

EVIDENCIAÇÃO EM CAMUNDONGOS DA SORONEUTRALIZAÇÃO PARAESPECÍFICA ENTRE VENENOS E ANTIVENENOS BOTRÓPICOS

Medardo SILES VILLARROEL*
Raymundo ROLIM ROSA**
Flávio ZELANTE***
Rosalvo GUIDOLIN****

RESUMO: Os autores comprovaram que a inoculação intraperitoneal em camundongos é também adequada para evidenciar as reações de soroneutralização paraespecíficas, entre venenos e antivenenos botrópicos. Os antivenenos de *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* foram estudados frente aos venenos das espécies *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. neuwiedi*, *B. pradoi*, *B. jaracussu* e *B. moojeni*. Conforme os resultados obtidos e confirmando trabalhos anteriores, fica comprovado que a mensuração da atividade dos componentes tóxicos, ao invés dos coagulantes, é a conduta mais adequada para o estudo dos venenos botrópicos, pois possibilita a adoção de um modelo satisfatório que permite a quantificação, com elevada reproduzibilidade, dos fatores responsáveis pela consequências mais graves, inerentes aos acidentes botrópicos.

UNITERMOS: Soroneutralização paraespecífica de venenos botrópicos; reações cruzadas entre venenos e antivenenos botrópicos; emprego de camundongos na soroneutralização cruzada de venenos botrópicos.

INTRODUÇÃO

A neutralização cruzada entre venenos botrópicos e os antivenenos específicos e paraespecíficos mono e polivalentes, tem sido investigada desde há muito tempo. Brazil e Rangel Pestana³ (1909) e Vellard¹⁶ (1930) realizaram tais observações "in vivo", utilizando pombos nos

* Professor Livre Docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

*** Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

**** Auxiliar de Ensino do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e Doutor em Ciências pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

Endereço para correspondência: Caixa Postal 4365 — São Paulo — Brasil.

quais promoviam inoculações por via intravenosa; os animais eram observados durante 20 a 30 minutos^{2, 6}. Nestas condições eram analisadas somente as manifestações devidas à atividade coagulante desses venenos e não as devidas aos seus componentes tóxicos.

Césari e Boquet⁴ (1937), utilizando o método de Calmette, estudaram as reações cruzadas entre venenos e antivenenos ofídicos. Concluíram que os antivenenos neutralizaram, satisfatoriamente, os venenos específicos e eram total ou parcialmente destituídos de capacidade neutralizante para outros venenos não específicos.

Schöttler^{10, 11}, Christensen⁵ (1966) e Puranananda e col.⁷ (1966), por outro lado, empregaram as vias intravenosa e subcutânea de camundongos. Bolaños e col.¹ (1975), mais recentemente, utilizaram a via intraperitoneal desses animais para a titulação de antivenenos monovalentes e polivalentes correspondentes ao gênero *Micrurus*.

Rosenfeld e col.⁸ (1962) e Rosenfeld e Kelen⁹ (1966), demonstrando "in vitro" a neutralização do fator coagulante através de reações cruzadas entre os venenos e antivenenos ofídicos, concluíram que o veneno de *B. cotiara* possui抗ígenos comuns a todos os venenos ofídicos por eles estudados.

Siles Villarroel e col.¹³ (1976/77), através de técnicas de imunodifusão, demonstraram a existência de vários componentes comuns entre seis venenos botrópicos, o que lhes possibilitou separar essas peçonhas em dois grupos, com características distintas.

Conforme demonstramos em trabalhos anteriores^{12, 14, 15}, a inoculação intraperitoneal em camundongos se constitui num recurso satisfatório e adequado para a titulação de venenos e para o doseamento de antivenenos botrópicos. Aplicando a metodologia então desenvolvida, nos propusemos, agora, a verificar a neutralização dos componentes tóxicos de sete venenos botrópicos, através de reações paraespecíficas, utilizando antivenenos monovalentes.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Venenos botrópicos

A origem e o processamento técnico dos sete venenos utilizados (*B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. neuwiedi*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*) foram descritos em trabalhos anteriores^{14, 15}.

