

ASPECTOS METODOLÓGICOS DA TITULAÇÃO DE SOROS ANTIPEÇONHENTOS^a

W. H. A. SCHÖTTLER^b

(Laboratório de Farmacobiologia, Instituto Butantan)

Ao contrário do que se passa com a titulação de antitoxinas bacterianas, onde os métodos de aferição e os "padrões" comportaram efetiva estandarização internacional, ainda não foi possível chegar-se a acôrdo com referência aos antivenenos (soros antipeçonhentos). De facto, cada instituição especializada nesta matéria está aplicando tipo diverso de prova e usando tipo diferente de padrão para seus produtos. Desta maneira, é praticamente impossível formar-se opinião razoável sôbre a eficiência desses soros, entregues ao consumo nos vários países ou contra as diferentes espécies de serpentes venenosas.

Por isso, parece oportuno apresentar as condições básicas a que um método de titulação de soros antipeçonhentos deve obedecer para ser universalmente aplicável e examinar as dificuldades e fontes de erro inerentes à sua execução.

Comparando o problema dos antivenenos com o das antitoxinas, nota-se uma série de diferenças características, tais como:

(a) Trabalho apresentado no "Simpósio sôbre Venenos Animais", realizado sob a presidência do prof. Afrânio do Amaral, Director do Instituto Butantan, na sexta reunião anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, em Ribeirão Preto, S. P., de 8 a 13 de Novembro de 1954.

(b) Contratado pela Secretaria de Saúde Pública e Assistência Social do Govêrno do Estado de São Paulo (contrato registrado sob n.º TC 47-53).

| | |
|---|--|
| <p>Nas doenças provocadas por toxinas bacterianas quanto à ação dos respectivos soros antitóxicos:</p> | <p>Nas mordeduras por serpentes venenosas quanto à ação dos respectivos soros anti-peçonhentos:</p> |
| <p>Há poucas doenças deste gênero com semelhança antigênica relativamente grande dentro do typo, de maneira que, por exemplo, uma antitoxina diftérica fabricada na Dinamarca tem o mesmo efeito terapêutico em casos de difteria na Dinamarca como na Sul-África, no Brasil ou na China.</p> | <p>A diferença antigênica entre venenos até dentro do mesmo gênero de serpentes pode ser fundamental. Por exemplo, um anti-veneno obtido pela imunização com veneno da cascavel norte-americana <i>Crotalus adamanteus</i> é sem valor prático no tratamento de uma picada pela cascavel sul-americana <i>Crotalus terrificus</i>.</p> |
| <p>A abundância dos casos clínicos minuciosamente estudados permite a avaliação estatística do valor curativo das antitoxinas e o estabelecimento de um esquema de doseamento eficaz para a medicação antitóxica bacteriana.</p> | <p>O número de casos de ofidismo que chegam à observação crítica de médicos especializados é tão limitado, que nenhuma conclusão sobre a eficiência da soroterapia anti-peçonhenta pode ser tirada da clínica.</p> |
| <p>Decorre, em geral, um longo intervalo de tempo entre a manifestação da doença e a acumulação de um nível letal de toxina, dando assim ampla margem para o início da soroterápica antes de serem provocados danos irremediáveis no organismo do paciente.</p> | <p>Numa mordedura por serpente venenosa, a vítima recebe bruscamente toda a quantidade de veneno. Desta maneira, sempre existe a dose final (concentração), e muitas vezes fatal, de veneno no corpo do picado antes da aplicação do antisoro.</p> |
| <p>A quantidade de toxina produzida no decorrer de uma doença bacteriana é sempre desconhecida e, por consequência, também o é a necessária dose da antitoxina.</p> | <p>É conhecida, ou pode ser apurada, a quantidade máxima de veneno, que uma serpente de determinada espécie possa injetar na pior das hipóteses, pelo peso das doses individuais obtidas na extração da peçonha em grande número de exemplares dessa espécie.</p> |
| <p>É difícil reproduzir ou mesmo imitar a doença humana em animais de laboratório sob condições controladas.</p> | <p>A mordedura por cobra venenosa efetua-se como simples injeção subcutânea ou intramuscular facilmente reproductível em animais de laboratório, pois o aparelho inoculador é tecnicamente idêntico a uma agulha hipodérmica.</p> |
| <p>As toxinas bacterianas para fins de estudo são produzidas por bactérias cultivadas em meios de cultura artificiais, cuja composição pode alterar as qualidades das toxinas desses germes de maneira, tornando-as diferentes do produto natural.</p> | <p>Podem-se obter os venenos ofídicos exactamente em estado natural e inalterado.</p> |

