

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA DETERMINAÇÃO DA DL50 DE VENENOS BOTRÓPICOS INOCULADOS POR VIA VENOSA EM CAMUNDONGOS — *Mus musculus* Linnaeus, 1758.

III. POSSIBILIDADE DE DETERMINAÇÃO DA DL50, ATRAVÉS DA PROTEÇÃO CRUZADA CONFERIDA POR DOSES INFRA-LETAIS DE OUTROS VENENOS DE SERPENTES DO MESMO GÊNERO.

REYNALDO SCHWINDT FURLANETTO *

RAYMUNDO ROLIM ROSA **

MEDARDO SILES VILLARROEL,***

JOSÉ NAVAS ****

RESUMO — Os autores demonstraram que doses infra-letais de um veneno botrópico pode prevenir a ocorrência de mortes imediatas dos animais, quando da inoculação duas horas após, de doses maciças de veneno de serpentes do mesmo gênero, porém, de espécies diferentes (*B. moojeni*, *B. jararaca* e *B. neuwiedi*), possibilitando a determinação da DL50 de um deles mediante dose preparatória (D.P.) de outro. Dmons-

traram duas possibilidades: a) eleger-se um veneno altamente coagulante como padrão para obter o efeito de dose preparatória (D. P.); b) para os venenos das espécies de *Bothrops* mencionadas pode obter-se o mesmo efeito com 2 µg do próprio veneno.

UNITERMOS — Veneno botrópico; DL50 de venenos botrópicos; proteção cruzada com venenos botrópicos.

INTRODUÇÃO

A inoculação intravenosa de doses infra-letais de veneno botrópico em camundongos, torna estes animais extraordinariamente resistentes à inoculação, duas horas após, de elevadas doses do próprio veneno sem ocorrer as “mortes imediatas” (em 10 min.). As doses prévias (D. P.), acima referidas, levam a uma incoagulabilidade sangüínea que atinge o seu máximo efeito cerca de duas horas após a inoculação (Furlanetto et al 1973b). Nesse trabalho foi demonstrado que 2 µg de veneno de *B. moojeni* aplicado duas horas antes de elevadas doses escalonadas do mesmo veneno, permite avaliar com reprodu-

* Ex-Chefe da Seção de Imunoterapia do Instituto Butantan. Atual Professor Catedrático do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan. Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

*** Ex-Assistente do Setor de Soros Antipeçonhentos do Instituto Butantan. Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

**** Encarregado do Setor de Imunização do Instituto Butantan.

bilidade satisfatória sua DL50. As doses infra-letais provocariam a destruição do fibrinogênio devido ao próprio “fator ou fatores coagulantes” do veneno em questão (Furlanetto 1965 e Furlanetto et al 1973b).

Se partíssemos agora da hipótese segundo a qual a fração coagulante dos diferentes venenos botrópicos teria natureza idêntica ou semelhante, variando mais quantitativa do que qualitativamente entre as espécies, o ensaio cruzado de D.P. de veneno de uma espécie de *Bothrops* poderia ser utilizada para o cálculo da DL50 de outro veneno do mesmo gênero.

MATERIAL E MÉTODOS

Venenos

Os venenos com os quais trabalhamos, bem como seu método de conservação e utilização foram aqueles descritos por Furlanetto et al (1973a).

Animais

Trabalhamos com camundongos de 18 a 22g, sem distinção de sexo, todos provenientes do Biotério Geral do Instituto Butantan; as inoculações eram sempre feitas por via venosa.

Outras especificações

Sempre que trabalhávamos com outro material, as técnicas utilizadas foram rigorosamente aquelas citadas pelos autores respectivos e cuja referência se encontra no texto. O veneno aqui citado como de *B. moojeni* (F) é o mesmo referido em trabalho anterior (Furlanetto et al 1973b).

RESULTADOS

Usando D.P. do veneno *B. moojeni* (F) e D.P. de um veneno de *Bothrops jararaca* ensaiamos a determinação da DL50 deste último. As características experimentais encontram-se sumariadas na Tabela I.

