

AÇÃO DERMATOTÓXICA DE VENENOS OFÍDICOS E SUA NEUTRALIZAÇÃO PELOS ANTIVENENOS

POR F. W. EICHBAUM (*)

(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

É fato conhecido há muito tempo que a injeção parenteral do sôro anti-*Bothrops jararaca* protege o indivíduo contra a ação tóxica geral (**) do mesmo veneno, mas praticamente não é capaz de prevenir o desenvolvimento de uma necrose local, mesmo quando o antiveneno for injetado pouco tempo depois da mordida dentro do próprio tecido atingido.

Para analisar esta falha da ação protetora local do sôro, estudamos no presente trabalho a ação dermatotóxica do veneno da *Bothrops jararaca* como também da *Crotalus terrificus terrificus* em relação aos antivenenos específicos, sob variadas condições experimentais.

MATERIAL E METODOS

Como animais de experiência servimo-nos de coelhos e cães cuja pele abdominal era depilada pela aplicação de uma solução de sulfureto de sódio.

Os vários reativos (sôro, veneno, etc.) foram injetados com agulhas finas (N.º 24), intradermicamente, e as reações foram observadas em intervalos determinados.

RESULTADOS

A.) Ação dermatotóxica (***) do veneno de *Bothrops jararaca*

A ação dermatotóxica do veneno de *Bothrops jararaca* manifesta-se por 3 tipos diferentes de reação que têm certa relação com a quantidade do veneno depositado na pele.

(*) Estagiário.

(**) Chamaremos de "ação tóxica geral", o conjunto dos fatores que conduzem à morte dos animais em contraste com os fatores tóxicos discutidos detalhadamente neste trabalho.

(***) Preferimos falar neste trabalho de uma "ação dermatotóxica" dos venenos em vez de "hemorragina", termo usado por outros autores, visto que a hemorragina representa só um componente (fração) do complexo dermatotóxico total.

Entregue para publicação em 22 de janeiro de 1947.

1. *Edema* ("E")

No caso de um edema muito forte e persistente o edema se transforma no 3.º-4.º dia num endurecimento (infiltração circunscrita da pele (infiltração = "I"))

2. *Hemorragia* ("H")3. *Necrose* ("N")

A próxima Tabela (N.º I) demonstra os vários tipos das lesões epidérmicas (no coelho) em relação à dose injetada.

TABELA I

Dosagem da dose necrosante mínima (D. N. M.) do veneno de Bothrops jararaca, na pele do coelho (1.500-2.000 g)

(Quantidade de veneno contido em 0.2 ml. Vol. total)

Quantidade de veneno em mg	Reação depois de				
	5'	60'	4 h	24 h	48 h
0.6	H ++	H ++++ E ++++	H ++++ E ++++	N +++ E +++	N +++
0.4	H ++	H ++++ E ++++	H ++++ E ++++	N +++ E ++++	N +++
0.2	H ++ E ++++	H ++ E ++++	H ++ E ++++	N ++	N ++
0.1	H ±	H ++ E ±	H ++ E ±	H ++ E +++	I +
0.05	E +-++	H ± H ++++	H ± E ++++	I+ E+++	I +
0.025	E +-++	H ± E ++++	H ± E ++++	E +++	O
0.020	E ±	E ++	E ++	O	O

Nota: No presente trabalho tôdas as indicações de "mg de veneno" se referem a mg de venenos secos, redissolvidos em salina isotônica.

Leitura: O = sem reação; H = hemorragia; E = edema; N = necrose; I = infiltração.

A dose necrosante mínima (D.N.M.) foi de 0.2 mg (numa outra experiência era de 0.4 mg). A dose edemaciante mínima (D.E.M.) foi somente de 15-20 gamas.

Doses intermediárias de cerca de 0.1 mg produziram uma lesão hemorrágica que foi regularmente acompanhada de um forte edema. Acontecia, aliás, frequentemente, que com as doses produtoras de hemorragia, o edema aparecia

mais tarde do que aquêle que se manifestava após a injeção de quantidades menores de veneno. Pode-se talvez explicar êste fenômeno (edema retardado com maiores doses) por uma coagulação intravascular nos pequenos vasos que inibe a transudação; não desprezamos a possibilidade de colaborarem nesse fenômeno outros mecanismos, atuando ou diretamente, ou por via reflexa, sobre os vasos periféricos.

