

VENENOS BOTRÓPICOS PRÉ-TRATADOS COM INIBIDORES ATIVOS PARA OS SÍTIOS ENZIMÁTICOS DE PROTEASES E COM SUBSTÂNCIA QUELANTE PRESERVAM SEU PODER IMUNOGÊNICO.

Hisako Gondo HIGASHI*
Rosalvo GUIDOLIN*
Amélia Keiko NISHIKAWA*
Ivone Kazuko YAMAGUCHI*
Maria Laura S. Rodrigues LIMA*
Josefina Farina MORAIS*
Wilmar DIAS da SILVA**

RESUMO: Estudou-se, no presente trabalho, o efeito de inibidores específicos para o centro ativo de proteases, o p-nitrofenil-p'-guanidino benzoato (NPGB) e o fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF) ou do quelante ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) sobre as propriedades imunogênicas dos componentes dos venenos botrópicos. A mistura usada como antígeno continha 50% de veneno de *B. jararaca* e 50% de uma mistura em partes iguais, dos venenos de *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. jararacuçu*, *B. neuwiedi*, *B. moojeni* e *B. pradoi* (MVB). Cinco cavalos, pesando 400-450kg foram imunizados com essa mistura pré-tratada com 5 μ M de NPGB, 5 μ M de PMSF e 10 μ M de EDTA, (MVB-I) e cinco cavalos do mesmo porte foram imunizados com a mistura "in natura" (MVB). A resposta primária foi induzida injetando-se 5 mg das misturas MVB-I ou MVB incorporadas em adjuvante completo de Freund (ACF). Quatro meses depois, os animais receberam cinco imunizações de reforço, cada uma com 10 mg de MVB-I ou MVB, em NaCl a 0,15M, a intervalos de 8 dias entre as imunizações. Os resultados permitem concluir: a) que os venenos botrópicos pré-tratados com esses inibidores de proteases deveriam ser usados como antígenos em substituição ao veneno não tratado; e, b) que o esquema de imunização de cavalos para a produção de soros antivenenos poderia constar de uma imunização de base com 5 mg do veneno incorporado em ACF seguida, 3-4 meses depois, por duas imunizações de reforço, cada uma com 10 mg de veneno em NaCl 0,15 M a intervalos de 8 dias, procedendo-se à sangria 8 dias depois.

UNITERMOS: *Bothrops*. Venenos botrópicos. Enzimas proteolíticas.

* Seção de Concentração e Fracionamento de Soros.

** Laboratório Especial de Imunoquímica

Instituto Butantan. C.P. 65 - 01051 - São Paulo-SP-Brasil

Recebido para publicação em 8.5.1989 e aceito em 27.6.1989.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; DIAS da SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan*, 51(3):107-115, 1989.

INTRODUÇÃO

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* contém numerosas proteases entre as quais se incluem endopeptidase e proteases de baixa especificidade, hidrolases de ésteres de arginina, ativadores de protrombina, ativadores do Fator X e cininogenases (Deutsch e Diniz,³; Iwanaga e Suzuki,⁵; Mebs,⁷; Kocholaty *et al.*⁶.)

Essas enzimas, quer por ação direta sobre tecidos e vasos quer liberando peptídios de proteínas teciduais ou plasmáticas, podem desempenhar papel importante na mediação das alterações subseqüentes à introdução dos venenos nos tecidos: aumento da permeabilidade vascular seguida de edema; formação de coágulos e obstrução vascular; ruptura de estruturas das paredes dos vasos e hemorragia; formação local de peptídios potencialmente capazes de promover efeitos locais e sistêmicos como a bradichina e as anafilatoxinas (Rocha e Silva, *et al.*⁹; Slotta,¹⁰; Dias da Silva, *et al.*⁴)

A bem documentada ação de algumas dessas enzimas proteolíticas sobre os tecidos animais e sobre proteínas plasmáticas implicam-nas como agentes potencialmente responsáveis por apreciável parte das lesões locais e sistêmicas que ocorrem, quer durante os envenenamentos por acidentes ofídicos, quer incidentalmente nos locais das injeção dos animais que estão sendo utilizados para a produção de soros antiofídicos.

