

POSSIBILIDADE DA DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DO VENENO DE *LACHESIS MUTA MUTA* E DA TITULAÇÃO DO ANTIVENENO ESPECÍFICO, EM CAMUNDONGOS

Medardo SILES VILLARROEL *

Flávio ZELANTE **

Raymundo ROLIM ROSA ***

José Luís DE LORENZO ****

RESUMO: Os autores testaram, em camundongos, a eficiência das vias intraperitoneal e intravenosa, tanto para a determinação da atividade tóxica, em termos de DL_{50} , do veneno de *Lachesis muta muta*, como para o doseamento do antiveneno específico.

Lotes de seis animais foram inoculados, pela via intraperitoneal, com doses crescentes de veneno, e observados após 10, 30, 60 minutos, 24 e 48 horas; todas as mortes ocorreram no período compreendido entre 60 minutos e 24 horas, sendo sempre proporcionais à progressão das doses. A inoculação intravenosa, por outro lado, não proporcionou os mesmos resultados; os animais, sem exceção, morreram durante os primeiros 30 minutos após a inoculação.

A via intraperitoneal permitiu, também, o doseamento do antiveneno específico, possibilitando a sua titulação em termos de mg ou de número de DL_{50} de veneno neutralizado por ml.

Os resultados demonstram a validade da via intraperitoneal de camundongos como modelo experimental satisfatório para essas finalidades.

PALAVRAS-CHAVE: Veneno de *Lachesis muta muta*, titulações do veneno e do antiveneno laquélico, em camundongos.

INTRODUÇÃO

Devido ao elevado número de acidentes, é grande o interesse despertado pelo estudo dos venenos e antivenenos ofídicos, sendo bastante

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

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

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

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

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

extensa a literatura pertinente. Todavia, poucos foram os autores que se preocuparam com a análise, "in vivo", da ação dos venenos das espécies de *Lachesis*. Este aparente desinteresse possivelmente esteja relacionado com a limitada distribuição geográfica dessas serpentes encontradas apenas na América Central e na América do Sul⁹. No Brasil, são encontradas somente na Região Amazônica e nas florestas da Vertente Atlântica Centro-Leste^{8,9}, sendo pequeno o número de acidentes relatados¹³.

Brazil e Rangel Pestana³ (1909), testaram vários animais com as finalidades de determinar a toxicidade dessas peçonhas e de dosar os respectivos antivenenos; concluíram que as aves são mais sensíveis à ação dos venenos ofídicos e adotaram, como modelo experimental, o pombo e a via intravenosa. Foram os primeiros pesquisadores a divulgar informes relativos à atividade tóxica do veneno laquéutico e da ação neutralizante do antiveneno. Mais tarde, Rosenfeld¹³ (1976) descreveu a sintomatologia e a evolução clínica da intoxicação laquéutica, observando indivíduos que sofreram acidentes por serpentes desse gênero.

Bolaños¹ (1972), estudando a toxicidade de peçonhas de serpentes da Costa Rica, comparou a variação da atividade do veneno de *Lachesis muta stenophrys*, quando inoculado pelas vias intravenosa e intraperitoneal de camundongos. Verificou que a primeira via determinava maior toxicidade.

Apesar da inconveniência do uso de pombos para a determinação da toxicidade de venenos, até o presente, em nosso país, ainda é adotado o método proposto por Vital Brazil² (1907). Sendo a Farmacopéia Brasileira⁶ (1977) omissa a respeito do laquéutico, seu doseamento é realizado a partir de inoculações intravenosas em pombo, que são observados durante 24-48 horas, embora Siles Villarroel¹⁵ (1977) e Siles Villarroel e cols.^{16, 17, 18, 19} tenham demonstrado que o camundongo e as vias intraperitoneal ou intravenosa, conforme o caso, constituem o modelo mais adequado para ensaios com venenos e antivenenos botrópicos, elapídicos e crotálicos.

Devido à inexistência de informações e dando continuidade às observações anteriormente realizadas, neste trabalho os autores se propuseram a analisar, comparativamente ao pombo, o comportamento do camundongo como animal experimental e as vias intravenosa e intraperitoneal, como vias de inoculação para a determinação da toxicidade do veneno da espécie *Lachesis muta muta* e da atividade neutralizante do antiveneno específico.

