ESTUDO QUANTITATIVO DA REAÇÃO DE FLOCULAÇÃO ENTRE O VENENO E O ANTIVENENO CROTÁLICO

POR

OTTO G. BIER

(com a assistência técnica de MARIA BRAZIL ESTEVES)

(Do Laboratório de Imunologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Arantes, Karmann & Bier (1) demonstraram que a reação de floculação observada entre o veneno de Crotalus t. terrificus (cascavel neotrópica) e o respectivo antiveneno deve ser considerada como uma reação antígeno-anticorpo específica, em vista da estreita correlação in vivo - in vitro por êles verificada, experimentando o veneno em relação a um grande número de partidas de antiveneno.

Uma vez que os métodos quantitativos desenvolvidos para a dosagem das precipitinas (2) foram aplicados com sucesso ao estudo da reação toxina-antitoxina, quer no caso da toxina diftérica (Pappenheimer & Robinson, 1937), quer no caso da toxina escarlatínica (Hottle & Pappenheimer, 1941), pareceu-nos que tal técnica devera ser aplicada também ao sistema V-A crotálico. A intenção foi a de obter, assim, dados importantes para a avaliação da atividade imunológica do veneno puro, independentemente do seu isolamento, bem como para a determinação quantitativa do antiveneno.

MATERIAL E MÉTODOS

Solução de veneno — As soluções de veneno foram preparadas adicionando-se o veneno sêco padrão do Instituto, na proporção de 0,4%, a um soluto hipertônico de NaCl (1.5%), de acôrdo com a técnica aconselhada por VITAL BRAZIL (5), a qual permite assegurar rápida e completa dissolução.

Esta solução-mãe foi conservada na geladeira sem adição de qualquer preservativo e usada dentro de 3 a 4 dias, no máximo, preparando-se diluições da mesma em soluto isotônico de NaCl (0.9%) que, antes de serem usadas nas experiências de floculação, eram centrifugadas na câmara fria a 2000 r.p.m. durante meia hora, a fim de obter-se um sobrenadante perfeitamente límpido.

Antivenenos — Foram usadas três partidas diferentes de antiveneno crotálico, sob a forma de sôro de cavalo hiperimune, não purificado, de sangria direta feita, no máximo, oito dias antes das experiências. O sôro, separado do coágulo por sifonagem, foi centrifugado no dia seguinte, deixado em repouso durante mais 24 a 48 horas em câmara fria e novamente centrifugado, a 2000 r.p.m. meia hora, no dia da experiência.

As três partidas de antiveneno utilizadas, correspondentes aos cavalos de números 152, 190 e 188, neutralizavam respectivamente 0.22 - 0.40 e 0.54 mg de veneno de *Crotalus t. terrificus* per ml de antiveneno, sendo as dosagens feitas no pombo, pela via intravenosa, de acôrdo com o método de uso corrente no Instituto.

Técnica das reações de precipitação — De cada antiveneno determinou-se o ótimo de floculação, quer usando-se o método α (proporções ótimas, segundo DEAN & WEBB), quer o método β (RAMON). No primeiro caso, a 2 ml de sôro adicionaram-se quantidades variáveis de veneno, igualando-se os volumes com água fisiológica; no segundo caso, a 2.5 ml de uma solução contendo 0.1 mg de veneno per ml, adicionaram-se quantidades variáveis de sôro, igualando-se também os volumes finais com solução isotônica de NaCl.

Os tubos foram imersos, então, em banho-maria a 50°C até uma altura correspondente a cêrca de 1/3 do seu conteúdo, fazendo-se leituras em intervalos repetidos, a fim de registrar o ótimo de floculação.

Nas experiências quantitativas, a porções de 4-5 ml de sôro adicionaram-se quantidades variáveis de um soluto de veneno contendo 1 mg per ml, misturando-se cuidadosamente o conteúdo dos tubos e deixando-se completar a precipitação durante a noite na geladeira.

Determinação de nitrogênio nos precipitados — Após centrifugação (na câmara fria) e decantação dos sobrenadantes, os precipitados foram desagregados e lavados três vezes com água fisiológica gelada, procedendo-se à recentrifugação dos sobrenadantes, de acôrdo com a referência (6). As análises foram feitas em duplicata, só se considerando satisfatórios os resultados compreendidos dentro de um êrro de ± 3%; ocasionalmente, quando os valores mais baixos não estiveram compreendidos dentro daquela variação, foram êles desprezados, computando-se apenas o valor superior.

As determinações de nitrogênio foram feitas pelo método micro-Kjeldahl, segundo a técnica de Meeker & Wagner, recebendo-se a amônia acarretada por uma corrente de vapor dágua em soluto saturado de ácido bórico e titulando-se diretamente com HCl n/70.

