

## NOVO MÉTODO DE DOSAGEM DE SOROS ANTIPEÇONHENTOS EM CAMUNDONGOS LACTENTES

### I — Dosagem do soro anticrotálico

Bruno SOERENSEN (1), Newton Pereira SANTOS (2), Mary Dalva Caparroz VANCETTO (3), Maria Laura Sales Rodrigues LIMA (3) e João Pessoa de Paula CARVALHO (4)

#### RESUMO

A atividade biológica dos soros antipeçonhentos pode ser determinada "in vivo" em pombos, coelhos, cobaios e camundongos adultos, não existindo, entretanto, nenhum método que possa ser recomendado internacionalmente. Estudou-se comparativamente aos métodos tradicionais de dosagem de soros em pombos e camundongos adultos, a validade do uso de camundongos lactentes de 6 a 7 dias, pesando 4 a 5g, inoculados pela via subcutânea. Inicialmente foi determinada a toxidez do veneno de *Crotalus durissus terrificus* através do estudo da sintomatologia do envenenamento e da atividade letal. O estudo comparativo dos três métodos forneceu maior concordância de resultados em  $DE_{100}$  entre as dosagens realizadas com camundongos lactentes e adultos. A  $DE_{100}$  e  $DL_{50}$  determinadas em camundongos lactentes forneceu resultados mais constantes que os dos métodos de camundongos adultos e pombos. O uso deste novo método permite eliminar a dificuldade de obtenção do atual animal de prova; a utilização de um maior número de animais por ponto de avaliação biológica, possibilitando uma maior precisão e conseguindo-se uma uniformidade nas características exigidas neste tipo de dosagem como peso, idade e linhagem, visando a reprodução sistemática dos resultados.

#### INTRODUÇÃO

A atividade biológica dos soros antiofídicos pode ser determinada pela via endovenosa em pombos e em coelhos adultos, pela via subcutânea em cobaios adultos ou ainda, pelas vias endovenosa, intramuscular ou intraperitoneal em camundongos adultos<sup>5</sup>. No Brasil é usado predominantemente o método de Vital Brazil em pombos adultos inoculados pela via endovenosa<sup>4</sup>. A Organização Mundial da Saúde descreve no Manual de Procedimentos o método de camundongos adultos inoculados pela via intraperitoneal, embora afirme, que não existe nenhum método que possa ser reco-

mendado internacionalmente pois as variações existentes quanto à composição e ação dos venenos são muito grandes<sup>6</sup>.

Numa análise comparativa das vantagens e inconveniências dos métodos expostos, encontramos para o de Vital Brazil a quase impossibilidade de se obter reprodutibilidade de resultados devido à restrição do número de animais por diluição em consequência do preço do animal de experimentação. Os métodos de dosagens em coelhos e cobaios apresentam os mesmos inconvenientes. Através do méto-

- (1) Diretor da Divisão de Microbiologia e Imunologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil
- (2) Chefe da Seção de Concentração e Fracionamento de Soros do Instituto Butantan
- (3) Biologista da Seção de Concentração e Fracionamento de Soros do Instituto Butantan
- (4) Professor Adjunto da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo

do de dosagem descrito pela O.M.S., em camundongos adultos pela via intraperitoneal, embora de custo menor, não são evidentes sinais significativos de intoxicação e por isto a determinação é feita com base somente na sobrevivência dos animais.

Estudamos comparativamente o uso de camundongos lactentes determinando a toxidez do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e a atividade neutralizante do soro específico, com os métodos de Vital Brazil e o descrito pela O.M.S./O.P.S..

### MATERIAL E MÉTODOS

I — **Veneno:** *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768). Instituto Butantan — Part. 16, seco a vácuo, conservado a 5°C, em frascos contendo 10 mg.

II — **Animais:** Pombos adultos de 250-320 g.  
Camundongos adultos de 16-18 g.  
Camundongos lactentes de 6-7 dias, com 4-5 g.

III — **Soro Hiperimune:** Soro Anticrotálico. Instituto Butantan.

Veneno de *Crotalus durissus terrificus* D.M.M. 1,5 µg, diluído a uma concentração de 5,0 mg/ml, em solução salina — 0,85% inoculado em pombos pela via endovenosa (veia axilar), em camundongos adultos pela via intraperitoneal e, em camundongos lactentes, pela via subcutânea, a fim de se obter a DL<sub>50</sub> onde a porcentagem de mortos é transformada em probitos e, usando papel semilog, são lançadas em gráfico o logaritmo das diluições do veneno contra a mortalidade em probitos<sup>6</sup>, pelo método de BLISS<sup>1,2,3</sup>.