Empregamos veneno de *Bothrops jararaca* com D.M.M. = 30 µg (Método de Vital Brazil, 1909). Foi feita uma solução contendo 400 µg/ml distribuída em “flaconetes” e mantida no congelador a -25°C. No momento do uso era descongelado sob água corrente um “flaconete” e o material excedente não era aproveitado, tudo como para o veneno *B. moojeni* (F).

TABELA I

Determinação da DL50 de veneno de Bothrops jararaca sem D.P., com D. P. do mesmo veneno e com D.P. de veneno B. moojeni (F), em camundongos de 18 a 22 g, inoculados por via venosa.

Veneno de <i>B. jararaca</i> em µg	a) sem D.P.				b) com D.P. — 2 µg de veneno de <i>B. jararaca</i>				c) com D.P. — 2 µg de <i>B. moojeni</i> (F)			
	Tempo de observação				Tempo de observação				Tempo de observação			
	10min.	60min.	24h	48h	10min.	60min.	24h	48h	10min.	60min.	24h	48h
25,0	2/10	2/10	5/10	—	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
28,0	0/10	1/10	9/10	—	0/10	1/10	2/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10
31,5	2/10	3/10	8/10	—	0/10	0/10	2/10	2/10	0/10	0/10	1/10	1/10
35,3	3/10	3/10	8/10	—	0/10	0/10	3/10	3/10	0/10	0/10	2/10	2/10
39,5	4/10	4/10	10/10	—	0/10	0/10	3/10	3/10	0/10	0/10	2/10	2/10
44,5	7/10	7/10	10/10	—	0/10	0/10	8/10	9/10	0/10	0/10	7/10	7/10
50,0	3/10	6/10	10/10	—	0/10	0/10	10/10	—	0/10	0/10	8/10	9/10
					DL50 *		24h = 39,0 µg 48h = 38,5 µg		DL50		24h = 42,1 µg 48h = 41,8 µg	

* DL50 calculada pelo método de Reed & Muench (1938).

A análise dos valores expressos pela Tabela I demonstra que a D.P. com veneno de *Bothrops moojeni*, atuou de modo semelhante à D.P. do próprio veneno de *Bothrops jararaca*. Em ambos os protocolos *b* e *c* desapareceram as mortes imediatas que ocorrem indiscriminadamente nos animais sem D.P. já anteriormente assinaladas por Furlanetto et al (1973a). Aparecem nitidamente as mortes tardias em 24 horas com as maiores doses de veneno, e o resultado com 48 horas praticamente não se altera; a DL50 nos dois protocolos, é muito semelhante.

Embora se saiba que o veneno de *B. jararaca* é de menor potencia coagulante que o de *B. moojeni* (Rosenfeld et al 1959), utilizamos arbitrariamente para aquele o mesmo valor de D.P., determinado experimentalmente para este (Furlanetto et al, 1973b), com resultados práticos idênticos.

A seguir decidimos verificar a possibilidade de proteção cruzada entre o veneno de outras espécies diferentes. Usando D.P. do veneno *B. moojeni* (F), D.P. do de *Bothrops jararaca* e D.P. do de *Bothrops neuwiedi*, ensaiamos a determinação da DL50 deste último veneno. As características experimentais foram semelhantes aos da Tabela I e os resultados encontram-se sumariados na Tabela II.

DISCUSSÃO

A análise dos resultados evidencia a possibilidade de emprego de D.P. de um veneno botrópico altamente coagulante (*B. moojeni*) para o cálculo da DL50 de outros venenos de serpentes do mesmo gênero.

É bem de ver-se, na realidade, que se houvesse necessidade de procurar um efeito de D.P. de cada veneno, com os ensaios necessários relativos aos tempos de coagulação, conforme feito em trabalho anterior (Furlanetto et al, 1973b), a aplicação do método seria laboriosa e conseqüentemente este teria menor generalização.

Nesse sentido, caso a D.P. de um veneno permitisse o cálculo da DL50 do outro, poder-se-ia eleger um veneno padrão, decorrendo daí facilitação tecnológica altamente desejável.

