

Modificaciones sanguíneas provocadas por los venenos

ACCION HEMOLITICA Y VARIACIONES DE LA RESISTENCIA GLOBULAR *IN VIVO*

Por J. VELLARD

En una memoria precedente, en colaboración con Miguelote Viana (*Annales Inst. Pasteur*, 55, 46, 1935), hemos estudiado las variaciones de los glóbulos sanguíneos en el curso de la intoxicación ofídica en el perro y la rata. Retornando a esas investigaciones interrumpidas por diversas misiones biológicas en América del Sud nos ocuparemos ahora de las variaciones de las propiedades hemolíticas del suero y de la resistencia globular en el perro.

La acción hemolítica de los venenos *in vitro* tema de numerosos trabajos es aún mal conocida *in vivo*. En el curso de la intoxicación ofídica las propiedades fosfatidásicas de los venenos, factores activos de la hemólisis, se ejercen a la vez sobre los elementos del plasma y sobre los glóbulos. Los venenos de Viperidos y los de algunos Colubridos poseen además propiedades coagulantes y proteásicas cuya acción tiende a trabar la hemólisis y a reforzar la resistencia globular. Según las fases de la intoxicación los resultados observados varían y pueden alejarse mucho de los que dejaría prever el estudio del poder hemolítico del veneno *in vitro*.

La mayor parte de los autores, teniendo en cuenta los hechos *in vitro*, se han limitado a señalar *in vivo* las alteraciones y las variaciones numéricas de los glóbulos sanguíneos. Pocos trabajos han sido consagrados a las modificaciones de la resistencia globular o a las condiciones de aparición de las hemolisinas circulantes.

Troisier y Richet han sido los primeros en poner en evidencia la disminución de la resistencia globular producida por los venenos no coagulantes de los Colubridos (*Naja tripudians*).

La acción de los venenos de Crotalinos de la América del Sud, a la vez coagulantes y proteolíticos, es más compleja. En la Argentina, Houssay y sus colaboradores, entre otros Aquino, han observa-

do después de la inyección de venenos de ese grupo por vía venosa un aumento inicial de la resistencia globular (diferencias de 0,02 a 0,06 % en el título de las soluciones salinas necesarias para producir hemólisis) que atribuyen demasiado exclusivamente a la precipitación del fibrinógeno en el momento del shock provocado por los venenos coagulantes. El fibrinógeno precipitado depositándose sobre los glóbulos los recubriría de una capa protectora. Esta elevación inicial de la resistencia globular, notada solamente por esos autores con glóbulos no lavados, es seguida, o no, de una disminución posterior de acuerdo con las propiedades hemolíticas más o menos marcadas de cada veneno.

En todos estos trabajos la resistencia globular ha sido estudiada en relación a soluciones salinas hipotónicas. Los resultados obtenidos así no informan sobre las variaciones de la resistencia globular a las hemolisinas formadas en el plasma al contacto de los venenos (J. Vellard, *C. R. de Sciences*, 208, 669, 1939). Es fácil verificarlo *in vitro*. Glóbulos de caballo, lavados, puestos en contacto durante una hora con una solución de veneno al 1‰ muestran frente a las soluciones salinas hipotónicas una disminución de resistencia en relación directa con la actividad hemolítica e inversa al poder coagulante del veneno empleado. La resistencia se eleva ligeramente con los venenos muy coagulantes y poco o no hemolíticos.

La resistencia globular a la acción hemolítica de los venenos es al contrario aumentada en las mismas condiciones. La adición de suero fresco a glóbulos lavados, e incubados durante una hora con una solución de veneno, provoca una hemólisis más lenta y más difícil que en los tubos testigos donde el suero y el veneno se añaden simultáneamente a los glóbulos, sin incubación previa (venenos hemolíticos poco o no coagulantes); con venenos hemolíticos y muy coagulantes la hemólisis en esas condiciones está fuertemente disminuída o desaparece (*C. R. Ac. Sciences*, 208, 538, 1919).

En el curso del envenenamiento ofídico aparecen propiedades hemolíticas en el plasma de los animales; producen una lisis más o menos fuerte de los propios glóbulos y liberación de la hemoglobina; en ciertos casos el suero se vuelve lactecente. Investigaciones realizadas con los venenos de *Naja tripudians* y de *Bothrops neuwiedii* han demostrado una disminución considerable del fósforo lipídico pudiendo alcanzar 60 % de los ácidos grasos (22 %) y de las substancias grasas totales (D. Potick).

En una primera memoria (*Annales Inst. Pasteur*, 49, 445, 1932), en colaboración con Miguelote Vianna, hemos indicado que el veneno de *Bothrops atrox* (del noreste del Brasil) produce general-

mente en el perro una disminución inmediata de las propiedades hemolíticas naturales del suero para los glóbulos lavados de carnero seguido de una elevación posterior transitoria, y de una nueva baja muy prolongada. La elección de glóbulos de carnero como reactivo introduce un factor extraño en este estudio estableciendo una confusión entre dos hechos distintos: las variaciones de hemolisinas naturales perro carnero y la formación de hemolisinas nuevas bajo la acción del veneno.

Para disociar estos dos fenómenos, estudiaremos comparativamente en este nuevo trabajo las variaciones de las propiedades hemolíticas del suero de perro para sus propios glóbulos y para glóbulos extraños de caballo y carnero.

PARTE EXPERIMENTAL

Doce ejemplares de veneno han sido estudiados: *Naja tripudians* (Bombay); *Elaps lemniscatus* L., serpiente coral (noreste del Brasil); *Lachesis muta* L. (noreste del Brasil), cuatro ejemplares de veneno de *Crotalus terrificus* Laur., (de Venezuela, del noreste del Brasil, del Brasil Central y de la Argentina); dos ejemplares de veneno de *Bothrops atrox* L. (Venezuela y noreste del Brasil); *B. jararaca* Wied (Río de Janeiro); *B. erythromelas* Am. (noreste del Brasil) y *B. alternata* D. y B. (Argentina).