2. Antivenenos botrópicos

Utilizamos os antivenenos de *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, monovalentes, fornecidos pelo Instituto Butantan e apresentando os títulos 10,0 mg/ml, 4,0 mg/ml e 2,0 mg/ml, respectivamente.

3. Animais utilizados e vias de inoculação

Utilizamos camundongos adultos jovens, de 18 a 22 g, sem distinção de sexo, nos quais as inoculações eram realizadas por via intraperitoneal; o período de observação foi de 48 horas.

4. Neutralização cruzada dos antivenenos botrópicos

Devido à sensibilidade dos animais ao fenol (agente preservativo), todos os antivenenos foram diluídos a 1/2. Para a realização das reações, tanto as específicas como as cruzadas, foi mantido constante o volume dos antivenenos (0,5 ml), sendo a eles adicionadas doses variadas do veneno e completado o volume para 1,0 ml, com a adição de solução salina (solução de cloreto de sódio a 0,85%). A mistura era, então, incubada a 37°C durante 30 minutos e integralmente inoculada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três antivenenos botrópicos monovalentes foram titulados, através de reações específicas e paraespecíficas, frente aos sete venenos utilizados. Os resultados constam das tabelas 1 a 10.

TABELA 1

Doseamento do antiveneno de *B. jararaca* (0,5 ml), colocado frente ao veneno de *B. jararaca* ($DL_{50} = 44,58 \mu g$) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. jararaca</i>	mg	ml	Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
					24 h	48 h
2,50	0,250	0,250	0,250	37°C	0/6	0/6
2,75	0,275	0,225	0,225		0/6	0/6
3,00	0,300	0,200	0,200	X	0/6	0/6*
3,25	0,325	0,175	0,175		0/6	5/6
3,50	0,350	0,150	0,150	30 min.	4/6	6/6

* Título: 1 ml de antiveneno de *B. jararaca* neutraliza 12 mg de veneno específico.

TABELA 2

Doseamento do antiveneno de *B. jararaca* (0,5 ml), colocado frente ao veneno de *B. alternatus* ($DL_{50} = 64,14 \mu g$) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. alternatus</i>	mg	ml	Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
					24 h	48 h
1,50	0,150	0,350	0,350	37°C	0/6	0/6
1,75	0,175	0,325	0,325		0/6	0/6*
2,00	0,200	0,300	0,300	X	0/6	1/6
2,25	0,225	0,275	0,275		2/6	3/6
2,50	0,250	0,250	0,250	30 min.	3/6	6/6

* Título: 1 ml de antiveneno de *B. jararaca* neutraliza 7 mg de veneno de *B. alternatus*.

TABELA 3

Doseamento do antiveneno de *B. jararaca* (0,5 ml), colocado frente ao veneno de *B. cotiara* ($DL_{50} = 106,86 \mu\text{g}$) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. cotiara</i>		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
1,00	0,100	0,400	37°C	0/6	0/6
1,25	0,125	0,375		0/6	0/6
1,50	0,150	0,350	X	0/6	0/6*
1,75	0,175	0,325		1/6	2/6
2,00	0,200	0,300	30 min.	3/6	6/6

* Título: 1 ml de antiveneno de *B. jararaca* neutraliza 6 mg de veneno de *B. cotiara*.

TABELA 4

Doseamento do antiveneno de *B. jararaca* (0,5 ml), colocado frente ao veneno de *B. neuwiedi* ($DL_{50} = 54,17 \mu\text{g}$) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. neuwiedi</i>		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,75	0,075	0,425	37°C	0/6	0/6*
1,00	0,100	0,400		0/6	2/6
1,25	0,125	0,375	X	1/6	3/6
1,50	0,150	0,350		2/6	4/6
1,75	0,175	0,325	30 min.	4/6	6/6

* Título: 1 ml de antiveneno de *B. jararaca* neutraliza 3 mg de veneno de *B. neuwiedi*.