Baseando-se nos fatos relatados, pareceria à primeira vista bastante fácil estabelecer um método eficiente para a titulação dos antivenenos. Seria somente necessário determinar a dose mortal de um veneno em animais de laboratório: uma vez, sem tratamento consecutivo; e, outra vez, com administração da dose do soro a ser aferido. A diferença entre estas duas doses letais da peçonha devia representar a quantidade de veneno neutralizada pela ação de certo volume do antiveneno. Bastaria então, teoricamente, calcular a dose do soro que corresponde à quantidade máxima de veneno injetável pela espécie ofídica em questão, para saber quanto soro seguramente protege a vítima mesmo na pior eventualidade.

Na tentativa de pôr este princípio em prática, surgem muitas dificuldades, sendo a primeira destas a escolha do tipo de animal de laboratório a ser empregado. Sabendo que a sensibilidade de cada animal a qualquer princípio tóxico é individualmente diferente, é lógico que quanto maior fôr o número de espécimes utilizados, tanto mais certa será a informação assim obtida. Deste ponto de vista, apresenta-se como espécie mais apropriada o camundongo, pelo menor custo de sua criação, pela maior disponibilidade do número de exemplares e pela facilidade de manipular grande número de indivíduos ao mesmo tempo em lugar relativamente pequeno. Outra vantagem que recomenda o uso do camundongo é a evidente economia do material a ser investigado devida ao baixo peso destes animais.

Mostra, porém, a prática que o emprêgo de grande número de animais, na determinação da toxicidade de um veneno, em si não garante a obtenção de resultados numéricos satisfatórios. Assim, entre centenas de pesquisas congêneras, empregando mesmo cem e ainda mais animais para uma única titulação, a zona de erro do resultado numérico obtido, estatisticamente acertada, alcançou até mais de 100% do valor médio por via endovenosa e até 170% por via subcutânea, com venenos botrópicos (1). Foram excluídas, nestas investigações, como fontes de erro conhecidas, a diferença do sexo dos animais de laboratório (2, 3), diferenças do ambiente, tais como temperatura (4, 5), estação do ano (1, 6), tipo de gaiola para contenção dos animais (7) e volume de líquido injectado. Outros factores, porém, que podem influenciar a resistência de animais de laboratório, não eram controláveis nas determinações acima referidas devido a circunstâncias peculiares à prova. Neste caso, os animais usados não procediam de linhagem pura da mesma prole, nem havia entre eles homogeneidade relativamente ao peso (8), e à idade (9), nem com referência à idade dos seus progenitores no acto do acasalamento (10). Além disso, variava o espaço à disposição de cada animal no decorrer das pesquisas (7), pois, não obstante o número de animais por gaiola ser igual no início da titulação, variações da mortalidade nos diferentes lotes de animais provocavam desigualdades na densidade de exemplares nas gaiolas durante a investigação. Outrossim, não foi

possível — e, de facto, nunca o é — injetar várias doses de veneno no mesmo volume e também na mesma concentração (8). Nem podia ser efectuado o cumprimento sòmente desta última exigência de nenhum jeito, pois, no mencionado trabalho (1), a proporção entre a dose de veneno mais baixa e a mais alta chegou a ser de 1: 6.000.

Ademais, intervém aí outro factor que provavelmente contribuirá para a irregularidade da reacção dos animais em face do veneno. Tal factor é a composição complexa das peçonhas, e isto, porque um veneno contém vários componentes tóxicos com propriedades farmacodinâmicas bem diferentes, sem que haja paralelismo nas sensibilidades individuais dos animais de laboratório para com estes diversos princípios activos. Por exemplo, um animal pode ter um sistema nervoso muito resistente contra a acção neurotóxica de um veneno, mas possuir um endotélio capilar que fàcilmente sucumbe à acção chamada hemorrágica do mesmo veneno, enquanto num outro animal da mesma espécie a situação é exactamente a oposta. Assumindo que mais de dois tais factores possam intervir no êxito letal pelo envenenamento ofídico, pode-se imaginar o grande número de combinações possíveis que determinam a sensibilidade global de um animal individualmente e, assim, a grande margem de erro causada só por esta complicação.