Los diversos ejemplares de veneno de *C. terrificus* y de *B. atrox* estudiados han demostrado diferencias considerables en sus propiedades ya señaladas en publicaciones precedentes (*C. R. Ac. Sciences*, 204, 1369, 1937; *ibíd.*, 1679, 1937).

Todas estas investigaciones han sido realizadas en el perro, cuyo suero y glóbulos son muy sensibles a la acción del veneno, algunas veces por vía intravenosa, algunas veces por vía intramuscular. La vía peritoneal, demasiado dolorosa con los venenos de Crotalinos, no ha sido utilizada sino para los venenos de *Naja* y de *Elaps*. Los animales se fijan sobre una mesa de operación sin anestesia. Las muestras de sangre han sido obtenidas por punción cardíaca; primero antes de la inyección del veneno; luego a intervalos variables después de ésta, generalmente 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos; las sangrías se espacian luego hasta la muerte o el restablecimiento.

Se han realizado las investigaciones siguientes:

1º) Poder hemolítico del suero para los propios glóbulos normales (recogidos antes de la inyección del veneno y lavados).

2º) Poder hemolítico del suero para los glóbulos lavados del carnero.

3º) Poder hemolítico del suero para los glóbulos lavados del caballo.

4º) Poder hemolítico *in vitro* del suero para los propios glóbulos normales (recogidos antes de la inyección y lavados) en presencia de un veneno hemolítico (*Lachesis muta*).

5º) Resistencia globular a las soluciones hipotónicas.

6º) Resistencia globular a la acción hemolítica del veneno de *Lachesis muta* en presencia del suero normal de caballo.

El tiempo de coagulación y el aspecto del suero están anotados durante cada prueba. Los glóbulos (perro, caballo, carnero) obtenidos por agitación de la sangre con perlas de vidrio se lavan inmediatamente después de las sangrías por tres veces en una solución de cloruro de sodio al 9,5 ‰. Las suspensiones utilizadas eran normales (llevadas al volumen primitivo de la sangre), o diluidas al 5 %.

RESULTADOS

Cuarenta perros han sido utilizados. Los resultados obtenidos pueden reunirse en tres grupos según las propiedades hemolíticas y coagulantes de los venenos:

a) Venenos hemolíticos, poco o no coagulantes: *Naja tripudians*, *Elaps lemniscatus*.

b) Venenos hemolíticos y coagulantes: *Crotalus terrificus*, *Lachesis muta*, *Bothrops atrox.*, *B. erythromelas*.

c) Venenos coagulantes, poco o no hemolíticos: *Bothrops alternata*, *B. jararaca*.

A) *Venenos hemolíticos, poco o no coagulantes.* — Tomaremos como tipo el veneno de *Naja tripudians*, *in vitro* fuertemente hemolítico (Un. hem. 0,02), anticoagulante (Un. a. coag. 0,2), y sin acción proteolítica.

La formación de autohemolisinas ha sido evaluada haciendo actuar dosis fijas de suero de perro (0,1 c. c.) sobre dosis crecientes (0,10 a 1,5 c. c.) de glóbulos del mismo animal, en suspensión al 5 %, recogidos antes de la inyección del veneno; baño-maría 37°; lectura a los 30 minutos.

Casi en seguida después de la inyección intravenosa el suero se vuelve hemolítico para sus propios glóbulos (fase positiva); en uno de nuestros animales dos minutos después de la inyección 0,1 c. c. de suero hemolizaba totalmente en las condiciones indicadas 0,2 c. c. de glóbulos. El poder autohemolítico del suero pasa por un máximo entre 2 y 5 minutos y luego baja progresivamente y cae a 0 (fase

negativa) antes del fin de la primera hora (entre 40 y 60 minutos de promedio). Se obtiene de esta manera una curva muy regular.

Después de las inyecciones intramusculares o intraperitoneales los resultados son en conjunto idénticos a los precedentes, pero presentan cierto desplazamiento, las hemolisinas formadas en los cinco primeros minutos alcanzan su máximo de intensidad hacia los quince minutos y desaparecen aún antes de terminar la primera hora.

Reemplazando en la reacción precedente los *glóbulos de perro por los de carnero*, los resultados son totalmente diferentes. Esos glóbulos sensibles a las hemolisinas naturales del suero de perro, son muy resistentes a la acción hemolítica de los venenos. La curva obtenida en esas condiciones representa las variaciones de las hemolisinas naturales perro-carnero, bajo la influencia del veneno; las hemolisinas venenosas no tienen aquí un papel directo.

Sea cual sea la vía empleada, el veneno de *Naja* provoca una disminución rápida y muy marcada de las propiedades hemolíticas naturales del suero de perro para los glóbulos de carnero. Su curva baja en cuanto aparecen las autohemolisinas, pasa por un mínimo coincidiendo con el máximo de actividad de estas últimas, luego se vuelve a levantar cuando éstas desaparecen de la circulación. En la mayor parte de los casos se mantiene un poco abajo de la normal por algunas horas más, después de la inyección.

Los *glóbulos de caballo* son sensibles a la vez a las hemolisinas naturales del suero de perro y a las hemolisinas venenosas. El aspecto de la curva obtenida, substituyéndolas en la reacción precedente a los glóbulos de perro o de carnero, está influenciada por las variaciones respectivas de esos dos grupos de hemolisinas en el curso de la intoxicación.

Al principio la curva acompaña de bastante cerca la de las autohemolisinas (elevación inicial seguida de baja antes del fin de la primera hora), cuando éstas desaparecen cae debajo de su valor primitivo; vuelve a subir a menudo ligeramente en el curso de la segunda hora al mismo tiempo que la curva de las hemolisinas perro-carnero, y se estabiliza para no volver sino tardíamente cerca de su nivel primitivo.

Acción hemolítica del suero in vitro en presencia de un veneno.