TABELA 5

Doseamento do antiveneno de *B. jararaca* (0,5 ml), colocado frente ao veneno de *B. pradoi* ($DL_{50} = 95,41 \mu\text{g}$) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. pradoi</i>		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,50	0,050	0,450	37°C	0/6	0/6
0,75	0,075	0,425		0/6	0/6*
1,00	0,100	0,400	X	2/6	3/6
1,25	0,125	0,375		3/6	4/6
1,50	0,150	0,350	30 min.	6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno de *B. jararaca* neutraliza 3 mg de veneno de *B. pradoi*.

TABELA 6

Doseamento do antiveneno de *B. jararaca* (0,5 ml), colocado frente ao veneno de *B. jararacussu* ($DL_{50} = 103,79 \mu g$) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. jararacussu</i>	mg	ml	Sol. salina	Incubação	Tempos de observação	
					24 h	48 h
0,50	0,050	0,450		37°C	0/6	0/6
0,75	0,075	0,425			0/6	0/6
1,00	0,100	0,400		X	0/6	0/6*
1,25	0,125	0,375			5/6	5/6
1,50	0,150	0,350		30 min.	6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno de *B. jararaca* neutraliza 4 mg de veneno de *B. jararacussu*.

TABELA 7

Doseamento do antiveneno de *B. jararaca* (0,5 ml), colocado frente ao veneno de *B. moojeni* ($DL_{50} = 105,50 \mu g$) e inoculado, por via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de <i>B. moojeni</i>	mg	ml	Sol. salina	Incubação	Tempos de observação	
					24 h	48 h
0,75	0,075	0,425		37°C	0/6	0/6
1,00	0,100	0,400			0/6	0/6
1,25	0,125	0,375		X	0/6	0/6*
1,50	0,150	0,350			1/6	1/6
1,75	0,175	0,325		30 min.	5/6	5/6

* Título: 1 ml de antiveneno de *B. jararaca* neutraliza 5 mg de veneno de *B. moojeni*.

Visando propiciar uma análise global, incluimos a tabela 8, que summariza todos os resultados das reações de neutralização realizadas entre o antiveneno de *B. jararaca* e os sete venenos.

TABELA 8

Títulos apresentados pelo antiveneno de *B. jararaca* quando colocado frente aos sete venenos botrópicos; o poder neutralizante está expresso em mg/ml e em DL_{50}/ml .

Venenos	Títulos do antiveneno de <i>B. jararaca</i>	
	mg/ml	DL_{50}/ml
<i>B. jararaca</i>	12,0	269,18
<i>B. alternatus</i>	7,0	109,14
<i>B. cotiara</i>	6,0	56,15
<i>B. neuwiedi</i>	3,0	55,38
<i>B. pradoi</i>	3,0	31,44
<i>B. jararacussu</i>	4,0	38,54
<i>B. moojeni</i>	5,0	47,39

A análise dos dados expostos permite constatar que, quando da reação específica, 1 ml do antiveneno de *B. jararaca* neutraliza 12,0 mg ou 269,18 DL50 do veneno e quantidades variáveis das demais peçonhas, conforme o número de componentes imunogênicos comuns. Assim, as quantidades de veneno de *B. alternatus* e *B. cotiara* neutralizadas (7,0 mg/ml e 6,0 mg/ml, respectivamente) demonstram que estes venenos poderiam ser considerados antigenicamente próximos ao veneno de *B. jararaca*. Aliás, este fato já tinha sido por nós anteriormente demonstrado, através de técnicas imunoquímicas¹³.

As tabelas 9 e 10 expressam os resultados observados quando dos testes de soroneutralização entre os antivenenos específicos de *B. moojeni* e *B. neuwiedi* frente aos venenos estudados.

