

## PRINCIPIOS COAGULANTES E ANTI-COAGULANTES NOS VENENOS DE SERPENTES

P E L O

Dr. D. de KLOBUSITZKY

Ex - professor na outrora Univ. Real Hungara de Pécs

(Recebido em 12 de Outubro de 1949)

Os venenos naturais de serpentes, como as secreções das glândulas salivares em geral, podem ser considerados na maneira mais aproximada como misturas de diversas substâncias fisiológica, bioquímica, farmacológica e toxicologicamente ativas. Estas substâncias diferem entre si tanto sob o ponto de vista qualitativo, como quantitativo não só conforme a espécie do animal, mas ainda, mesmo dentro da mesma espécie, conforme as circunstâncias climáticas, idade, modo de alimentação e condições de vida do respetivo individuo. A maioria daquelas substâncias é do tipo de fermentos, portanto pouco acessíveis para pesquisas químico-analíticas. As experiências fisiológicas e toxicológicas dos autores contemporâneos (Beujean, Belfanti, Bognasco, Bouche, Boquet, Brazil, Cesari, Corteggioni, Delezenne, Duran, Essex, Feldberg, Ganguly, Gautrelet, Halpern, Hanut, Houssay, Hustin, Kellavay, Klobusitzky, König, Laigned-Lavastine, Launoy, Ledebt, Manwaring, Mastronardi, Negrete, Noc, Noguchi, Phisalix, Pratt Jhonson, Pristley, Rangel Pestana, Reynolds, Vellard, etc.), demonstram que nos diferentes venenos naturais de serpentes podem estar presentes substâncias que se deixam classificar de acordo com os seus efeitos, da maneira seguinte:

Princípios ativos que agem sobre o sangue total e sobre os diversos componentes do sangue. A êste grupo pertencem aquelas substâncias que favorecem ou impedem a coagulação sanguínea e ainda aquelas que provocam hemólise e outras que suspendem a capacidade de locomoção dos leucocitos.

Um outro grupo de substâncias age duma maneira muito acentuada sobre a circulação. Dentre êstes devem existir os que agem sobre o centro vasomotor e os que causam uma paralisia dos vasos periféricos.

Existem, ainda, na secreção natural de veneno, substâncias que atacam sómente os músculos estriados, alterando a permeabilidade dos mesmos, causando assim uma modificação no seu estado de entumescimento. Nós conhecemos ainda venenos que provocam contrações fibrilares do músculo cardíaco.

Acham-se nestes venenos animais substâncias especiais que agem sómente sobre os músculos lisos. A sua presença verifica-se da maneira melhor em órgãos isolados, como intestino delgado, útero e oviduto, nos quais em doses pequenas elas provocam contrações, enquanto que em doses maiores causam geralmente paralisia.

O metabolismo também pode ser influenciado por diversos venenos de serpentes. É verdade que até agora com certeza só do veneno de *Trimeresurus mucrosquamatus* foi verificado que nos coelhos, em doses de 10 mg por quilo de peso do animal, aumenta o açúcar do sangue de 200%. Esta substância age mesmo quando os nervos esplâncnicos estejam cortados e as glândulas suprarrenais extirpadas.

Quase todos os venenos de serpentes contém citolisinás em quantidades diferentes, porém facilmente verificáveis. A capacidade destes venenos de libertar histamina nos tecidos baseia-se no seu conteúdo em citolisina e consequentemente a busca queda da pressão sanguínea, característica para estes tipos de venenos, explica-se pela libertação repentina da histamina.

Também são muito frequentes nas secreções naturais as hemorraginas que não são outra coisa senão proteases de ação específica.

Diversas substâncias agem especialmente sobre o sistema nervoso. Sobre as terminações dos nervos motóricos agem elas na maneira do curare. O seu efeito, ao contrário ao do veneno de flexa, não é reversível e pode ser suspenso sómente pela administração da antitoxina correspondente. Algumas substâncias atacam sómente as terminações dos nervos sensitivos sem danificar as próprias fibras. Alguns venenos, como os de *Notechis scutatus* ou de *Crotalus terrificus* (neotropical rattlesnake) demonstram uma afinidade específica sobre o nervo ótico. Causam cegueira, mesmo em concentrações relativamente baixas ou no princípio da intoxicação. Muitos venenos de serpentes matam pela paralisia do centro respiratório; a sua principal substância neurotóxica possue, portanto, uma eletividade em relação a esta parte do sistema nervoso central.

Resumindo as partes atacadas, acima enumeradas, pelos venenos naturais, temos como resultado um grande número de princípios ativos, que podem ser resumidos como segue:

Sangue . . . . .	{ substâncias coagulantes substâncias anti-coagulantes substâncias que causam hemólise substâncias que impedem a locomoção dos leucocitos
Circulação . . . . .	substâncias que atacam o centro vasomotórico
Vasos sanguíneos . . . . .	{ substâncias que causam paralisia dos vasos sanguíneos substâncias que causam hemorragias
Metabolismo . . . . .	substância que provoca hiperglicemia
Músculos estriados . . . . .	substância que altera a permeabilidade
Músculo cardíaco . . . . .	substância que provoca contrações fibrilares
Músculos lisos . . . . .	substância que causa contração e paralisia, respetivamente
Tecidos . . . . .	substância que causa citólise
Sistema nervoso . . . . .	{ substâncias que paralisam as terminações motóricas substâncias que paralisam as terminações sensoriais substância que paralisa o centro respiratório substância que ataca o nervo óptico

Portanto, no mínimo 16 ações diferentes, sem afirmar que não possam existir ainda outros efeitos destes venenos até agora desconhecidos.