Para cada ponto de dosagem usou-se dois pombos, de acordo com o método de Vital Brazil, pela via endovenosa no volume de 2,0 ml (4); seis camundongos adultos, de acordo com a O.M.S./O.P.S. pela via intraperitoneal no volume de até 0,5 ml (6); dez camundongos lactentes no volume de até 0,3 ml, pela via subcutânea, na região dorsal.

Inicialmente foi determinada a sintomatologia do envenenamento assim como, o número de mortos após 24 e 48 horas de observação.

Após determinação da DL<sub>50</sub> do veneno pelos três métodos procedeu-se à dosagem de

potência dos soros pela neutralização "in vitro" de diferentes concentrações de veneno na presença do soro durante 30 minutos a 37°C e a seguir inoculados nos animais nos volumes de 2,0 ml nos pombos, 0,5 ml nos camundongos adultos e finalmente 0,2 ml nos camundongos lactentes com seringas Omega Microstat de 1 ml.

As leituras dos resultados foram feitas 24 e 48 horas após as inoculações, sendo consideradas somente as doses em que os animais não apresentaram sintoma algum.

Nas determinações realizadas com camundongos lactentes, os animais foram mantidos separados das mães, não sendo necessária a administração de água ou nenhum alimento, pois os mesmos suportam estas condições durante um período de 72 horas<sup>8</sup>.

### RESULTADOS

1. A média das DL<sub>50</sub> do veneno foi superior em camundongos lactentes (2,6 µg), seguindo-se a dos pombos (1,6 µg) e finalmente a dos camundongos adultos (1,2 µg), Tabela I.
2. A média das DE<sub>100</sub> do veneno foi superior nos pombos (1,08 µg), seguindo-se a dos camundongos adultos (0,95 µg) e a dos lactentes (0,90 µg), Tabela I.
3. A sintomatologia do envenenamento crotálico nos camundongos lactentes se inicia pela paralisia dos membros anteriores, logo em fase mais avançada paralisia também dos membros posteriores, taquipnéia mantendo o animal com a boca aberta e, em determinados animais, é observada a posição de opistótono, Figs. 1, 2 e 3. A sintomatologia embora pouco aparente, nos camundongos adultos é a da contração da musculatura abdominal. A sintomatologia nos pombos é a paralisia dos membros superiores e inferiores e, em determinadas oportunidades observa-se a posição de opistótono.
4. Na dosagem de potência do soro (DE<sub>100</sub>) houve uma concordância de resultados nos 3 métodos em 3 oportunidades das 10 provas realizadas. Gráfico 1.

T A B E L A I

Determinação da DE<sub>100</sub> e da DL<sub>50</sub> de veneno de *Crotalus durissus terrificus* em pombos, camundongos adultos e camundongos lactentes

ANIMAIS DE PROVA E PESO	DATA DA DETERMINAÇÃO DA TOXIDEZ																			
	29.06.82		12.07.82		16.08.82		13.09.82		29.09.82		06.12.82		14.12.82		05.01.83		11.01.83		02.02.83	
	DE <sub>100</sub>	DL <sub>50</sub>	DE <sub>100</sub>	DL <sub>50</sub>	DE <sub>100</sub>	DL <sub>50</sub>	DE <sub>100</sub>	DL <sub>50</sub>	DE <sub>100</sub>	DL <sub>50</sub>	DE <sub>100</sub>	DL <sub>50</sub>	DE <sub>100</sub>	DL <sub>50</sub>	DE <sub>100</sub>	DL <sub>50</sub>	DE <sub>100</sub>	DL <sub>50</sub>	DE <sub>100</sub>	DL <sub>50</sub>
* Pomba adulto (250-320g)	1,00 µg	1,50 µg	2,00 µg	2,25 µg	0,90 µg	1,90 µg	1,20 µg	1,80 µg	0,60 µg	0,90 µg	1,20 µg	1,50 µg	0,90 µg	1,20 µg	1,20 µg	2,40 µg	0,90 µg	1,20 µg	0,90 µg	1,20 µg
** Camundongo adulto (16-18g)	0,75 µg	0,95 µg	1,20 µg	1,65 µg	0,90 µg	1,80 µg	1,20 µg	1,40 µg	0,90 µg	0,86 µg	0,90 µg	0,92 µg	0,90 µg	1,00 µg	0,90 µg	1,00 µg	0,90 µg	1,30 µg	0,90 µg	1,20 µg
*** Camundongo lactente (4-5g)	0,90 µg	2,30 µg	0,90 µg	2,45 µg	0,90 µg	2,40 µg	0,90 µg	2,70 µg	0,90 µg	2,60 µg	0,90 µg	2,70 µg	0,90 µg	3,00 µg	0,90 µg	2,85 µg	0,90 µg	3,00 µg	0,90 µg	2,30 µg

\* Inoculados pela via endovenosa, em 2 animais por ponto de avaliação e observados durante 24 horas.

