

O FATOR DE DIFUSÃO ("SPREADING FACTOR") DOS VENENOS DE *BOTHROPS JARARACA* E DE *CROTALUS* *TERRIFICUS TERRIFICUS*

POR F. W. EICHBAUM (*)

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

A injeção intradérmica de extratos testiculares aumenta intensamente a permeabilidade do tecido cutâneo, o que se manifesta pela rápida difusão de uma suspensão de tinta Nankin injetada no mesmo lugar (2, 3, 11, 12).

O poder de aumentar a difusão é atribuído a um fator específico ("spreading factor") contido nos extratos testiculares; uma certa avaliação quantitativa obtém-se medindo a área de infiltração preta produzida pela injeção simultânea do extrato + tinta Nankin, em comparação com a área preta produzida pela injeção de tinta Nankin em água fisiológica.

Um fator semelhante àquêle presente nos testículos foi encontrado mais tarde por Duran-Reynals e outros, em extratos bacterianos (estafilococos, pneumococos, bacilos de gangrena gasosa), em tumores malignos, nos venenos de espécies ofídicas norte-americanas e australianas como também em outros animais venenosos (aranhas, escorpiões, sanguessugas (4, 9, 10, 13, 14).

De acôrdo com os trabalhos de Duran-Reynals, o spreading factor "de venenos ofídicos sofre pouco pelo aquecimento à 65-100º, temperatura suficiente para destruir a ação tóxica geral do veneno da rattlesnake"; ao contrário, Madina-veitia (9) achou o "spreading factor" (mucinase) do veneno de *Crotalus atrox* mais termo-sensível do que os componentes neurotóxicos (protease, lecitinase).

Duran-Reynals mostrou ainda que os soros antiofídicos são capazes de neutralizar especificamente a ação tóxica local da spreading factor dos venenos.

A presença de fatores de difusão em órgãos, tecidos, líquidos de composição e proveniência tão diferente, constituiu um fenômeno problemático, até que Chain e Duthie (1) conseguiram demonstrar que o extrato testicular possui uma forte ação mucolítica; ésta atividade pode ser demonstrada pela queda rápida da viscosidade, que sofrem certas mucoproteínas (do corpo vítreo do olho, do cordão umbilical) em presença de extratos testiculares.

(*) Estagiário.

Entregue para publicação em 13 de fevereiro de 1947.

Esta observação sugeriu a probabilidade de que o spreading factor fosse nada mais do que uma mucinase — mais exatamente uma hyaluronidase — que agia sobre as substâncias mucoides intrafibrilares do colagênio da cutis (13,14). Esta hipótese foi ainda melhor apoiada pelas observações subsequentes de vários autores que verificaram que todos os produtos portadores de uma hyaluronidase provocam também o fenômeno do "spreading"; por outro lado Meyer e Chaffee (15, 16, 17) afirmam que nem tôdas substâncias causadoras de "spreading", contêm necessariamente uma hyaluronidase. Contra esta observação fica o pêso da evidência de muitos outros autores que demonstraram uma coincidência constante do fator de difusão e da mucinase.

Faltam até agora suficientes experiências quantitativas para realmente provar a indentidade do "spreading factor" e da hyaluronidase.

A presença de um fator de difusão nos venenos ofídicos de *Vipera aspis*, *Lachesis alternatus* e *lanceolatus* (= *Bothrops jararaca*), *Crotalus terrificus* *Naje haje* foi demonstrada por Tarabini-Castellani (19) em 1938; Favilli (5) verificou que os mesmos venenos possuem um enzima de alto poder mucolítico que é neutralizado pelos antivenenos específicos; o aquecimento do veneno a 70° durante 30' aboliu inteiramente o seu poder mucolítico. Também o veneno da *Vipera russellii* possui um fator que reduz a viscosidade de ácido hialurônico; pela digestão enzimática do muco libertam-se substâncias redutoras, como N-acetyl hexosamina, cuja quantidade é em certa relação quantitativa ao decrescimo da viscosidade (14) (*).

Madinaveitia (9) purificou a mucinase da *Crotalus atrox* por adsorção à terra de Fuller.

A importância prática do "spreading factor" reside no fato que este princípio parece intimamente ligado à facilidade com que certos germes piogênicos se implantam no tecido impregnado por tal fator. É de fato conhecido o grande perigo da infecção local das feridas causadas pela mordida de serpentes venenosas.