MATERIAL E MÉTODOS

Veneno laquéutico

O veneno utilizado em todos os ensaios, foi obtido por extração manual de várias serpentes adultas *Lachesis muta muta* Linnaeus, 1766, dessecado a vácuo e, após a cristalização, mantido em geladeira, a $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Quando do uso, foi preparada uma solução concentrada a 1% em solução de NaCl a 0,85%. A partir desta, foram preparadas todas as demais diluições utilizadas.

Para as posteriores comparações, a Dose Mínima Mortal (DMM) do veneno, determinada em pombos segundo o método de Vital Brazil, correspondeu a 225,0 μ g do veneno seco. Em todas as determinações realizadas, as mortes ocorreram em até 30 minutos.

Antiveneno laquético

O antiveneno específico foi obtido através da hiperimunização de cavalos e purificado de acordo com o método de Pope modificado⁷ (1961). Quando da realização dos ensaios, foi diluído a 1:2 em virtude da sensibilidade apresentada pelos camundongos ao fenol, normalmente adicionado como preservador dos imunossoros purificados.

A sua atividade neutralizante, determinada em pombos (método de Vital Brazil), foi equivalente a 1,5 mg/ml.

Animais utilizados

Foram utilizados camundongos brancos (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758), sem distinção de sexo, adultos jovens, pesando 20 g \pm 2,0 g, procedentes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP; estes animais receberam inoculações pelas vias intravenosa ou intraperitoneal, no volume de 0,5 e 1,0 ml, respectivamente. Foram utilizados lotes de seis animais por dose; após as inoculações, foram observados por um período máximo de 48 horas, com leituras parciais aos 10, 30 e 60 minutos e 24 horas.

Determinação da DL₅₀ do veneno

Foi realizada de acordo com o método de Reed & Muench¹² (1938).

RESULTADOS

Para possibilitar a determinação da DL₅₀, foi necessária a avaliação prévia das zonas de toxicidade do veneno, inoculado tanto pela via intravenosa como pela intraperitoneal. Os resultados constam das tabelas 1 e 2, respectivamente.

TABELA 1

Determinação da zona de toxicidade do veneno de *Lachesis muta muta* inoculado, pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas			
	25	50	100	200
10 minutos	0/6	0/6	2/6	6/6
30 minutos	0/6	0/6	3/6	—
60 minutos	0/6	0/6	3/6	—
24 horas	0/6	0/6	3/6	—
48 horas	0/6	0/6	3/6	—

SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F. ROLIM-ROSA, R. & DE LORENZO, J. L. Possibilidade da determinação da toxicidade do veneno de *Lachesis muta muta* e da titulação do antiveneno específico, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:281-288, 1980/81.

TABELA 2

Determinação da zona de toxicidade do veneno de *Lachesis muta muta* inoculado, pela via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas			
	50	100	200	400
10 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6
24 horas	0/6	0/6	0/6	6/6
48 horas	0/6	0/6	0/6	—

A partir dessas informações, foram realizados os ensaios determinantes da DL_{50} , cujos resultados constam das tabelas 3 e 4.

TABELA 3

Tentativa de determinação da DL_{50} do veneno de *Lachesis muta muta* inoculado, pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas					
	50,00	60,00	72,00	86,40	103,68	124,42
10 minutos	1/6	1/6	1/6	1/6	6/6	6/6
30 minutos	1/6	1/6	1/6	1/6	—	—
60 minutos	1/6	1/6	1/6	1/6	—	—
24 horas	1/6	1/6	1/6	1/6	—	—
48 horas	1/6	1/6	1/6	1/6	—	—

TABELA 4

Determinação da DL_{50} do veneno de *Lachesis muta muta* inoculado, pela via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas						
	250,00	280,00	313,60	351,23	393,38	440,58	DL_{50}
10 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	0/6	3/6	4/6	5/6	6/6	6/6	295,27 μ g
48 horas	0/6	3/6	4/6	5/6	—	—	295,27 μ g

A tabela 5 apresenta os resultados dos ensaios para a determinação do título neutralizante do imunessoro específico, através da via intraperitoneal.

TABELA 5

Doseamento do antiveneno de *Lachesis muta muta* (0,5 ml), aferido frente ao veneno específico ($DL_{50} = 295,27 \mu\text{g}$); mistura inoculada, pela via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos.