Dispõe-se, hoje, de inibidores específicos de baixo peso molecular capazes de inibir irreversivelmente os centros ativos de enzimas proteolíticas sem produzir apreciáveis modificações conformacionais na sua estrutura molecular ou de quelar íons fundamentais para a expressão da atividade enzimática dessas enzimas. Entre os primeiros enquadram-se o "p - nitrofenil-p'-guanidino-benzoato, (NPGB)" e o "fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF)" e entre os segundos o ácido etileno-diamine-tetraacético (EDTA).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que venenos botrópicos tratados com dois inibidores de baixo peso molecular ativos sobre o sítio enzimático de enzimas proteolíticas, o "p - nitrofenil - p' - guanidino benzoato" (NPGB) e o fenil - metil - sulfonil fluoreto (PMSF) e o agente quelante para cations bivalentes, o ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA), induzem a produção de antisoros, em cavalos, com títulos semelhantes aos antisoros produzidos pelos mesmos venenos não submetidos ao tratamento com estes inibidores. Observou-se além disso, que as lesões usualmente observadas no local da injeção dos venenos eram menos intensas, ou mesmo ausentes, quando os venenos eram pré-tratados com os inibidores.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados dez eqüideos adultos sendo seis muares (M) e quatro cavalos (C) que haviam sido utilizados para a produção de soro anti-rábico registrados com os números M-89, M-90, M-130, M-550, M-594, M-650, C-375, C-385, C-588 e C-590.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; DIAS da SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan*, 51(3):107-115, 1989.

Antígenos: Utilizou-se, como antígeno, a mistura de venenos botrópicos usualmente empregada no Instituto Butantan para a produção de soro antibotrópico. Esta mistura foi preparada, adicionando-se a um volume de solução de veneno de *B. jararaca* a 5 mg/ml em NaCl a 0,15M igual volume de uma solução a 5 mg/ml, em NaCl a 0,15M, contendo partes iguais dos venenos de *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. jararacuçu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi*. Esta mistura foi dividida em duas porções: uma, "in natura" designada MVB e a outra contendo 5 μ M de NPGB, 5 μ M de PMSF e 10 μ M de EDTA, designada MVB-I. As duas misturas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, divididas em alíquotas e congeladas à -20°C. As soluções MVB-I foram diluídas em NaCl a 0,15 M para 1 mg/ml de veneno. Para a imunização de base 5 ml de cada solução de veneno foram emulsionados com igual volume de adjuvante completo de Freund (ACF). Para as imunizações de reforço foi usada a solução de veneno diluído em NaCl a 0,15M a 1 mg/ml.

Imunizações dos animais: Os animais M-89, M-90, M-130, C-375, e C-385 foram imunizados com a mistura de venenos designada MVB e os animais M-550, M-594, M-650, C-588 e C-590 foram imunizados com a mistura MVB-I.

Imunização de base: Dez mililitros das emulsões MVB-AFC ou MVB-I-AFC foram injetados, pela via subcutânea, em diferentes pontos do dorso do animal distanciados um do outro o suficiente para que não ocorresse confluência dos granulomas que viessem a se desenvolver.

Imunização de reforço: Quatro meses depois os animais foram injetados com 10 ml das soluções de venenos botrópicos MVB ou MVB-I a 1 mg/ml em NaCl 0,15M, pela via subcutânea, ao redor dos granulomas. Esta injeção foi repetida por mais quatro vezes a intervalos de 8 dias entre as inoculações.

Amostras de sangue foram obtidas antes de cada injeção de veneno e os soros obtidos foram alíquotados e armazenados a -20°C até o uso. O período de imunização foi de 160 dias e cada animal recebeu um total de 60 mg de veneno.