O presente estudo trata da presença do "spreading factor" nos venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus* e sua neutralização pelos sôros específicos.

MATERIAL E MÉTODOS

No estudo do "spreading factor" na pele depilada de coelhos encontramos certas dificuldades de ordem técnica que conseguimos eliminar somente depois de repetidas experiências em numerosos animais. Além da dificuldade de depositar quantidades iguais do veneno sôro, etc., na mesma altura da epiderme,

(*) Também outras substâncias redutoras como o ácido ascórbico, phenylhydrazina, etc. produzem uma diminuição da viscosidade do muco.

os coelhos demonstraram uma reatividade individual bem variável tanto em relação ao soro como aos venenos ou a mistura dos dois. Para excluir o mais possível este fator individual injetamos no lado direito do abdomen os controles (tinta Nankin em salina, soro antiofídico + tinta Nankin; soro normal + tinta Nankin) e no lado esquerdo os respectivos reativos junto com o veneno.

O lugar da injeção (perto do processo xifoide ou da sínfise) parece pouco influenciar o tipo da reação. Por outro lado a leitura dos resultados fica em certos casos dificultada numa observação prolongada (2-3 horas) pela confluência das zonas de "spreading", impossibilitando desta maneira uma demarcação exata das lesões. Em tais casos repetimos a experiência num maior número de coelhos, nos quais foram aplicadas só 4 injeções por animal (2 para o teste, 2 para controle). No estudo do spreading factor é imprescindível escolher animais aproximadamente do mesmo peso e idade. Os animais com um peso acima de 2500 gramas apresentam geralmente uma pele rígida, grossa em que o fenômeno do "spreading" se desenvolve pouco nitidamente.

Preferimos para este estudo, em geral, coelhos (brancos) com um peso médio de 1200 — 1500 gramas, cuja pele fina é um indicador sensível ao "spreading factor". Uma avaliação quantitativa do grau do "spreading" fizemos medindo o diâmetro máximo da zona corada pela tinta Nankin.

Um fator que dificultou ainda o estudo da ação "anti-spreading" dos antivenenos, foi a propriedade de certos soros causarem por si só (sem presença do veneno) um nítido "spreading" em comparação com o controle. Encontramos este fenômeno principalmente com os soros anticrotálicos (tanto nativos como concentrados pelo sulfato de amônio). Em tais casos, naturalmente não se pode concluir sobre uma eventual neutralização do veneno.

A maior frequência do spreading espontâneo dos soros anticrotálicos (observado ocasionalmente também com os soros anti-botrópicos) pode se explicar, em parte, pelo fato que a quantidade relativa do soro injetado era maior nos soros crotálicos devido ao seu menor título de neutralização, (outros pormenores da técnica podem ser vistos nas tabelas I e II).

