

Ação de venenos de serpentes brasileiras sôbre a alexina ou complemento

Dr. F. Rocha Lagôa

O conhecimento acêrca da ação inativante de certos venenos de serpentes sôbre a alexina ou complemento, existe desde os trabalhos de OMOROKOV (5), SACHS & OMOROKOV (8) e RITZ (7), que verificaram a destruição do 3.^o componente do complemento (C3), quando se coloca sôro frêsko de cobaia em mistura com veneno de cobra (*Naja naja*) e incuba-se a mistura a 37°, durante 1 $\frac{1}{4}$ hora.

Posteriormente, em 1932, BIER (2) constatou que o veneno de *Bothrops jararaca* destrói uma fração diversa daquela assinalada nos trabalhos anteriores e que seria idêntica à inativada pela amônea (4.^o componente (C4)); logo a seguir, TODA & MITSUE (9) constataram que veneno viperideo atua sôbre o 4.^o componente do complemento (C4) destruindo-o, ao contrário do veneno de *Naja naja* que destrói o 3.^o componente (C3). Êsses autores não especificaram em sua publicação qual a espécie de serpente que forneceu o veneno viperideo usado. Confirmando êsses resultados, TAKANO (10), em 1936, verificou a inativação do 4.^o componente do complemento (C4) por alguns venenos viperideos (*Crotalus*, *Bothrops*, *Trimezurus*, *Mokassin* e *Daboia*), não referindo igualmente quais as espécies produtoras dos venenos utilizados.

Em 1939, VELLARD & VIANNA (11) publicaram constatações acêrca da ação de venenos ofídicos sôbre o complemento, com resultados positivos para alguns e negativos para outros. Empregaram venenos de *Naja tripudians*, *Vipera aspis*, *Trimezuros flavo-viridis*, *Crotalus terrificus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops atrox*, *Bothrops lanceolata* e *Bothrops jararacussú*.

Obtiveram resultados negativos com os venenos de *V. aspis* e *C. terrificus*, que revelaram não possuir poder inativante sôbre o complemento; positivos com os venenos de *Trimezurus* e *Bothrops* utilizados e pouco intensos com o da *Naja tripudians*.

Êsses autores não verificaram qual a fração do complemento que sofre a ação dos venenos possuidores de poder inativante.

Em vista dêsses fatos pouco definidos e não encontrando, na bibliografia consultada, referências a estudos relativos à ação de venenos de ser-

pentas do Brasil sobre a alexina ou complemento, resolvemos verificar a ação de alguns desses venenos sobre o mesmo.

Utilizamos venenos de espécies freqüentemente encontradas nas zonas rurais do país e pertencentes às famílias dos Elapideos, que corresponde à série proteoglypha e Crotalideos, que corresponde à série solenoglypha, (AMARAL) (1). Da primeira família, usamos veneno de *Micrurus frontalis*; da segunda, empregamos venenos de espécies pertencentes aos gêneros *Crotalus* e *Bothrops*. Do primeiro gênero, a única espécie encontrada entre nós é a *Crotalus terrificus*, cujo veneno foi o empregado. Do gênero *Bothrops*, utilizamos venenos das seguintes espécies: *Bothrops atrox*, *Bothrops neuwiedii*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussú*, *Bothrops cotiara* e *Bothrops alternata*, venenos esses que nos foram gentilmente fornecidos pelo Dr. JOSÉ BERNARDINO ARANTES, do Instituto Butantan de São Paulo.