RESULTADOS

Os resultados das determinações quantitativas feitas com três diferentes antivenenos figuram nas tabelas 1, 2 e 3.

TABELA I

Floculação quantitativa do sôro crotálico 190

Quantidades crescentes de veneno adicionadas a 4 ml de antiveneno.

I ol. veneno I mg. per ml	II N-veneno (*)	III N•precipitado	IV N-antiveneno (III - II)	N-antiveneno N-veneno (1V - 11)	VI Ôtimo de floculação		
ml	mg	mg	mg	-	a) 0.77 mg de		
1.1	0.0824	1.164	1.082		veneno para 2		
1.2	0.0898	1.202	1.112	and the same of	ml de sôro.		
1.3	0.0973	1.311	1.214	0.0590	Ratio: 2,6 8) 0.6 ml de		
1.4	0.1048	1.398	1.293	12.3	sôro para 0.25		
1.5	0.1123	1.425	1.312	11.7	mg de veneno.		
1.6	0.1198	1.408	1.288	10.7	Ratio: 2.4. Tempo de flo		
1.7	0.1273	1.420	1.292	10.1	culação:		
1.8	0.1348	1.404	1.269	9.4	30 min.		

^(*) Calculado da seguinte maneira: Cada ml do soluto de veneno empregado continha, em realidade, 0.78 mg de veneno crú (descontando-se 12% de água contidos no voneno padrão pulverulento).

Sôbre a base do rendimento máximo de crotoxina obtido por Slotta & Fraenkel-Conrat (7) e que é de cêrca de 60%, pode-se calcular que 0.78 mg de veneno crú contém 0.468 mg de crotoxina, ou sejam, 0.468: 6,25 = 0.07488 mg de N-crotoxina.

TABELA II

Floculação quantitativa do sôro crotálico 188

Quantidades crescentes de veneno adicionadas a 4 ml de antiveneno.

I II N - veneno 1 mg per ml		III N-precipitado	IV N-antiveneno (III - II)	V Ratio N-antiveneno N-veneno (IV - II)	VI Ôtimo de floculação		
ml	mg	mg	N. correspo	calcular o	α) Não poude		
1.1	0.0824	0.138	dente ao an	N correspon	ser determina- do com exati-		
1.2	0.0898	0.386	ratio N-an	sesion, que	dão.		
1.3	0.0973	0 679	piray obstic	de N-prec	β) 0.6 ml de		
1.4	0.1048	0.931	0.826	mis by the	sóro para 0.25		
1.6	0.1198	1.340	1.220	10.2	mg de veneno. Ratio: 2.4.		
1.7	0.1273	1.442	1.315	10.3	Tempo de flo-		
1.8	0.1348	1.586	1.451	10.8	culação: 150 min.		

TABELA III

Floculação quantitativa do sôro crotálico 152

i)	Quantidades	crescentes	de	veneno	adicionadas	a	4	ml	de	antiveneno.
----	-------------	------------	----	--------	-------------	---	---	----	----	-------------

I II N-veneno 1 mg per ml		III N-precipitado	IV N-antiveneno (III - II)	V Ratio N-veneno N-antiveneno (IV - II)	VI Ótimo de floculação		
ml 0.8 0 9 1.0 1.1 1.2	mg 0.0599 0 0674 0.0749 0.0824 0.0898	mg 0.532 0.723 0.696 0 674 0.540	mg 0.472 0.655 0.621 0.591 0.450	9.7 8.3	 α) 0.46 mg de veneno para 2 ml de sóro. Ratio: 4.3. β) 1.13 mg de sóro para 0.25 mg de veneno. Ratio: 4.5. Tempo de floculação: 60 min. 		
ii) Qua	ntidades cress	0.856	no adicionada	s a 5 ml de	antiveneno		
1.3 1.4 1.5	0.0973 0.1048 0.1123	0.819 0.647 0.410	0.721 0.542	of the second	AND THE PARTY OF T		

DISCUSSÃO

Os dados quantitativos apresentados indicam que a floculação entre o veneno e o antiveneno crotálico, tal como acontece com a reação toxina-antitoxina diftérica, apresenta uma faixa mais ou menos estreita na qual o valor de N-precipitado passa por um máximo, decrescendo abruptamente abaixo ou acima desta zona ótima.

Avaliando-se em 60% o teor de veneno puro (crotoxina) contido no veneno crú (7) pode-se calcular o N correspondente ao veneno e, por subtração do N-precipitado, o N correspondente ao antiveneno.