Veneno de <i>L. muta muta</i>		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
1,0	0,10	0,40	37°C	0/6	0/6
1,1	0,11	0,39		0/6	0/6 *
1,2	0,12	0,38	x	1/6	1/6
1,3	0,13	0,37	30 min.	2/6	3/6
1,4	0,14	0,36		3/6	4/6

* Título: 1 ml de antiveneno de *L. muta muta* neutraliza completamente 4,4 mg ou 14,9 DL_{50} do veneno respectivo.

DISCUSSÃO

Ao contrário do método de Vital Brazil, o emprego de camundongos que sofreram inoculações pela via intraperitoneal possibilitou a determinação da DL_{50} do veneno de *Lachesis muta muta*, com satisfatória reprodutibilidade.

Embora, em todos os ensaios realizados, o período de observação tenha sido mantido até 48 horas, quando da inoculação intravenosa, as mortes ocorreram, sistematicamente, dentro dos primeiros 30 minutos, com as doses próximas ou superiores à zona de toxicidade (Tabela 3), não permitindo a determinação da DL_{50} . Com isto, ficou evidenciado que a inoculação intravenosa não é adequada para essa finalidade.

Ao contrário, quando o veneno foi administrado pela via intraperitoneal, as mortes se sucederam somente após 60 minutos (Tabela 4), obedecendo a uma regularidade e guardando uma relação com a progressão das doses inoculadas. A DL_{50} equivalente a 295,27 μg do veneno, correspondente à leitura de 24 horas, manteve-se para a de 48 horas, permanecendo esta característica constante em todos os ensaios realizados. Desta forma, torna-se desnecessária a leitura até 48 horas, reduzindo o período de observação.

As demais vias usuais de inoculação não foram verificadas no presente trabalho, devido às observações de outros autores, que demonstraram serem elas menos eficientes^{2, 3}.

Embora Bolaños¹ (1972) tenha utilizado a via intravenosa para a determinação da DL_{50} da peçonha de *Lachesis muta stenophrys*, os nos-

Os resultados não podem ser cotejados devido à provável constituição diversa do veneno analisado por aquele autor, apesar de serem produtos de serpentes do mesmo gênero.

As mortes precoces, observadas quando da inoculação intravenosa, possivelmente sejam devidas à somatória de diferentes atividades do veneno, dentre as quais a coagulação intravascular constatada por Rosenfeld¹³ em humanos, embora estes testes "in vitro" tenham demonstrado que este veneno é dotado de fraca atividade coagulante¹⁴. Todavia, Deutsch & Diniz⁴ (1955), Diniz e cols.⁵ (1973) e Oliveira¹⁰ (1974), empregando o método de Ware & Seegers²⁰ (1949), observaram o contrário.

A DL₅₀ determinada nas presentes observações (295,27 µg), superior à DMM verificada em pombos (225,0 µg), demonstra que estes animais, embora de maior porte mas morrendo dentro dos primeiros 30 minutos após a inoculação, são dotados de elevada sensibilidade ao veneno em si ou a algum dos fatores que o constituem. A DMM, nestas condições, não determina a real toxicidade do veneno, mas um fenômeno particular da via de inoculação, pois o mesmo foi observado nos camundongos que sofreram inoculação pela mesma via, num determinado limiar da progressão das doses (Tabela 3).

O mesmo modelo experimental permitiu o doseamento da potência do antiveneno laquélico específico, possibilitando expressá-la em termos de mg de veneno ou em número de DL₅₀ neutralizadas por ml. Esta conduta, confirmando as recomendações de Bolaños^{1, 11}, comportou-se de forma semelhante à verificada com o antiveneno botrópico^{15, 17}.

Assim, a atividade tóxica responsável pelas manifestações clínicas dos venenos de *Lachesis muta muta* e das principais espécies botrópicas do Brasil e, ainda, a capacidade neutralizante dos antivenenos específicos, somente podem ser determinadas de forma segura, econômica e reprodutível, empregando-se a via intraperitoneal de camundongos.

CONCLUSÕES

1. A inoculação intraperitoneal em camundongos possibilitou, satisfatoriamente, a determinação da DL₅₀ do veneno de *Lachesis muta muta* e o doseamento do antiveneno específico;

2. ao contrário, conforme a dose, a inoculação intravenosa promoveu a morte rápida dos animais, no máximo em 30 minutos, tornando inviáveis tais determinações.