TABELA 9

Títulos apresentados pelo antiveneno de *B. moojeni* quando colocado frente aos sete venenos botrópicos; o poder neutralizante está expresso em mg/ml e em DL50/ml.

Venenos	Títulos do antiveneno de <i>B. moojeni</i>	
	mg/ml	DL50/ml
<i>B. moojeni</i>	5,0	47,39
<i>B. jararaca</i>	5,0	112,16
<i>B. alternatus</i>	5,0	77,95
<i>B. cotiara</i>	3,0	28,07
<i>B. neuwiedi</i>	3,0	55,38
<i>B. pradoi</i>	3,0	31,44
<i>B. jararacussu</i>	3,0	28,90

A atividade do antiveneno de *B. moojeni* é a mesma para os venenos de *B. moojeni*, de *B. jararaca* e de *B. alternatus*, quando expressas em mg de veneno neutralizado. Todavia, quando comparadas as atividades em DL50 neutralizadas, o antiveneno de *B. moojeni*, é mais ativo para os venenos de *B. jararaca*, de *B. alternatus* e de *B. neuwiedi*, que para o veneno específico.

TABELA 10

Títulos apresentados pelo antiveneno de *B. neuwiedi* quando colocado frente aos sete venenos botrópicos; o poder neutralizante está expresso em mg/ml e em DL50/ml.

Venenos	Títulos do antiveneno de <i>B. neuwiedi</i>	
	mg/ml	DL50/ml
<i>B. neuwiedi</i>	3,0	55,38
<i>B. jararaca</i>	2,0	44,86
<i>B. alternatus</i>	1,0	15,59
<i>B. cotiara</i>	1,0	9,36
<i>B. pradoi</i>	3,0	31,44
<i>B. jararacussu</i>	2,0	19,27
<i>B. moojeni</i>	2,4	22,75

Quanto ao antiveneno de *B. neuwiedi*, verificamos igual eficiência de neutralização cruzada para o veneno da espécie *B. pradoi*, seguida pelas espécies *B. moojeni*, *B. jararaca* e *B. jararacussu*, quando analisados em termos de mg de veneno neutralizados por ml.

Assim, além de demonstrar, satisfatoriamente, a ocorrência de reações cruzadas entre os vários venenos e antivenenos botrópicos, através de inoculação intraperitoneal em camundongos, confirmamos, também, a conveniência de que a titulação dessas substâncias biológicas se relate à soroneutralização dos componentes tóxicos desses venenos.

Os nossos resultados não podem ser cotejados com os de outros autores, que utilizaram critérios diferentes quanto aos animais de experimentação e às vias de inoculação. Como exemplos, Brazil e Rangel Pestana³ (1909) e Vellard¹⁶ (1930) usaram pombos, enquanto que Césari e Boquet⁴ (1937) empregaram coelhos; por outro lado, Schöttler^{10, 11}, empregou as vias intravenosa e subcutânea de camundongos. No entanto, nossos resultados permitiram o estabelecimento de um modelo experimental que se presta, satisfatoriamente, para as finalidades às quais nos propusemos. A demonstração da importância da quantificação dos componentes tóxicos, ao invés dos coagulantes, quando da titulação de venenos e antivenenos botrópicos e a comprovação da existência de neutralização cruzada, quer nos parecer terem aberto novas perspectivas para o estudo do ofidismo, permitindo-nos recomendar este método como o mais condizente com as propriedades farmacológicas desses venenos.

CONCLUSÕES

1. O emprego da via intraperitoneal de camundongos nos possibilitou demonstrar, satisfatoriamente, a soroneutralização paraespecífica, com a utilização dos antivenenos de *B. jararaca*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, colocados frente aos venenos botrópicos estudados;
2. o antiveneno de *B. jararaca* neutraliza, com maior eficiência o veneno específico, seguindo-se dos venenos das espécies *B. alternatus* e *B. cotiara*;
3. o antiveneno de *B. moojeni* neutraliza, com igual eficiência, os venenos das espécies *B. jararaca*, *B. alternatus* e o específico;
4. o antiveneno de *B. neuwiedi* neutraliza, com igual eficiência, os venenos das espécies *B. pradoi* e *B. neuwiedi*, seguindo-se dos venenos de *B. moojeni*, *B. jararaca* e *B. jararacussu*.