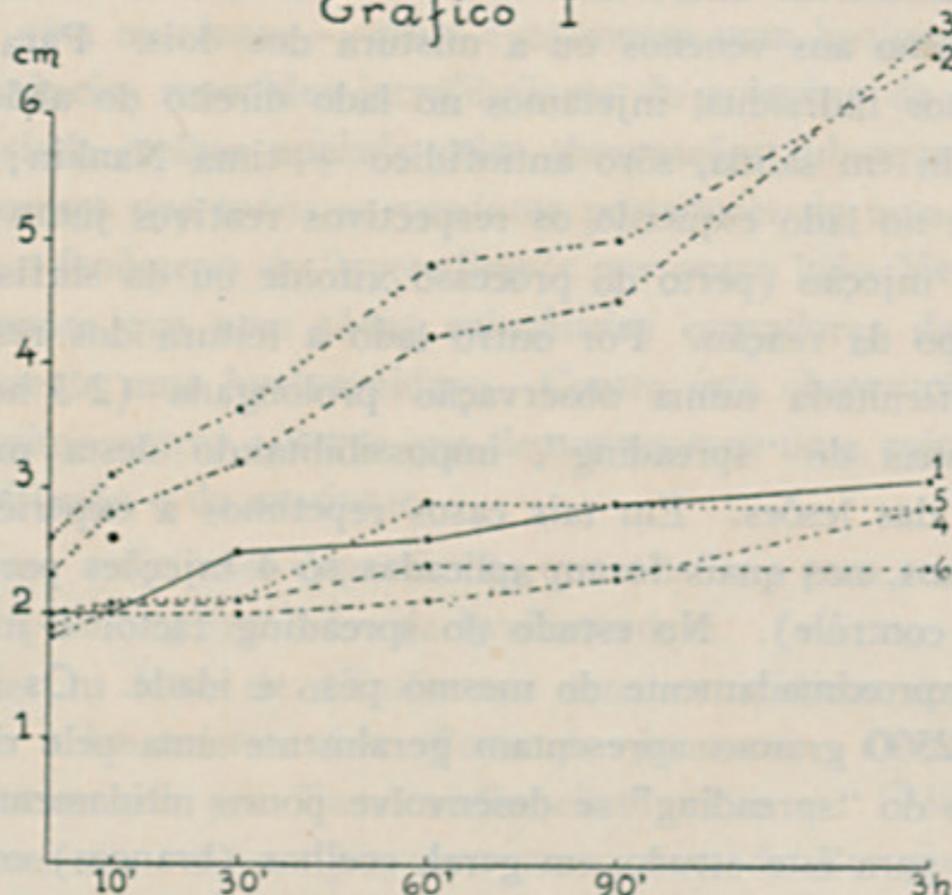
Nos seguintes gráficos (I, IIa e IIb) estão condensados os resultados de várias experiências realizadas num total de 46 animais e com 4 soros antibotrópicos, 4 soros anticrotálicos e 8 soros normais de cavalo.

RESULTADOS

Gráfico I

"Spreading factor" do veneno de *Bothrops jararaca* e sua neutralização pelo antiveneno específico. As abscissas dão o tempo de observação em minutos, as ordenadas o diâmetro máximo do spreading em cm.

Gráfico I



- 1—Veneno *Bothrops jararaca* + antiveneno
 2..... " " " + soro normal (cavalo)
 3..... " " " + água fisiológica
 4..... Antiveneno bothrópico
 5..... Soro normal (cavalo)
 6..... Água fisiológica

TABELA I

(mostrando a proporção dos vários reativos misturados in vitro)

S	Tubos n.º					
	1	2	3	4	5	6
Tinta Nankin 1/10 ..	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Sol. veneno jararaca 10 mg/ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	—	—	—
Sôro antibotrópico (**)	0.5 ml	—	—	0.5 ml	—	—
Sôro normal de ca- valo (*)	—	0.5 ml	—	—	0.5 ml	—
NaCl fisiológico	—	—	0.5 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.6 ml

(*) Os sôros normais de cavalo nunca mostraram uma tendência a um "spreading" espontâneo, mesmo quando usados em doses elevadas. As pequenas quantidades de fenol, contidas nos antivenenos ofídicos, não influem sobre o "spreading" como conseguimos verificar em contrôles realizados neste sentido.

(**) 4 diferentes sôros nativos e concentrados pelo sulfato de amônio que se comportaram praticamente de modo idêntico. O título antitóxico dos 4 sôros testados em pombos variava de 1,9 mg a 2,4 mg de veneno neutralizado por 1 ml de sôro.

De cada mistura, dos tubos 1-6, injetam-se 0.2 ml intradermicamente na pele abdominal do coelho. A quantidade do soro antibotrópico usado corresponde àquela que na dosagem em pombos neutraliza 1 mg, ou seja a quantidade de veneno injetado nesta experiência.

Conclusão: 1) O veneno de *Bothrops jararaca*, injetado intradermicamente no coelho em quantidades de 0.2 mg (contido num volume de 0.2 mg1) mostra nitidamente a presença de um "spreading factor". Este fator é quase completamente neutralizado em presença de quantidades equivalentes (*) do antiveneno específico. Também o soro anticrotálico parece exercer uma certa inibição, que aliás - mais fraca do que a causada pelo soro botrópico (**). O soro normal de cavalo reforça nitidamente o "spreading" causado pelo veneno. Vários sôros normais testados sempre deram ausência de um "spreading factor", enquanto que alguns dos sôros anti-*Bothrops jararaca* também em ausência de veneno promoveram a difusão da tinta Nankin na epiderme do coelho; tais sôros não podiam ser usados no estudo da neutralização do "spreading factor" dos venenos.