A necrose que segue a injeção intradérmica de 0.2 — 0.6 mg era antecedida regularmente por uma intensa hemorragia e mostrava pleno desenvolvimento somente 24-48 horas após a injeção do veneno.

Quer nos parecer que as lesões hemorrágicas e necróticas dependem unicamente de diferenças quantitativas da mesma fração do veneno. Quanto ao edema, as experiências a serem descritas mais adiante, parecem indicar ser produzida por uma fração separada do mesmo veneno.

Ação neutralizante do soro anti-Bothrops jararaca sobre a ação dermatotóxica do veneno de Bothrops jararaca

Foram realizados 4 tipos de experiências:

1. *Proteção geral* do animal pela injeção intramuscular de uma dose maciça do soro, seguida 24 horas após por uma injeção intradérmica do veneno.

TABELA II

	Quantidade de veneno injetado (num volume total de 0.2 ml)	Reação depois de			
		10'	30'	3 h	24 h
Coelho A (proteção geral)	0.6 mg	H ++	H ++	H ++ E ++	N+ N+ E+
	0.4 mg	H ++	H ++	H ++ E ++	N+ H++ E+
	0.2 mg	H ±	H ±	H ± E ++	H± E++++
	0.1 mg	O	H ±	H ± E +++++	E +++++
Coelho B (Normal) contrôle	0.6 mg	H ++	H +++	H +++ E ++	N++ H+
	0.4 mg	H ++	H +++	H +++ E +	N++ E+
	0.2 mg	H ±	H ±	H ± E+	H± E+++
	0.1 mg	H ±	H ±	H +++ E +	H++ E++

2. *Proteção local* pela injeção intradérmica do soro; injeção sucessiva do veneno, no mesmo lugar, após 3-5.

3. Injeção intradérmica do veneno seguida, imediatamente, depois por uma injeção intravenosa de altas doses de antiveneno ("tratamento parenteral").

4. Injeção intradérmica do veneno, seguida por uma injeção de soro no mesmo lugar, 3-5' após (tratamento local).

5. Injeção simultânea do veneno + soro, que antes da injeção tinham ficado em contacto durante 30' a 37°C (*neutralização do veneno in vitro*).

TABELA III

Tipo de experiência	Substâncias injetadas	Reação depois de			
		5'	15'	60'	24 h
Contrôle soro	Antiveneno (*) 2 ml <i>i. d.</i>	O	O	O	E + - + + (I)
Contrôle veneno	Veneno 2 mg <i>i. d.</i> (contidos em 2 ml de água fisiol.)	H +	H + + + +	H + + + + +	N + + + + + E + + + + +
Ad 2) Proteção local	Antiveneno (*) 2 ml <i>i. d.</i> Depois de 5' no mesmo lugar Veneno 2 mg	E + + +	E + + + + + H ±	E + + + + + H +	E + + + + + H +
Ad 3) Tratamento parenteral	Veneno 0.8 mg <i>i. d.</i> Depois de 1' Antiveneno (*) 5 ml por via venosa	H + + +	H + + + +	H + + + + + E + + +	N + + + H + + + E + + +
Ad 4) Tratamento local	Veneno 2 mg <i>i. d.</i> Depois de 4-5' no mesmo lugar Antiveneno (*) 2 ml	H +	H + + + + +	H + + + + + E + + +	N + + + H + + + + E + + +
Ad 5) Neutralização <i>in vitro</i>	Antiveneno (*) 2 ml Veneno 2 mg injetados após contacto durante 30' a 37°	O	E +	E + + +	E + + + + +

i. d. = intradérmica.

(*) Antiveneno = soro anti-*Bothrops jararaca* No. 18: 2 ml deviam neutralizar 4.4 mg de veneno de acôrdo com adosagem em pombos (método de Vital Brazil).

(**) Os intervalos de 5', 15', 60' e 24 h contam-se do momento em que o veneno foi injetado.