Método de ELISA Theakston e col. ¹¹. Cem microlitros da solução da mistura de venenos botrópicos contendo veneno das sete espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, (conforme indicado no item "Antígenos"), na concentração 1 μ g/ml, foram adicionados aos poços em forma de U das placas de plástico marca "Nuclon" (Delta, Dinamarca). As placas foram mantidas a 4.°C durante a noite, tempo suficiente para que se realizasse a adsorção do veneno à superfície dos poços. A seguir, as placas foram saturadas com uma solução de albumina (BSA) a 3%, contendo em 0,05% de Tween 20 em NaCl a 0,15M e deixando-as em repouso, à temperatura ambiente, por 3h. Após três lavagens com uma solução de PBS 100mM pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20, a cada poço adicionou-se 100 μ l dos soros de equídeos hiperimunizados com veneno botrópicos nas diluições de 1/100 a 1/12.000, deixando as placas em repouso por 45min. à temperatura ambiente. Após lavagem seguindo a metodologia descrita acima, 100 μ l de soro de coelho anti imunoglobulinas de cavalo conjugado com peroxidase (Cappel, Cochaville, USA) foram adicionados aos poços e as placas deixa-

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; DIAS da SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan*, 51(3):107-115, 1989.

das em repouso por 45 min. à temperatura ambiente. Após lavagem pelo mesmo método descrito acima, 100 μ l de ortho-fenildiamina (Sigma Co. USA) na concentração de 1 mg/ml e 0,04 μ l de H₂ O₂ foram adicionados aos poços e as placas mantidas à temperatura ambiente por 15-20 minutos, tempo suficiente para o desenvolvimento da cor. Como controles, em cada placa, em um grupo de poços omitiu-se a adição da solução de veneno e em outro omitiu-se a adição de soros de cavalos hiperimunizados. A intensidade da cor desenvolvida era determinada espectrofotometricamente a 492 nm.

*Dupla-Difusão em Gel de Agarose Ouchterlony*⁸. Placas de vidro de 4cm x 19cm foram recobertas com uma camada uniforme de gel de agarose (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) a 0,8% em tampão barbital sódio, pH 8,6, 0,056 M. Em cada placa foram feitos conjuntos de orifícios com 3mm de diâmetro, havendo em cada conjunto um orifício central e seis orifícios periféricos circularmente dispostos e distanciados 4mm um do outro. Vinte microlitros da solução de veneno a 1 mg/ml, em NaCl a 0,15M, foram depositados no orifício central e iguais quantidades de soro de cavalo antiveneno botrópico em diferentes diluições, nos orifícios periféricos. As placas, depois de transferidas para câmaras úmidas, foram deixadas em repouso por 24h à temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas sucessivamente em NaCl a 0,15M por 24h e em água destilada por 24h, secadas na estufa a 37°C e imersas em uma solução corante (0,2% de azul de Coomassie, 45% de metanol, 45% de água e 10% de ácido acético glacial) por 5min e descoradas até fundo transparente na solução descorante (45% de metanol, 45% de água e 10% de ácido acético). Depois de secadas em estufa a 37°C as bandas de precipitação foram identificadas e o título dos soros imunes foram avaliados pela última diluição do soro que ainda fornecia bandas de precipitação visíveis.

Eletroforese em acetato de celulose. Amostras de 5 μ l de soro de cavalos hiperimunizados com venenos botrópicos obtidas um dia antes do início do processo de imunização e oito dias após a última imunização de reforço foram aplicadas sobre fitas de acetato de celulose pré-embebidas em tampão veronal de sódio, pH 8,6, 0,04M e submetidas a uma eletroforese a 200V por 25 minutos; logo a seguir, as fitas de acetato de celulose foram imersas na solução corante (0,5% de amido-Schwars IOB em uma solução com 47,5% de metanol, 47,5% de água e 5% de ácido acético glacial) por 8min. e transferidas para a solução diferenciadora (47,5% de metanol, 47,5% de água e 5% de ácido acético glacial). A seguir, as fitas foram imersas na solução transparentizadora (85% de metanol, 14% de ácido acético glacial e 1% de glicerol) e secadas na estufa a 37°C. A absorvância foi determinada no densitômetro.