ABSTRACT: The authors demonstrate that the intraperitoneal inoculation in mice is also appropriate to evidence the reactions of paraspécific neutralization between sera of bothropic venoms and antivenins. The antivenins of *B. jararaca*, *B. moojeni*, and *B. neuwiedi* were studied in relation to the venoms from the species *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. neuwiedi*, *B. pradoi*, *B. jararacussu* and *B. moojeni*. According to the obtained results, and confirmed by prior studies, it is proven that in measuring the activity of the toxic instead of the coagulant components would be more adequate for the study of bothropic venoms, since this procedure facilitates the adoption of a highly reproductive quantification of the factors responsible for the more serious consequences inherent to ophidic accidents.

KEYWORDS: paraspecific serum neutralization of bothropic venoms; cross reaction between bothropic venoms and antivenins; utilization of mice in cross neutralization of bothropic venom sera.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOLAÑOS, R.; CERDAS, L. & TAYLOR, R. The production and characteristics of a coral snake (*Micrurus mipartitus Hertwigi*) antivenin. *Toxicon*, 13: 139-42, 1975.
2. BRAZIL, V. Dosagem do valor antitóxico dos seruns antipeçonhentos. *Rev. méd. São Paulo*, 10: 457-62, 1907.
3. BRAZIL, V. & RANGEL PESTANA, B. Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophídico. *Rev. méd. São Paulo*, 12: 415-25, 1909.
4. CÉSARI, E. & BOQUET, P. Recherches sur les antigènes des venins et les anticorps des sérum antivenimeux. *Ann. Inst. Pasteur*, 58: 6-25, 1937.
5. CHRISTENSEN, P.A. Venom and antivenom potency estimation. *Mem. Inst. Butantan*, 33: 305-26, 1966.
6. FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2.^a ed. São Paulo, Gráfica Siqueira, 1959. p. 1034-5.
7. PURANANANDA, C.; LAUHATIRANANDA, P. & GANTHAVORN, S. Cross immunological reactions in snake-venoms. *Mem. Inst. Butantan*, 33: 327-30, 1966.
8. ROSENFIELD, G.; KELEN, E.M.A. & NUDEL, F. Neutralização cruzada do poder coagulante de venenos ofídicos com soros antivenenos. *Ciênc. Cult.*, 14:254-5, 1962.
9. ROSENFIELD, G. & KELEN, E.M.A. Cross neutralization of the coagulant activity of some snake venoms by antivenins. *Toxicon*, 4: 7-15, 1966.
10. SCHÖTTLER, W.H.A. Antigen-antibody relations in the present antivenin production of Brazil. *Amer. J. trop. Med.*, 31: 500-9, 1951.
11. SCHÖTTLER, W.H.A. Serological analysis of venoms and antivenins. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 12:877-903, 1955.
12. SILES VILLARROEL, M. Contribuição ao estudo de venenos e antivenenos botrópicos. São Paulo, 1977. /Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/.
13. SILES VILLARROEL, M.; FURLANETTO, R.S.; ZELANTE, F. & ROLIM ROSA, R. Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. III. Análise dos componentes antigênicos comuns através da dupla difusão em gel de ágar. *Mem. Inst. Butantan*, 40/41:241-50, 1976/77.
14. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. & FURLANETTO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, 42/43:311-23, 1978/79.
15. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F. & FURLANETTO, R.S. Padronização da avaliação da potência de antivenenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, 42/43:325-36, 1978/79.
16. VELLARD, J. Spécificité des sérum anti-ophidiques. *Ann. Inst. Pasteur* 44:148-70, 1930.