Resultado das experiências em 17 coelhos de 1500 — 1800 g;

1. O coelho *A*, de 1.800 g recebeu por via venosa 2,5 cm³ do sôro antibotrópico (Op. 17), quantidade essa que, de acôrdo com a dosagem em pombos, devia neutralizar 4.75 mg de veneno. Vinte e quatro horas após, foram injetadas várias quantidades de veneno, em diferentes lugares. As reações observadas foram comparadas com as obtidas num outro coelho (*B*), não protegido pelo sôro.

Fôra de ligeiras diferenças, atribuíveis à reatividade individual dos dois animais, a pele do animal "protegido" e a do animal normal reagiram idênticamente. *Conclusão*: a injeção parenteral do sôro não protege a pele contra a ação necrotica e quase completamente a ação hemorrágica do veneno, mas não excesso. (Tab. II).

2. A infiltração prévia da pele com antiveneno (*proteção local*) neutraliza a ação necrotica e quase completamente a ação hemorrágica do veneno, mas não é capaz de neutralizar a ação edemaciante. (Tab. III).

3. *Tratamento parenteral*: — a ação hemorrágica-necrotica e edemaciante do veneno praticamente não é influenciada pela injeção de altas doses de antiveneno, aplicadas poucos minutos após a injeção do veneno. (Tab. III).

4. *Tratamento local*: — Como em 3. —, também a injeção local de sôro no mesmo lugar onde o veneno era depositado, não influe sôbre a ação dermatotóxica do último. (Tab. III).

5. *Neutralização in vitro*: — o contacto *in vitro* do antiveneno com o veneno neutraliza a ação hemorrágiconecrotica dêste último, mas diminui somente de pouco a ação edemaciante. (Tab. III).

Contrôle de sôro: — A injeção do sôro deixa notar depois de 24 h uma ligeira infiltração edematosa, diferente do edema pastoso observável nos outros animais tratados com veneno ou veneno mais sôro. (Tab. III).

Resultados análogos foram obtidos em dois cães:

1. *Proteção local por injeção prévia do sôro* (sôro antibotrópico No. 19: dosagem em pombos: 10 ml neutralizam 24 mg de veneno).

Cão No. 2, pêso 8 kg, injeção intradérmica na pele abdominal depilada de 2 ml de sôro (correspondendo a um valor neutralizante de 4.8 mg de veneno). Depois de 5', injeção de 0.2 ml = 1 mg de veneno botrópico (jararaca) no mesmo lugar. Paralelamente injetam-se em outro lugar da pele não tratada previamente e distante 15 cm do primeiro, 0.2 cm³ (= 1 mg de veneno).

Tempo de observação, contado da injeção do veneno	Resultado	
	a) Infiltração prévia da pele com sôro, seguido por injeção de veneno	b) Veneno na pele não protegida (contrôle)
5'	—	H ++
10'	E ++	H +++ E +++
60'	E +++	H ++++ E +++
4 horas	E ++++ H +	H ++++ E ++
24 horas	E ++ I +	N +++ E +
72 horas	I ±	N ++ I +++

(O cão que depois de 1 hora apresentou evacuação sanguinolenta e forte abatimento, recebeu 10 ml de sôro, (*) o que fez desaparecer logo os sintomas gerais).

Como na experiência em coelhos a proteção local prévia protege só contra a ação necrosante do sôro, mas não é capaz de evitar o aparecimento do edema.

2. Injeção intradérmica prévia do veneno seguida por uma injeção local do sôro:

Cão No. 5, pêso 8 kg. O animal recebe em diferentes lugares da pele abdominal as seguintes injeções:

- 1 mg de veneno botrópico (jararaca), contido em 0.2 ml de salina (contrôle).
- 1 mg de veneno botrópico (jararaca), contido em 0.2 ml de salina, e depois de 3 minutos, 2 ml do sôro No. 19 no mesmo lugar.
- como b, injetando-se, aliás 1 ml do sôro antibotrópico No. 19.
- ml do sôro antibotrópico No. 19 (contrôle).

(*) por via intraperitoneal.