*Neutralização da atividade letal dos venenos botrópicos Vital Brazil*². A uma série de amostras de 1,0ml de soro de cavalo antiveneno botrópico, não diluído, adicionou-se 1,0ml de NaCl a 0,15M contendo diferentes quantidades da mistura de venenos botrópicos. Após incubação das misturas à temperatura ambiente por 1h, 2,0ml de cada mistura foram injetados intravenosamente em pombos adultos pesando 250g. O título neutralizante do soro foi considerado como sendo a maior quantidade de veneno cuja atividade letal foi neutralizada por 1,0ml do soro não diluído.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; DIAS da SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan*, 51(3):107-115, 1989.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anticorpos antiveneno botrópico estavam ausentes nas amostras de plasma colhidas imediatamente antes do início da imunização dos cavalos. Após a imunização de base já havia anticorpos circulantes com títulos variáveis de 8 a 3.2×10^3 no ensaio pelo método de ELISA ou de 1,6 a 3.2×10^1 no ensaio pelo método da dupla-difusão em gel de agarose. Após a 1.^a imunização de reforço houve brusca e acentuada ascensão nos títulos de anticorpos detectáveis pelo método de ELISA passando para 128 a 512×10^3 , permanecendo estável ao redor desses valores mesmo após a 5.^a e última imunização de reforço. Todavia, no ensaio pelo método da dupla-difusão em gel de agarose não houve alterações apreciáveis em relação aos títulos obtidos nas amostras de plasma colhidas após a imunização de base (Tabelas 1 e 2).

TABELA I

Titulação de anticorpos pelo micrométodo imunoenzimático-ELISA antiveneno botrópico em cavalos imunizados com venenos botrópicos "in natura" ou pré-tratados com inibidores enzimáticos de baixo peso molecular ativos sobre o centro ativo de enzimas proteolíticas.

Mistura* de Venenos Botrópicos	Animal n.º	Anticorpos antivenenos botrópicos (**)(***) (10 ³)					
		Imunização de base	Imunização de reforço				
			1. ^a dose	2. ^a dose	3. ^a dose	4. ^a dose	5. ^a dose
MVB*	89	16	256	200	200	400	200
	90	8	128	50	50	50	100
	130	16	256	200	200	400	400
	375	8	128	200	400	200	200
	385	16	512	200	400	400	200
MVB-I*	550	16	512	200	400	100	200
	594	8	128	200	200	100	—
	650	32	256	400	400	200	100
	588	32	256	200	200	100	100
	590	16	512	400	200	100	200

* MVB: mistura de venenos botrópicos contendo um volume de uma solução de veneno de *B. jararaca* a 5,0mg/ml em NaCl 0.15M e um volume de uma solução de venenos de *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi* a 5.0mg/ml contendo quantidades iguais de cada um destes venenos.

* MVB-I — A solução MVB pré-incubada com 5 µM de p-Nitrofenil-p'guanidino benzoato (NPGb), 5 µM de fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF) e 10 µM de ácido etileno-diamino tetracético (EDTA) a 32°, 30 min.

** Última diluição dando reação nitidamente positiva (x10³)

*** As amostras de soro colhidas imediatamente antes da imunização de base não deram reações positivas.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; DIAS da SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan*, 51(3):107-115, 1989.

TABELA 2

Titulação de anticorpos pelo método de dupla-difusão em gel de agarose antiveneno botrópico em cavalos imunizados com venenos botrópicos "in natura" ou pré-tratados com inibidores enzimáticos de baixo peso molecular ativos sobre o centro ativo de enzimas proteolíticas.

