Mem. Inst. Butantan
38: 13-30, 1974

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO IMUNOQUÍMICO DE VENENOS BOTRÓPICOS

I. *Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese en gel de ágar.*

MEDARDO SILES VILLARROEL*
FLÁVIO ZELANTE**
REYNALDO SCHWINDT FURLANETTO***
RAYMUNDO ROLIM ROSA***

RESUMO — Os autores analisaram comparativamente os componentes antigênicos de seis espécies de venenos botrópicos frente a seus respectivos antivenenos, "in natura" e "purificados" através de micrométodos de Ouchterlony e de Grabar & Williams.

Concluem, que a metodologia aplicada, permitiu a obtenção de resultados satisfatórios quando da separação dos componentes antigênicos, principalmente pela imunoeletroforese. Os antivenenos purificados permitem caracterizar melhor os componentes antigênicos quando seus resultados são comparados com os obtidos com antivenenos "in natura".

UNITERMOS — Venenos botrópicos; dupla difusão em gel de ágar de venenos botrópicos; imunoeletroforese de venenos botrópicos.

INTRODUÇÃO

Em trabalhos anteriores, utilizando-se de membranas de "Cellogel" verificamos electroforeticamente, o número de frações que compõem os venenos de algumas espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, sendo que para a espécie *B. jararaca*, pudemos distinguir 15 frações (Siles Villarroel, 1972; Siles Villarroel e col., 1973).

Uma análise dos trabalhos publicados a esse respeito evidencia que poucos autores se preocuparam com o estudo da composição antigênica dos venenos ofídicos e, em particular com a dos venenos do gênero *Bothrops;* aqueles que estudaram o assunto sob este aspecto limitaram-se a verificar a existência de componentes comuns aos vários venenos, através da reação de neutralização "in vivo" ou, então, muito mais raramente, "in vitro". Neste aspecto, podemos destacar o trabalho de Rosenfeld e col. (1962).

Ex-assistente da Seção de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

** Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

*** Atual Diretor do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P. e Professor Catedrático do Departamento de Microbiologia do mesmo Instituto.

**** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

Endereço para correspondência:
C.P. 4365 — S. Paulo — Brasil.

Não encontramos na literatura consultada trabalhos que estabeleçam uma análise comparativa entre os resultados observados com os venenos botrópicos, quando da aplicação das técnicas de dupla difusão e de imunoeletroforese em gel de ágar. Os autores se limitaram em analisar isoladamente, utilizando de uma das duas técnicas. Quer nos parecer que, entre nós, somente Gonçalves (1961) realizou este estudo comparativo, porém com veneno crotálico.

Schenberg (1958, 1961 e 1963), aplicando a técnica de Ouchterlony, realizou observações com os venenos das espécies *B. jararaca* e *B. neuwiedi*, introduzindo algumas modificações na metodologia original.

Este autor conclui da possibilidade de existir um grande número de componentes antigênicos nesses venenos, tendo ainda verificado que, em seis sub-espécies de *B. neuwiedi*, os venenos também diferem, entre si, imunologicamente.

Outros autores, utilizando venenos de serpentes de vários gêneros, inclusive o botrópico, e aplicando a técnica de dupla difusão em gel de ágar, apresentaram resultados que assim podem ser sintetizados:

1 — é possível a utilização desse método no estudo da composição antigênica dos venenos ofídicos (Grasset e col. 1956a e 1956b);

2 — é possível determinar a existência de identidades antigênicas entre venenos de serpentes do mesmo gênero (Scavini & Ferraresi, 1962) e mesmo em gênero bastante distantes (Boquet e col., 1969).

A imunoeletroforese também foi aplicada por alguns autores para verificar a composição antigênica de venenos ofídicos, inclusive de espécies do gênero *Bothrops*.

Parece-nos que foi Gonçalves (1961), quem primeiramente se utilizou desta metodologia no estudo dos venenos ofídicos, aplicando-a na verificação da composição do veneno crotálico.

Rascovsky & Scavini (1964), utilizaram da mesma técnica para verificar a presença de anticorpos contra os venenos *B. alternatus*, *B. neuwiedi* e *C. terrificus*, nas frações globulínicas β_1 e β_2 de antivenenos específicos.

Ferri (1967), entre nós, verificou através da imunoeletroforese, o comportamento do veneno *B. atrox* tendo, todavia realizado a separação eletroforética prévia do antiveneno, para em seguida realizar a difusão do veneno. Tal modelo experimental, demonstrou as linhas de precipitação, somente na região γ globulínica, o que aliás, era o único objetivo do autor.

Uriel e col. (1968), pela aplicação da imunoeletroforese caracterizaram a natureza antigênica de duas enzimas constitutivas do veneno

da espécie *B. jararaca,* previamente isoladas através de processos químicos, demonstrando que uma delas é bastante heterogênica e, a outra, representada por uma única fração.

Jouannet (1968), realizando a imunoeletroforense de vários venenos de serpentes provenientes da Etiópia, obteve uma nítida e satisfatória separação dos componentes antigênicos dessas peçonhas.

Boquet e col. (1969), aplicando esta metodologia, verificaram que, a α toxina do veneno *N. nigricollis,* é comum a outros venenos de espécies de serpentes diferentes.

Face ao exposto, nos propusemos a estudar comparativamente, contando com o aprimoramento das técnicas imunoquímicas originais de Ouchterlony e de Grabar & Williams, a composição antigênica de seis espécies de venenos de serpentes do gênero *Bothrops.* Os resultados obtidos, eventualmente poderão fornecer subsídios a serem utilizados em outros campos, como da filogenia e da sistemática das serpentes botrópicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Venenos ofídicos

Os venenos ofídicos utilizados, fornecidos pelo Instituto Butantan, foram obtidos por extração manual de numerosas serpentes adultas, cristalizados a vácuo e mantidos na geladeira a 0-4°C. Utilizamo-nos das peçonhas das seguintes espécies: *Bothrops jararaca* (Wied, 1824). *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron et Duméril, 1854, *Bothrops insulares* (Amaral, 1921), *Bothrops jararacussu* Lacerda 1844, *Bothrops moojeni* Hoge, 1965* e *Bothrops cotiara* (Gomes, 1913).

Foram preparadas soluções a 0,5%, 1%, 2% e 4% a partir do veneno cristalizado, em solução fisiológica (NaCl a 0,85%) distribuidas em frascos contendo 2 ml de cada solução, hermeticamente fechados e mantidos à temperatura de -25°C, (Furlanetto, 1965). No momento do uso, as soluções eram descongeladas e os excedentes desprezados.

Soros Hiperimunes

Utilizamo-nos de antivenenos específicos, obtidos por hiperimunização de seis cavalos (um para cada espécie de veneno); os animais escolhidos apresentavam-se em condições normais de saúde e nunca haviam sido antes utilizados para outras imunizações. As hiperimunizações obedeceram ao esquema adotado pelo Serviço de Imunização do Instituto Butantan.