Um dos problemas mais importantes na determinação da toxicidade de um veneno, aliás em qualquer ensaio biológico, é a necessidade de poder reproduzir os resultados na repetição da prova. Pesquisas realizadas para esta finalidade com seis venenos botrópicos (1) não deram resultados muito satisfatórios. Assim, em 43 pares de aferição da toxicidade, 14 vezes os resultados mostraram-se estatisticamente diferentes, tendo sido de 1: 10 a maior discrepância verificada entre dois resultados correspondentes.

Os factores responsáveis por esta falta de concordância são representados, ora por diferenças do material animal relativamente aos índices já enumerados, ora por diversidades na alimentação dos animais e em outras condições externas da pesquisa, tais como temperatura do ambiente, hora de injeção, etc.. Para a explicação das discordâncias na repetição da mesma prova devem-se também tomar em consideração possíveis alterações nas propriedades farmacológicas dos venenos pela armazenagem (11), pois ainda não se achou um método simples que seja absolutamente satisfatório para a conservação de venenos ofídicos. Que este último factor, porém, não é sempre responsável, é evidente pela observação de que em certos casos a dose letal da mesma amostra de veneno se revelou menor e, portanto, aumentada a toxicidade, na repetição da prova depois de decorridos alguns meses.

Não é surpreendente que, na maior parte dos venenos animais, a dose fatal, para a mesma espécie de animal de laboratório e em função de seu peso, dependa da via de inoculação do material, no sentido de que consideravelmente

menor quantidade de veneno é necessária para provocar a morte pela injeção endovenosa do que pela administração subcutânea (1, 3). Nota-se como uma das raras exceções o comportamento de certos venenos escorpionicos, cujas doses letais correspondentes a estas duas vias de aplicação não mostram diferença apreciável (12). Todavia, um fenômeno bem embaraçoso foi observado na determinação da atitoxicidade de várias peçonhas botrópicas em camundongos (1). Os resultados destas investigações indicam que não há paralelismo nas interrelações entre estes venenos, estabelecidas pelos dois modos de inoculação; ou, em outras palavras, verifica-se que a ordem de toxicidade destes venenos revelada pela injeção endovenosa é inversa à obtida na prova subcutânea. Assim, por exemplo, a peçonha mais tóxica pela administração na veia — neste caso um veneno de Caiçaca (*Bothrops atrox*) — era a mais fraca na prova por via hipodérmica. Esta observação reforça a hipótese de que o mecanismo farmacodinâmico da morte pelo envenenamento botrópico é diferente nas duas vias de aplicação, embora se precisem de mais estudos sobre o assunto antes de se poder generalizar tal opinião.

A situação torna-se ainda mais complicada quando se considera que a diferença da toxicidade entre várias amostras de veneno da mesma espécie ofídica, cada uma escolhida de centenas de exemplares, pode ser extremamente grande. Assim é que, por exemplo, cinco amostras de peçonha de Jararacuçu (*Bothrops jararacussu*) revelaram doses mortais médias, por via subcutânea em camundongos, de 5, 20, 35, 39 mg/kg, e, em duas provas separadas, uma vez 38 e outra vez 100 mg/kg (1, 13).

Se é indiscutível que todos estes factores têm papel importante dentro de uma mesma espécie de animal de laboratório, a dificuldade cresce quando se faz a comparação de resultados obtidos em diferentes tipos de animais, dada a diversa sensibilidade de cada espécie para com as várias peçonhas. Por exemplo: com relação a serpentes da Austrália, um veneno do *Pseudechis guttatus* se mostrou mais tóxico do que um veneno da *Denisonia superba* para o rato, mas menos tóxico para o camundongo (14, 15).