—La formación de hemolisinas circulantes al principio del envenenamiento (fase positiva) representa la primera etapa de la destrucción de los fosfátidos sanguíneos; en un período más avanzado mientras el ataque de los fosfátidos continúa (fase negativa), esas hemolisinas desaparecen. Esta transformación progresiva de los fosfátidos produce desde el comienzo de la fase positiva la disminu-

ción gradual, luego la supresión, de la propiedad normal del suero de formar *in vitro* al contacto de un veneno nuevas hemolisinas.

La regeneración de los fosfátidos es lenta y son necesarios varios días para que el suero agotado recupere su facultad de volverse hemolítico en presencia de los venenos.

El poder hemolítico del suero ha sido evaluado según el volumen de glóbulos que puede hemolizar en 30 minutos una dosis fija de suero (0,1 c. c.) en presencia de 0,1 c. c. de una solución al 1^o/₁₀₀ de veneno fuertemente hemolítico de *Lachesis muta*: suero y veneno se añaden sin incubación previa a tubos conteniendo dosis crecientes (0,2 a 1,2 c. c.) de glóbulos normales del perro en experimento (recogidos antes de la inyección del veneno), lavados, en suspensión al 5 %; baño maría a 37°C; lectura a los 30 minutos.

Después de las inyecciones intravenosas el poder hemolítico del suero *in vitro* en presencia de un veneno baja de manera considerable en cuanto aparecen las autohemolisinas circulantes y desaparece en unos quince minutos, generalmente antes de la desaparición de las hemolisinas de la circulación.

Las inyecciones intramusculares o peritoneales actúan más lentamente. Provocan cuando aparecen las hemolisinas circulantes, una caída inicial brusca del poder hemolítico del suero *in vitro*. La curva baja luego lentamente para caer a cero hacia el fin de la primera hora o al principio de la segunda.

En ningún caso con ese veneno he podido poner en evidencia una elevación inicial del poder del suero de formar *in vitro* nuevas hemolisinas al contacto del veneno.

La curva del poder hemolítico del suero en presencia de un veneno (suero más glóbulos más veneno) nunca se confunde con la de las autohemolisinas (suero más glóbulos en las mismas dosis y recogidas en las mismas condiciones, sin veneno). Baja bruscamente cuando esta última comienza a elevarse y la corta en general en el momento en que las hemolisinas circulantes disminuyen y cae casi siempre antes que ésta a cero. La destrucción de los fosfátidos que determina la desaparición de las hemolisinas formadas en la circulación al principio de la fase positiva, se acelera por la adición *in vitro* de veneno al suero, de donde resulta esta discordancia de las dos curvas.

Un hecho comparable se observa haciendo actuar *in vitro* dosis crecientes (0,001 a 1,0 mg.) de un veneno hemolítico (*Lachesis muta*, por ejemplo) sobre un suero normal (perro o caballo) en presencia de glóbulos homólogos normales. Los primeros tubos no muestran ninguna hemólisis por insuficiencia de veneno; las dosis medianas provocan una hemólisis creciente, que pasa por un máximo

y luego disminuye en los tubos inmediatamente superiores; con las dosis elevadas el exceso de veneno no permite captar la hemólisis.

Las variaciones de la resistencia globular a las soluciones salinas hipotónicas o a toda otra acción física, tal como la agitación mecánica, guardan una relación estrecha con la actividad de las hemolisinas circulantes.

La resistencia globular ha sido medida en relación con soluciones de NaCl de título de 2,8 a 7,2 ‰. Para cada serie se utilizaban 12 tubos de reacción más los tubos de control necesarios; el título de las diluciones variaba de 0,4 a 0,4 por mil. La emulsión globular en solución de NaCl isotónica 9,5 ‰ se llevaba al volumen primitivo de la sangre desfibrinada. En cada tubo se colocaban 0,1 c. c. de esta emulsión y 2 c. c. de solución NaCl de título variable; baño maría a 37°; lectura a los 30 minutos.

El veneno de *Naja* produce desde la aparición de las hemolisinas circulantes una disminución considerable de la resistencia globular. Después de las inyecciones intravenosas de dosis bastante elevadas de veneno (5 mgs.) los glóbulos, a menudo no resisten a una centrifugación aún moderada; después de las inyecciones intraperitoneales y sobre todo intramusculares su fragilidad es un poco menos grande. En cuanto las hemolisinas circulantes disminuyen, la resistencia globular se eleva lentamente y vuelve más o menos a lo normal hacia el fin de la primera hora o en el transcurso de la segunda; en algunos casos se eleva ligeramente por encima de su valor primitivo. Ningún animal ha presentado con ese veneno elevación inicial de la resistencia globular por la acción de las soluciones hipotónicas.

Las variaciones de la resistencia globular a la acción de las hemolisinas venenosas son totalmente diferentes de las variaciones de la resistencia a las soluciones hipotónicas.

Han sido establecidas según la intensidad de la hemólisis producida en 30 minutos en baño maría a 37°C por la acción de un volumen fijo de suero normal de caballo (0,1 c. c.) en presencia de un volumen fijo de veneno de *Lachesis muta* (0,1 c. c. Sol. 1 ‰) sobre cantidades variables de glóbulos lavados (emulsiones al 5 %) del perro en experiencia.

En el curso de los primeros minutos después de las inyecciones intravenosas o intraperitoneales la resistencia globular estudiada en estas condiciones se eleva rápidamente; se mantiene a su mismo nivel o aumenta aún ligeramente mientras las hemolisinas se encuentran presentes en la circulación (primera hora); vuelve tardíamente a lo normal.

Después de inyecciones intramusculares la elevación de la resis-

tencia globular es más lenta y más pequeña. Uno de los animales habiendo recibido 15 mgs. de veneno por esta vía ha presentado en lugar de la elevación habitual, una disminución inicial de la resistencia globular entre los 15 y 30 minutos, vuelve a su valor primitivo a los 45 minutos y se mantiene ligeramente por encima hasta el día siguiente.