MÉTODOS

A técnica utilizada para a verificação da existência do poder inativante dos venenos sobre o complemento foi quase idêntica à usada nos primeiros estudos sobre o assunto por SACHS & OMOROKOV (8), técnica esta que consiste em tomar 1 ml. de soro frêso de cobaia, ao qual se adiciona 0,4 ml. em solução salina a 15%, para o veneno crotalico e 7% para os demais. O veneno de serpente é diluído a 1/6%. Completa-se o volume para 2 ml. com água fisiológica e incuba-se a mistura em banho-maria, a 37° durante 1 $\frac{1}{4}$ hora. Findo este período, verifica-se a presença do complemento no soro estudado, adicionando-se 0,2 ml. do mesmo a um sistema hemolítico contendo 10 unidades hemolíticas por 1 ml. (diluição do soro hemolítico a 1/200) e mais 0,5 ml. de uma suspensão de glóbulos de carneiro lavados e na concentração de 5%. Completa-se o volume total para 3,5 ml. com água fisiológica.

A mistura glóbulos-hemolisinas ficou sempre em contato durante 1 hora pelo menos, antes de ser utilizada, a fim de conseguir-se assim uma perfeita sensibilização das hemácias à ação complementar.

Os sôros de cobaia dos quais usamos o complemento, quando não foram empregados logo após o seu preparo, foram sempre imediatamente guardados submerso em água gelada no refrigerador a $\pm 4^{\circ}$ C., sendo sempre pesquisada a sua atividade complementar, com menos de 24 horas após a sua obtenção.

Sòmente o veneno de *B. jararacussú* foi utilizado na quantidade de 0,8 ml. para 1 ml. de sôro frêsko, devido ao fato de apresentar nessa concentração resultados mais nítidos e constantes.

A verificação da existência de hemolise demonstrativa da ação do complemento sobre os glóbulos sensibilizados foi feita após a manutenção da mistura no banho-maria a 37° durante 1 hora.

Para constatação da fração do complemento afetada pela ação do veneno, empregou-se complemento com as frações cuja presença desejávamos verificar prèviamente destruídas. Assim, para verificar a existencia do componente no complemento inativado pelo veneno, usamos um complemento com esta fração retirada prèviamente pelo levedo, o que foi procedido conforme a técnica utilizada por COSTA CRUZ e AZEVEDO PENNA (3) e que nos deu sempre excelentes resultados. Consiste esta técnica em tomar 0,5 gr. de levedo Fleischmann (Yeast Fleischmann) em tabletes, dissolver em 20 ml. de água, aquecer durante 1 hora a 100°C., centrifugar e lavar repetidamente o centrifugado em água fisiológica, até o líquido sobrenadante tornar-se límpido. Ao depósito que contém apenas levedo, mistura-se 4 ml. de sôro recente de cobaia e incuba-se durante 2 horas em banho-maria a 37°. Findo êste período, centrifuga-se a mistura e aproveita-se o sôro sobrenadante. O complemento assim tratado acha-se desprovido do seu 3° componente (C3).

A destruição do 4° componente foi conseguida pela técnica original de GORDON, WITHEAD e WORMALL (4), com amônea e que consiste na adição a sôro recente de cobaia (1 ml.) de 0,25 ml. de amônea (NH⁴OH) a n 6/5, banho-maria a 37° durante 1 hora. Findo êste período, neutraliza-se cuidadosamente a amônea com ácido clorídrico a n 1/10 (\pm 0,75 ml. para 1 ml. de sôro). Esta técnica é delicada e deve ser realizada cuidadosamente, dando então resultados sempre constantes.

A destruição das 2 frações termolabeis do complemento (C1 e C2) foi conseguida aquecendo-se o sôro fresco a 56° durante 1/2 hora.

Os elementos assim preparados, quando não eram utilizados imediatamente após o seu preparo, foram sempre guardados imediatamente após, submergidos em água gelada, no refrigerador a 4° C., sendo empregados sempre com menos de 24 horas após a obtenção do sôro.

Com essas diversas substâncias assim preparadas, realizamos as nossas constatações.

RESULTADOS

Inicialmente, foi verificado o poder inativante dos diversos venenos utilizados sobre o complemento, usando-se a técnica anteriormente descrita.