ABSTRACT: The authors tested in mice the efficiency of intraperitoneal and intravenous routes for the determination of the toxic activity, in terms of LD₅₀, of *Lachesis muta muta* venom as well as for the dosage of specific antivenins.

Groups of 6 animals were inoculated via intraperitoneal with increasing doses of venom, and observed after 10, 30, and 60 min, 24 and 48 h; death occurred between 60 min and 24 h, always proportional to the progression of the doses. The intravenous

inoculation, on the other hand, did not produce the same results; without exception, the animals died within the first 30 min after inoculation.

Moreover, the intraperitoneal route allowed the dosage of the specific antivenin, granting its titration in terms of mg or the number of LD₅₀ of neutralized venom per ml.

The results demonstrated the intraperitoneal route in mice as a satisfactory experimental model for this purpose.

KEY-WORDS: *Lachesis muta muta* venom; titrations in mice of lachesis venom, and its antivenins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOLAÑOS, R. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. *Amer. j. trop. Med. Hyg.*, 21:360-3, 1972.
2. BRAZIL, V. Dosagem do valor antitóxico dos serums antipeçonhentos. *Rev. méd. São Paulo*, 10:457-62, 1907.
3. BRAZIL, V. & RANGEL PESTANA, B. Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. *Rev. méd. São Paulo*, 12:415-25, 1909.
4. DEUTSCH, H.F. & DINIZ, C.R. Some proteolytic activities of snake venoms. *J. biol. Chem.*, 216:17-26, 1955.
5. DINIZ, C.R.; MAGALHÃES, A. & OLIVEIRA, G.J. Proteases de serpentes brasileiras. I. Separação de enzima coagulante (Clotase) do veneno de *Lachesis mutus*. *Ciênc. e Cult.*, 25:872, 1973.
6. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3.^a ed., São Paulo, Organização Andrei Editora S.A., 1977.
7. FURLANETTO, R.S. *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico*. São Paulo, 1961. p-64-5. /Tese — Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo/.
8. HOGE, A.R. & ROMANO, S.A. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem. Inst. Butantan*, 36:109-208, 1972.
9. HOGE, A.R. & ROMANO HOGE, S.A.R.W.L. Poisonous snakes of the world. Part. I — Check list of the Pit Vipers Viperioidea, Viperidae, Crotalinae. *Mem. Inst. Butantan*, 42/43:179-310, 1978/79.
10. OLIVEIRA, G.J. *Purificação e propriedades de uma enzima do veneno de Lachesis muta muta com atividade de trombina*. Belo Horizonte, 1974. /Tese — Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais/.
11. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual de Procedimientos — Producción y pruebas de control en la preparación de antisueros diftérico, tetánico, botulínico, antivenenos y de la gangrena gaseosa. Enero, 1977.
12. REED, L.J. & MÜNCH, H. A simple method of estimating fifty per cent and points. *Amer. j. Hyg.*, 27:493-7, 1938.
13. ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. In: Veronesi, R., ed., *Doenças infecciosas e parasitárias*. 6.^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976.
14. ROSENFELD, G.; HAMPE, O.G. & KELEN, E.M.A. Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms. Determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mem. Inst. Butantan*, 29:143-63, 1959.
15. SILES-VILLARROEL, M. *Contribuição ao estudo de venenos e antivenenos botrópicos*. São Paulo, 1977. /Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/.

SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM-ROSA, R. & DE LORENZO, J. L. Possibilidade da determinação da toxicidade do veneno de *Lachesis muta muta* e da titulação do antiveneno específico, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:281-288, 1980/81.

16. 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.
17. 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.
18. SILES-VILLARROEL, M. ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F. & GOMES JARDIM, E. Perspectivas de padronização das titulações de venenos e antivenenos elapídicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45: — , 1980/81.
19. SILES-VILLARROEL, M.; ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F.; BANCHER, W. & PIOTO, H.M. Verificações das atividades tóxicas de venenos crocálicos e neutralizante dos antivenenos específicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45: — , 1980/81.
20. WARE, A.G. & SEEGER, W.H. Two stage procedure for the quantitative determination of prothrombin concentration. *Am. j. Clin. Path.*, 19:471-82, 1949.