TABELA V

Tempo de observação, contado da injeção do veneno	material injetado			
	a) veneno 1 mg i. d. (*) —	b) veneno 1 mg i. d. depois de 3' sôro 2 ml i. d.	c) veneno 1 mg depois de 3' sôro 1 ml i. d.	d) sôro 2 ml i. d.
	R e a ç ã o			
5'	H+	H+	H+	—
10'	H++ E+	H++ E+	H++ E+	I+
60'	H+++ E+++	H+++ E+++	H+++ E+++	I±
4 horas	H+++ E++	H++++ E+++	H++++ E+++	0
24 horas	N+++ E+++	N++++ E+++	N+++ E+++	0
72 horas	N++++	N++++	N++++	0

(O cão que depois de uma hora apresenta sintomas fortes de uma intoxicação geral, recebe 10 ml de sôro i.p. (**)) o que fez desaparecer logo os sintomas gerais).

Como nas experiências em coelhos, a ação necrosante do veneno não foi neutralizada pelo sôro, mesmo quando êste era injetado no mesmo lugar em que o veneno era depositado 3 minutos antes. (Notar que os 2 ml de sôro deviam neutralizar 4.8 mg de veneno). Nem a injeção adicional de uma grande dose de sôro aplicada por via venosa 1 hora depois da injeção de veneno modificou os resultados.

Pareceu ainda de um certo interêsse tanto teórico como prático, verificar-se a relação quantitativa entre a ação anti-tóxica-geral e a ação antidermatotóxica do sôro antibotrópico.

Realizamos uma série de experiências com o sôro (nativo) Op. 17, que deu para êste sôro uma certa aproximação entre a dose antineurotóxica (dosada em pombos) e antinecrosante-antihemorrágica (dosada na pele abdominal de coelhos). Verificou-se mais uma vez nesta experiência a falta absoluta de um princípio antiedemaciante mesmo com doses elevadas do sôro. (cf. Tab. VI).

B.) Ação dermatotóxica do veneno de *Crotalus terrificus terrificus*

A ação dermatotóxica do veneno de *Crotalus terrificus terrificus* é muito menos pronunciada do que aquela dos venenos botrópicos. No veneno crotálico,

(*) i.d. = intradermal

(*) i.p. = intraperitoneal

TABELA VI

Ação antidermatotóxica do soro anti-Bothrops jararaca No. 17 — dosagem em coelhos (A)
— Comparação com o poder anti-“tóxico-geral” do mesmo soro, dosado em pombos (B)

A

Dosagem na pele abdominal do coelho

Soro antibotrópico	Sol. Vene- no <i>Bothrops</i> <i>jararaca</i> 1 mg/ml	Na Cl fisiol.	Reação intracutânea depois de						
			2 h	4 h	24 h	48 h	72 h	120 h	
1.	0.1 ml	0.5 ml	0.15cm ³	E+++ H+	E+++ H+	E+++ N+	E+++ N+++	I+++ N+++	I+++ N+++
2.	0.1 ml	0.25 ml	0.4 cm ³	E+++	E+++	E+++	E+++	I+++	I++++
3.	0.2 ml	0.25 ml	0.3 cm ³	E+	E+	E+++	E++ I+	—	N±
4.	0.3 ml	0.25 ml	0.2 cm ³	E+	E+	I+			I+
5.	0.4 ml	0.25 ml	0.1 cm ³	E+	E+++	E+++ I+	E++ I+		I+
6.	0.5 ml	0.25 ml	—	E+	E+++	E+++	O	O	O
7.	—	0.25 ml	0.25cm ³	E+++	E+++	E+++	O	O	O
8.	—	0.5 ml	0.5 cm ³	H+++ E+++	H+++ E+++	E+++ N+++	E+++ N++++	—	O
9.	0.1 ml	—	0.65cm ³	H+++ E±	H+ E±	E++++ N+	E++++ N+++	—	N+++ N+++
10.	0.5 ml	—	0.15cm ³	E±	E±	O	O	O	O

B

Dosagem em pombos

1.*	0.1 ml	0.5 ml	0.15 ml	pombo N.º 37 — peso 260 g — morto depois de 10'
2.*	0.1 ml	0.25 ml	0.4 ml	pombo N.º 24 — peso 250 g — sobrevive 48 h
3.*	0.2 ml	0.25 ml	0.3 ml	pombo N.º 26 — peso 260 g — sobrevive 48 h

Todos os reativos ficaram em contacto por 30' a 37° antes da injeção.