As dificuldades e fontes de erro até agora relatadas referem-se somente à determinação pura e simples da dose mortal do veneno. Lógicamente, elas se revelam igualmente na determinação da potência do antiveneno, quando o veneno é combinado com soro anti-peçonhento, o que introduz novos factores (variantes) na prova. Assim, não há conformidade entre a dose de veneno neutralizada por certo volume de soro, aferida pela prova subcutânea e pela endovenosa (1, 3): por exemplo, a mesma quantidade de um soro anti-jararaca neutralizou 15 mg de um veneno de *jararacussu* na titulação por via endovenosa, contra 195 mg na titulação por via subcutânea (1). Outra dificuldade impõe-se pelo facto de a neutralização de veneno por antiveneno não obedecer à regra das proporções múltiplas (3, 16, 17) e, assim, 2 ml de certo soro não neutralizarem o dôbro,

mas algo menos do dôbro, do mesmo peso de veneno que é neutralizado por 1 ml. Pode-se até chegar a uma dose de veneno que não seja mais possível de neutralizar por qualquer aumento da quantidade de sôro (3).

Conforme nos parece, todos os institutos que se ocupam com a titulação de soros anti-peçonhentos, usam métodos baseados na neutralização do veneno pelo antiveneno "in vitro", feita antes da inoculação da mistura em animais de laboratório. Admite-se que este proceder, executado com todas as cautelas para diminuir as possibilidades de erro acima acusadas, permita a comparação entre dois, ou mais, soros. Infelizmente, os resultados numéricos assim obtidos não fornecem informação segura sobre a dose de antiveneno a ser eficientemente aplicada no tratamento de casos humanos de ofidismo.

Não resta dúvida de que o valor terapêutico de um antiveneno só pode ser comprovado mediante a perfeita imitação do fenômeno natural, i. e., aplicando-se o sôro depois da inoculação subcutânea ou intramuscular do veneno, e este tipo de investigação foi iniciado, em cães, no Instituto Butantan já há mais de trinta anos (18). Ademais é indispensável experimentar com as doses máximas de peçonha que uma serpente possa injectar, e isso exige o emprego de animais de grande porte na pesquisa, quer dizer do cão para cima. Tal exigência não deve ser considerada como original ou mesmo irrisória, pois já foi por vezes tentada em prática. Por exemplo, com o gasto de mais de 120 carneiros, foram executadas investigações sobre o valor curativo do garrote (constricção) no tratamento do ofidismo experimental (19), e com o emprego até de cavalos foram feitas outras pesquisas sobre venenos (14, 20).

Injectando a dose máxima de veneno que existe disponível nas glândulas de determinada espécie ofídica e aplicando o soro destinado ao tratamento de tais casos após intervalo razoável, talvez de meia hora, poder-se-ia verificar se volumes admissíveis de antiveneno exercem um efeito benéfico no envenenamento. Um soro anti-peçonhento que, nestas condições, acusasse propriedades curativas satisfatórias poderia servir como padrão, contra o qual novos produtos do mesmo gênero pudessem provavelmente ser titulados mediante o emprêgo de animais menores em condições experimentais semelhantes.

Por mais laboriosa e custosa que esta tarefa possa parecer, devia ser atacada, com o objectivo de se transformar o atual mistério que cerca a titulação de soros anti-peçonhentos em método prático, acessível e cientificamente fundado. Justificar-se-iam o trabalho e as despesas assim exigidas à luz dos algarismos impressionantes obtidos num inquérito recém-realizado pela Organização Mundial de Saúde (21), o qual mostrou que, fora da Europa Central, da União Soviética e da China, cerca de 500.000 pessoas são anualmente mordidas por serpentes, com resultado fatal em 30.000 a 40.000 desses casos.

RESUMO

Os métodos actualmente usados para a titulação de soros antipeçonhentos são diferentes em cada país e somente têm em comum não permitirem a determinação do valor terapêutico de tais produtos. Além da necessidade de evitar os erros inerentes à determinação da toxicidade de venenos e da aferição da sua neutralização por antivenenos, e de achar os factores responsáveis para tais erros, é preciso estabelecer soros padrões para os antivenenos, de forma semelhante à adoptada para as antitoxinas bacterianas. Para servir como padrão, um determinado soro antipeçonhento deve, em volume razoável, ser capaz de salvar a vida de um animal susceptível, previamente injectado com a quantidade máxima de veneno que algum exemplar da espécie ofídica correspondente pode inocular na picada.