B. Veneno crotálico

TABELA II

(mostrando a proporção dos vários reativos misturados in vitro)

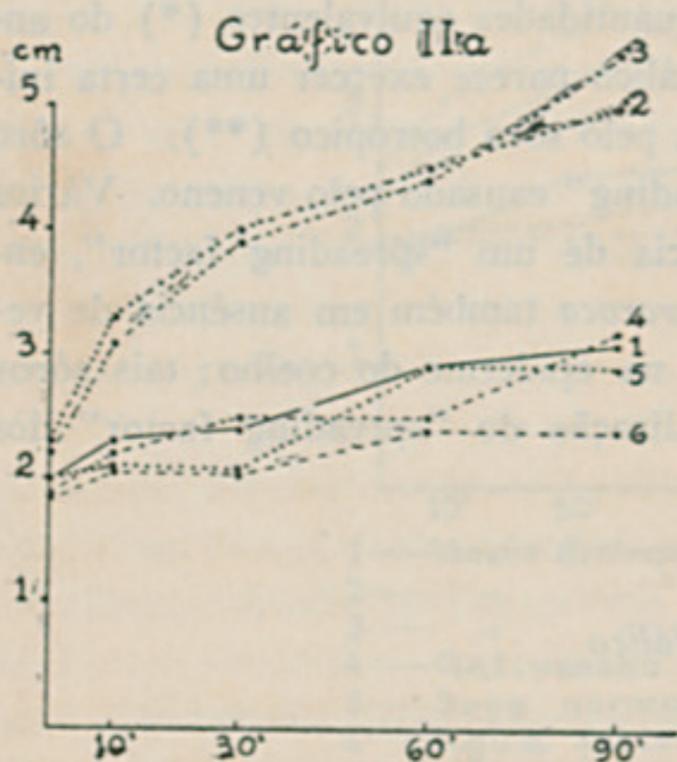
	Tubos n.º					
	1	2	3	4	5	6
Tinta Nankin 1/10 ..	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Sol. veneno <i>C. t. terrificus</i> 5 mg/ml ..	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	—	—	—
Soro anticrotálico (1 ml neutraliza 0.8 mg veneno)	1.3 ml	—	—	1.3 ml	—	—
Soro normal de cavalo	—	1.3 ml	—	—	1.3 ml	—
Na Cl. fisiol.	—	—	1.3 ml	0.2 ml	0.2 ml	1.5 ml

(*) De acôrdo com o poder antitóxico geral testado em pombos. Experiências quantitativas no sentido de determinar a dose mínima do soro, capazes de inibir o "spreading", não foram feitas.

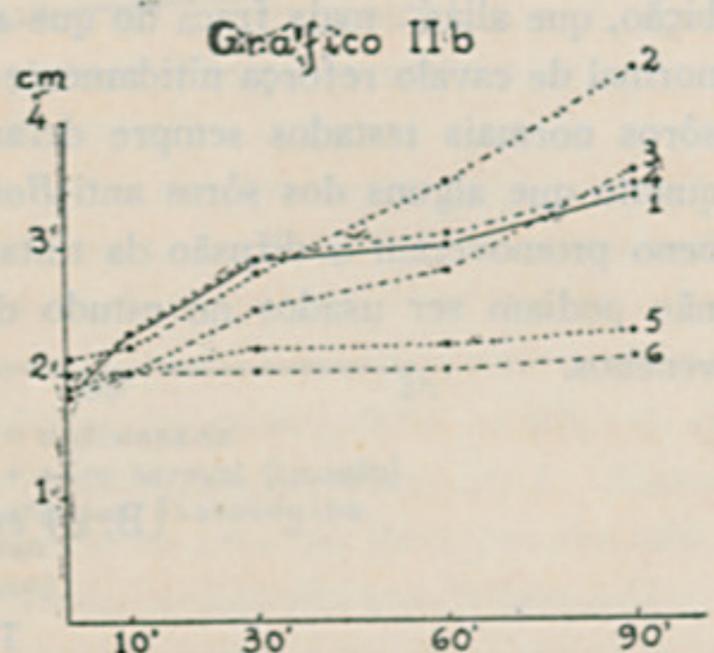
(**) Devido ao número relativamente pequeno de observações estes resultados não foram registrados no gráfico I.