Dentre das mencionadas substâncias, fora da neurotoxina, provocadora da morte, as substâncias influentes na coagulação sanguínea são aquelas que despertaram mais cedo, o maior interesse dos pesquisadores.

F o n t a n a (1) foi o primeiro que, em 1781, descreveu alguns venenos de serpentes como coagulantes e outros como anti-coagulantes. E o costume de distinguir venenos coagulantes de anti-coagulantes permaneceu durante muitos dezenas, apesar dos resultados contraditórios de varios autores (Lacerda (2), assim como Brazil e Range Pestana (3) que consideravam os venenos do gênero *Bothrops* (denominação antiga: *Lachesis*) *in vivo* anti-coagulantes, enquanto que Noc (4) regista que os venenos destas serpentes facilitam a coagulação. S a m m a r t i n o (5) afirma que o envenenamento pelo veneno de *Bothrops alternata* (Urutú) tem por consequência uma diminuição da coagulabilidade, ao contrário de *Arthus* (6) quem indica trombose, quando a dose é pequena, e coagulação elevada no princípio, seguida por uma tendência persistente à não coagulação, quando a dose empregada for grande. O veneno de *Bitis arietans* (Puff adder) é considerado por Bea ujean (7) como coagulante, enquanto que Link (8) acha que o seu efeito é anti-coagulante. Conforme Eagle (9) o veneno do *Crotalus adamanteus* (Florida diamond black) causa coagulação e, conforme Mathews (10) o seu efeito é anti-coagulante. O veneno da *Vipera Russellii* (antiga denominação: *Daboia elegans*; nome vulgar: Daboia) segundo Lamb (11) e Hanut (12) é de efeito coagulante, enquanto que Arthus (13) e Link (8) atribuem ao mesmo propriedades anti-coagulantes.

O objeto dêste trabalho é dar um resumo, em parte baseado sobre experiências próprias, em parte sobre os mais recentes dados de outros pesquisadores, relativamente às seguintes questões: 1.º - quais os motivos destas divergências; 2.º - sob que condições um veneno dado como coagulante torna-se anti-coagulante; 3.º - as substâncias coagulantes ou anti-coagulantes serão idênticas às neurotoxinas como afirmava Faust (14) e outros, ou serão diferentes desta como Fontana (1) já pensava; 4.º - como se comportam as substâncias que influem na coagulação sanguínea sob o ponto de vista imunológico e, finalmente 5.º - quais as possibilidades de aproveitar a propriedade coagulante destes venenos para fins terapêuticos e o que devemos exigir de tais preparados.

A coagulação sanguínea, como todos nós bem sabemos, é um fenômeno complexo, no qual tomam parte fermentos, íons de cálcio e uma proteína; consequentemente basta que uma substância tenha influência sobre qualquer um destes componentes, integrantes do fenômeno de coagulação, para que a mesma seja alterada, isto é, para que o tempo de coagulação torne-se mais curto ou mais prolongado.

A primeira vista parece pouco comprehensível, como podem ocorrer discordâncias em torno da questão se um veneno dado é de efeito coagulante ou anti-coagulante, quando deveria ser suficiente verificar a sua ação sobre os diversos componentes que fazem parte do fenômeno de coagulação e sobre o sangue total. A realidade, porém, é diferente, visto que a) quase todos os venenos contêm substâncias coagulantes e anti-coagulantes e o efeito do veneno natural é o resultado da proporção das mesmas na amostra examinada; b) os resultados obtidos em componentes isolados de coagulação nem sempre são idênticos aos obtidos em sangue total, ou *in vivo*, justamente por causa da presença simultânea das substâncias de efeito coagulante e anti-coagulante e, c) muitos venenos contêm um fermento proteolítico o qual é capaz de destruir o fibrinogênio, tornando o sangue incoagulável.

A idéia que o mesmo veneno pode conter simultaneamente substâncias coagulantes e anti-coagulantes, e que o efeito observado depende das condições experimentais, é bastante antiga. Mitchell e Reichter (15) foram os primeiros que apresentaram tais dados experimentais, obtidos com o veneno de *Crotalus adamanteus*, dos quais podia partir esta suposição. As investigações posteriores, executadas em venenos oriundos de grande número de espécies de cobras (16 - 18) demonstraram claramente que o efeito daqueles venenos que possuem ação coagulante e anti-coagulante depende, tanto *in vivo* como *in vitro*, da concentração; em concentrações elevadas impedem a coagulação e em concentrações baixas favorecem a mesma.

(Aliás, este efeito duplo, variável conforme a concentração, não é peculiaridade exclusiva dos venenos coagulantes. Os extractos de medula se comportam da mesma maneira.) Nas experiências *in vivo* o efeito anti-coagulante das doses grandes fica suprimido com o tempo e, isso acontecendo, aparece o efeito coagulante. Para poder observar nítidamente estes dois efeitos precisa-se escolher doses bem certas, visto que doses muito altas podem causar hemólise que torna impossível o desenvolvimento da ação coagulante.