\*\* Inoculados pela via intraperitoneal em 6 animais por ponto de avaliação e observados durante 48 horas.

\*\*\* Inoculados pela via subcutânea, em 10 animais por ponto de avaliação e observados durante 48 horas.

MÉDIA DAS DE <sub>100</sub>	MÉDIA DAS DL <sub>50</sub>
Pombos adultos: 1,08µg	Pombos adultos: 1,6µg
Camundongos adultos: 0,95µg	Camundongos adultos: 1,2µg
Camundongos lactentes: 0,90µg	Camundongos lactentes: 2,6µg

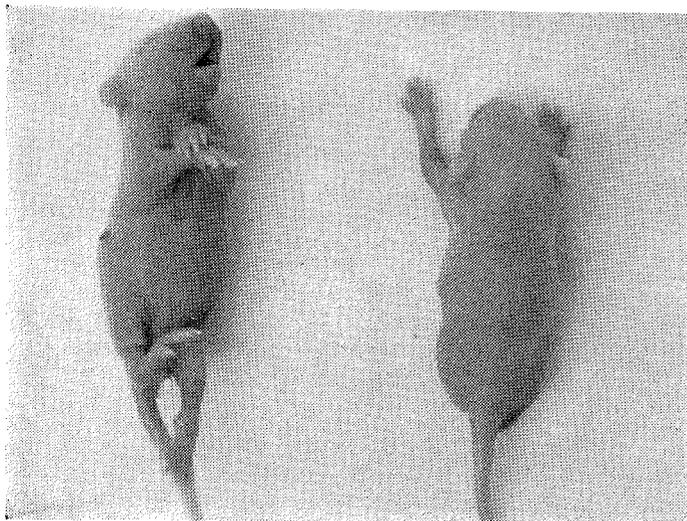


Fig. 1 — À direita controle normal e a esquerda o animal apresentando paralisia dos membros anteriores e taquipnéia mantendo a boca aberta, após 48 horas de ter recebido 0,9  $\mu$ g de veneno



Fig. 2 — À direita controle normal e a esquerda animal com paralisia dos membros anteriores e posteriores, após 48 horas de ter recebido 1,5  $\mu$ g de veneno

5. Em 7 oportunidades, as dosagens realizadas em pombos e em camundongos adultos, não foram concordantes, embora as diferenças fossem pequenas e sempre superiores para os camundongos.
6. As dosagens realizadas em camundongos lactentes com a dos pombos coincidiram em 5 oportunidades, Gráfico 1.
7. As dosagens realizadas em camundongos lactentes e camundongos adultos foram concordantes em 6 oportunidades, Gráfico 1.
8. Considerando-se as discordâncias das dosagens realizadas com pombos, camundon-

gos adultos e camundongos lactentes, os camundongos lactentes e adultos forneceram resultados ligeiramente superiores aos dos pombos, Gráfico 1.

## DISCUSSÃO

Quanto ao animal de prova, considerando-se o peso do animal, mostrou-se o pombo com maior sensibilidade ao veneno crotálico que o camundongo, situando-se o camundongo lactente ainda como de menor sensibilidade, entretanto, o aparecimento da sintomatologia do envenenamento foi idêntico nos três animais de experimentação, fato este que permite, to-



Fig. 3 — A direita controle normal e a esquerda animal com paralisia dos membros anteriores e posteriores; taquipnéia mantendo o animal com a boca aberta e corpo colocado o mesmo em posição de opistótono; após 48 horas de ter recebido 2,1  $\mu$ g de veneno