Mistura* de Venenos Botrópicos	Animal n.º	Anticorpos antivenenos botrópicos (**)					
		Imunização de base	Imunização de reforço				
			1.ª dose	2.ª dose	3.ª dose	4.ª dose	5.ª dose
MVB*	89	16	16	16	≥32	16	≥32
	90	≥32	4	≥32	≥32	≥32	≥32
	130	16	32	≥32	16	16	28
	375	16	8	≥32	8	16	32
	385	16	8	≥32	≥32	16	16
MVB-I*	550	16	4	≥32	≥32	16	32
	594	16	16	≥32	≥32	16	8
	650	16	32	≥32	≥32	16	16
	588	16	16	≥32	≥32	16	—
	590	16	16	16	8	16	≥32

* MVB: mistura de venenos botrópicos contendo um volume de uma solução de veneno de *B. jararaca* a 5,0mg/ml em NaCl 0.15M e um volume de uma solução de venenos de *B. alternatus*, *B. cotiara*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi* a 5.0mg/ml contendo quantidades iguais de cada um destes venenos.

* MVB-I A solução MVB pré-incubada com 5 µM de p-Nitrofenil-p'-guanidino benzoato (NPGB), 5µM de fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF) e 10 µM de ácido etileno-diamino tetracético (EDTA) a 32°, 30 min.

** Todos morreram com um minuto após inoculação.

A enorme diferença entre os títulos de anticorpos detectáveis pelos métodos de ELISA e pela dupla-difusão em gel agarose poderia ser explicada pela também notável diferença entre os limites de sensibilidade dos dois métodos: os métodos imunoenzimáticos podem detectar anticorpos em quantidades da ordem de µg-pg enquanto no método de dupla-difusão só aparecem bandas de precipitação nitidamente visíveis quando a concentração de anticorpos acha-se presente, pelo menos entre 5 a 10 µg; Bier *et al.*¹

Anticorpos neutralizantes dos efeitos letais presentes nos venenos botrópicos não existiam ou se achavam em quantidades indetectáveis nas amostras de plasma colhidas antes do início da imunização e mesmo nas amostras de plasma obtidas após a imunização de base. Entretanto, uma semana depois da 1.ª imunização de reforço houve um aumento abrupto nos níveis de anticorpos neutralizantes em todos os cavalos imunizados, 1,0ml de soro foi capaz de neutralizar os efeitos letais para o pombo em mais de 0,2mg e menos de 1,0mg da mistura de venenos botrópicos, à exceção do soro do cavalo n.º 650, cujo título foi superior a 1,0 mg/ml de soro. Estes títulos não variaram apreciavelmente ao longo de todo o processo de imunização de reforço (Tabela 3).

Esta página tem uma errata. Para acessá-la, vá até o link do Sumário desta edição.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; DIAS da SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan*, 51(3):107-115, 1989.

TABELA 3

Titulação dos anticorpos neutralizantes das atividades letais presentes nos venenos botrópicos em cavalos imunizados com venenos botrópicos "in natura" ou pré-tratados com inibidores enzimáticos de baixo peso molecular ativos sobre o centro ativo de enzimas proteolíticas.

Mistura* de Venenos Botrópicos	Animal n.º	Anticorpos neutralizantes					
		Imunização de base	Imunização de reforço				
			1.ª dose	2.ª dose	3.ª dose	4.ª dose	5.ª dose
MVB*	89	**<0,2 mg	>0,2<0,5	>1,0<1,5	>0,8<1,0	<0,8	>0,2<0,5
	90	"	>0,2<0,5	>0,2<0,5	>0,5<0,8	>0,2<0,5	>0,2<0,5
	130	"	>0,2<0,5	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0<2,0
	375	"	>0,2<0,5	>0,5<0,8	>1,0	>1,0	>0,8<1,0
	385	"	<0,2	<0,2	<0,2	>0,2<0,5	>0,5<0,8
MVB-I*	550	**<0,2mg	>0,8<1,0	>1,0<1,5	>1,0<1,5	>0,8<1,0	>0,5<0,8
	594	"	>0,5<0,8	>0,8<1,0	>0,5<1,0	<0,5	>0,2<0,8
	650	"	>1,0	>1,5	>1,5	>1,5	>2,5<3,0
	588	"	>0,2<0,5	>0,8<1,0	>0,8<1,0	>0,8<1,0	>0,8<1,0
	590	"	>0,8<1,0	>0,8<1,0	<0,8	<0,8	>0,5<0,8

* MVB: mistura de venenos botrópicos contendo um volume de uma solução de veneno de *B.jararaca* a 5,0mg/ml em NaCl 0.15M e um volume de uma solução de venenos de *B.alternatus*, *B.cotiara*, *B.jararacussu*, *B.moojeni*, *B.neuwiedi* e *B.pradoi* a 5.0mg/ml contendo quantidades iguais de cada um destes venenos.