as doses infra-mortais (no coelho) que ficam entre 0.05 e 0. mg produzem somente um fraco efeito sôbre a pele. A única reação que se observa é um ligeiro edema que aparece, em geral, 20 horas após a injeção intradérmica do veneno e que desaparece 24 horas após. Doses mais altas, de 1-2 mg, não mostram efeito algum durante as primeiras horas depois da injeção, além de um ligeiro edema local. Estas doses, porém, matam os animais entre 10-20 horas, tempo insuficiente para o desenvolvimento de nítidas reações locais. Pode ser, aliás, demonstrado, que o veneno crotálico possui, de fato, uma ação dermatotóxica injetando-se na pele do coelho 1-2 mg de veneno (0.2 ml de uma solução a 0.5 — 1.0%) e imediatamente depois o sôro anticrotálico por via venosa, em quantidade suficiente para neutralizar a ação neurotóxica do veneno. Nestas condições, o sôro protege o animal contra a ação geral (neurotóxica) e, sendo incapaz de neutralizar a ação dermatotóxica, a reação cutânea pode manifestar-

TABELA VII

Ação dermatotóxica do veneno crotálico evidenciada pela injeção simultânea do veneno por via intradérmica e do sôro, por via venosa

Coelho N.º	Peso	Quantidade de veneno injetado intradérmicamente	Antiveneno injetado intravenosamente		Reação depois de	
			Sôro N.º	Quantidade	24 h	48 h
20	kg ± 1 500	1 mg	—	—	morto V± E+	—
165	± 1 500	2 mg	—	—	morto V+	—
115	± 1 500	a) 1 mg b) 2 mg	173*	8.5 ml	a) V+ E++	N± E++
					b) V++ E++	b) N+++ E++
167	1 200	a) 1 mg b) 2 mg	175**	4 ml	a) N+ E+++ V++	N++ E++ V++
					b) N+++ E+++ V++	N+++ V++ E+++

Leitura: E = edema, V = "Vermelhidão" (Eritema), N = necrose.

(*) 1 ml de sôro No. 173 neutraliza 0.8 mg de veneno (dosagem em pombos).

(**) 1 ml de sôro No. 175 neutraliza 1 mg de veneno (dosagem em pombos).

Nota: Os animais 115 e 167 receberam as injeções de 1 e 2 mg de veneno em lugares diferentes da pele abdominal ("a" e "b"), guardando-se uma distancia de 8 cm entre os dois lugares injetados.

se nitidamente; depois de 24 horas aparece um forte edema e um eritema de cor vermelho-arroxeadado, acompanhado, por vèzes, de hemorragias petequiais. A necrose produzida por 2 mg de veneno é no primeiro dia após a injeção ainda pouco desenvolvida e fica nítida somente depois dum intervalo de mais de 24 horas. O edema persiste sempre até o segundo dia, enquanto que o eritema mostra uma certa tendência a regredir neste intervalo. Uma experiência dêste tipo mostra a Tabela VII.

Quando o veneno (em quantidades de 1-2 mg) é depositado intradermicamente e depois de um intervalo de 5' uma quantidade equivalente do anti-sôro é injetado no mesmo lugar, a única reação a observar é um forte edema e ocasionalmente um ligeiro eritema, ambos aparecendo somente depois de um intervalo de 24 horas. O mesmo efeito é obtido quando sôro e veneno são misturados *in vitro* e injetados juntamente, depois de ter ficado em contacto à 37° durante 30'. Reações neurotóxicas não são observadas neste caso.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Veneno botrópico

O fato de que unicamente as ações hemorrágica e necrosante do veneno são neutralizadas pelo sôro enquanto que a ação edemaciante fica praticamente inalterada, mesmo em contacto com doses elevadas do sôro, parece indicar que os dois primeiros fenômenos, *hemorragia* e *necrose*, são devidas a uma fração antigênica do veneno, que é diferente de uma segunda fração não antigênica produtora do edema (*).

Podia-se pensar que o efeito edemaciante, não neutralizável pelo antiveneno, é devido a presença de histamina no próprio veneno ou causado pela libertação secundária de histamina da pele sob influencia do veneno. Esta ultima hipótese pode ser afastada, porquanto a fração proteolítica e a lecitinase do veneno — que não são geralmente responsáveis pela libertação secundária de histamina — ficam certamente neutralizadas por quantidades equivalentes do sôro.