La disminución inicial de la resistencia globular a la acción hemolítica de los venenos debe ser la regla, pero es muy breve y difícil ponerla en evidencia; no puede ser observada sino lavando los glóbulos inmediatamente después de la sangría para sacarles el suero e impedir que la acción de las autohemolisinas se prosiga *in vitro*. Sobre 40 perros estudiados en las condiciones más diversas y con diferentes venenos no he podido encontrar netamente sino cuatro veces esta fase inicial después de inyecciones intramusculares de dosis débiles de veneno o con venenos poco hemolíticos, es decir siempre en casos en que los síntomas evolucionaban lentamente.

La elevación de la resistencia globular es paralela a la formación de las hemolisinas en la circulación: cuanto más hemolítico el suero para sus propios glóbulos, tanto más aumenta la resistencia globular a las hemolisinas del veneno.

Estas variaciones de la resistencia a las hemolisinas venenosas, traducen una acción directa del veneno sobre los fosfátidos globulares análoga a la observada sobre los fosfátidos del plasma y puede ser reproducida *in vitro* haciendo actuar una solución de veneno de *Naja* sobre glóbulos normales lavados.

Al principio (fase positiva), la activación de los fosfátidos globulares provoca *in vitro* como *in vivo* el aumento de tamaño de los glóbulos sin llegar a la hemólisis espontánea y la disminución muy breve de su resistencia a las hemolisinas venenosas; casi en seguida (fase negativa), la transformación de los fosfátidos acentuándose hace que éstos se vuelvan incapaces de actuar sobre el veneno, produciendo la elevación prolongada de la resistencia globular a las hemolisinas venenosas.

Este mecanismo desempeña un papel importante en la defensa del organismo en el curso de la intoxicación venenosa.

Dos ejemplos bastan para documentar estos hechos.

Perro N. R. 3, macho, 5.500 grs.; fijado sobre la mesa de operación. Inyección intravenosa de 5 mg. de veneno. Al fin del tercer minuto disnea moderada acompañada de un leve estado de sopor que desaparece en unos 10 minutos; 15', gritos, agitación, polipnea aguda; 30' parálisis progresiva de los músculos de la laringe y de la faringe; salivación abundante; 35' respiración corta y rápida,

con períodos de bra-disnea volviéndose de más en más largas y frecuentes; parálisis marcada de los músculos de la nuca; nystagmus; 38' primer período de apnea; estado de asfixia; 40' paro definitivo de la respiración; 44' paro del corazón.

Sangrías: Antes de la inyección: 2, 5, 15, 30 y 44 minutos después de la inyección.

Perro N. R. 3	Antes de la inyección	Después de la inyección				
		2'	5'	15'	30'	44'
1. Acción hemolítica del suero × propios glóbulos	0	0,5	0,4	0,4	0,3	0
2. Acción hemolítica del suero × glóbulos carnero	1,8	1,1	0,9	1,0	1,0	1,0
3. Acción hemolítica del suero × glóbulos caballo	1,0	1,2	1,2	1,2	0,9	0,9
4. Acción hemolítica <i>in vitro</i> del suero + veneno <i>L. muta</i> × propios glóbulos	2,0	0,3	0,3	0	0	0
5. Resistencia globular a las soluciones hipotónicas	3 ‰	hemólisis espontánea 7,2 ‰				
6. Resistencia globular a las hemolisinias venenosas	1,4	1,0	1,0	1,0	1,0	0,8
7. Coagulación sanguínea =	N	N	R	R	R	R
8. Aspecto del suero =	N	L	L	LL	LH	LH

Notación: 1, 2, 3, 4 y 6 = volumen más elevado de glóbulos en c. c. (emulsión 5 %) dando una hemólisis neta en 30 minutos. 5 = título de la dilución más alta permitiendo un comienzo de hemólisis en 30 minutos. O, ausencia total de hemólisis; N, normal; R, coagulación retardada; L, suero lactecente; LL, suero fuertemente lactecente; H, suero cargado de hemoglobina.

Perro N. R. 1, hembra, 5.200 grs.; fijado sobre la mesa de operación. Inyección intramuscular de 15 mg. de veneno en el muslo. Ningún síntoma durante la primera hora; al principio de la segunda hora, parálisis de los músculos de la nuca; 80', salivación abundante, disnea intermitente; 90', parálisis progresiva de los músculos de la nuca; principio de parálisis laríngea y faríngea; 180', principio de la parálisis de los miembros; sacado de la mesa de operación, el animal abre ampliamente sus patas anteriores para sostenerse y se cae. Muerto entre la octava y la duodécima hora.

Sangrías: Antes de la inyección; 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos después de la inyección.

Perro N. R. 1	Antes de la inyección	Después de la inyección								
		5'	15'	30'	45'	60'	90'	120'	180'	240'
1. Acción hemolítica del suero × propios glóbulos	0	0,6	0,7	0,2	0	0	0	0	0	0
2. Acción hemolítica del suero × glóbulos cordero	1,5	1,5	1,0	0,9	0,9	1,4	1,5	1,5	1,6	1,8
3. Acción hemolítica del suero × glóbulos caballo	0,7	1,4	1,4	1,4	0,8	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6
4. Acción hemolítica <i>in vitro</i> del suero + veneno. <i>L. muta</i> × propios glóbulos	0,8	0,5	0,4	0,3	0,3	0,3	0	0	0	0
5. Resistencia globular a las soluciones hipotónicas	3,6 ‰	5,2 ‰	4,8 ‰	4,4 ‰	4,0 ‰	4,0 ‰	3,6 ‰	3,6 ‰	3,6 ‰	3,6 ‰
6. Resistencia globular a las hemolisinas venenosas	1,2	1,2	1,5	1,3	1,2	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2
7. Coagulación sanguínea =	N	N	N	R	R	R	R	R	R	R
8. Aspecto del suero =	N	L	LH	LH	LH	H	N	N	N	N

Observaciones: Entre 15 y 90 minutos después de la inyección las hematies son frágiles y se deforman fácilmente a la fijación (hematies espinosas). Igual notación que en el cuadro precedente.