Se fosse possível simplificar mais ainda a metodologia, o âmbito de influência do método seria grandemente ampliado. Esse raciocínio levou-nos a ensaiar, comparativamente, como D.P. para determinação da DL50 de um dado veneno, o próprio veneno em estudo, na quantidade idêntica àquela encontrada para o *B. moojeni* (F). Tal forma de procedimento emergia, também, do raciocínio dado pelos resultados do trabalho supra citado, pois talvez não fosse necessário obter-se uma fase de completa incoagulabilidade para se obter proteção, sendo suficiente, quicá, conseguir-se uma dilatação de tempo de coagulação. Nessa ordem de idéias, o princípio coagulante do mesmo veneno a ser ensaiado poderia talvez promover dilatação suficiente do tempo de coagulação capaz de evitar as mortes imediatas por coagulação intravascular.

TABELA II

Determinação da DL50 de veneno de B. neuwiedi, com D. P. do mesmo veneno, com D.P de B. jararaca e com D. P. de B. moojeni (F) em camundongos de 18 a 22 g, inoculados por via venosa.

Veneno de <i>B. neuwiedi</i> em µg	a) com D. P. de <i>B. neuwiedi</i>				b) com D.P. de <i>B. jararaca</i>				Veneno de <i>B. neuwiepi</i> em µg	c) com D.P. de <i>B. moojeni</i> (F)			
	Tempo de observação				Tempo de observação					Tempo de observação			
	10min.	60min.	24h	48h	10min.	60min.	24h	48h		10min.	60min.	24h	48h
16,0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	40,0	0/10	1/10	1/10	1/10
20,2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	44,8	0/10	0/10	1/10	1/10
25,4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	50,4	0/10	0/10	2/10	2/10
32,0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	56,4	0/10	1/10	5/10	5/10
40,3	0/10	1/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	63,2	0/10	2/10	5/10	5/10
50,8	1/10	1/10	3/10	3/10	0/10	0/10	2/10	2/10	71,2	0/10	1/10	8/10	8/10
64,0	1/10	1/10	8/10	9/10	0/10	1/10	5/10	6/10	80,0	0/10	3/10	8/10	8/10
	DL50	24h = 55,4 µg 48h = 54,5 µg			DL50	24h = 61,6 µg 48h = 59,8 µg				DL50	24h = 59,8 µg 48h = 59,8 µg		

Novamente aqui, com D.P. de tres venenos de espécies diferentes de *Bothrops* houve supressão das mortes imediatas.. As tres DL50 são razoavelmente próximas

Com essas questões em mente foram conduzidas as experiências constantes do presente trabalho, cujos resultados nos permitem postular que realmente, determinada D.P. de um veneno pode prevenir morte imediatas capazes de resultar da inoculação de determinadas doses de outros venenos do mesmo gênero. Com efeito, o veneno *B. moojeni* (F) atuou como D.P. para venenos de *B. jararaca* e *B. neuwiedi*, permitindo homogeneidade das respostas e cálculo das DL50 respectivas. Tal resultado autoriza-nos a supor que o veneno *B. moojeni* (F) possa ter o mesmo eleito para os demais venenos do gênero *Bothrops* e, portanto, possa ele, ou outro que se demonstre superior, servir como padrão, caso assim seja considerado necessário. A comprovação, em maior escala, desta suposição alicerçada em nossa experiência, constitui trabalho de casuística em aberto.