A Bothrops moojeni Hoge, 1965, era até então, classificada como *Bothrops atrox.*

Ao término das hiperimunizações, cerca de sete dias após a última inoculação, foram realizadas as sangrias finais em duas etapas:

a) inicialmente retiravam-se 500 ml de sangue; este era deixado coagular e o soro era decantado e centrifugado a 3.000 rpm por 20 minutos. Em seguida, era o soro distribuido em volumes de 10 ml e guardado em frascos hermeticamente fechados e conservados a -25°C até sua utilização. Este material constitui o que chamamos de antiveneno "in natura".

b) o restante de cada sangria individual era feita em recipiente contendo citrato de sódio a 1,7 g por 100 ml de sangue; o plasma era decantado após 24 horas de sedimentação dos elementos figurados e encaminhado à purificação e concentração pelo método de Pope (1938-1939) modificado por Furlanetto (1961), técnica usualmente adotada nos laboratórios do Instituto Butantan. O material assim tratado constitui o que chamamos de "antiveneno purificado".

Titulação dos antivenenos

A titulação dos antivenenos foi realizada pelo método de Vital Brazil, segundo a Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959). A atividade neutralizante dos antivenenos está expressa na tabela I.

TABELA I

TÍTULOS APRESENTADOS PELO DOSEAMENTO "IN VIVO", SEGUNDO O MÉTODO DE VITAL BRAZIL, DOS ANTIVENENOS OBTIDOS

Veneno	Título do antiveneno "in natura" (mg/ml)	Título do antiveneno purificado (mg/ml)
B. jararaca	2,0	5,0
B. alternatus	3,0	6,0
B. insularis	4,0	15,0
B. jararacussu	2,0	5,5
B. moojeni	2,0	4,0
B. cotiara	>2,0<3,0	9,0

Dupla difusão em gel de ágar

Para a realização desta prova, baseamo-nos nos trabalhos originais de Ouchterlony (1948, 1949). A perfuração do ágar obedeceu aos modelos adotados por Ferri (1968) e sumariamente consta dos seguinte procedimentos:

Preparo prévio da lâmina

Foram utilizadas lâminas de microscopia de 7,5 x 2,5 cm e de 1 mm de espessura, numeradas em uma de suas extremidades.

As lâminas, sulfocromicamente limpas, eram revestidas com 1,0 ml de ágar (Bacto Ágar Difco) a 1% em água destilada. Em seguida, eram levadas à estufa a 37°C até a completa secagem do ágar. Assim preparada, as lâminas conservavam-se até o momento de sua utilização.

No momento do uso, as lâminas recebiam um segundo revestimento, constituído por 3,0 ml de ágar (Bacto Ágar Difco), a 1% em solução fisiológica, adicionado de mertiolato a 1:10.000. Deixava-se solidificar por 10 minutos à temperatura do laboratório.

Após o tratamento acima descrito, com o auxílio de perfuradora de diâmetro de 5 mm, eram abertos os orifícios. Padronizamos a utilização de três perfurações, com uma disposição triangular, com 8 mm de distância entre cada orifício. A retirada dos fragmentos de ágar era realizada com o auxílio de uma agulha de grosso calibre, adaptada a uma trompa de vácuo.

Execução da dupla difusão em gel de ágar

Em todas as reações, padronizamos, a colocação do antiveneno na perfuração do vértice superior ou inferior e a colocação das soluções de venenos, nas outras duas perfurações conforme o modelo experimental adotado.

Também padronizamos, para todas as reações realizadas, o volume de 0,02 ml, quer das soluções de venenos, quer de antivenenos. As lâminas eram colocadas imediatamente em câmaras umedecidas com uma solução de sulfato de cobre a 1%, onde permaneciam por 48 horas. Em seguida, as lâminas eram lavadas por três dias, imersas em cubas com solução fisiológica (NaCl a 0,85%) que era renovada duas vezes ao dia. Após este período, eram envolvidas em papel filtro umedecido em água destilada e colocadas na estufa a 60°C, até completar a secagem do papel. Esta operação era repetida mais uma vez. Em seguida, eram lavadas em água corrente e novamente submetidas a 60°C na estufa até a secagem do ágar. Após o resfriamento, eram coradas pelo Amido Schwarz 10 B a 4% em ácido acético, durante 10 minutos. Seguia-se a descoloração pelo ácido acético a 5% e subseqüente lavagem em água corrente e secagem à temperatura ambiente. Para melhor visualização das linhas de precipitação, realizamos a leitura das lâminas com o auxílio de Imunocópio de Projeção Zeiss *.

* Montado nos Laboratórios de Carl Zeiss — Companhia Ótica e Mecânica, segundo recomendações técnicas do Prof. R. G. Ferri.

Imunoeletroforese

Seguimos as técnicas de Grabar & Williams (1953 e 1955), com as modificações propostas por Ferri & Cossermelli (1964), relativas à aparelhagem e técnicas necessárias à realização do micrométodo por nós utilizado e que sumariamente consiste no seguinte:

Aparelhagem para Imunoeletroforese

a) retificador de corrente, munido de miliamperímetro e voltímetro, regulável de zero a 100 mA e de zero a 500 volts;
b) cuba de "plexiglás", de procedência nacional, confeccionada segundo o modelo preconizado por Ferri e Cossermelli (1964);
c) lâminas de microscopia de 7,5 x 2,5 cm e de 1 mm de espessura, numeradas em uma de suas extremidades.

Preparo de lâminas

As lâminas quimicamente limpas pelo tratamento sulfocrômico eram revestidas com 1,0 ml de ágar (Bacto Ágar Difco) a 1% em água destilada. Em seguida, eram levadas à estufa a 37°C, até a completa secagem do ágar. Assim preparadas, conservam-se até o momento de sua utilização.

No momento do uso as lâminas recebiam um segundo revestimento com 3,0 ml de ágar a 1% (Bacto Ágar Difco), em solução tampão de veronal acetato com pH 8,6 e força iônica de 0,05, adicionado de mertiolato a 1:10.000. Deixava-se solidificar por 10 minutos e em seguida, o ágar era recortado. A abertura das fendas e do orifício central, era realizada através de um aparelho recortador, equipado com lâminas laterais e tubo central oco. As fendas apresentavam um comprimento de 6,5 cm por 1 mm de largura; o orifício central tinha um diâmetro de 2 mm. As distâncias entre o orifício e as fendas eram de 5 mm. A retirada dos fragmentos de ágar era realizada com o auxílio de uma agulha de grosso calibre, adaptada a uma trompa de vácuo.

Execução da imunoeletroforese

A solução de veneno era depositada no orifício central, com o auxílio de tubo capilar de vidro, observando-se os cuidados necessários para que não transbordasse. Era depositado um volume de, aproximadamente, 0,015 ml de solução. Em seguida, a lâmina era colocada na cuba que continha uma solução tampão de veronal acetato com pH 8,6 e força iônica 0,1, com a sua numeração voltada para o polo negativo; era então, acionada a fonte elétrica, regulada em 15 mA por lâmina, pelo período de uma hora.