Os resultados obtidos, conforme nos mostra o *Quadro I*, foram positivos para alguns venenos e negativos para outros. Os venenos de *M. frontalis*, e *C. terrificus* demonstram não possuir ação inativante sobre o complemento. Ao contrário, todos os venenos botrópicos utilizados mostraram-se altamente inativantes, sendo sempre destruído pela sua ação o 4º componente (C4) fração semelhante àquela sobre qual atua a amônia, conforme nos mostra o *Quadro II* e o *Esquema III*.

Aos complementos inativados pelos diversos venenos, tentou-se ainda reconstituir senão totalmente pelo menos parcialmente a sua atividade hemolítica, pela adição das frações termolábeis, separadamente, conhecidas que são as ligações existentes entre o 1º componente termolábil (C1) e o 3º componente termoestável (C3) e entre o 2º componente termolábil (C2) e o 4º componente termoestável (C4). As frações termolábeis foram obtidas pela técnica de LIEFMAN modificada por BRAUN e aconselhada por COSTA CRUZ (3), que consiste em passar uma corrente de CO₂ em solução de soro frêscio diluído a 1/10 em água destilada gelada, centrifugação, lavagem do depósito que contém as globulinas (C1), reconstituição da isotania e pH. e aproveitamento do líquido sobrenadante que contém as albuminas (C2).

Os resultados obtidos foram todos negativos, patenteando-se assim serem as frações termolábeis, isoladamente, incapazes de reconstituírem, pela sua presença, a fração inativada pelos diversos venenos botrópicos empregados. Também o uso das 2 frações termolábeis unidas não reconstituíram a fração inativada pelo veneno.

QUADRO I

| COMPLEMENTO (sôro recente de cobaia) | VENENO SOLUÇÃO 1/6% | ÁGUA FISIOLÓGICA | | COMPLEMENTO INATIVADO PELO VENENO 1 1/4 HORA | SISTEMA HEMOLÍTICO 10 U.H. E GLÓBULOS DE CARNEIRO 5% | ÁGUA FISIOLÓGICA | | RESULTADOS (HEMÓLISE) |
|--------------------------------------|------------------------|------------------|----------------------------|--|--|------------------|------------------------|-----------------------|
| 1 ml..... | M. frontalis 0,4 ml. | 0,6 ml. | Banho-maria 37° 1 1/4 hora | 0,2 ml. | 1,5 ml. | 1,8 ml. | Banho-maria 37° 1 hora | +++ |
| 1 ml..... | C. terrificus 0,4 ml. | 0,6 ml. | | 0,2 ml. | 1,5 ml. | 1,8 ml. | | +++ |
| 1 ml..... | B. atrox 0,4 ml. | 0,6 ml. | | 0,2 ml. | 1,5 ml. | 1,8 ml. | | --- |
| 1 ml..... | B. neuwiedii 0,4 ml. | 0,6 ml. | | 0,2 ml. | 1,5 ml. | 1,8 ml. | | --- |
| 1 ml..... | B. jararaca 0,4 ml. | 0,6 ml. | | 0,2 ml. | 1,5 ml. | 1,8 ml. | | --- |
| 1 ml..... | B. jararacussú 0,8 ml. | 0,2 ml. | | 0,2 ml. | 1,5 ml. | 1,8 ml. | | --- |
| 1 ml..... | B. alternata 0,4 ml. | 0,6 ml. | | 0,2 ml. | 1,5 ml. | 1,8 ml. | | --- |
| 1 ml..... | B. cotiara | 0,6 ml. | | 0,2 ml. | 1,5 ml. | 1,8 ml. | | --- |

Testemunhas:

- 1) Solução de veneno (0,5 ml.) e sistema hemolítico: ausência de hemólise (—)
- 2) Complemento normal (0,5 1/20) e sistema hemolítico: hemólise total (+++)
- 3) Água fisiológica e sistema hemolítico ausência de hemólise (—)