Verifica-se, assim, que a ratio N-antiveneno: N-veneno, no tubo correspondente ao máximo de N-precipitado variou, nos três soros experimentados, entre 9.7 e 11.7. Tomando-se, por exemplo, o valor 11 para tal relação, admitindo que o antiveneno é uma globulina de pêso molecular igual a 180.000 e que o precipitado formado entre veneno e antiveneno crotálico, no ponto de floculação ótima tem a mesma composição molecular (GA₂) que os precipitados nos sistemas toxina-

antitoxina diftérica e ovalbumina-antiovalbumina (de cavalo), chega-se à conclusão de que o pêso molecular da crotoxina deve ser próximo de 33.000 (2×180.000).

Ora, êste é justamente o valor atribuido por Slotta & Forster (8), ao pêso molecular da crotoxina, calculado pelo teor de metionina. A uma ratio de 12 corresponderia um pêso molecular de 30.000: segundo as determinações de Gralén & The Svedeberg (9), o pêso molecular da crotoxina é de 30.500.

Quanto ao N correspondente ao antiveneno, atingiria, para os soros 190, 188 e 152, respectivamente os valores de 1.312 - 1.451 e 0.655 para 4 ml de sôro, ou seja de 328, 363 e 164 mg per ml, valores que estão de acôrdo com o poder neutralizante dos soros correspontes e que permitem aferir a atividade do antiveneno crotálico na base de cêrca de 600 mg de N-antiveneno para a neutralização de 1 mg de veneno bruto (ou 0.6 mg de crotoxina).

As especulações teóricas expostas têm, porém, valor limitado, sendo necessário comprová-las à custa de dados quantitativos que permitam o cálculo direto da ratio de combinação entre o veneno e o antiveneno na zona de equiva-lência. Estudos quantitativos com a crotoxina são também claramente indicados.

RESUMO E CONCLUSÕES

- O estudo quantitativo da reação de floculação entre o veneno e o antiveneno crotálico conduz a resultados semelhantes aos que se observam na reação toxina-antitoxina diftérica.
- 2. Os dados quantitativos apresentados não permitiram calcular a ratio de combinação entre o veneno e o antiveneno. Avaliando-se esta, porém, em função do pêso molecular da crotoxina, chega-se a interessantes conclusões sôbre a atividade imunológica do veneno puro e do antiveneno, que são brevemente discutidas no texto.

ABSTRACT

- The quantitative course of the reactions is very similar for Crotalus t. terrificus venom-antivenin and diphtheria toxin-antitoxin systems.
- 2. From the data obtained so far it was impossible to calculate the ratio N-antivenin: N-venom in the precipitate formed within the equivalence zone.

However, when this ratio is determined on the basis of the molecular weight attributed to crotoxin, interesting conclusions may be drawn regarding the immunological activities of venom and antivenin which are briefly discussed in the text.

BIBLIOGRAFIA

- Arantes, J. B., Karmann, G. & Bier, O. G. (1945). Emprêgo da reação de floculação específica na dosagem do antiveneno crotálico. Memórias do Instituto Butantan, 18, 172-177.
- Heidelberger, M. (1939). Quantitative absolute methods in study of antigen-antibody reactions. Bacteriological Rev., 3, 49.
- Pappenheimer, A. M., Jr. & Robinson, E. S. (1937). Quantitative study of Ramon diphtheria flocculation reaction. J. Immunol., 32, 291-300.
- 4. Hottle, G. A. & Pappenheimer, A. M., Jr. (1941). A quantitative Study of the Scarlet Fever Toxin-Antitoxin Flocculation Reaction. J. exp. Med., 74, 545-546.
- Vital Brazil (1908). A defesa contra o Ophidismo. Pocai-Weiss & Cia., São Paulo, Cf. pág. 60.
- 5. Heidelberger, M. & Kabat, E. A. (1938). Chemical studies on bacterial agglutination; quantitative data on pneumococcus R (Dawson S) anti-R (S) systems. J. exp. Med., 67, 545-550. Alexander, H. E. & Heidelberger. M. (1940). Chemical studies on bacterial agglutination; agglutinin and precipitin content of antisera to Haemophilus influenzae, type B. J. exp. Med., 71, 1-11.
- Slotta, C. H. & Fraenkel-Conrat, H. L. (1939). Estudos químicos sóbre os venenos ofídicos. 4. Purificação e cristalização do veneno da cobra Cascavel. Memórias do Instituto Butantan, 12, 505-512.
- Slotta, C. H. & Forster, W. (1939). Estudos químicos sóbre os venenos ofídicos. 5.
 Determinação quantitativa dos componentes que contêm enxofre. Memórias do Instituto Butantan, 12, 513-521.
- Gralén, N. & The Svedeberg. (1938). The molecular weight of crotoxin. Biochem.
 J., 32, 1375-1377.

(Recebido para publicação em março de 1945).