B) *Venenos hemolíticos y coagulantes*: A este grupo pertenecen todos los ejemplares de venenos de *Crotalus terrificus* y de *Bothrops atrox* estudiados como también los de *B. erythromelas* y *Lachesis muta*.

Todos los venenos de este grupo poseen además de sus propiedades hemolíticas de intensidad variable una acción coagulante marcada tendiendo a abreviar *in vivo* la fase hemolítica positiva reforzando la resistencia globular. Esta acción no es específica y se ejerce también en relación con los agentes físicos, tales como la agitación mecánica y la acción de las soluciones hipotónicas, como en relación a las hemolisinas venenosas.

El veneno de *C. terrificus* de Venezuela, a la vez muy coagulante (unidad coagulante 0,000.8 mg.) y fuertemente hemolítico (unidad hemolítica 0,01 mg.) es un ejemplo excelente de este grupo; posee también una acción proteásica marcada (unidad proteolítica 0,20 mg.; unidad anticomplementaria 0,06 mg.).

Con este veneno la formación de las autohemolisinas es muy activa. En el conjunto las curvas son análogas a las obtenidas con el veneno *Naja tripudians*. Después de las inyecciones intravenosas el poder hemolítico del suero para los propios glóbulos pasa por un máximo entre 2 y 5 minutos pero desaparece muy pronto, en menos de 30 minutos. Las inyecciones intramusculares ejercen una acción menos acentuada pero más prolongada.

Las propiedades hemolíticas del suero para los glóbulos de carnero presentan, como con el veneno de *Naja*, una disminución rápida, en cuanto aparecen las autohemolisinas, seguida de elevación muy lenta después de la desaparición de estas últimas. Su curva vuelve a la normal mucho más tardíamente que con el veneno precedente (a menudo más de 24 horas). En ciertas intoxicaciones graves por vía venosa la acción hemolítica del suero para los glóbulos de carnero puede ser suprimida totalmente durante más de 24 horas.

En relación con los glóbulos de caballo las variaciones son igualmente vecinas de las observadas con el veneno de *Naja*. La curva obtenida es influenciada por dos factores opuestos: la disminución de las hemolisinas naturales y la aparición en la circulación de las hemolisinas debidas a la acción del veneno sobre los fosfátidos del plasma. Las curvas de la acción hemolítica del suero sobre los glóbulos de caballo y los de perro tienden a juntarse al comienzo, cuando las hemolisinas naturales disminuyen. Con un suero muy rico en hemolisinas naturales, perro, caballo, la curva obtenida con los glóbulos de caballo bajará después de la inyección para acercarse a la de los glóbulos de perro (perro XV); se elevará al mismo tiempo que esta última en el caso de un suero pobre en hemolisinas

naturales (perro XVI). La curva de los glóbulos de caballo acompañada después en sus grandes rasgos la obtenida con los glóbulos de perro; vuelve lentamente a su valor inicial cuando las hemolisinas venenosas desaparecen. El suero de uno de nuestros animales (perro XV) demostró al día siguiente de la inyección una elevación muy marcada de su poder hemolítico para esos glóbulos.

La disminución del *poder hemolítico del suero in vitro en presencia de un veneno* es generalmente un poco más lenta y menos marcada que en el envenenamiento por el veneno de *Naja*, traduciendo un ataque menos profundo de los fosfátidos sanguíneos; puede ser precedida de una leve elevación inicial (perro XVI). En ciertos casos, después de las inyecciones intramusculares de dosis no mortales esta disminución puede perseguirse progresivamente durante más de 24 horas sin llegar a la supresión total.

La disminución de la *resistencia globular a la acción de las soluciones salinas hipotónicas* es aún considerable después de las inyecciones intravenosas, sin ser sin embargo tan marcada como con el veneno no coagulante de *Naja*; después de finalizar la primera hora de la inyección vuelve a su valor inicial.

Las inyecciones intramusculares tienen una acción más débil y un poco más prolongada, como con el veneno precedente. Ningún animal ha presentado elevación por encima de su valor inicial de resistencia globular a las soluciones hipotónicas.

La *elevación de la resistencia globular a la acción de las hemolisinas venenosas* es más acentuada que con el veneno de *Naja*, siendo reforzada por la acción coagulante del veneno. Comienza en cuanto aparecen las hemolisinas circulantes; brusca y muy marcada después de inyecciones intravenosas, es más lenta y más débil en las inyecciones intramusculares. Cuando las hemolisinas desaparecen de la circulación la curva de la resistencia globular se mantiene en « plateau » o baja de manera más sensible para subir ligeramente hacia el fin de la primera hora. Puede volver cerca de lo normal recién al día siguiente.

Dos animales servirán de ejemplo:

Perro XVI, macho, 6.500 grs.; fijado sobre la mesa de operación. Inyección intravenosa de 2 mg. de veneno de *C. t.* de Venezuela. Shock inmediato, muy marcado, respiración tumultuosa, luego síncope respiratorio (120 seg.); relajamiento de los esfínteres, inconciencia. Durante 15 minutos la respiración es muy lenta, apenas perceptible, luego el estado general se mejora progresivamente y 30 minutos después de la inyección el estado de shock se disipa. Agitación, gritos. 90' comienzo de parálisis; la voz y la visión desaparecen; respiración corta, jadeante, de tipo diafragmático; miosis;