SUMMARY

The methods now used in the titration of antivenins vary from country to country. In common they only have the fact that they give no indication of the therapeutic value of such serums. It is, therefore, necessary not only to establish standards for antivenins like those adopted for antitoxins but also to avoid the errors inherent to in the determination of the toxicity of venoms and of their neutralization by the specific antivenin as well as to trace the factors responsible for such errors. In order for an antivenin to serve as standard, it must, in a reasonable amount, be able to save the life of a susceptible animal that has been previously inoculated with the maximum amount of venom any specimen of the corresponding species of snake may inject on biting.

BIBLIOGRAFIA

1. Schöttler, W. H. A. — Serological analysis of venoms and antivenins. Bull. World Health Org., sendo impresso.
2. Dossena, P. — Recherches sur l'influence des hormones sexuelles dans l'intoxication expérimentale par le venin de *Naja flava* (Cape cobra). Acta Trop. 6: 263; 1949.
3. Schöttler, W. H. A. — Problems of antivenin standardization. Bull. World Health Org. 5: 293; 1952.
4. Micheel, F., & F. Jung-Zur Kenntnis der Schlangengifte. Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 239: 217; 1936.
5. Slotta, C. H., & G. Szyszka — Estudos químicos sobre os venenos ophídicos. 1. Determinação de sua toxicidade em camundongos. Mem. Inst. Butantan 11: 109; 1937.
6. Südmersen, H. J., & A. T. Glenny-Variation in susceptibility of guinea-pigs to diphtheria toxin. J. Hyg. 9: 399; 1909.

7. Chance, M. R. A. — Factors influencing the toxicity of sympathomimetic amines to solitary mice. *J. Pharm. & Exp. Ther.* 89: 289; 1947.
8. Glenny, A. T. — The relation between dosage and death-time. *J. Path. & Bact.* 28: 251; 1925.
9. Lévy, J., & R. Meyer — Variations de sensibilité individuelle chez la souris en fonction de la croissance. *C. r. Soc. Biol.* 140: 445; 1946.
10. Lévy, J., & R. Meyer — Variations de sensibilité individuelles chez la souris en fonction de l'âge des reproducteurs. *C. r. Soc. Biol.* 140: 447; 1946.
11. Schöttler, W. H. A. — On the stability of desiccated snake venoms. *J. Immunol.* 67: 299; 1951.
12. Schöttler, W. H. A. — On the toxicity of scorpion venom. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 3: 172; 1954.
13. Schöttler, W. H. A. — Toxicity of the principal snake venoms of Brazil. *Am. J. Trop. Med.* 31: 489; 1951.
14. Kellaway, C. H. — A preliminary note on the venom of the Australian copper-head (*Denisonia superba*): its toxic effects in the common laboratory animals. *Med. J. Australia* 1: 358; 1929.
15. Kellaway, C. H. — A preliminary note on the venom of *Pseudechis guttatus*. *Med. J. Australia* 1: 372; 1929.
16. Brazil, V. — Dosagem do valor anti-toxico dos serums anti-peçonhentos. *Rev. med. S. Paulo* 10: 457; 1907.
17. Houssay, B. A., & J. Negrete — Proporciones en que el suero antiofídico neutraliza la ponzoña de las serpientes. *Rev. Asoc. méd. Argentina* 34: 845; 1921.
18. Gomes, J. F. — Da acção do soro anti-botropico sobre a intoxicação experimental pelo veneno da *Lachesis lanceolatus*. *Ann. Paul. Med. & Cir., S. Paulo*, 8: 149; 1920.
19. Fairley, N. H. — Criteria for determining the efficacy of ligature in snake bite. *Med. J. Australia* 1: 377; 1929.
20. Kellaway, C. H. — The venom of *Notechis scutatus*. *Med. J. Australia* 1: 348; 1929.
21. Swaroop, S., & B. Grab — Snakebite mortality in the world. *Bull. World Health Org.* 10: 35; 1954.