As quantidades de histamina preexistentes nos venenos são tão *infinitesimais* que também não podem ser responsáveis por tal fenomeno.

(*) Existe mais um outro argumento que fala em favor da multiplicidade dos fatores dermatotóxicos no veneno botrópico: o aquecimento do veneno a 65° durante meia hora destróe completamente a ação hemorrágica e necrosante do veneno, enquanto que a ação edemaciante fica ainda mais nítida, especialmente com as doses mais altas do veneno. Um aquecimento do veneno ao ponto de fervura, durante 15' diminue muito pouco a ação edemaciante: um edema nítido (E++) é ainda produzido com doses de 30-40 gamas do veneno fervido, efeito comparável ao causado por doses de 10-20 gamas do veneno nativo.

Consignamos os nossos melhores agradecimentos ao nosso colega Dr. Ananias Porto do Instituto Butantan pela dosagem de histamina nos venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus*, que deram os seguintes resultados:

Veneno	Dose edemaciante minima D. E. M.	Conteudo em histamina por	
		1 grama	1 D. E. M.
<i>Bothrops jararaca</i>	0.02 mg	0.029 mg	6×10^{-7} mg
<i>Crotalus terrificus terrificus</i>	0.05 — 0.1 mg	0.010 mg	$5 \times 10^{-7} \cdot 10^{-6}$ mg

Estes resultados demonstram que a ação edemaciante dos 2 venenos aparentemente não tem relação alguma a histamina e deve ser atribuída, por isso, a uma fração específica que faz parte integral dos dois venenos.

A atividade anti-hemorrágica — anti-necrosante do soro antibotrópico se manifesta unicamente quando se injeta uma mistura de veneno + soro que tenham ficado em contacto, *in vitro*, por algum tempo, ou quando se injeta o veneno dentro de um depósito intradérmico de soro — 2 tipos de experiência que tem pouco interesse do ponto de vista prático.

A incapacidade do soro de neutralizar a ação dermatotóxica do veneno, mesmo quando as duas injeções (do veneno e do soro) são feitas num curto intervalo de tempo no mesmo lugar, demonstra uma rapidíssima fixação do veneno pelas células tissulares; a injeção subsequente de soro não consegue mais neutralizar o veneno fixado no tecido.

Uma imunização passiva por via intramuscular não exerce efeito sobre a ação dermatotóxica do veneno, da mesma forma como a injeção i.v. do soro imediatamente depois da inoculação intradérmica do veneno; aparentemente a concentração do antiveneno nos tecidos é tão reduzida que não consegue alterar a afinidade do veneno pelo tecido cutâneo.

Veneno crotálico

Estas experiências mostram que o veneno crotálico contém, semelhante ao veneno botrópico, duas frações dermatotóxicas 1.) Fração produtora de eritema e necrose neutralizável pelo soro anticrotálico 2.) Uma fração edemaciante que não é influenciada pelo soro anticrotálico.

Em relação à termo-resistência, estas frações do veneno crotálico se comportam diferentemente das frações análogas do veneno botrópico. Um aquecimento do veneno a 65° durante 30' destrói o poder necrosante sem afetar niti-

damente o seu poder eritematoso e edemaciante. O aquecimento a 100° durante 5 não modifica muito o resultado; só há uma redução apreciável do eritema e do edema com veneno fervido por 10-20'.

Estes fatos parecem indicar que o aquecimento destrói em função do grau e tempo de aquecimento, gradativamente, o veneno inteiro, não se verificando uma termo-resistência ou labilidade específica das frações descritas.

A dose necrosante mínima do veneno crotálico é cerca de 10 vezes maior (= 2 mg) do que aquela do veneno botrópico (0.2 m), produtora do mesmo efeito; no caso do veneno crotálico, esta dose fica perto da dose letal mínima (para o coelho) e devido a sua ação lenta (24-48 h) não pode ser evidenciada sob condições normais. Uma reação hemorrágico-necrótica se produz unicamente quando o veneno é injetado intradermicamente e o soro na veia; nestas condições o soro neutraliza a ação neurotóxica, aparentemente sem atingir no tecido cutâneo uma concentração suficiente para inibir a ação local do veneno.