Os quadros que apresentamos demonstram esta variação do efeito conforme a concentração do veneno.

QUADRO I - 5 cc de sangue normal de cavalo, contendo 0,3% de oxalato de sódio + 1 cc de sol. de veneno de *Bothrops jararaca* em água fisiológica (seg Klobusitzky, [19]).

Concentr. do veneno na mistura em %	0,17	0,08	0,04	0,02	0,01	0,005	0,0025	0,0012	0,0006	0,0003
Tempo de coag.	não coagula		2'	2'	2'5"	2'5"	2'30"	3'40"	10'	12'15"

QUADRO II - Sangue natural de cavalo + 1 cc de veneno de *Bothrops jararaca* (Klobusitzky, [19]).

Concentração do veneno no sangue em %	1. <sup>a</sup> leitura 1 h depois	2. <sup>a</sup> leitura 19 h depois
2,3%	começo de hemólise	hemólise
1,39	líquido	hemólise
0,49	líquido	hemólise

QUADRO III - Sangue normal de cavalo, contendo 0,3% de oxalato de sódio + 1 cc de sol. de veneno de *Bothrops jararaca* (seg. Klobusitzky, [19]).

Concentração do veneno no sangue em %	1. <sup>a</sup> leitura 1 h depois	2. <sup>a</sup> leitura 3½ h depois	3. <sup>a</sup> leitura 19 h depois
6,9	líquido	hemólise	
4,16	líquido	hemólise	
1,4%	líquido	líquido	hemólise

**QUADRO IV** - Efeito duma fração isolada pela técnica de Klobusitzky e König (20) do veneno de *Bothrops jararaca* sobre a coagulação sanguínea do pombo *in vivo* (seg. Klobusitzky e König, [21]).

Concentração da substância no sangue em % (considerando a quantidade total de sangue do pombo como 20 cc)	TEMPO DE COAGULAÇÃO		
	antes da injeção	Sangue tirado da veia	
		20' depois da injeção	24 horas depois da injeção
0,028	7' 30"	não coagula dentro de 24 horas	1'
0,0014	3' 30"	12 horas	3' 30"
0,00028	5'	3'	20"
0,000112	3' 30"	2'	1' 20"
0,000056	5' 30"	4'	1'
0,000028	7'	30"	1' 30"
0,000014	5'	1'	30"
0,0000056	5'	1' 40"	20"

Resultados semelhantes foram obtidos por Taylor, Mallick e Ahuja (22) com os venenos de *Vipera Russellii*, *Echis carinatus* e *Naja naja*, por Billing (23) com o veneno de *Crotalus adamanteus*, por Klobusitzky e König (15) e Link (16) com o veneno de *Crotalus terrificus*, por Cesari e Boquet (24) com o de *Vipera aspis*, por Vellard (25) com os venenos das seguintes serpentes venezuelanas: *Bothrops atrox*, *B. nasuta* (Mapanare de rabo frito), *Lachesis muta*, *Crotalus terrificus* e *Micruurus lemniscatus* (Ibiboca). Muitos autores, principalmente europeus, trabalhando, provavelmente devido a escassez do seu material, sómente com solutos fortemente diluidos, podiam registrar únicamente a ação coagulante dos mesmos (veja os trabalhos de Hanut [12; 26] sobre várias espécies de *Bothrops*, de *Vipera aspis*, *V. Russellii* e *Cerastes cornutus*).

Para demonstrar a dependência do resultado das provas de coagulação do método usado quero lembrar os casos dos venenos de *Crotalus terrificus* e de *Ancistrodon piscivorus*. Quando Link (8) examinava pela primeira vez o veneno do mencionado *Crotalus* usava solutos isolados de tromboquinase, protrombina, trombina e fibrinogenio e achou que o mesmo não tem efeito coagulante; Klobusitzky e König (27) fazendo as suas provas em sangue normal de cavalo, contendo 0,3% de oxalato de sódio, observaram uma ação coagulante

bem acentuada (0,03%) tornou a coagular o sangue em 10' 50"). Link (28) repetindo posteriormente as suas experiências confirmou os resultados daqueles autores "por ser o método por eles usado mais sensível". O veneno de *Ancistrodon piscivorus* nas experiências *in vitro* de Eagle (9) não demonstrava possuir ação coagulante, enquanto que Peck e Sobotka (29) baseando-se em suas pesquisas feitas *in vivo* chegaram à uma conclusão oposta.

Os venenos de *Ancistrodon piscivorus*, *Crotalus atrox*, *C. horridus*, *Bitis arietans* e *Vipera ammodytes*, decompõem por meio de proteólise o fibrinogênio (Eagle, 9), os de *Vipera latastei*, *Crotalus ruber*, além de exercerem uma ação proteolítica, ainda destróem a protrombina (Link, 30). Por este motivo apresentam-se estes venenos, em geral, como anti-coagulantes, porém, alguns deles, sob condições experimentais especiais, podem revelar também um efeito coagulante.

Além destas causas das discordâncias nos resultados dos diversos autores a respeito do efeito sobre a coagulação, que acabamos de demonstrar, temos que contar ainda, quando se trata de autores que trabalharam com venenos comprados, muitas vezes de procedências duvidosas, com a possibilidade que o objeto de pesquisa não foi colhido com o devido cuidado ou que é uma mistura de venenos de espécies diferentes, ou que o mesmo foi mal conservado.