* MVB-I A solução MVB pré-incubada com 5 µM de p-Nitrofenil-p'-guanidino benzoato (NPGb), 5µM de fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF) e 10 µM de ácido etileno-diamino tetracético (EDTA) a 32°, 30 min.

**Última diluição dando nítidas bandas de precipitação.

Via de regra, não há diferenças apreciáveis nos títulos de anticorpos quer nos animais imunizados com os venenos botrópicos "in natura" quer nos animais imunizados com a mistura de venenos botrópicos pré-tratada com inibidores enzimáticos. Assim, os inibidores NPGb e PMSF, compostos de baixo peso molecular, ativos sobre o centro ativo de enzimas proteolíticas, não interferiram com a imunogenicidade dos componentes dos venenos botrópicos responsáveis por seus efeitos letais. É importante ressaltar que os venenos botrópicos pré-tratados com os inibidores enzimáticos, ao contrário dos venenos "in natura", produziram lesões muito discretas no local da injeção que logo se cicatrizavam. Houve aumento da fração γ-globulinas após a 2.ª imunização de reforço.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem: a) que a mistura de venenos botrópicos utilizada para a produção de soros terapêuticos deveria ser pré-tratada com inibidores enzimáticos de baixo peso molecular, visando reduzir as ações das enzimas proteolíticas presentes nesses venenos e assim reduzir as lesões locais que expoliam desnecessariamente a saúde dos animais em imunização; b) que o número de doses da imunização de reforço seja reduzido para duas, uma vez que não houve modifica-

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; DIAS da SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan*, 51(3):107-115, 1989.

ções apreciáveis nos títulos de anticorpos ensaiados tanto pelos métodos imunológicos de ELISA e de imunodifusão como pelo método de neutralização das atividades letais dos venenos botrópicos.

ABSTRACT: The effect of protease active site direct inhibitors, the p-nitrophenyl-p'-guanidino benzoate (NPGP) and the phenyl-methylsulphonyl-fluoride (PMSF) or the chelator ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on the immunogenic properties of *Bothrops* venom components was studied. A group of 5 horses weighing 400-450 kg was immunized with *Bothrops* venoms pretreated with 5 μ M NPGP, 5 μ M PMSF and 10mM EDTA. As control a similar group of horses was immunized with untreated venom. The animals were primed with 5 mg of venom in complete Freund's adjuvant and restimulated 4 months later with five boosters, each with 10 mg of venoms in NaCl 0,15 M, 8 days apart. During the immunization procedure (160 days long) each animal received 55 mg of venom. Serum samples were collected just before each venom injection and the antibodies levels evaluated by three methods: the micro-ELISA assay, the double immunodiffusion precipitin reaction and the venom lethal effects neutralization test. Antibodies against *Bothrops* venoms were absent before immunization, were present in low titers 4 months after priming with the venom incorporated in FCA, increasing after the first two boosters and plateauing thereafter. Pretreatment with NPGP, PMSF and EDTA did not interfere with the immunogenic properties of the venoms but blocks their local tissue damage effects. These results lead to conclude that *Bothrops* venom pretreated with protease active site direct inhibitors should be used as substitute for crude venom as antigen and that the immunization schedule of horses for antivenoms production should be constituted by a priming with 5 mg of venom in FCA followed 3-4 month later by two boosters with 10 mg of venom in 0,15 M NaCl 8 days apart.