Após a corrida eletroforética de veneno, as lâminas eram retiradas da cuba e tinham as suas fendas laterais preenchidas pelo antiveneno, com o auxílio de seringa hipodérmica de 1,0 ml de capacidade, equipada com agulha de pequeno calibre. Era depositado um volume de 0,1 ml. Em seguida, as lâminas eram colocadas em câmaras umedecidas com solução de sulfato de cobre a 1%, pelo período de 48 horas, e a seguir lavadas por três dias, imersas em cubas com solução fisiológica que era renovada duas vezes ao dia. Após este período, eram envolvidas em papel de filtro umedecido em água destilada e colocadas na estufa a 60°C, até completar a secagem do papel. Esta operação era repetida mais uma vez. Eram então lavadas em água corrente e novamente submetidas a 60°C na estufa, até a sécagem do ágar. Após o resfriamento, eram coradas pelo Amido Schwarz 10 B a 4% em ácido acétido durante 10 minutos. Seguia-se a descoloração pelo ácido acético a 5% e subseqüente lavagem em água corrente e secagem à temperatura ambiente.

Também neste caso, a leitura das lâminas foi realizada com o auxílio do Imunoscópio de Projeção Zeiss, da mesma forma como procedido para as lâminas de dupla difusão em gel de ágar.

RESULTADOS

Análise comparativa entre o número de linhas de precipitação obtidas na dupla difusão em gel de ágar e o número de linhas obtidas na imunoeletroforese, entre os venenos e os respectivos antivenenos específicos "in natura".

Como os antivenenos obtidos "in natura" apresentaram títulos de anticorpos diferentes (tabela I) decidimos nivelar a concentração de título de anticorpos para cada antiveneno específico. Assim sendo, diluímos, quando necessário o antiveneno para 2 mg/ml (1,0 ml de antiveneno neutralizando 2 mg de veneno). Com estes antivenenos realizamos vários ensaios preliminares, colocando-os frente à concentrações variáveis de veneno (0,5%, 1%, 2% e 4%), tanto para a dupla difusão em gel de ágar como para a imunoeletroforese. Quanto ao primeiro método pudemos verificar que a concentração a 0,5% dos venenos, não permitia exteriorizar com nitidez algumas das linhas de precipitação por falta da intensidade na coloração. As concentrações superiores a 1% não mostravam vantagem alguma quanto ao número de linhas obtidas e, pelo contrário, dificultavam a leitura visto que coravam muito intensamente tendo o corante se difundido entre uma linha e outra. A mencionada çoncentração de 1% dos venenos, além de evidenciar maior número de linhas de precipitação, facilitava a leitura, sendo por essa razão escolhida para a metodologia em questão. Quanto a imunoeletroforese, fenômenos semelhantes foram observados; a concentração de 0,5% não permitia

evidenciar com nitidez todas as linhas de precipitação, resultando na obtenção de um número menor de linhas que nas concentrações maiores.

As lâminas correspondentes às concentrações de veneno de 2% e 4%, após sua coloração, ficaram coradas em excesso e com difusão do corante entre as linhas, apesar da lavagem prolongada. Além disso, essas concentrações fizeram com que a migração do veneno, nas nossas condições de trabalho, fosse mais lenta, resultando em acúmulo de linhas em determinada zona da lâmina, o que dificultava em muito a leitura. Adotamos a concentração de 1%, pois, foi aquela que permitiu uma nítida separação das linhas e conseqüentemente uma visualização mais completa do seu número.

A tabela II decalcada das figuras 1 a 12 apresenta o número de linhas de precipitação obtidas com cada veneno e seu respectivo antiveneno "in natura" através das duas técnicas por nós utilizadas.

TABELA II

COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE LINHAS DE PRECIPITAÇÃO OBTIDAS NAS REAÇÕES DE DUPLA DIFUSÃO E IMUNOELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR (SOLUÇÕES DE VENENOS A 1% E ANTIVENENOS ESPECIFICOS "IN NATURA" NEUTRALIZANDO 2 MG/ML)

Solução de Veneno	N.º de linhas obtidas na dupla difusão em gel de ágar	N.º de linhas obtidas na imunoeletroforese
B. jararaca	9	16
B. alternatus	9	14
B. insularis	10	14
B. jararacussu	8	11
B. moojeni	8	12
B. cotiara	8	14

As figuras 1 a 12 ilustram os resultados consubstanciados pela tabela II.

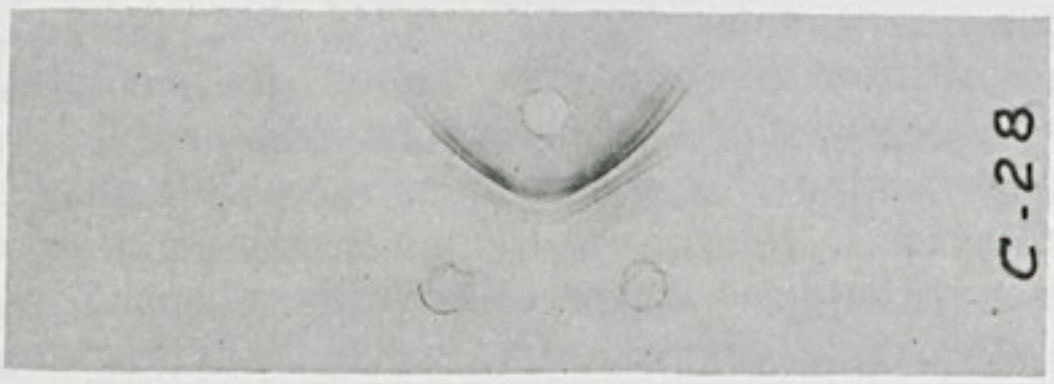

Fig. 1 — LÂMINA N.º C-28. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. jararaca* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

Fig. 2 — LÂMINA N.º C-86. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. alternatus* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

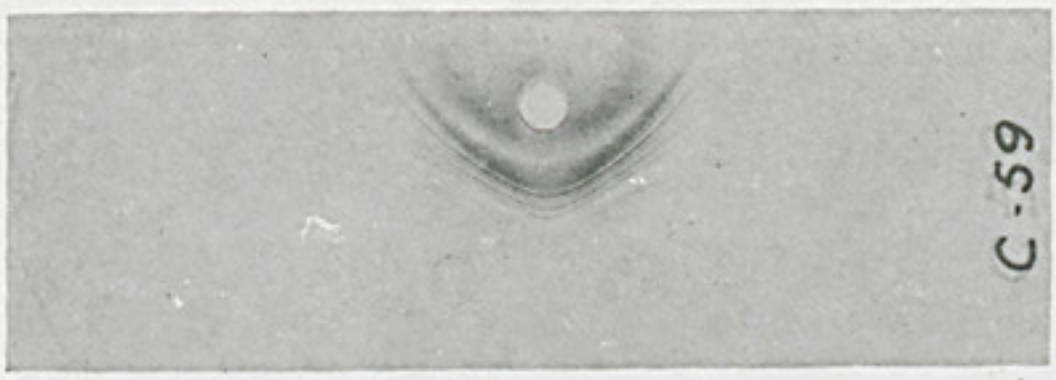

Fig. 3 — LÂMINA N.º C-59. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. insularis* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