Gráfico IIa e IIb

"Spreading factor" do veneno de *Crotalus terrificus terrificus* e sua neutralização pelo antiveneno específico. As abscissas dão o tempo de observação em minutos, as ordenadas o diâmetro máximo em cm.



- 1 — Veneno crotálico + antiveneno
2 " " + soro normal (cavalo)
3 " " + água fisiológica
4 Antiveneno crotálico
5 Soro normal (cavalo)
6 Água fisiológica



- 1 — Veneno crotálico + antiveneno
2 " " + soro normal (cavalo)
3 " " + água fisiológica
4 Antiveneno crotálico
5 Soro normal (cavalo)
6 Água fisiológica

De cada mistura dos tubos 1-6 injetam-se 0.2 ml intradermicamente na pele abdominal do coelho. A quantidade de soro anticrotálico usada corresponde àquela que na dosagem em pombos neutraliza 1 mg, ou seja, a quantidade de veneno usada nesta experiência. Devido ao baixo poder neutralizante destes sôros, comparados com os sôros antibotrópicos, a quantidade absoluta do soro nestas experiências é maior do que nas experiências com veneno e soro botrópico.

Os resultados obtidos foram divididos em 2 grupos; incluímos no gráfico IIa aquelas experiências em que os sôros crotálicos não possuíam fator intrínscico capaz de promover a difusão da tinta Nankin, permitindo desta maneira observar o seu poder neutralizante sobre o "spreading factor" do veneno; incluíram-se ainda os sôros de cavalo que aumentaram só fracamente o "spreading" causado pelo veneno. No gráfico IIb registramos as experiências com sôros anticrotálicos, que possuíam por si mesmos um fator de difusão e os sôros nor-

mais que promoveram fortemente o "spreading", quando combinados com o veneno crotálico. O conteúdo dos sôros anticrotálicos e normais (de cavalo) em fenol na quantidade de 0.2 — 0.4% não influe sôbre o caráter do "spreading", como conseguimos verificar em experiências de contrôle.

Conclusão: O veneno de *Crotalus terrificus terrificus* possui um "spreading" factor neutralizavel pelo anti-sôro específico (gráfico IIa). Alguns dos sôros anticrotálicos possuem um poder intrínseco de aumentar a difusão da tinta Nankin (gráfico IIb), desconhecendo-se os fatores que determinam esta qualidade peculiar a alguns sôros. O sôro normal de cavalo, por si só incapaz de promover a difusão da tinta Nankin reforça o "spreading" causado pelo veneno crotálico; o valor ativador de sôros normais sôbre o "spreading factor" do veneno crotálico varia de sôro para sôro (fraca ativação: gráfico IIa; forte ativação: gráfico IIb). Apesar de algumas observações indicarem uma fraca ação inibidora do sôro antibotrópico sôbre o "spreading factor" do veneno crotálico, não incluímos estas experiências nos gráficos acima, devido à escassez de observações detalhadas.

Interessava ainda saber si os venenos botrópicos e crotálicos, portadores do "spreading factor" possuem também uma atividade mucolítica. Por falta de aparelhagem adequada, fizemos um test de orientação, no qual medimos o tempo de esvaziamento de uma pipeta de bola com uma capacidade de 18 cm³. Comparamos o tempo de esvaziamento da mistura muco (corpo vítreo de olho de boi) + veneno + buffer (*), depois de vários períodos de incubação à 37.º, com o tempo de esvaziamento de muco + buffer e de água + buffer.

Verificou-se em numerosos experiências paralelas, uma diminuição progressiva da viscosidade em tôdas as misturas muco + veneno, atingindo valores pouco acima do valor de água; contrariamente a mistura muco + buffer conservou uma viscosidade constante durante todo o tempo de observação.

Conclue-se disso que tanto o veneno de *Bothrops jararaca* como de *Crotalus terrificus terrificus*, portadores de um "spreading factor", possuem também uma mucinase capaz de reduzir a viscosidade de substratos ricos em ácido hyalurônico (corpo vítreo de olho de boi).

(*) buffer acetato pH 4.8 o que corresponde aproximadamente ao optimum da atividade da hyaluronidase.