Devido a estes fatos não se pode estabelecer uma série, na qual se possa enquadrar as diversas espécies de acordo com a capacidade coagulante do seu veneno. Agrupando-as em ordem decrescente conforme os resultados dos diversos autores, podemos apresentar as seguintes séries:

*Bothrops jararaca* > *Lachesis muta* > *Crotalus terrificus* > *Micruurus corallinus* (Klobusitzky [19], Klobusitzky e König, [31]).

*Bothrops atrox* > *Cerastes cornutus* > *Vipera aspis* > *Vipera Russellii* > *Crotalus terrificus Cesari* e Boquet, [32]).

*Bothrops atrox* > *B. jararaca* > *B. nummifer* > *Crotalus adamanteus* > *C. horridus* > *C. terrificus* > *Notechis scutatus*, (Eagle, [9]).

*Bothrops atrox* \*) > *Vipera Russellii* > *B. neuwiedii* >

\*) *B. atrox* e *B. lanceolata* são a mesma espécie, o engano do tragicamente falecido jovem autor foi causado, provavelmente, pela denominação antiga: *Lachesis lanceolatus*. O veneno da espécie aqui designada como *B. atrox* é de Costa Rica, enquanto que o da *B. lanceolata* é do Brasil.

(Wite-tail Jararaca) > *B. lanceolata* \*) > *B. alternata* > *B. nummifer* > *Vipera aspis* > *Cerastes cornutus* > *Crotalus terrificus* (H a n u t, [33]).

*Bothrops atrox* > *Lachesis muta* > *Crotalus terrificus* > *Bothrops nasuta* > *Micrurus lemniscatus* (V e l l a r d, [25]).

A velha divergência entre os pesquisadores, se o efeito coagulante é provocado por uma substância específica ou pela neurotoxina, foi decidida, visto que K l o b u s i t z k y e K ö n i g (20) conseguiram, em 1936, por meio de precipitação fracionada da neurotoxina e outros componentes da secreção natural da *Bothrops jararaca* a separação da substância coagulante e, alguns anos mais tarde R o s e n f e l d e R u b i n s t e i n (34) obtiveram o mesmo resultado, precipitando o veneno de *Notechis scutatus* por meio de HCl.

A substância obtida do veneno da *B. jararaca*, é denominada pelos autores mencionados como "Haemocoagulase", e mostra, em comparação com o veneno natural, as seguintes diferenças: a) não revela ação anti-coagulante, nem em concentração muito elevada (0,06%), e b) reduz o tempo de coagulação à metade daquele que foi encontrado como mais curto quando se usava venenos naturais. Em experiências feitas *in vivo* verificou-se que a substância isolada numa concentração de 0,000.000.05% ainda apressa bem sensivelmente a coagulação sanguínea. A sua toxidez é igual a 1/11 - 1/12 do veneno natural.

A fração isolada do veneno de *Notechis scutatus* revelou possuir efeito coagulante muito maior do que a sua substância de partida e era 1.500 vezes menos tóxica do que aquela.

A composição química de ambas as substâncias é, por enquanto, desconhecida, visto que, devido a escassez do respetivo material, não foi possível analisá-las, mas são, sem dúvida, fermentos (H a r g r e a v e s, 35). Pela natureza fermentácea dos componentes coagulantes fala, além de diversos argumentos baseados sobre suas condições de adsorpção, termolabilidade, caráter coloidal, sensibilidade para os agentes químicos, conhecidos como "venenos de fermentos" ainda o

\*) Vide nota pg. 17.

fato que conhecemos certos venenos cujos princípios neurotóxicos e coagulantes demonstram diferenças quanto às suas temperaturas de inativação. Assim, p. ex., a neurotoxina da *Bothrops atrox* de Costa Rica fica inativa a 65°C, a da *Bothrops jararacussu* a 110°C, enquanto que os seus princípios coagulantes ficam destruidos a 80°C e 85°C, respectivamente (Klobusitzky, 36).

Como venenos de ação puramente anti-coagulante podemos considerar, baseando-nos sobre resultados uniformes de diversos autores, os das seguintes espécies: *Acanthopis antarcticus*, *Acistrodon blomhoffii*, *Bungarus fasciatus*, *Bitis arietans*, *Crotalus ruber*, *Denisonia superba*, *Merremia haemachates*, *Micrurus frontalis*, *Naja flava*, *Naja haie*, *Naja naja*, *Vipera ammodytes* e *V. mesocoronis* (também conhecida por *V. bosniensis*, Bosnian viper) (Kellaway, [37], Mednikyan, [38], Brasil e Rangel Pestana [39], Link [8], Eagle [9], Klobusitzky e König [27], Cesari e Boquet [32]).

Conforme a opinião unânime de quase todos os autores o efeito anti-coagulante é provocado por uma substância, provavelmente de natureza enzimática, a qual destroi a protrombrina; alguns, porém, como p. ex., os venenos de *Bitis arietans* e *Crotalus ruber*, contém ainda uma protease que decompõem o fibrinogênio.