Fig. 4 — LÂMINA N.º C-92. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno *B. jararacussu* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

Fig. 5 — LÂMINA N.º C-22. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. moojeni* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

Fig. 6 — LÂMINA N.º C-21. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. cotiara* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

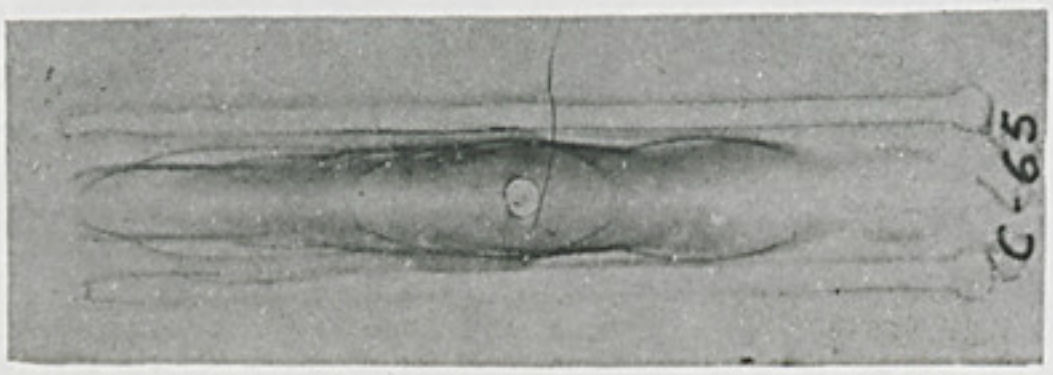

Fig. 7 — LÂMINA N.º C-65. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. jararaca* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

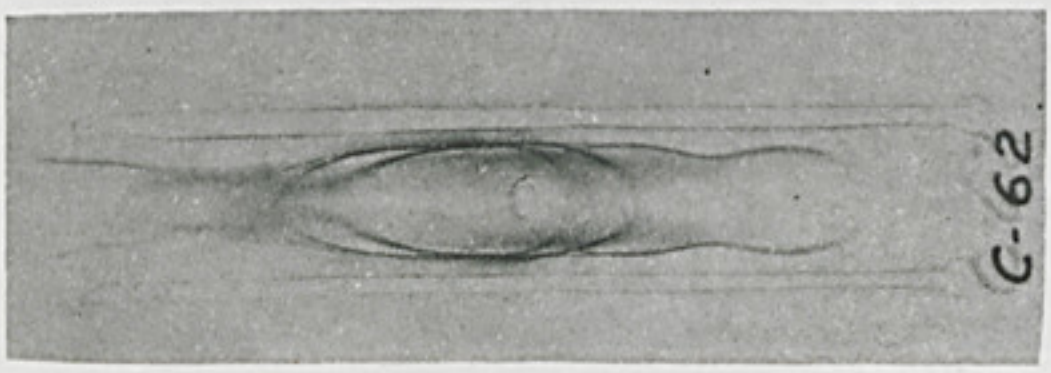

Fig. 8 — LÂMINA N.º C-62. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. alternatus* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

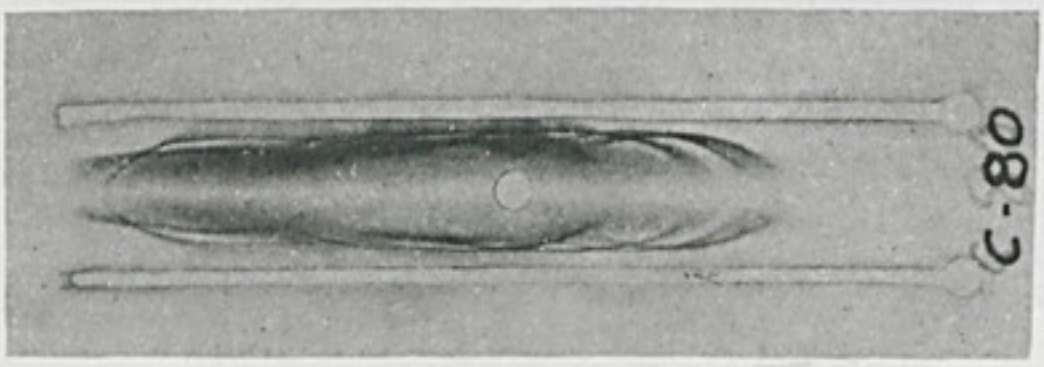

Fig. 9 — LÂMINA N.º C-80. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. insularis* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

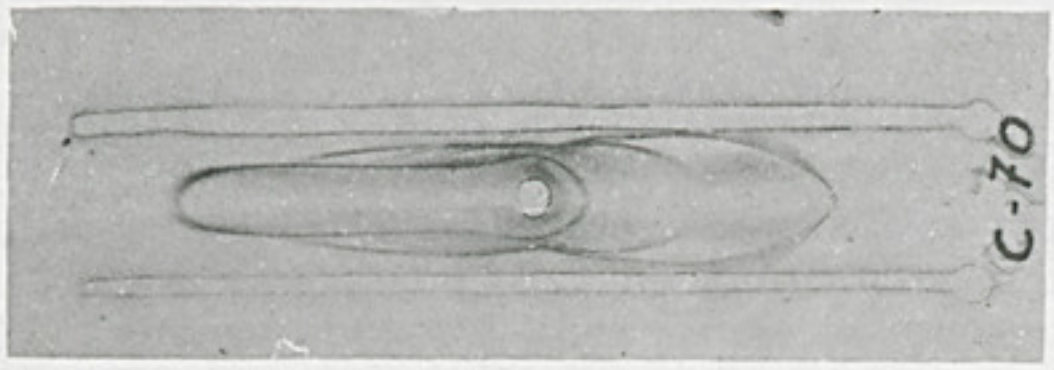

Fig. 10 — LÂMINA N.º C-70. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. jararacussu* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

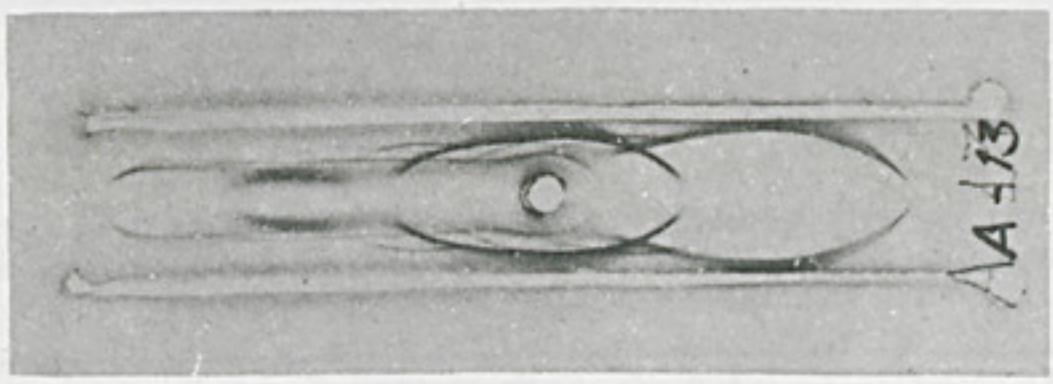

Fig. 11 — LÂMINA N.º A-13. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. moojeni* a 1% e o antiveneno específico "in natura".