TABELA III

Diminuição da viscosidade do corpo vítreo de olho de boi em presença de venenos
botrópico e crotálico

	1)	2)	3)	4)
Contacto dos reat. à 37°	Corpo vítreo 17.0ml Ven. jararaca 20 mg/cm ³ 1.0ml buffer 2.0ml	Corpo vítreo 17.0ml Ven. crotálico 20 mg/cm ³ 1.0ml buffer 2.0ml	Corpo vítreo 17.0ml sol. fisiol. .. 1.0ml buffer 2.0ml	Água dist. ... 17.0 sol. fisiol. 1.0 buffer acet. pH 4.8 2.0
0 ...	36½"	37 "	37 "	29"
1 h .	31 "	31 "	38 "	29"
2 h .	30½"	31 "	37 "	29"
3 h .	31 "	30½"	37½"	30"

Os segundos indicam o tempo de esvaziamento de uma pipeta graduada de 18 cm³ volume.

DISCUSSÃO

Confirmam-se os resultados obtidos por Tarabini-Castellani (1938) sobre a presença de fatores de difusão nos venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus*.

Nossa observação de que a atividade do "spreading factor" dos venenos botrópico e crotálico é nitidamente reforçada em presença do soro normal parece interessante por que uma ativação pelo soro pode ser observada também em outras frações dos venenos:

1 Ativação do poder hemolítico em presença de soro; este fenômeno pode ser explicado pelo desdobramento da lecitina do soro com a formação de liso-lecitina, não podendo-se excluir a possível colaboração de outros fatores ativantes do soro.

2 Ativação do poder metahemoglobinisante do veneno de *B. jararaca* e de outros venenos botrópicos (observação não publicada do autor).

Não temos conhecimentos exatos de que maneira o soro ativa o "spreading factor", podendo-se admitir a formação de um produto secundário ativo, liberado do soro sob a influência do veneno.

A verificada diminuição da viscosidade de ácido hialurônico (impuro) em contato com os venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus* confirma os resultados obtidos por Favilli (5) demonstrando a coincidência, si

não a identidade, dos "diffusing factors" e da mucinase (hyaluronidase). De acôrdo com os recentes trabalhos de Humphrey (7,8) parece mais certo de admitir a existência de diferentes hyaluronidases nos vários venenos e toxinas o que explicaria a especificidade dos antisôros capazes de suprimir o "spreading" causado por certa substância (venenos, extratos de órgãos etc).

Analizando os princípios responsáveis pela atividade do "spreading" dos venenos ofídicos, é preciso tomar em consideração também a capacidade dos venenos de libertarem histamina, a qual por sua vez promove a migração de partículas coloidais no tecido cutâneo (18).

RESUMO

Os venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus* possuem um fator de difusão ("spreading factor") neutralizável pelos respectivos anti-sôros específicos, mostrando-se ainda uma neutralização incompleta pelos sôros heterólogos.

A atividade do "spreading factor" é intensamente reforçada pela mistura dos venenos com sôro normal de cavalo; tais soros possuem por si só nenhuma atividade de "spreading". Entre os antivenenos botrópicos e crotálicos (ambos preparados em cavalos), encontraram-se alguns que possuíram um poder intrínseco de causarem o fenômeno de "spreading".

A ativação do "spreading factor" dos venenos pelo sôro normal têm uma certa analogia na ativação pelo sôro, observada em outras frações de venenos: ativação da hemólise, ativação do poder metahemoglobinisante (transformação da hemoglobina em metahemoglobina) (*).

Os venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus terrificus terrificus* possuem uma mucinase capaz de reduzir a viscosidade de ácido hyalurônico (corpo vítreo do olho de boi).

Analisando os princípios responsáveis pelo fenômeno do "spreading" causado pelos venenos ofídicos, é preciso considerar também a capacidade dos venenos de libertarem histamina, a qual por sua vez promove a migração de partículas coloidais no tecido cutâneo.

ABSTRACT

The venoms of *Bothrops jararaca* and *Crotalus terrificus terrificus* are carriers of a spreading factor which is completely neutralized by the homologous antivenoms and partially by the heterologous antivenom.

(*) Observações do autor não publicadas.