O comportamento imunológico dos princípios coagulantes e anti-coagulantes foi pesquisado por vários autores. O quadro que segue demonstra os resultados.

**QUADRO V - Poder neutralizante de diversos antivenenos  
em relação aos componentes coagulantes e anti-coagulantes.**

Antiveneno obtido pela imunização do ... de ...	Poder neutralizante da substância .. . do veneno de .... (+ neutraliza — não neutraliza)	Autor
veneno de <i>Crotalus terrificus</i>	— Haemocoagulase — coagulante de <i>Bothrops jararaca</i> + neurotóxica de " " — " de <i>B. atrox</i> — " de <i>B. flavoviridis</i>	Klobusitzky e König (15) Vellard (40) "
Haemocoagulase	— coagulante de <i>Crotalus terrificus</i>	Klobusitzky e König (41)
venenos de <i>Bitis arietans</i> e <i>Sepedon haemachates</i>	+ coagulante de <i>Cerastes cornutus</i> + " de <i>Vipera aspis</i> + " de <i>V. russellii</i> — neurotóxica de <i>V. russellii</i> — " de <i>C. terrificus</i> — " de <i>B. atrox</i> + " de <i>V. lebetina</i> + anti-coagulante de <i>Naja naja</i> + " de <i>N. flava</i>	Cesari e Boquet (32) " " " " " Cesari e Boquet (42) Cesari e Boquet (32)
Antiveneno preparado pelo Inst. de doenças infeciosas de Toquio sem indicação das respetivas serpentes	— coagulante de <i>Crotalus terrificus</i> — " de <i>Bothrops jararaca</i> — " de <i>B. atrox</i> + " de <i>B. flavoviridis</i>	Vellard (40)
veneno de <i>Vipera aspis</i>	— coagulante de <i>Crotalus terrificus</i> — " de <i>Bothrops jararaca</i> — " de <i>B. atrox</i> — " de <i>B. flavoviridis</i> + " de <i>Cerastes cornutus</i> + " de <i>Vipera lebetina</i>	Vellard (40) " " " Cesari e Boquet (42)
veneno de <i>Vipera russellii</i>	— coagulante de <i>Echis carinata</i>	Taylor, Mallick e Ahuja (22)
veneno de <i>Echis carinata</i>	— coagulante de <i>Vipera russellii</i>	Ahuja (22)
veneno de <i>Cerastes cornutus</i>	+ coagulante de <i>Vipera aspis</i>	Cesari e Boquet (42)
venenos de <i>Micruurus corallinus</i> e <i>M. frontalis</i>	— haemocoagulase — coagulante de <i>Bothrops jararaca</i>	Klobusitzky e König (15)
veneno de <i>Lachesis muta</i>	+ haemocoagulase + coagulante de <i>Bothrops jararaca</i>	"
veneno de <i>Naja naja</i>	+ coagulante de <i>Vipera lebetina</i>	Cesari e Boquet (42)

Os dados deste quadro apresentam dois fatos muito interessantes, a saber: os casos dos antivenenos de *Crotalus terrificus* e de *Bitis arietans*. O primeiro, apesar de ter neutralizado a ação neurotóxica do veneno de *Bothrops jararaca*, não neutralizou nem o poder coagulante do mesmo, nem tão pouco a substância coagulante isolada daquele mesmo veneno. O segundo antiveneno comportou-se opostamente, isto é, neutralizou o poder coagulante, mas não o efeito neurotóxico do veneno de *Vipera russellii*. As serpentes do gênero *Bothrops* e do gênero *Crotalus* são da mesma família (Crotalidae), e as dos gêneros *Bitis* e *Vipera*, respectivamente, pertencem a mesma Sub-família, Viperinae.

Conforme o nosso vêr estes fatos tem certa importância sob o ponto de vista da biologia geral, visto que os mesmos significam que a estrutura química das neurotoxinas e dos demais componentes da secreção natural é independente ou, talvez, é melhor dizer, não forçosamente depende da posição zoológica do respetivo animal produtor. Seria naturalmente falso querer concluir que a classificação hodierna dos ofídios venenosos seja errada, inexata ou biologicamente desnatural. Nada disso, sómente temos que reconhecer o fato, que o "milieu", as condições de vida, o modo de viver exercem uma influência tão forte, tão profunda sobre estes animais, que as suas secreções venenosas, originalmente talvez quase idênticas, sofreram alterações mais ou menos profundas. As já lembradas pesquisas de Vellaard (40) demonstram claramente que os venenos das serpentes venezuelanas diferem profundamente dos da América Central e do Sul, da mesma espécie.

Quanto ao caráter antigênico do princípio coagulante isolado, existe, por enquanto, conforme sabemos, uma indicação unica, e referente ao princípio anti-coagulante, nenhuma. Klobusitzky e König (41) imunizaram pela haemocoagulase duas cabras e acharam que os sôros assim obtidos foram bem mais fracos em relação ao poder coagulante do que os antivenenos obtidos por meio de imunização comum, isto é, por veneno natural. Eles atribuem, portanto, à substância coagulante um caráter de hapteno.