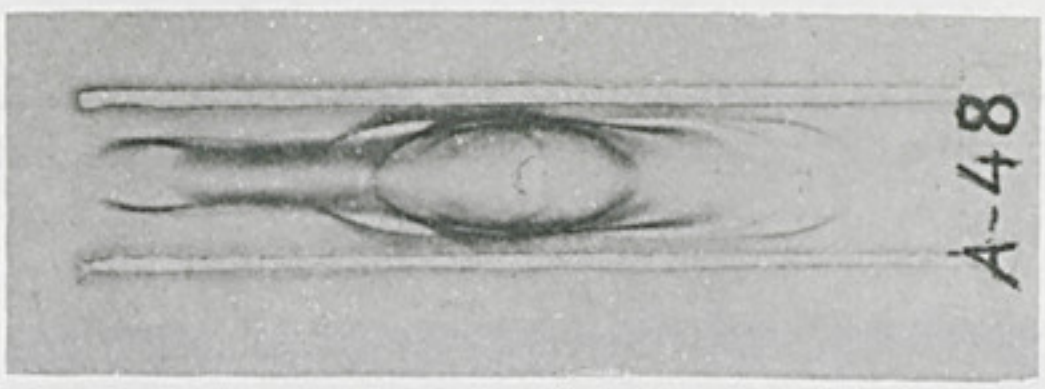

Fig. 12 — LÂMINA N.º A-48. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. cotiara* a 1% e o antiveneno especifco "in natura".

Do exposto parece não haver dúvidas de que, submetendo-se o veneno à corrida eletroforética e, em seguida, realizando a imunodifusão com o antiveneno "in natura", obtém-se sempre um número maior de linhas de precipitação, quando se comparam esses resultados com o número de linhas obtidas na reação de dupla difusão em gel de ágar.

SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., FURLANETTO, R. S. & ROLIM ROSA, R. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. I — Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar.

Mem. Inst. Butantan, 38: 13-30, 1974.

ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE O NÚMERO DE LINHAS DE PRECIPITAÇÃO OBTIDAS NA DUPLA DIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR E O NÚMERO DE LINHAS OBTIDAS NA IMUNOELETROFORESE, ENTRE OS VENENOS E OS RESPECTIVOS ANTIVENENOS ESPECÍFICOS PURIFICADOS

Como os antivenenos purificados apresentaram, em geral, elevado título de anticorpos (tabela I), decidimos trabalhar reduzindo as concentrações a um mesmo título, limitado pelo menor obtido, isto é, 4 mg/ml (1,0 ml de antiveneno neutralizando 4 mg de veneno). Para essa concentração de anticorpos testamos várias concentrações do veneno, conforme o especificado na primeira parte deste capítulo. As experiências prévias vieram demonstrar que nestas condições de trabalho, era preferível usarmos concentração de veneno a 2%, tanto para a reação de dupla difusão em gel de ágar, como para a reação de imunoeletroforese.

A tabela III decalcada das figuras 13 a 24, apresenta o número de linhas de precipitação obtidas em cada veneno e seu respectivo antiveneno, através das duas técnicas por nós utilizadas.

TABELA III

Comparação do nmero de linhas de precipitação obtidas nas reações de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar (solução de veneno a 2% e antivenenos específicos purificados, neutralizando cada um 4 mg/ml).

Solução de veneno	*N.º de linhas obtidas na dupla difusão em gel de ágar*	*N.º de linhas obtidas na imunoeletroforese*
B. jararaca	10	16
B. alternatus	9	17
B. insularis	10	16
B. jararacussu	11	12
B. moojeni	9	13
B. cotiara	9	15

As figuras 13 a 24 ilustram os resultados consubstanciados pela tabela III.

Fig. 13 — LÂMINA N.º D-72. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. jararaca* a 2% e o antiveneno específico purificado.

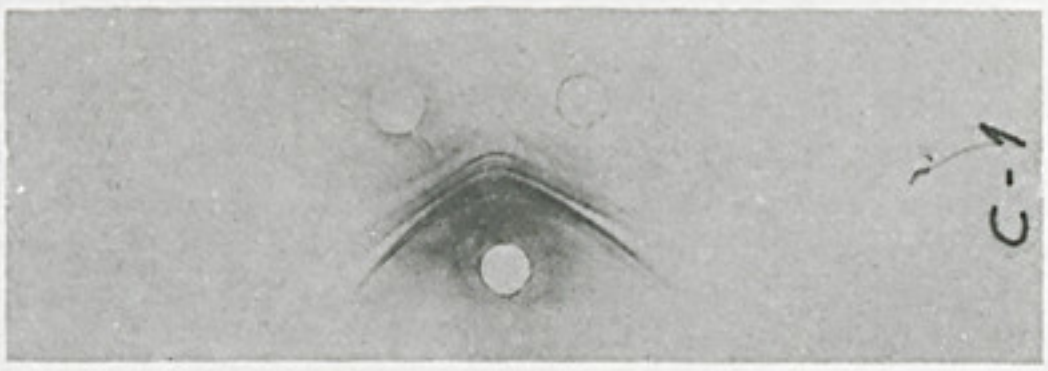

Fig. 14 — LÂMINA N.º C-1. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. alternatus* a 2% e o antiveneno específico purificado.

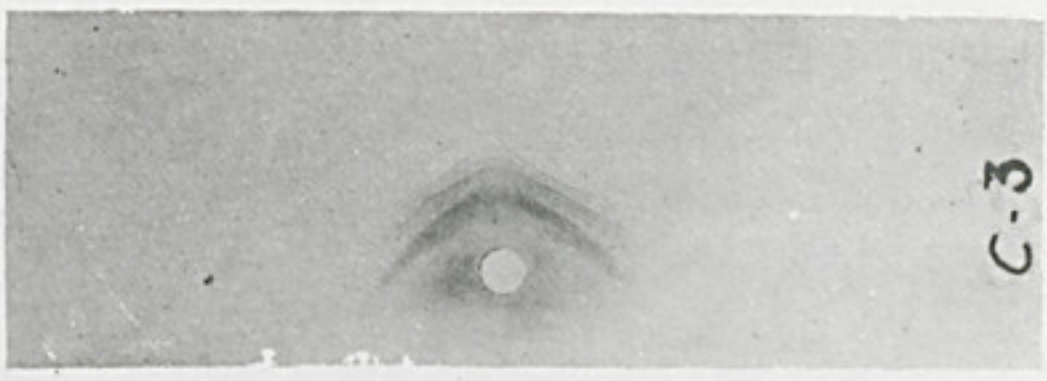

Fig. 15 — LÂMINA N.º C-3. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. insularis* a 2% e o antiveneno específico purificado.