Perro XVI	Antes de la inyección	Después de la inyección								
		2'	5'	15'	30'	45'	60'	90'	120'	180'
1. Acción hemolítica del suero × propios glóbulos	0	0,8	0,6	0,2	0	0	0	0	0	0
2. Acción hemolítica del suero × glóbulos cordero	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3. Acción hemolítica del suero × glóbulos caballo	0	0,6	0,6	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0	0
4. Acción hemolítica <i>in vitro</i> del suero + veneno. <i>L. muta</i> × propios glóbulos	0,5	0,8	0,5	0	0	0	0	0	0	0
5. Resistencia globular a las soluciones hipotónicas	4,0 ‰	6,8 ‰	6,8 ‰	6,6 ‰	6,4 ‰	4,8 ‰	4,0 ‰	4,0 ‰	4,0 ‰	4,0 ‰
6. Resistencia globular a las hemolisinas venenosas	2,0	0,8	0,8	0,8	1,0	1,0	0,8	0,8	0,8	0,8
7. Tiempo de coagulación sanguínea	250''	150''	60''	60''	0	0	0	0	0	0
8. Aspecto del suero	N	LL	LL	L	L	LH	LH	H	H	H

Observaciones: H = suero cargado de hemoglobina; h, suero ligeramente cargado de hemoglobina. Otras abreviaciones como en el cuadro precedente (*). Comienzo de coagulación a los 60 segundos pero la coagulación permanece incompleta.

taquicardia; la mínima excitación produce crisis generalizadas de temblores. 120' parálisis motriz completa; diarrea, sin hemorragias; 179' paro de la respiración; 183' paro del corazón. Sangrías: antes de la inyección; 2, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la inyección.

Perro XV, macho, 9.500 grs.; fijado sobre la mesa de operación. Inyección intramuscular de 25 mg. veneno *C. t.* de Venezuela en el muslo. Agitación, gritos inmediatos; 2' respiración lenta y profunda; 3' crisis repetidas de temblores generalizados epileptiformes; 20' estado de schock incompleto, torpeza profunda, respiración muy lenta; este estado dura unos 20 minutos, luego se disipa; 60' edema en el punto de la inyección; 150' gran edema local, hemorrágico y doloroso; 240' paresia ligera haciendo difícil el estar de pie y caminar; 24 horas, buen estado general, gran edema hemorrágico que toma toda la pata y una parte de la pared abdominal. Se restablece.

Sangrías: antes de la inyección, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 minutos y 24 horas después de la inyección.

C) *Venenos coagulantes, poco o no hemolíticos.* — Solamente dos venenos estudiados *Bothrops alternata* y *B. jararaca*, pertenecen a este grupo.

El veneno de *B. alternata* (ejemplar argentino) es muy poco hemolítico *in vitro* (unidad hemolítica 1,0 mg.) fuertemente coagulante (unidad coagulante 0,0006 mg.) y posee además una acción enérgica sobre los proteidos (unidad anticoagulante 0,15 mg.; unidad anticomplementaria 0,10 mg.; unidad proteolítica 1,0 mg.).

En el perro las inyecciones intravenosas o intramusculares no han provocado la aparición de propiedades hemolíticas apreciables para los propios glóbulos. La actividad hemolítica sobre los glóbulos heterólogos (caballo, carnero) se modifica poco; en algunos casos se observa una ligera disminución pasajera inmediatamente después de las inyecciones intravenosas (entre 5 y 45 minutos); es más tardía y un poco más prolongada después de las inyecciones intramusculares.

El poder hemolítico del suero *in vitro* en presencia de un veneno (*L. muta*) no ofrece tampoco modificaciones apreciables (muy leve disminución tardía en algunos casos), subrayando la insignificancia del ataque de los fosfátidos en el curso del envenenamiento.

La acción directa sobre los glóbulos rojos es un poco más marcada. Las pequeñas dosis de veneno, sea por vía intravenosa, sea por vía intramuscular, elevan transitoriamente después de la inyección, la resistencia globular a la acción de las soluciones hipotónicas

Perro XV	Antes de la inyección	Después de la inyección									
		5'	15'	30'	45'	60'	90'	120'	180'	240'	24 h
1. Acción hemolítica del suero × propios glóbulos	0	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,2	0	0	0	0
2. Acción hemolítica del suero × glóbulos cordero	2,0	1,2	0,9	1,2	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	2,0
3. Acción hemolítica del suero × glóbulos caballo	0,6	0,5	0,4	0,8	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	1,2
4. Acción hemolítica <i>in vitro</i> del suero + veneno. <i>L. muta</i> × propios glóbulos .	1,2	0,9	0,9	0,9	0,8	0,7	0,7	0,7	0,6	0,4	0,2
5. Resistencia globular a las soluciones hipotónicas	3,6 ‰	4,4 ‰	4,4 ‰	4,6 ‰	4,2 ‰	4,0 ‰	4,0 ‰	4,0 ‰	3,8 ‰	3,6 ‰	3,6 ‰
6. Resistencia globular a las hemolisinas venenosas	1,5	1,5	1,4	1,4	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,4
7. Tiempo de coagulación sanguínea	240''	80''	80''	80''	80''	70''	70''	70''	180'	240''	250''
8. Aspecto del suero =	N	N	N	LL	LL	LH	L	L	L	N	N

(las variaciones observadas han sido en el orden de 0,1 a 0,3 ‰ en el título de las diluciones empleadas como reactivos); dosis más fuertes provocan a menudo una disminución ligera igualmente pasajera.

La resistencia globular a las hemolisinas venenosas se eleva de manera moderada pero constante en el curso de la primera hora, sea cual sea la vía de introducción del veneno; en ciertos casos después de las inyecciones intravenosas, esta elevación es precedida de una muy corta disminución análoga a la señalada con el veneno de *Naja*. Generalmente la resistencia globular vuelve a la normal en algunas horas; después de la inyección de dosis fuertes de veneno por vía intramuscular, puede ser aún superior a la normal 24 horas más tarde.