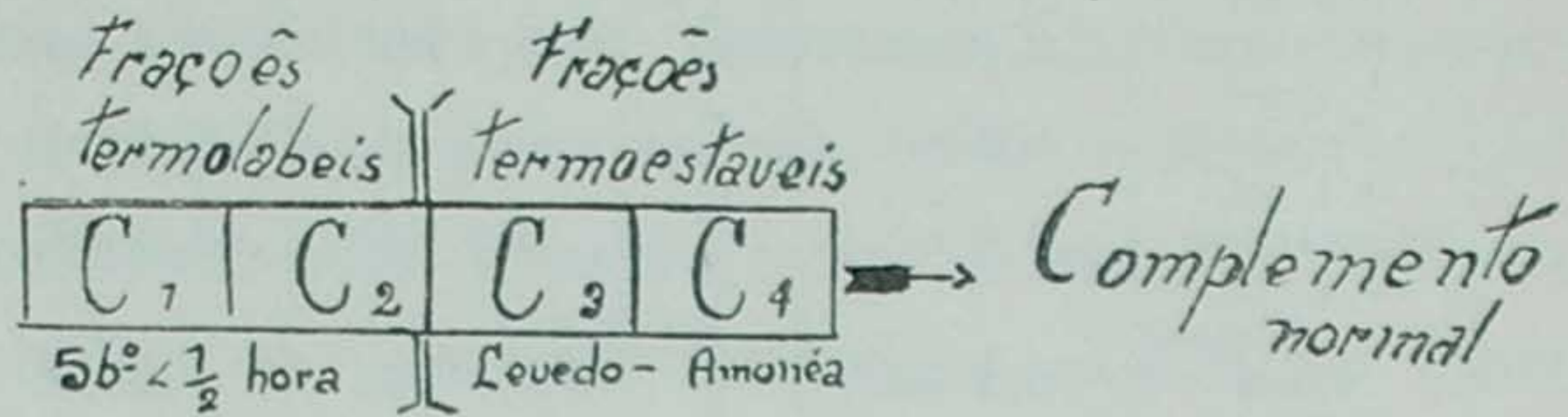
QUADRO II

| COMPLEMENTO INATIVADO PELO VENENO 0,4 ML. DE SOLUÇÃO 1/6% | COMPLEMENTO INATIVADO PELO LEVEDO (3° COMPONENTE DESTRUÍDO (C3)) | COMPLEMENTO INATIVADO PELA AMÔNEA (4° COMPONENTE DESTRUÍDO (C4)) | SISTEMA HEMOLÍTICO 10 U.H. GLÓBULOS DE CARNEIRO 5% | ÁGUA FISIOLÓGICA | | RESULTADOS (HEMÓLISE) |
|---|--|--|--|------------------|-------------------------|-----------------------|
| B. atrox — 0,2 ml..... | 0,2 ml. | — | 1,5 ml. | 1,6 ml. | Banho-maria 37°C 1 hora | +++ |
| B. neuwiedii — 0,2 ml... | 0,2 ml. | — | 1,5 ml. | 1,6 ml. | | +++ |
| B. jararaca — 0,2 ml..... | 0,2 ml. | — | 1,5 ml. | 1,6 ml. | | +++ |
| B. jararacussú — 0,2 ml.. | 0,2 ml. | — | 1,5 ml. | 1,6 ml. | | +++ |
| B. alternata — 0,2 ml.... | 0,2 ml. | — | 1,5 ml. | 1,6 ml. | | +++ |
| B. cotiara — 0,2 ml..... | 0,2 ml. | — | 1,5 ml. | 1,6 ml. | | +++ |
| B. atrox — 0,2 ml..... | — | 0,2 ml. | 1,5 ml. | 1,6 ml. | | --- |
| B. neuwiedii — 0,2 ml. ... | — | 0,2 ml. | 1,5 ml. | 1,6 ml. | | --- |
| B. jararaca — 0,2 ml... | — | 0,2 ml. | 1,5 ml. | 1,6 ml. | | --- |
| B. jararacussú — 0,2 ml. | — | 0,2 ml. | 1,5 ml. | 1,6 ml. | | --- |
| B. alternata — 0,2 ml.... | — | 0,2 ml. | 1,5 ml. | 1,6 ml. | --- | |
| B. cotiara — 0,2 ml..... | — | 0,2 ml. | 1,5 ml. | 1,6 ml. | --- | |