Fig. 16 — LÂMINA N.º C-20. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. jararacussu* a 2% e o antiveneno específico purificado.

Fig. 17 — LÂMINA N.º C-52. Dupla difusão em gel de ágar, entre a solução de veneno de *B. moojeni* a 2% e o antiveneno específico purificado.

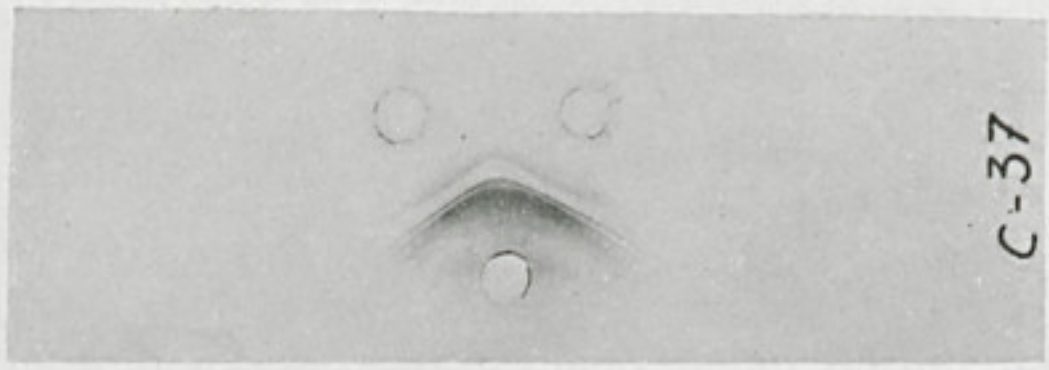

Fig. 18 — LÂMINA N.º C-37. Dupla difuão em gel de ágar, entre a soluçã› de veneno de *B. cotiara* a 2% e o antiveneno específico purificado.

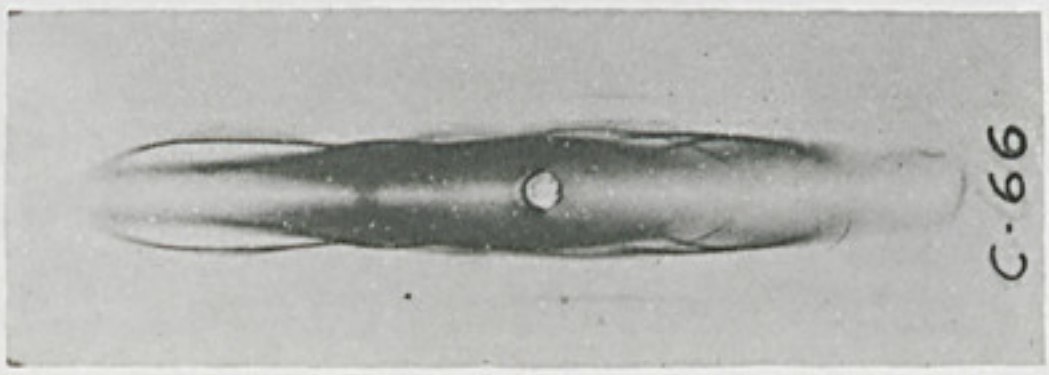

Fig. 19 — LÂMINA N.º C-66. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. jararaca* a 2% e o antiveneno específico purificado.

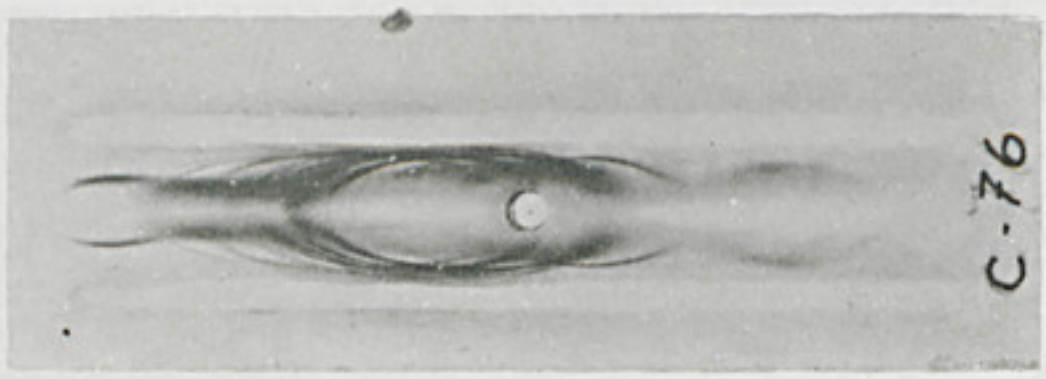

Fig. 20 — LÂMINA N.º C-76. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. alternatus* a 2% e o antiveneno específico purificado.

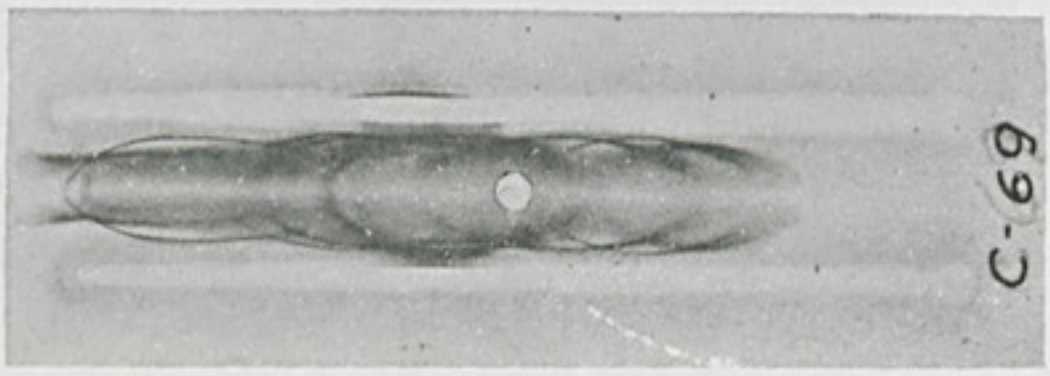

Fig. 21 — LÂMINA N.º C-69. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. insularis* a 2% e o antiveneno específico purificado.