Perro Alt. III, macho, 9.000 gramos, fijado sobre la mesa de operación. Inyección intravenosa de 0,5 mg. de veneno. Ausencia de shock inmediato; la respiración es apenas acelerada. 5' temblores generalizados; 40' vómitos y síncope respiratorio; emisión de orina y heces; después de 2 minutos de apnea, los movimientos respiratorios reaparecen muy lentos y de débil amplitud. Nuevo período de apnea (52'), paro del corazón a los 55'.

Sangrías: Antes de la inyección; 5, 10, 15, 30, 45 y 55 minutos después de la inyección.

Perro Alt. III	Antes de la inyección	Después de la inyección					
		5'	10'	15'	30'	45'	55'
1. Acción hemolítica del suero × propios glóbulos	0	0	0	0	0	0	0
2. Acción hemolítica del suero × glóbulos de carnero	1,0	0,4	0,8	1,0	1,0	1,0	1,0
3. Acción hemolítica del suero × glóbulos de caballo .	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
4. Acción hemolítica <i>in vitro</i> del suero + veneno <i>L. muta</i> × propios glóbulos .	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,8	2,0
5. Resistencia globular a las soluciones hipotónicas	3,6 ‰	3,4 ‰	3,4 ‰	3,5 ‰	3,5 ‰	3,6 ‰	3,6 ‰
6. Resistencia globular a las hemolisinas venenosas . . .	1,2	1,4	1,3	1,2	1,2	1,2	1,0
7. Tiempo de coagulación sanguínea	300''	70''	70''	80''*	0	0	0
8. Aspecto del suero =	N	N	N	N	h	h	N

Observaciones: Mismas anotaciones que anteriormente.

(*) Comienzo de coagulación en 80''; pero la coagulación queda incompleta.

Perro Alt. I	Antes de la inyección	Después de la inyección								
		5'	15'	30'	45'	60'	90'	120'	150'	180'
1. Acción hemolítica del suero × propios glóbulos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. Acción hemolítica del suero × glóbulos cordero	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0
3. Acción hemolítica del suero × glóbulos caballo	0,7	0,7	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7
4. Acción hemolítica <i>in vitro</i> del suero + veneno <i>L. muta</i> × propios glóbulos	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
5. Resistencia globular a las soluciones hipotónicas	3,6 ‰	3,6 ‰	4,0 ‰	4,2 ‰	4,2 ‰	3,6 ‰	3,6 ‰	3,6 ‰	3,6 ‰	3,6 ‰
6. Resistencia globular a las hemolisinas venenosas	1,4	1,4	1,4	1,2	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,2
7. Tiempo de coagulación sanguínea	240''	240''	110''	100''	80''	80''	90''	*90''	*90''	0
8. Aspecto del suero =	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Observaciones: Mismas anotaciones que las anteriores.

(*) Principio de la coagulación en 90'', pero la coagulación queda incompleta.

Perro Alt. I, hembra, 7.000 gramos; fijada sobre la mesa de operación. Inyección intramuscular de 30 mgs. de veneno en el muslo. No hay síntomas inmediatos, fuera de las manifestaciones de dolor. 5' respiración lenta y profunda; 10' ligera disnea; 35' edema local, hemorrágico, ya apreciable; 150' debilitamiento progresivo del animal. Muerte en 180 minutos, provocado por un gran derrame sanguíneo en el pericardio (accidente durante la sangría).

Sangrías: antes de la inyección; 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos después de la inyección.

La acción del veneno de *B. jararaca* (Río de Janeiro) es poco diferente. *In vitro* este veneno posee propiedades hemolíticas un poco más marcadas que las del veneno de *B. alternata* (unidad hemolítica 0,15) que no se traducen en el curso del envenenamiento en el perro sino por variaciones de la resistencia globular análogas a las observadas con el veneno anterior; el suero no ha demostrado acción hemolítica apreciable para sus propios glóbulos; la acción sobre los glóbulos heterólogos se modifica poco.

La acción proteásica muy elevada de estos dos venenos concurre a limitar su acción coagulante y su débil acción hemolítica. Esta aparece más neta después de suprimir la acción proteásica, por ejemplo por el calor.

Calentados al baño-maría entre 70 y 72°C durante 30 minutos los venenos *B. alternata* y *B. jararaca* pierden sus propiedades proteásicas; su acción coagulante se atenúa ligeramente, de ahí una mejor tolerancia por vía venosa de los venenos así modificados. Inyectados en el perro muestran una acción fosfatidásica moderada mucho más neta que la de los mismos venenos no calentados; formación de hemolisinas para los propios glóbulos; disminución temporaria de las hemolisinas naturales para los glóbulos heterólogos, ligera disminución de las propiedades hemolíticas del suero *in vitro* en presencia de un veneno; elevación marcada de la resistencia globular a las hemolisinas venenosas; la disminución de la resistencia globular a las soluciones hipotónicas es poco sensible.

Perro J. II, macho, 6.900 grs.; testigo fijado sobre la mesa de operación. Inyección intravenosa de 1 mg. de veneno de *B. jararaca*, no calentado. Shock muy violento 9 minutos después de la inyección: apnea de 4 minutos; bradicardia enorme; desaparición del pulso femoral, emisión de orina y de heces. Mejoría notable en 20'; movimientos respiratorios lentos, de débil amplitud. A partir de la segunda hora, debilitamiento progresivo; muerte en 160 minutos.

Sangrías: antes de la inyección, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 y 150 minutos después de la inyección.

El veneno de Lachesis muta (de Pernambuco) posee *in vitro* propiedades coagulantes muy elevadas (unidad coagulante 0,0002 mg.), su acción hemolítica es casi idéntica a la del veneno de *C. terrificus* de Pernambuco (unidad hemolítica 0,025 mg.); sus propiedades proteásicas son menos marcadas que las del veneno venezolano de *C. terrificus* (unidad proteolítica 0,6 mg.; un. anticomplementaria 1,5 mg.; un. anticoagul. 0,04 mg.). Su acción en el perro se acerca a la del *Crotalus* venezolano por inyección intravenosa; es sensiblemente más débil por vía intramuscular.