Diante da ação coagulante muito acentuada dos venenos oriundos de mais de uma duzia de espécies de serpentes, seria de admirar se não fosse tentado usá-la para fins terapêuticos. Mas isto não aconteceu. Ainda numa época em que os nossos conhecimentos a respeito do mecanismo da ação coagulante eram bastante rudimentares, já dois alopatas norte-americanos, Peck (43) e Frank (44) experimentaram o veneno da víbora aquática (*Ancistrodon piscivorus*), no tratamento de hemorragias, aplicando-o em fortes diluições. Eles

partiram da observação de Peck e Sobotta (29) segundo a qual ratos injetados com pequenas doses (0,1 mg) de veneno da víbora mencionada, se mostravam refratários à evolução do fenômeno de Schwartzman. Devido aos resultados favoráveis obtidos por Peck e Frank em poucos casos clínicos, tanto norte-americanos, como europeus, iniciaram estudos sobre o tratamento de hemorragias com as mais diversas causas usando, além do veneno de *Ancistrodon*, venenos de *Vipera russellii*, *Notechis scutatus*, *Cerastes cornutus*, *Naja naja*, *Bothrops atrox* (Koressios, [45], Mc Farlane e Barnett, [46], Rosenfeld e Lenke, [47], Baker e Gibson, [48], Peck e Rosenthal [49], Peck e Goldberger, [50], Peck, Crimmins e Erf, [51], Hance, [52], Hanzséros [53] e Sergeant [54]).

Relativamente ao valor terapêutico a conclusão que se pode tirar destas publicações é, em poucas palavras a seguinte: os componentes coagulantes dos venenos ofídicos são capazes de sustar as hemorragias parenquimatosas ou capilares causadas ou por diminuição da coagulabilidade do sangue ou, em indivíduos com coagulabilidade normal, quando a hemorragia é uma consequência de ferimentos ou decomposição tissular não acompanhados por processos inflamatórios. Também não dão resultados nas hemorragias de origem endócrina das mulheres.

Na maior parte os solutos de veneno empregados na clínica eram, e ainda o são, diluídos numa base empírica, o que produz não só uma atividade variável e impossibilita a comparação de dois produtos de diferentes origens, mas ainda o teor de albumina existente nos mesmos frequentemente causa também reações alérgicas (51). Além disso, com o tempo nota-se uma diminuição acentuada no poder coagulante, circunstância que pode causar surpresas desagradáveis para o clínico.

Entre nós, o uso de anti-coagulantes é bastante espalhado e os resultados são, conforme testemunham as respetivas publicações (Freire, [55] Vaz e Pereira, [56], Barbosa, [57], Buchert, [58], Azevedo [59]) - em geral satisfatórias.

Nos parece que o interesse pelo aproveitamento terapêutico dos venenos ofídicos coagulantes aumentou nos últimos anos, pelo menos o Conselho de Farmácia e Química dos Estados Unidos (The Council on Pharmacy and Chemistry) já se manifestou favoravelmente à sua introdução (60), e o 1º Congresso Pan-Americano de Farmácia, realizado em fins deste ano em Havana, incluiu nos seus temários oficiais o da aplicação destes venenos na farmácia. Como nós tivemos a hon-

ra de ser convidados pela nossa Academia Nacional de Farmácia para relatar este assunto e apresentar sugestões para as normas das especialidades farmacêuticas preparadas sob a base de venenos animais, para serem submetidas à aprovação daquele certame Pan-Americano, achamos oportuno pôr à vista neste lugar as nossas sugestões já apresentadas e unânimemente aceitas não só pela competente comissão nacional, mas também pelo congresso. Foram as seguintes (61):

"A fixação de normas para as especialidades coagulantes é relativamente simples, visto que dispomos de técnicas que permitem o dosamento do poder coagulante dos preparados, de modo que a nossa tarefa pode ficar restringida para apresentar propostas no sentido que sejam estabelecidos para tais especialidades a) o seu poder coagulante por unidade, b) o critério para a sua toxidez e, c) a indicação obrigatória do prazo de sua validade.

Para poder indicar e controlar o poder coagulante destes preparados temos a necessidade de estabelecer uma unidade de medida. Propomos introduzir e estabelecer a unidade coagulante, para a qual sugerimos a definição seguinte: uma unidade coagulante é aquela quantidade do suposto fermento de coagulase, oriundo de serpente, que, contida em 1 cc de água fisiológica, justamente é suficiente para tornar a coagular completamente (até «hard clotting») 5 cc de sangue normal de cavalo, contendo 0,3% de oxalato de sódio dentro de 9 a 10 minutos, à temperatura ambiente. Queremos adiantar logo, que esta unidade corresponde exatamente à dose terapêutica para um adulto. Experimentando um preparado correspondente a esta exigência em animais homoiotermos, injetando quantidades proporcionais ao seu peso (tomando como base 70 kg para o peso dum homem adulto) por via endovenosa, verifica-se que o tempo de coagulação sanguínea diminui, já alguns minutos após a aplicação, com bastante exatidão para a terça parte do seu valor normal e permanece neste nível pelo menos 24 horas.

Fazendo a exigência que uma dose indicada para o tratamento de adultos contenha uma unidade coagulante, asseguraremos aos produtos desta natureza uma uniformidade segura e facilitaremos o seu uso nas crianças, visto que o efeito do preparado assim padronizado é proporcional ao peso da pessoa na qual o mesmo tem que ser empregado.