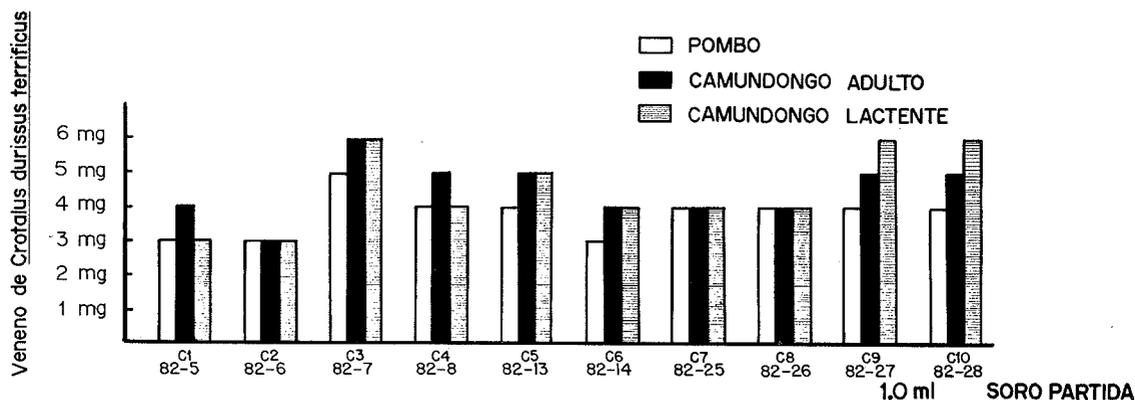


GRAFICO 1 — Dosagem de potência de soro anticrotálico através da DE<sub>100</sub> pelos métodos tradicionais e em camundongos lactentes

mando-se como parâmetro a observação da sintomatologia, o uso de camundongos lactentes na dosagem de neutralização do soro anticrotálico. SCHÖTTLER<sup>7</sup> observou o mesmo fenômeno de sensibilidade entre o pombo e o camundongo adulto, e quando, a dose de veneno foi aumentada de 50 para 200 vezes para os testes com antiveneno, essa diferença foi desprezível da mesma maneira como no presente trabalho.

Escolhemos para nosso modelo nos camundongos lactentes a via subcutânea por se aproximar ao que acontece na prática e pela facilidade de inoculação. Evitamos o uso da via endovenosa pelo fato dos venenos da subfamília *Crotalinae* serem muito coagulantes<sup>6</sup>.

Considerando-se o baixo custo dos camundongos lactentes elevamos o número de animais para cada diluição, desta maneira usamos 10 ao invés de 6 como é recomendado no caso do uso de camundongos adultos<sup>6</sup>.

### CONCLUSÃO

O método de dosagem de potência do soro anti-crotálico em camundongo lactente apresenta vantagens de segurança, praticabilidade e economia quando comparado aos métodos tradicionais de dosagem.

### SUMMARY

New method for dosage of antivenoms sera in baby mice. I-Anticrotalic serum's dosage

The biological activity of antiserum against venoms can be assessed by "in vivo" tests using pigeons, rabbits, guinea-pigs and adult mice although there is no International standardized reaction for it.

The traditional methods using pigeons and adult mice were comparatively studied with those using mice of 4-5 g (6-7 days of age), inoculated by subcutaneous injection. The toxicity of the *Crotalus durissus terrificus* venom was initially determined by studying the symptomatology after administration of venom and lethal activity. The comparative study of these three methods showed that the best concordance in the results of the ED<sub>100</sub> was obtained using adult and baby mice. The most homogeneous ED<sub>100</sub> and LD<sub>50</sub> results were found in baby mice when compared with those found in adult mice and pigeons.

With this new method we can avoid the difficulty in obtaining those animals, besides utilization of a great number of animals per biological evaluation point reaching better precision and a great uniformity, required in this type of dosage like weight, age and strains, in order to get better reproductibility of results.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BLISS, C. I. — The methods of probits. *Science* 79: 38-39, 1934a.
2. BLISS, C. I. — The methods of probits — a correction. *Science* 79: 409-410, 1934b.
3. BLISS, C. I. — The calculation of the dosage mortality curve. *Ann. appl. Biol.* 22: 134-167, 1935a.
4. BRAZIL, V. — Dosagem do valor antitóxico dos soros antipeçonhentos. *Trib. med. (Brasil)* 14(3): 39-44, 1908.
5. GRASSET, E. — Survey of Assay methods of antivenins. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 16: 79-122, 1957.
6. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD — Manual de Procedimientos. Producción y pruebas de control en la preparación de antisueros diftérico, tetánico, botulínico, anti-venenos y de la gangrena gaseosa. Edición revisada, 1977.
7. SCHÖTTLER, W. H. A. — Problems of antivenin standardization. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 5: 293-320, 1952.
8. SOERENSEN, B. & MUTTI PEREIRA, M. — Ensaios para o uso de camundongos lactentes em provas de segurança de vacinas e soros. In: *Congresso Brasileiro de Vacinas e Soros*, 1, São Paulo (Brasil), 1981. *Anais* p. 13.

Recebido para publicação em 6/12/1983.