Testemunhas:

- Complementos inativados pelos venenos e sistema hemolítico: ausência de hemólise (—)
- Complemento inativado pelo levedo e sistema hemolítico: ausência de hemólise (—)
- Complemento inativado pela amônia e sistema hemolítico: ausência de hemólise (—)
- Complemento inativado pelo levedo +
- Complemento inativado pela amônia e sistema hemolítico: hemólise total (+++)
- Água fisiológica e sistema hemolítico: ausência de hemólise (—)

Ação de veneno de serpentes brasileiras sobre o complemento de cobaia

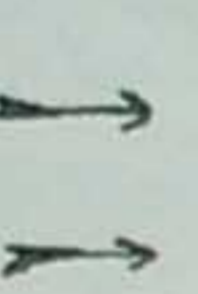


| | | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ |
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ |



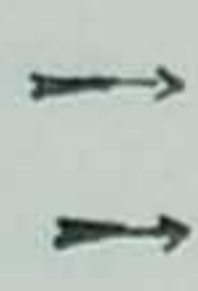
Complemento e veneno de *Micrurus frontalis*
Complemento normal

| | | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ |
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ |



Complemento e veneno de *Crotalus terrificus*
Complemento normal

| | | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | |
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ |



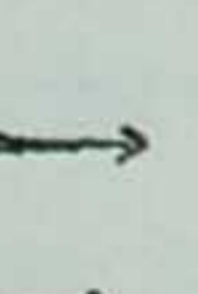
Complemento e veneno de *Bothrops atrox*
Complemento normal

| | | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | |
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ |



Complemento e veneno de *Bothrops neuwiedii*
Complemento normal

| | | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | |
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ |



Complemento e veneno de *Bothrops jararaca*
Complemento normal

| | | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | |
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ |



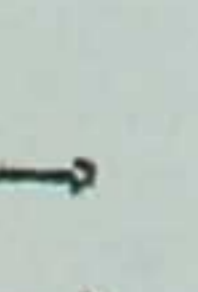
Complemento e veneno de *Bothrops jararacussu*
Complemento normal

| | | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | |
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ |



Complemento e veneno de *Bothrops alternata*
Complemento normal

| | | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | |
| C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ |



Complemento e veneno de *Bothrops cotiara*
Complemento normal

COMENTÁRIOS

Êsses resultados nos mostram que entre os diversos venenos de serpentes brasileiras estudadas, somente aqueles provenientes de serpentes do gênero *Bothrops* revelaram possuir propriedade inativante sobre o complemento de cobaia, destruindo nêle o seu 4.º componente, fração esta semelhante à destruída pela amônea, fato portanto diverso do originalmente observado por SACHS, OMOROKOV e RITZ com o veneno de *Naja naja*, que destrói o 3.º componente do complemento e semelhante ao assinalado por BIER, relativamente ao veneno de *B. jararaca*.

O fato registrado de que o veneno de *Micrurus frontalis* e *Crotalus terrificus* não inativa o complemento nos revela que esta propriedade inativante dos venenos de serpentes não está ligada às famílias a que elas pertencem e sim apenas ao seu gênero, assim o *M. frontalis*, cujo veneno não é inativante, pertence à mesma família dos Elapideos que a *Naja naja* com veneno dotado de poder inativante e o *C. terrificus*, com veneno não inativante, integra a mesma família dos Crotalideos, as quais também pertencem as diversas espécies fornecedoras dos venenos botrópicos por nós utilizados e que se mostraram grandemente inativantes.