Para a determinação e controle do poder coagulante destes produtos estamos propondo estabelecer duas provas, sendo uma a ser executada *in vitro*, e outra a ser feita *in vivo*.

Para a prova *in vitro* sugerimos adotar a técnica seguinte: colocar em cada um de uma série de tubos de ensaio de diâmetros iguais, 5 cc sangue normal de equino, contendo 0,3% de oxalato de sódio e juntar depois 1 cc de diferentes diluições de soluto do veneno a ser acondicionado. A diluição que torna a coagular completamente o sangue dentro de 9 a 10 minutos, à temperatura ambiente (20 a 22°C), deverá ser considerada como adequada para o uso terapêutico.

Como prova *in vivo* poderá ser usada, conforme as nossas experiências, qualquer espécie de animal homoiotermo e propomos que a mesma seja feita da seguinte maneira: faz-se do preparado que contém 1 unidade coagulante em 1 cc, uma diluição que contenha para cada quilograma de peso do animal teste, por cc, 1/70 daquela unidade em água fisiológica. Determina-se então o tempo de coagulação do animal e injeta-se em seguida ao mesmo, por via endovenosa, 1 cc do soluto e tira-se, depois de 20 minutos e 24 horas uma prova de sangue, para determinar os respectivos tempos de coagulação, que mostram uma diminuição correspondente a 1/3 do valor normal.

Como critério de toxidez sugerimos exigir que 1,5 cc do produto, contendo por cc uma unidade coagulante, contenha menos do que uma unidade pombo e, ainda, a ausência completa de proteínas coaguláveis por fervura \*).

Deve-se exigir a indicação do prazo de validade também em caixa embalagem quando o preparado é guardado à temperatura ambiente.

A isotonía dos produtos deverá ser verificada de acordo com as respetivas provas fixadas na farmacopéia mais moderna do nosso Continente, i. é, na 13<sup>a</sup> edição da Farmacopéia dos Estados Unidos (U. S. P. XIII)

Relativamente à qualidade e quantidade da substância conservadora achamos ser suficiente adotar as respetivas determinações referentes aos sôros antitóxicos da mencionada farmacopéia."

Ao terminar esta palestra "entre amigos" queremos manifestar um único desejo: que os fatos, ora apresentados sejam acolhidos e interpretados pelos nossos prezados colegas no sentido, que os mesmos nada mais são de que uma nova e modesta prova, porém positiva, da capacidade criadora das modernas ciências naturais.

\*) Uma unidade pombo é a quantidade mínima dum veneno de serpente, que, dissolvida em 2 cc dum soluto isotônico à temperatura de 37°C, quando injetada por via endovenosa a um pombo adulto tendo aproximadamente 300 gr de peso e mantido previamente 6 horas em estado de jejum, justamente é suficiente para causar a morte do animal teste, observado à temperatura ambiente, dentro dum prazo fixado para cada espécie de veneno sob sintomas de intoxicação característicos para o veneno em questão (62).

#### SUMMARY

The A. — after giving a short summary of 16 different effects of the snake venoms — discuss partly on the basis of his own experimental data partly on most recent ones of other investigators the following questions:

1 - What is the reason of the discrepancies published in the literature concerning the influence of any venoms on the blood coagulation.

2 - Under which conditions does a certain venom known as a coagulant behave as an anticoagulant.

3 - Are the coagulant or anticoagulant substances identical with the neurotoxins as maintained by Faust and others or different substances as already Fontana believed them to be.

4 - How do substances that influence blood coagulation behave from the point of view of immunology.

5 - Which are the possibilities of their application for therapeutic purposes, and what can be expected from such preparations.