Contrariamente às observações feitas com o veneno e soro botrópico, tanto a ação tóxica geral como a ação local do veneno crotálico são neutralizadas (com exceção da ação edemaciante), quando o soro é injetado num lugar previamente infiltrado com uma dose mortal de veneno (1-2 mg).

Estes resultados concordam em parte com as observações de Githens que trabalhando com os venenos de crotalídeos norte - e centro-americanos, verificou uma neutralização *in vitro* pelos antivenenos homólogos e heterólogos. "A reação local dos venenos desenvolveu-se tão rapidamente que a injeção subsequente do antiveneno neutralizante não produziu efeito. A toxidez sistemática (geral) era maior com a injeção intradérmica do que com a subcutânea do veneno; nos venenos mais tóxicos a dose letal era menor do que a dermatotóxica." Contrariamente à ação das cascaveis sul-americanas, a maioria das cascaveis norte - e centro-americanas mostraram uma forte ação necrosante nas experiências de Githens.

RESUMO

O veneno de *Bothrops jararaca* possui uma forte ação dermatotóxica; a injeção intradérmica (em coelhos) de 0.2 — 0.4 mg de veneno causa após poucos minutos o aparecimento de um extenso edema e de hemorragia, seguidos por uma profunda necrose 24-48 horas depois. Doses menores (0.01 — 0.02 mg) causam unicamente um edema das camadas epidérmicas superficiais. Demonstramos neste trabalho que o veneno botrópico contém dois princípios dermatotóxicos diferentes: 1.) uma fração produtora do efeito hemorrágico-necrótico, neutralizável *in vitro* pelo antiveneno específico e destruída pelo aquecimento a

65° durante 30'. 22.) Uma fração edemaciante, não neutralizável mesmo por altas doses do antiveneno, resistente a um aquecimento de 100 graus durante 10' (Experiências em coelhos e cães).

A afinidade das dermatotoxinas para com o tecido cutâneo parece muito grande, visto que a injeção de doses altas de antitoxina não conseguem neutralizar o veneno injetado poucos minutos antes no mesmo lugar. A presença de um anticorpo dirigido contra a ação hemorrágico-necrótica pode ser demonstrado pelo fato que u'a mistura do sôro + veneno, injetada após 30' de contacto a 37°, produz unicamente uma reação edematosa.

As atividades antitóxica-geral e antidermatotóxica de um sôro antibotrópico testado em pombos e coelhos, respetivamente, eram aproximadamente iguais.

Em contraste com a rápida e intensa reação dermatotóxica do veneno botrópico, o efeito local do veneno crotálico (de *Crotalus terrificus terrificus*) — no teste em coelhos — não é muito impressionante. Doses baixas (0.05 - 0.1 mg) injetadas intradermicamente produzem depois de algumas horas um edema pouco espalhado o qual desaparece geralmente depois de 24-48 horas. Doses maiores (1-2 mg) matam o animal dentro de 10-20 horas, verificando-se no lugar da injeção unicamente um ligeiro edema e vermelhidão (eritema).

Foi demonstrado, aliás, por um artifício de técnica que também o veneno crotálico possui um fator necrosante: quando se injetam 1-2 mg de veneno crotálico, intradermicamente, e ao mesmo tempo por via venosa uma quantidade de sôro suficiente para neutralizar a ação neurotóxica do veneno, o efeito visível depois de 24-48 horas será uma necrose nítida, cercada de um edema e intenso eritema. Aparentemente o antiveneno introduzido por via venosa não atinge no tecido cutâneo uma concentração suficiente para suprimir a ação necrosante. O sôro anticrotálico, aliás, possui por si mesmo, uma atividade antidermatotóxica, visto que a injeção combinada de sôro + veneno, ou mesmo a injeção sucessiva de veneno e sôro no mesmo local, inibe o desenvolvimento da necrose e do eritema como também o efeito neurotóxico. Como no caso do antiveneno botrópico, o sôro crotálico não contém anticorpo que neutralize a ação edemaciante do veneno (crotálico).