Parece, no entanto, obedecer a certa especificidade a ação dos diversos venenos de serpentes pertencentes ao mesmo gênero, porquanto todos os venenos botrópicos por nós empregados agiram sempre inativando a mesma fração do complemento, o seu 4.º componente (C4).

Mostram-nos, ainda, êsses fatos que a ação dos venenos de serpentes sobre o complemento é variável, conforme a sua natureza, podendo serem inativantes ou não, e, quando inativantes, destruírem a 3.ª fração do complemento, como acontece com o veneno de *Naja naja*, ou a 4.ª fração, como se dá com os venenos botrópicos usados em nossas verificações.

A respeito da natureza do fator inativante contido nos venenos botrópicos, faremos oportunamente uma publicação mais detalhada.

SUMÁRIO

O autor estudou a ação inativante, sobre o complemento de cobaia, de alguns venenos de serpentes brasileiras pertencentes às famílias dos Elapideos e Crotalideos. Da primeira, foi utilizado veneno de *Micrurus frontalis*, da segunda, foram usados venenos de espécies pertencentes aos gêneros *Crotalus* (*C. terrificus*) e *Bothrops* (*B. atrox*, *B. neuwiedii*, *B. jararaca*, *B. jararacussú*, *B. cotiara* e *B. alternata*). O venenos de *M. frontalis* e *C. terri-*

ficus se revelaram incapazes de inativar o complemento, ao passo que os diversos de *Bothrops* empregados se mostraram altamente inativantes, destruindo sempre o 4.º componente do complemento (C4), fração idêntica à afetada pela ação da amônia.

SUMMARY

The author shows in this paper the results of the inactivation of complement or alexin by some Brazilian snakes venoms of the Elapidae and Crotalidae families. The venom of *Micrurus frontalis* (Elapidae family) and of *Crotalus terrificus* (Crotalidae family) did not destroy the complement; but the venoms of *Bothrops* genus (*B. atrox*, *B. neuwiedii*, *B. jararaca*, *B. jararacussú*, *B. cotiara* e *B. alternata*), (Crotalidae family) are highly active in the inactivation complement, always destroying the fourth component, which is exactly the same component that is destroyed by ammonia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) AMARAL, A.
1930
Animais venenosos do Brasil. Instituto Butantan — São Paulo.
- (2) BIER, O.
1932
Ueber Komplement-Inaktivierung durch Bothropsgift (*B. jararaca*). Zeitschr. f. Immunitätsforschung — 11 : 187-194.
- (3) COSTA CRUZ, J. e AZEVEDO PENNA, H.
1932
Ação do formol sobre a alexina de cobraia. Memórias do Inst. Oswaldo Cruz — 26 : 85-97.
- (4) GORDON, J., WITEHEAD, H. R. & WORMALL, A.
1926
The action of ammonia on complement. The fourth component. Biochem. J. 20 : 1.029-1.035.
- (5) OMOROKOV, L.
1911
Ueber die wirkung des Cobragfites auf die Komplemente. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. — 10 : 285-306.
- (6) OSBORN, T. W. B.
1937
Complement or alexin. Oxford Press. — London.

- (7) RITZ, H.
1912
Ueber die wirkung des Cobragfites auf die Komplemente. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. — 13 : 62-83.
- (8) SACHS, H. e OMOROKOV, L.
1911
Ueber die wirkung des cobragfites auf die Komplemente. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. — 11 : 710-724.
- (9) TODA, T. e MITUSE, B.
1933
Studien über die Komponenten des hämolytischens Komplements. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. — 78 : 62-83.
- (10) TAKANO, Y.
1936
Ueber die Inativeringung des Komplements, insbesondere der 4. Komponente durch verschiedene Eingriffe. Zeitschr. f. Immunitätsforschung — 87 : 29-47.
- (11) VELLARD, J. e MIGUELOTE VIANNA.
1939
Ação dos venenos ofídicos sobre o complemento. Rev. Fluminense de Medicina — 7 : 283-284.