Por outro lado, os resultados constantes das Tabelas I e II, evidenciam que a dose de 2 µg, tomada à semelhança do veneno *B. moojeni* (F), pode ter efeito de D.P., protegendo contra doses do próprio veneno capazes de provocar a coagulação intravascular maciça imediata. Esse fato auspicioso para a metodologia, demonstrado com venenos de *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, parece indicar talvez, que a dose que funcione como D.P. pode ser facilmente encontrada através de simples ensaios preliminares, sem necessidade de se repetirem as experiências até aqui realizadas: bastaria, talvez, ensaiar-se uma dose do próprio veneno, incapaz de promover mortes imediatas, para se obter o efeito de D.P. Por fim, aqueles resultados levaram ainda ao conceito de que as proteções obtidas de modo cruzado com venenos diversos, pudessem ser devidas, pelo menos em parte, a identidade do fator coagulante nos vários venenos ensaiados. Tal conceito encontra apóio nos trabalhos de Rosenfeld et al (1962) que demonstrou haver neutralização cruzada do poder coagulante por antisoros obtidos pela imunização com venenos do mesmo gênero, porém, de espécies diferentes.

CONCLUSÕES

1. A inoculação intravenosa de doses infra-letais (D.P.), de um determinado veneno botrópico previne a ocorrência de mortes imediatas dos animais quando da inoculação duas horas após, de doses maciças de outro veneno de serpentes do mesmo gênero.

2. Para os venenos botrópicos ensaiados (*B. moojeni*, *B. jararaca*, *B. neuwiedi*), a dose preparatória (D.P.) tendo efeito cruzado, permite determinar a DL50 de um, mediante dose preparatória de outro.

3. Pode-se eleger um veneno altamente coagulante como padrão para a D.P. para fins de cálculo da DL50 de outros venenos botrópicos.

4. Pode-se também usar o próprio veneno na dose de 2 µg para os fins colimados na conclusão anterior no caso dos venenos de *B. moojeni*, *B. jararaca* e *B. neuwiedi*.

FURLANETTO, R. S., ROLIM ROSA, R., SILES VILLARROEL, M. & NAVAS, J. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via da DL50, através da proteção cruzada conferida por doses intra-letais de outros venenos de venosa em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758. III — Possibilidade de determinação serpentes do mesmo gênero.

Mem. Inst. Butantan, 37: 123-129, 1973.

SUMMARY — The authors demonstrated that sublethal doses of a *Bothrops* venom can prevent the occurrence of immediate death of the animals if two hours later these animals will receive massive venom doses of snakes that belong to the same genus, but to different species (*B. moojeni*, *B. jararaca* and *B. neuwiedi*).

It is possible to determine the LD50 of one of these venoms by means of a preparatory dose (P.D.) of another.

The authors demonstrated two possibilities:

a) To select a standard venom with high coagulant power in order to obtain the preparatory dose effect (P. D.).

b) For the venoms of the mentioned *Bothrops* species it is possible to obtain the same effect with 2,0 µg of the very venom.

UNITERMS — *Bothrops* venom; LD50 of *Bothrops* venoms; cross protection with *Bothrops* venoms.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FURLANETTO, R. S. — *Emprego de camundongos tratados com doses preparatórias de venenos bothropicos para a avaliação de DL50 desses venenos*. São Paulo, 1965 /Tese — Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo/
2. FURLANETTO, R. S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & SIRACUSA, Y. Q. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus, 1758. I. Fenômenos que ocorrem na tentativa de determinação da DL50. (*Mem. Inst. Butantan*) — no prelo, 1973a.
3. FURLANETTO, R. S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. — Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos *Mus musculus* Linnaeus, 1758. II. Possibilidade da determinação da DL50 através da inoculação prévia de doses infra-letais do próprio veneno. (*Mem. Inst. Butantan*), no prelo, 1973b.
4. REED, L. J. & MÜENCH, H. — A simple method of estimating fifty per cent end points. *Amer. J. Hyg., Baltimore*, 27: 493-497, 1938.
5. ROSENFELD, G.; HAMPLE, O. G. & KELEN, E. M. A. — Coagulant and fibrinolytic activity of animals venoms; determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mem. Inst. Butantan*, 29: 143-163, 1959.
6. ROSENFELD, G.; KELEN, E. M. A. & NUDEL, F. — Neutralização cruzada do poder coagulante de venenos ofídicos com soros antivenenos. *Ciênc. Cult.*, São Paulo, 14: 254-255, 1962.

Recebido para publicação em 15.VI.73.

Aceito para publicação em 15.VIII.73