A resistência ao calor das duas frações dermatotóxicas do veneno crotálico difere das frações análogas do veneno botrópico porquanto o aquecimento a 65° por 30' abole unicamente o efeito necrosante do veneno crotálico, sem diminuir a sua atividade eritematosa e edemaciante. Somente quando fervido por mais de 10', o veneno perde gradualmente o poder de produzir os dois últimos sintomas. Este fato indica uma redução progressiva da atividade do inteiro complexo dermatotóxico em função do tempo e grau de aquecimento. Não existe, no caso do veneno crotálico, uma termolabilidade "específica" de diferentes frações dermatotóxicas, como foi observado no veneno de *Bothrops jararaca*.

ABSTRACT

The venom of *Bothrops jararaca* has a strong dermatotoxic activity. The intradermal injection (in rabbits) of 0.2 — 0.4 mgr. of the venom produces, after a few minutes, a very extensive edema and hemorrhage, which is followed 24-48 hours later by a deep necrosis. Smaller dosis (0.01 — 0.02 mgr.) cause only an edema of the superficial skin layers. It could be shown in this paper, that the bothropic venom contains two different dermatotoxic fractions, one responsible for the hemorrhagic-necrotizing effect, the other one responsible for the development of an edema.

The hemorrhage-necrosis producing fraction (fraction I) is neutralizable in vitro by specific antiserum and is destroyed by heating to 65° for 30'. The edema producing fraction (fraction II) is not neutralizable even by high dosis of specific antiserum and resists heating to 100° for 10-15' (Experiments in rabbits and dogs). The affinity of the dermatotoxins to the cutaneous tissue appears very strong, since the local injection of high antivenom doses is unable to neutralize the topical action of a venom, which had been injected at the same place a few (3-5) minutes before. The presence of an anti-dermatotoxic (fraction I) antibody can be proved by the fact that the intradermal injection of a serum-venom, mixture which had remained in contact for 30' at 37°, produces only an edematous reaction.

The general antitoxic and the anti-dermatotoxic power of an anti-bothropic serum — tested in pigeons and rabbits respectively — were about the same.

Contrary to the intensive dermatotoxic action of the bothropic venom, the local effect of the *Crotalus* venoms (from *Crotalus terrificus terrificus*) in rabbits is not very impressive. The intradermal injection of small venom doses (0.05 - 0.1 mgr.) produces after a few hours a fairly large edema, which generally disappears 24-48 hours later. Higher doses (1-2 mg) kill the animals within 10-20 hours, exposing the injected site slight edema and hyperemia.

By a special technique it can be shown, however, that also the crotalic venom possesses a necrotizing factor:

When the intradermal injection of 1-2 mg of crotalic venom is followed immediately afterwards by an antivenom injection of a serum-dose sufficient to neutralize the neurotoxic action, there will appear within 24-48 hour, a marked necrosis, surrounded by an edema and intensive erythema. Apparently, the intravenously injected serum did not attain, in the cutaneous tissue a sufficient concentration to suppress necrotizing action. The anticrotalic serum in order possesses an anti-dermatotoxic activity too, since the combined injection of serum + venom, or even a local serum injection applied 5-10' after the venom injection,

inhibits the development of necrosis and erythema, as well as the neurotoxic effect. As in the case of the antithrotophic serum, the edema producing power of the crotalic venom is not interfered with even by high serum amounts.

The heat resistance of the two dermatotoxic fractions (*) of the crotalic venom differs from the homologous bothrops venom fractions in so far as heating to 65° for 30' abolishes only the necrotizing effect of the crotalic venoms without diminishing its edema and erythema producing activity. Only when the venom is boiled for more than 10', it loses gradually its power to cause the last mentioned symptoms. This fact points to a progressive reduction of activity of the entire dermatotoxic venom complex as a function of time and degree of heat applied; there is no specific heat lability of the different dermatotoxic fractions, as in the case of the *Bothrops jararaca* venom.

BIBLIOGRAFIA

Githens, T. S. — The polyvalency of Crotalidic antivenins. IV. Antinecrotic, anticoagulant and antiproteolytic actions, *J. Immunol.*, 42:149-159, 1941.

(*) Fraction I — causing erythema and necrosis, neutralizable by antivenom.
Fraction II — causing edema, not neutralizable by antivenom.