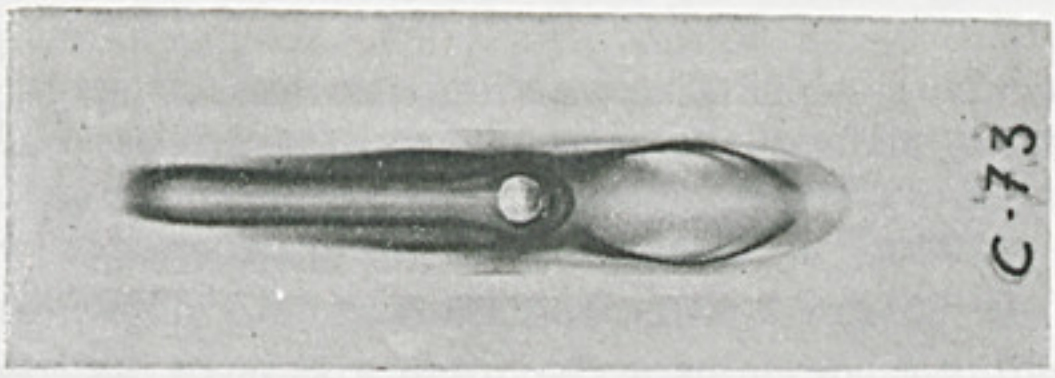

Fig. 22 — LÂMINA N.º C-73. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. jararacussu* a 2% e o antiveneno específico purificado.

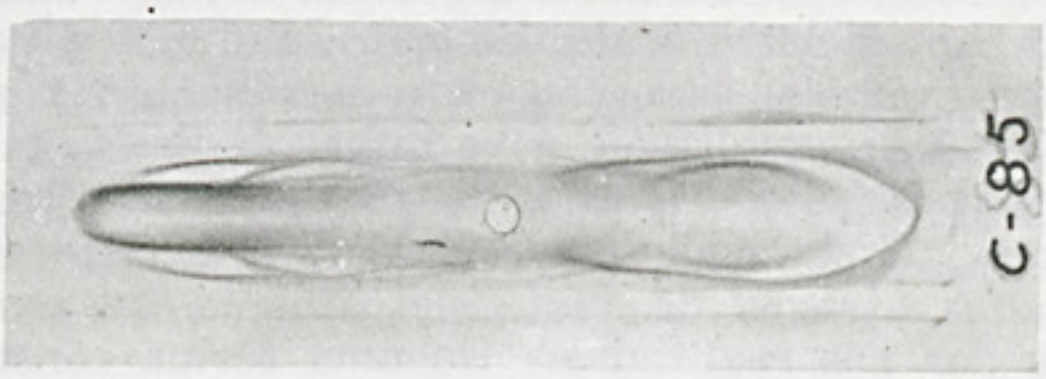

Fig. 23 — LÂMINA N.º C-85. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. moojeni* a 2% e o antiveneno específico purificado.

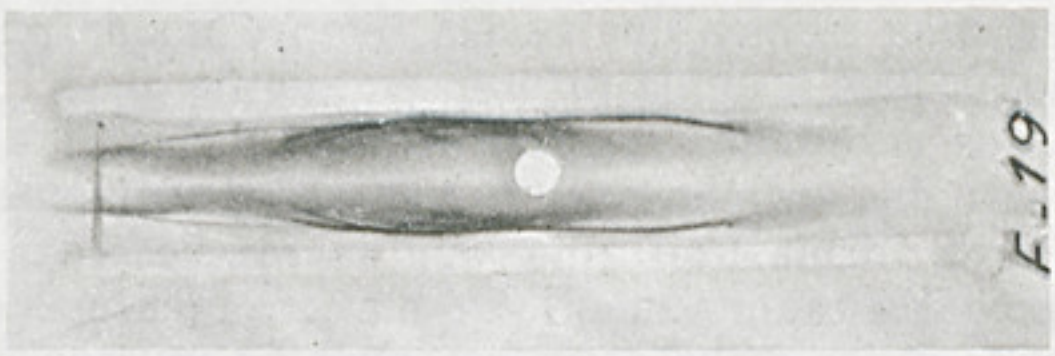

Fig. 24 — LÂMINA N.º F-19. Imunoeletroforese entre a solução de veneno de *B. cotiara* a 2% e o antiveneno específico purificado.

Os resultados expostos demonstram mais uma vez que submetendo-se o veneno à corrida eletroforética e em seguida realizando a imunodifusão com o antiveneno purificado, obtém-se sempre um número maior de linhas de precipitação, quando se comparam esses resultados com o número de linhas obtidas na reação de dupla difusão em gel de ágar.

Por outro lado, comparando os resultados das tabelas II e III verifica-se que os antivenenos purificados, provavelmente por estarem mais concentrados, exteriorizam de um modo geral, através das duas técnicas empregadas, sempre um aumento do número de linhas de precipitação.

DISCUSSÃO

Análise comparativa entre o número de linhas de precipitação obtidas na dupla difusão em gel de ágar e o número de linhas obtidas na imunoeletroforese, entre os venenos e os respectivos antivenenos específicos "in natura" e também com os antivenenos purificados.

A execução dos modelos experimentais para as reações de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar, foram precedidas pelo doseamento "in vivo" através do método de Vital Brazil, cujos títulos estão apresentados na tabela I, no capítulo "Material e Métodos". A análise da tabela II nos demonstra que as reações entre o veneno e o respectivo antiveneno específico, apresentam sempre um número maior de linhas de precipitação na imunoeletroforese, do que na dupla difusão em gel de ágar; assim por exemplo, a reação entre o veneno e o respectivo antiveneno de *B. jararaca*, resulta em nove linhas de precipitação pela reação de dupla difusão em gel de ágar e de 16 linhas de precipitação na de imunoeletroforese. Esta melhor caracterização e melhor separação das linhas, observadas através da imunoeletroforese, se confirma para as demais reações por nós realizadas. De uma forma constante, a imunoeletroforese sempre condicionou a uma melhor separação dos componentes antigênicos e a uma melhor visualização das linhas de precipitação.

Os antivenenos purificados, também foram submetidos às reações de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar. A análise da tabela III mostra os resultados obtidos. Mais uma vez se verifica que a imunoeletroforese é uma técnica que revela sempre maior número de linhas de precipitação, do que a dupla difusão em gel de ágar. Por outro lado, a comparação dos resultados constantes das tabelas II e III, referentes ao comportamento dos antivenenos "in natura" e antivenenos purificados, demonstra de uma forma uniforme, que as reações com os antivenenos purificados, apresentam um aumento do número de linhas de precipitação, quer na reação de dupla difusão em gel, quer na imunoeletroforese. Evidentemente os soros purificados, sendo mais concentrados em anticorpos, permitem revelar maior número de linhas de precipitação do que os soros "in natura", onde alguns anticorpos não atingem uma concentração suficiente para exteriorizar o fenômeno de precipitação, quando frente ao antígeno.

A comparação dos resultados das provas realizadas com antivenenos "in natura" e purificados, foi feito com o objetivo de verificar se estes não teriam perdido alguns anticorpos, visto que a purificação e concentração pelo método de Pope, controlados pela eletroforese, apresentam somente uma banda, correspondente à fração gama globulínica. Os resultados obtidos nesta comparação, nos permitem crer que os anticorpos antivenenos estão concentrados totalmente na zona eletroforética que

engloba as várias globulinas localizadas na região gama da eletroforese, visto que, sistematicamente foi obtido maior número de linhas de precipitação com os soros purificados.

