se em geral a mesma, de sorte que a relação entre a acção neurotoxica e a coagulante é ainda menos favoravel.

Aproveitamos o ensejo para agradecer o auxilio tecnico, fornecido gentilmente pelo academico, sr. Carlos de T. Fleury, no curso das presentes experiencias.

ABSTRACT

In the course of some tests made on pigeons with the coagulating solution, poor both in proteins and in neurotoxin, which had been prepared from the *Bothrops jararaca* venom by a previously described technic, it was ascertained that its action depends on the following factors: 1) length of time between injection and bleeding of the animal; 2) concentration of the solution.

In the light of previous tests it was found that the maximum concentration of the coagulating principle in the solution used was of 0.056mg. per cc.; it was also proven that same principle is still quite active even under a concentration of 5.10^{-10} g. per cc. in the blood. The present investigation suggests that it is possible to obtain solutions of snake poisons with coagulating power under such a concentration as to make them available for therapeutic application to humans.

BIBLIOGRAPHIA

1. von Klobusitzky, D. & König, P. — Mem. Inst. Butantan X: 223. 1936, et Arch. exp. Pathol. Pharmakol. CLXXXI: 387. 1936.
2. Stokton, M. R. & Franklin, G. C. H. — J. Amer. Med. Assoc. XCVI: 677. 1931.
3. Peck, S. M. & Sobotka, H. H. — J. Exper. Med. LIV: 407. 1931.
4. Peck, S. M. & Goldberger, M. A. — Americ. J. Obstetr. Gyn... XV: 887. 1933.
5. Macfarlane, R. G. & Barnett, B. — Lancet CCXXVII: 985. 1934.
6. Barnett, B. & Macfarlane, G. R. — Proc. Zool. Soc, parte IV: 97. 1934.
7. Peck, S. M.; Crimmins, M. L. & Erf, L. A. — Proc. Soc. Exper. Biol. Med. XXXII: 1525. 1935.
8. von Klobusitzky, D. — Klin Wschr. em impressão.
9. Houssay, B. A. & Sordelli, A. — Rev. Inst. Bacteriol. Buenos Aires, II (2) 1919.
10. von Klobusitzky, D. — Mem. Inst. Butantan IX: 259. 1935 & Arch. exp. Pathol. Pharmakol. CLXXIX: 204. 1935.
11. Phisalix, M. — Animaux venimeux et venins, vol. 2, Paris, Masson & Cia. 1932.
12. Noc. F. — Ann. Inst. Pasteur de Paris XVIII: 387. 1904.
13. Urazil, V. & Rangel Pestana, B. — Rev. Med. de S. Paulo XII: 439. 1909.
14. Riesser, O. & Nagel, A. — Arch. exp. Pathol. Pharmakol. CLXXIX: 748. 1935.
15. Cotti, L. & Larissa, P. — Klin. Wschr. XV: 227. 1936.
16. Fischer, A. — Biochem. Z. CCLXXVIII: 320. 1935.

(Trabalho da Secção de Physico-chimica do Instituto Butantan, apresentado á Sociedade de Biologia de S. Paulo 11-IV-1936. Recebido em novembro de 1936. Publicado em alemão em Arch. exp. Pathol. Pharmakol. CLXXXII: 577.1936 Dado á publicidade em maio de 1937.)