The intensity of spreading caused by either venom is strongly activated in presence of normal horse serum, which had stayed in contact with the venom during 1/2 hour at 37.º. Normal horse serum by itself does not increase the spreading of Indian ink, on intracutaneous injection. The activation of the spreading factor by normal sera has a certain analogy in the serum-activation of other toxic principles of some venoms: the activation of hemolysis, the activation of an oxydizing enzyme which transforms hemoglobin in to methemoglobin.

In some instances antiothropic and anticrotalic sera, both prepared in horses, were found to contain an intrinsic spreading promoting principle.

Bothropic as well as crotalic venoms reduce the viscosity of vitreous humour preparations (mucinase activity).

In appreciating the spreading activity of snake venoms and the supposed identity of the spreading factor and hyaluronidase, the histamin liberating power of these venoms should also be taken into account, since histamin by itself is known to promote the migration of colloidal particles in the dermal tissue.

BIBLIOGRAFIA

1. Chain, E. & Duthie, E. S. — Mucolytic enzyme in testis extracts, *Nature*, **144**:977-978, 1939.
2. Duran-Reynals, F. — Studies on a certain spreading factor existing in bacterial and its significance for bacterial invasiveness, *J. Exper. Med.*, **58**:161-181, 1933.
3. Duran-Reynals, F. — Further studies on influence of testicle extract upon effect of toxins bacteria and viruses and on Schwartzman and Arthur's phenomenon, *J. Exper. Med.*, **58**:451-463, 1933.
4. Duran-Reynals, F. — Spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action, *J. Exper. Med.*, **69**:69-81, 1939.
5. Favilli, G. — Mucolytic effect of several diffusing agents and diazotized compound, *Nature*, **145**:866-867, 1940.
6. Hoffman, D. C. & Duran-Reynals, F. — Influence of testicle extract on intradermal spread of injected fluids and particles, *J. Exper. Med.*, **53**:387-398, 1931.
7. Humphrey, J. H. — Studies on diffusing factors. I. The kinetic of the action of hyaluronidase from various sources upon hyaluronic acid, with a note upon anomalies encountered on the estimation of N.-acetyl glucosamine, *Bioch. J.*, **40**:435-441, 1946.
8. Humphrey, J. H. — Studies on diffusing factors. II. The action of hyaluronidase preparations from various sources upon some substrates other than hyaluronic acid, *Bioch. J.*, **40**:442-445, 1946.
9. Madinaveitia, J. — Diffusing factors; concentration of mucinase from testicular extracts and from *Crotalus atrox* venom, *Bioch. J.*, **35**:447-455, 1941.
10. Madinaveitia, J. & Quibell, T. H. H. — Diffusing factors; effect of salts on action of testicular extracts on viscosity of vitreous humour preparations, *Bioch. J.*, **35**:456-460, 1941.

11. *McClellan, D.* — Influence of testicular extract on dermal permeability and response to vaccine virus, *J. Path. & Bact.*, 33:1045-1070, 1930.
12. *McClellan, D.* — Further observations on testicular extract and its effect upon tissue permeability, *J. Path. & Bact.*, 34:459-470, 1931.
13. *McClellan, D.* — Factor in culture filtrates of certain pathogenic bacteria which increases permeability of tissues, *J. Path. & Bact.*, 42:477-512, 1936.
14. *McClellan, D. & Hale, C. W.* — Studies on diffusing factors; hyaluronidase activity of testicular extracts, bacterial culture filtrates and other agents that increase tissue permeability, *Bioch. J.*, 35:159-183, 1941.
15. *Meyer, K. & Chaffee, E.* — Mucopolysaccharide acid of pleura and possible relation to spreading factor, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 43:487-489, 1940.
16. *Meyer, K.; Hobby, G. L.; Chaffee, E. & Dawson, M. H.* — Hydrolysis of hyaluronic acid by bacterial enzymes, *J. Exper. Med.*, 71:137-146, 1940.
17. *Meyer, K.; Hobby, G. L.; Chaffee, E. & Dawson, M. H.* — Relationship between "spreading factor" and hyaluronidase, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 44:294-296, 1940.
18. *Rocha e Silva, M.* — Histamina e Anafilaxia, S. Paulo, Gráfica e Editora Edigraf Ltda., 1946.
19. *Tarabini-Castellani, G.* — Sulla presenza di "Fattori" di diffusione in alcuni veleni animali, *Arc. Ital. Med. Sper.*, 2:969-978, 1938.