## B i b l i o g r a f i a

- 1 - 1922, Fontana, citado p. Phisalix, M.: Animaux venimeux et venins, t. II Ed.: Masson & Cie., Paris.  
**2** - 1878, Lacerda Filho: Archivo Mus. Nac. Rio de Janeiro, 2:1. — **3** - 1909, Brazil, V. e Rangel Pestana, B.: Rev. Meu. S. Paulo (Brasil), 12:375. — **4** - 1904, Noe, F.: Ann. Inst. Pasteur, Paris, 18:387. — **5** - 1917, Sammartino, S.: Tese de doutoramento, Esc. Veterin. B. Aires. — **6** - 1912, Arthus, M.: Arch. internat. Physiol., 12:369. — **7** - 1915, Beaujean, R.: Bull. Soc. Pathol. exot., 6:50. — **8** - 1935, Link, T.: Zeitschr. Immunitätsforschg., 85:504. — **9** - 1937, Eagle, H.: J. exp. Med. 65:613. — **10** - 1828, Matthews, A.: Arch. de Sci. Biol., 12:145. — **11** - 1903, Lamb, G.: Scient. Mem. by Off. of the Med. San. Dept. Gov. of India, fasc. 3.  
**12** - 1938, Hanut, CH.: Arch. Internat. Physiol., 47:361. — **13** - 1919, Arthus, M.: C. R. Soc. de Biol., 82:1156; 82:1158-**14** 1907, Faust, E. St.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol., 56:236  
*idem*, 1911, 64:244. — **15** - 1886, Mitchell, S. W. and Reichenert, E. T.: Smithsonian contributions to knowledge, Washington. — **16** - 1938, Gessner, O.: Tierische Gifte, em Heubner, W. - Schüller, J.: Handbuch d. exp. Pharmakol., vol. 6, pg. 1-84 Ed.: J. Springer, Berlin. — **17** - 1940 v. Klobusitzky, D.: Wiener klin. Wochenschr., 53-276. — **18** - 1941, *idem* Ergebnisse d. Hygiene, Bakteriol. Immunitätsforschung u. exp. Ther., 24:226-265. Ed. J. Springer, Berlin, — **19** - 1935, *idem* Arch. exp. Pathol. Pharmakol., 179:204. — **20** - 1936, v. Klobusitzky, D. und König, P.: Arch. exp. Pathol. Pharmakol., 181:387. — **21** - 1936, *idem* Arch. exp. Pathol. Pharmakol., 182:577. — **22** - 1935, Taylor, J. Mallick, S. M. K. and Ahuja, M. L.: Indian J. Med. Res. 23:131. — **23** - 1930, Billin, W. McG.: J. Pharmacol. exper. Ther., 38:173. — **24** - 1935, Cesari, E. et Boquet, P.: Ann. Inst. Pasteur, Paris, 55:307. — **25** - 1938, Vellard J.: Ann. Inst. Pasteur, Paris. 60:511. — **26** - 1939, Hanut, CH. Arch. internat. Physiol., 48:1. — **27** - 1936, Klobusitzky, D. und. König, P.: Zeitschr. f. Immunitätsforschg., 89:145. — **28** - 1937, Link, T.: Zeitschr. f. Immunitätsforschg., 90:352. — **29** - 1931, Peck, S. M. and Sobotta, H.: J. exper. Med., 54:407. — **30** - 1938, Link, T.: Zeitschr. f. Immunitätsforschung., 92:133. — **31** - 1936, v. Klobusitzky, D. und. König, P.: Zeitschr. f. Immunitätsforschg. 87:202. — **32** - 1937, Cesari, E. et Boquet, P.: Ann. Inst. Pasteur, Paris, 58:6. — **33** - 1938, Hanut, CH.: Arch. Internat. Physiol., 47:377. — **34** - 1941, Rosenfeld, S. and Rubinstein, J.: J. Labor. Clinical Med., 27:45. — **35** - 1944, Hargreaves, A. B.: Rev. Brasileira Biol., 4(3):367. — **36** - 1938 v. Klobusitzky, D.: Deutsche Zeitsch. ges. gerichtl. Med. 30:156. — **37** -

1937, Kellaway, C. H.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 60:1. — 38 - 1937, Mednikyan, G. A.: Bull. Biol. Med. exp. U.R. S. S., 3:602. — 39 - 1909, Brazil, V. e Rangel Pestana, B.: Rev. Med. S. Paulo (Brasil), 12:439. — 40 - 1930, Vellarid, J.: Ann. Inst. Pasteur, Paris, 44:148. — 41 - 1937, Klobusitzky, D. und König, P. Mem. Inst. Butantan, 11:149. — *idem* 1938, Zeitschr. Immunitätsforschg., 92:418. — 42 - 1937, Cesari, E. et Boquet P.: C. R. Séances Soc. Biol., 124:335. — 43 - 1932, Peck, S. M.: Proc. Soc. exper. Biol. Med., 29:579. — 44 - 1932, Frank, R. T.: Amer. J. Obstetr., 24:574. — 45 - 1935, Koressios, N. T.: Le venin de cobra, son action physiologique, ses indications, thérapeutiques, Ed.: Maloine, Paris. — 46 - 1934, Macfarlane, R. M. and Barnett, N.: Lancet, 227:985. — 47 - 1935, Rosenfeld, S. and Lenke, S. E.: Amer. J. med. Sci., 190:779. — 48 - 1936, Baker, G. A. and Gibson, P. C.: Lancet, 230:428. — 49 - 1935, Peck, S. M. and Rosenthal, N.: J. amer. med. Assoc., 104:1065. — 50 - 1933, *idem* and Goldberger, M. A.: Amer. J. Obstetr., 25:887. — 51 - 1935, *idem* Crimmins, M. L. and Erf, L. A.: Proc. Soc. exper. Biol. Med., 32:1525. — 52 - 1937, Hance, J. B.: Ind. med. Gaz. nr. 2. — 53 - 1937, Hanzséros, J., cit. p. v. Klobusitzky, D.: Klin. Wochenschr., 16:669. — 54 - 1940, Hattyasy, D., comun. pess. Autor. — 55 - 1937, Sergent, E.: Arch. Inst. Pasteur, Algier, 15:20. — 56 - 1943, Freire, R.: Rev. Brasil. Cir., 12:197. — 57 - 1944, Vaz, E. e Pereira, M.: Ann. Inst. Pinheiros (S. Paulo), 7 (4):45. — 58 - 1944, Barbosa, A.: Rev. Bras. Biol., 4:367. — 59 - 1945, Buchert, Rev. Bras. Med., 2:189. — 60 - 1946, Azevedo, Rev. Paulista Med., 29:105. — 61 - 1941, *idem* J. Amer. med. Assoc., pg. 2521. — 62 - 1944, *idem* J. Amer. med. Assoc., pg. 825. — 63 - 1948, de Klobusitzky, D.: Bol. Acad. Nac. Farm., 10(2):627 - Rio de Janeiro.