El veneno de Bothrops atrox de Venezuela es el más coagulante *in vitro* de los venenos estudiados (unidad coagulante 0,00015 mg.); posee una fuerte acción hemolítica (unidad hemolítica 0,02 mg.) y propiedades proteásicas moderadas (unidad proteolítica 2,5 mg.; un. anticomplementaria 0,60 mg.; un. anticoagulante 2,5 m.). En el perro su acción sobre las propiedades hemolíticas del suero es sensiblemente más débil que la del veneno de *C. terrificus* venezolano, sobre todo después de las inyecciones intramusculares; pero produce una elevación mucho más marcadas de la resistencia globular a las hemolisinas venenosas debido a sus propiedades coagulantes enérgicas.

El veneno de B. atrox del noreste del Brasil se distingue *in vitro* de los ejemplares de Venezuela por su más fuerte acción proteásica (unidad proteolítica 0,10 mg.; un. anticomplementaria 0,01 mg.; unidad anticoagulante 0,10 mg.) y sus propiedades hemolíticas y coagulantes menos acentuadas (unidad hemolítica 0,40 mg.; unidad coagulante 0,00075 mg.). *In vivo* su acción es poco diferente de la del veneno venezolano.

El veneno de B. erythromelas (Pernambuco) es fuertemente coagulante (unidad coagulante 0,00020) y proteolítico *in vitro* (unidad proteolítica 0,25; unidad anticomplementaria 0,04; unidad anticoagulante 0,70); su acción hemolítica es en gran parte disimulada por sus propiedades coagulantes y proteásicas. *In vivo* su acción hemolítica está muy marcada, sobre todo después de las inyecciones intravenosas; provoca la aparición de hemolisinas circulantes muy activas para los propios glóbulos, produciendo una fuerte disminución de la resistencia globular a las soluciones hipotónicas y una disminución pasajera de las hemolisinas naturales para los glóbulos heterólogos; el suero pierde muy rápidamente sus propiedades hemolíticas al contacto de un veneno *in vitro*; la resistencia globular a las hemolisinas venenosas aumenta en fuertes proporciones.

CONCLUSIONES

Los venenos que poseen propiedades fosfatidásicas elevadas y no coagulantes (*Naja tripudians*) provocan en el perro al comienzo de su acción la aparición en la circulación de propiedades hemolíticas poderosas (fase positiva) que traen una destrucción masiva de los glóbulos rojos con liberación de hemoglobina; disminuye de manera considerable la resistencia globular a las soluciones hipotónicas o a toda otra acción física (agitación, etc.). Esta primera fase es siempre breve.

En una fase posterior (*fase negativa*) acentuándose la destrucción de los fosfátidos, esas propiedades hemolíticas desaparecen; la resistencia globular a las soluciones hipotónicas o a las acciones físicas vuelve a la normal. En el curso de esta segunda fase la disminución considerable y las transformaciones de los fosfátidos sanguíneos se traducen por la desaparición progresiva de la propiedad normal del suero de perro de volverse hemolítico *in vitro* en presencia de un veneno.

Las hemolisinas naturales del suero para los glóbulos heterólogos (caballo, carnero) disminuye en el curso de la fase positiva para volver luego bastante rápidamente cerca de su valor primitivo.

La disminución, a menudo considerable, de la resistencia globular a las soluciones hipotónicas en el curso de la fase positiva es debida a la acción de las hemolisinas circulantes formadas. El veneno ejerce además una acción directa sobre los fosfátidos globulares idéntica a su acción sobre los fosfátidos del plasma. Al principio (fase positiva) provoca la deformación de los glóbulos rojos que aumentan de volumen sin llegar a hemolizar espontáneamente; su resistencia a las hemolisinas venenosas disminuye. Después de esta primera fase muy fugaz y a menudo difícil de alcanzar, la resistencia globular a las hemolisinas venenosas aumenta progresivamente (fase negativa).

Según la vía de introducción del veneno y la dosis empleada estos fenómenos evolucionan más o menos rápido; cualesquiera que sean las condiciones experimentales las autohemolisinas aparecidas en la circulación persisten rara vez más allá de la primera hora (media 30 a 45 minutos). La regeneración de los fosfátidos es siempre lenta; normalmente más de 24 horas son necesarias para que el suero recupere sus capacidades hemolíticas en presencia de un veneno *in vitro*.

La acción de los venenos coagulantes y fosfatidásicos (*Crotalus terrificus*) es semejante en sus grandes rasgos a la del veneno de

Naja; pero su acción coagulante refuerza la resistencia globular a las hemolisinas venenosas, atenúa la baja de la resistencia globular a las soluciones hipotónicas, y tiende a disminuir su acción hemolítica.

Esta acción antagonista de la hemólisis es aún más notable con los venenos a la vez muy coagulantes y fuertemente proteásicos (diversos Crotalinos sudamericanos). Su acción hemolítica *in vivo* puede ser enteramente disimulada y la resistencia globular a las soluciones hipotónicas puede elevarse desde el comienzo de la intoxicación (aún para los glóbulos lavados); pero las propiedades hemolíticas reaparecen empleando esos mismos venenos calentados a baño-maría a 72°C para destruir su acción proteásica.

Estos hechos están confirmados por observaciones anteriores *in vitro* sobre las variaciones de la resistencia globular en presencia de diversos tipos de venenos y sobre la acción hemolítica de los venenos en presencia de sueros normales.

La destrucción progresiva de los fosfátidos sanguíneos haciendo desaparecer rápidamente de la circulación las propiedades hemolíticas aparecidas al comienzo del envenenamiento y la elevación rápida de la resistencia globular a las hemolisinas venenosas detienen la destrucción de los glóbulos rojos y desempeñan un papel importante en la defensa del organismo en el curso de los accidentes provocados por los venenos de serpientes.

(Misión Vellard en América del Sud)