CONCLUSõES

1. A aplicação de micrométodos nas técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar, permitiram separar satisfatoriamente os componentes antigênicos das seis espécies de venenos estudados;
2. a utilização da técnica de imunoeletroforese em gel de ágar para a análise dos componentes antigênicos de venenos ofídicos, proporcionou a evidenciação de maior número de frações, do que quando feita através da dupla difusão em gel de ágar;
3. os antivenenos purificados pelo método de Pope, modificado por Furlanetto (1961), quando submetidos às duas técnicas aplicadas (dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar), evidenciaram um maior número de componentes antigênicos do que os antivenenos "in natura".

SUMMARY — The authors analysed comparatively the antigenic components of 6 types of bothropic venoms, crude and purified, by the micromethods of Ouchterlony, and of Grabar and Williams.

They came to the conclusion that the applied methodology, mainly immunoelectrophoresis, allowed the achievement of satisfactory results as for the antigenic component separation. Purified antivenoms granted better results for antigenic component characterization than crude antivenoms.

UNITERMS — *Bothrops* venoms; double diffusion in agar-gel of *Bothrops* venom; immunoelectrophoresis of *Bothrops* venom.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOUQUET, P.; DETRAIT, J. & FARZAPAY, R. — Recherches biochimiques e immunologiques sur le venin des serpents. *Ann. Inst. Pasteur, 116* (4): 521-542, 1969.
2. FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2.ª ed. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, 1959, p. 471.
3. FERRI, R. G. — *Natureza dos anticorpos nas diversas fases de imunização e propriedades dos fragmentos mono e bivalentes.* São Paulo, 1967. p. 43-45 (Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).
4. FERRI, R. G. — *Curso de eletroforese, imunoeletroforese e Imunodifusão.* São Paulo, Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1968. (Apostila).
5. FERRI, R. G. & COSSERMELLI, W. — Analyse immuno-eletrophorétique. Micro et macro méthodes. *Rev. franç. Étud. clin. biol., 9*: 134-138, 1964.
6. FURLANETTO, R. S. — *Estudo sobre a preparação do soro antiloxoscélico.* São Paulo, 1961. p. 64-65 (Tese — Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo).
7. FURLANETTO, R. S. — *Emprego de camundongos tratados com dose preparatória de venenos bothrópicos para a avaliação de DL50 desses venenos.* São Paulo, 1965. p. 8-9. (Tese — Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo).

SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., FURLANETTO, R. S. & ROLIM ROSA, R. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. I — Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletroforese em gel de ágar.

Mem. Inst. Butantan, 38: 13-30, 1974.

---

8. GONÇALVES, J. M. — *Estudos sobre crotamina* — Ribeirão Preto, 1961. p. 7-9. (Tese — Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo).
9. GRASSET, E.; BRECHBUHLER, T.; SCHWARTZ, D. E. & PONGRATZ, E. — Comparative analysis and electrophoretic fractionations of snake venoms with special reference to Vipera russelli and Vipera aspis venoms. In: BUCKLEY, E. E. & PORGES, N., eds. *Venoms. Washington*, 1956a. p. 153-169. (American Association for the Advancement of Science. Publication n.º 44).
10. GRASSET, E.; PONGRATZ, E. & BRECHBUHLER, T. — Analyse immunochimique des constituants des venins de serpents par la méthode de précipitation en milieu gélifié. *Ann. Inst. Pasteur, 91*: 162-186, 1956b.
11. GRABAR, P. & WILLIAMS, C. A., JR. — Méthode permettant l'étude conjugée des propriétes électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim, biophys. Acta* (Amst), *10*: 193-194, 1953.
12. GRABAR, P. & WILLIAMS, C. A., JR. — Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. biophys. Acta* (Amst), *17*: 67-74, 1955.
13. JOUANNET, M. — L'analyse immunoélectrophorétique appliquée aux venin de serpents. *Toxicon 5*: 191-199, 1968.
14. OUCHTERLONY, O. — In vitro method for testing the toxin producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta path. microbiol. scand., 25*: 186-189, 1948.
15. OUCHTERLONY, O. — Antigen-antibody reactions in gels. *Acta path. microbiol. scand., 26*: 507-515, 1949.
16. POPE, C. G. — Disagregation of proteins by enzimes. *Brit. J. exp. Path., 19*: 245-251, 1938.
17. POPE, C. G. — The action of proteolytic enzymes of the antitoxins and proteins in immune sera. II. Heat Denaturation after partial enzyme action. *Brit. J. exp. Path., 20*: 201-212, 1939.
18. RASCOVSKY, S. & SCAVINI, L. M. — Estudio de la antigenicidad de los venenos ofídicos. *An Soc. cient. argent. 178*: 51-58, 1964.
19. ROSENFELD, G.; KELEN, E. M. A. & NUDEL, F. — Neutralização cruzada do poder coagulante de venenos ofídicos com soros antivenenos. *Ciência e cultura, 14*: 254-255, 1962.
20. SCAVINI, L. M. & FERRARESI, R. W. — Capacidad de protección y coincidencias antigénicas de sueros antiofídicos. *An. Soc. cient. argent., 174*: 87-99, 1962.
21. SCHENBERG, S. — Estudo comparativo da composição do veneno de Bothrops neuwiedii em placas de Cuchterlony. *Ciência e Cultura, 10*: 163-164, 1958.
22. SCHENBERG, S. Análise imunológica (micro-difusão em gel) de venenos individuais de Bothrops jararaca. *Ciência e Cultura, 13*: 225-230, 1961.
23. SCHENBERG, S. — Immunological (Ouchterlony method) identification of intrasubspecies qualitative differences in snake venom composition. *Toxicon, 1*: 67-75, 1963.
24. SILES VILLARROEL, M. — *Contribuição ao estudo de venenos de serpentes do Gênero Bothrops (B. jararaca, B. alternatus, B. insularis, B. jararacussu, B. atrox e B. cotiara)*. São Paulo, 1972 (Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
25. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; FURLANETTO, R. S. & ZELANTE, F. Estudo eletrofético em "Cellogel" de venenos do gênero *Bothrops*. Mem. Inst. Butantan, *37*:83-90, 1973.
26. SIMON, J.; BRISBOIS, L. & GILLO, L. — Fractionation of cobra venom by electrofocusing. *J. Chromatog., 44*: 209-211, 1969.
27. URIEL, J.; SANTINA, D. M. & RIZZO, E. — Caracterisation d'enzimes dans le venin de Bothrops jararaca para les méthodes d'immunodiffusion. *Bull. Soc. Chim. biol.* (Paris) *50*: 938-940, 1968.

Recebido para publicação em 15-V-1974 e aceito em 15-X-1974.