KEYWORDS: *Bothrops* venom. Proteolytic enzyme.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários e servidores do Setor de Imunização e Concentração e Fracionamento de Soros, pela colaboração prestada no decorrer do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIER, O.G.; DIAS da SILVA, W.; GOTZE, D.; MOTA, I. Antigen-antibody interaction. In: ——— Fundamentals of immunology. Berlin, Springer-Verlag, 1986. Cap. 7, p. 179.
2. BRAZIL, V. Dosagem do valor antitóxico dos serums antipeçonhentos. *Trib. méd. Rio de Janeiro*, 14(3): 39 - 44, 1908.
3. DEUTSCH, H.F. & DINIZ, C.R. Some proteolytic activities of snake venoms. *J. Biol. Chem.*, 216: 17 - 26, 1955.
4. DIAS da SILVA, W., EISELE, J.W.; LEPOW, I.H. Complement as mediator of inflammation. III. Purification of the activity with anaphylatoxin properties generated by interaction of the first four components and its identification as a cleavage product of C3. *J. exp. Med.*, 126: 1027 - 1048, 1967.
5. IWANAGA, S. & SUZUKI, T. Enzymes in snakes venom. In: LEE, C.Y. *Snake venoms*. Berlin, Springer-Verlag, 1979. Cap. 21. p. 684-750. (Handbook of experimental pharmacology, 52).
6. KOCHOLATY, W.F.; LEDFORD, E.B.; DAYLY, J.G.; BILLINGS, T.A. Toxicity and some enzymatic properties and activities in the venoms of *Crotalinae*, *Elapidae*, and *Viperidae*. *Toxicon*, 9: 31 - 138, 1971.
7. MEBS, D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *Int. J. Biochem.*, 1: 335 - 342, 1970.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; DIAS da SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan*, 51(3):107-115, 1989.

8. OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta. path. microbiol. scand.*, 26: 507, 1949.
9. ROCHA e SILVA, BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor releases from plasma globulin by snake venoms and trypsin. *Amer. J. Physiol.*, 156: 261 - 273, 1949.
10. SLOTTA, k. Chemistry and biochemistry os snake venoms. *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.*, 12:406, 1955.
11. THEAKSTON, R.D.G.; LLOYD-JONES, M.J.; REID, H.A. Micro-ELISA for detecting and assaying venom and antivenom-antibody. *Lancet*, 2:639-641, 1977.

PRESENÇA DE HEPATOCYON PLINAE (SAMSON, 1919) — COCCIDIA, HAEMOGRESGARINIDAE — EM EXEMPLAR DE BOTHROPS JARARACA (WIED, 1824) — SERPENTES VIPERIDAE, CROTALINAE — MANTIDO EM CATIVEIRO

Perácio De BIASI*
Rubens Pinto CARDOZO JUNIOR**
Selma Maria de Almeida SANTOS***

RESUMO: Descreve-se a presença de *Hepatocon plinae* (Samson, 1919) em serpente vivente, *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) mantida em cativeiro em Mantido em cativeiro do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Lembrando sobre as características de reprodução do coccídio por meio de hospedeiros intermediários obrigatórios, apresentando migração cruzada durante o desenvolvimento. Levantamos a hipótese de que tenha se originado biologicamente de hospedeiros de grande importância por si próprios, devido à importância da espécie, lembrando também a importância dos hospedeiros.

INTRODUÇÃO: *Hepatocon plinae* (Samson, 1919) — *Haemogresgarinidae*, *Serpentes*, *Viperidae*.

INTRODUÇÃO

Hepatocon plinae (Samson, 1919) tem sido descrita há muito tempo de ocorrência associada em órgãos viscerais do lagartinho venenoso. Segundo Levins¹, ocorrem várias gerações alternadas nos órgãos viscerais, mas o número de gerações é limitado em determinado hospedeiro.

Miler², ao estudar em laboratório o ciclo de reprodução de *Hepatocon plinae* (Samson, 1919) numa população de larvas brancas, mencionou que a esquizogonia do coccídio verifica-se no fígado do hospedeiro por três gerações e se, ocasionalmente, há uma 4ª ou 5ª geração.

Na informação apresentada, Levins¹, afirmou que a esquizogonia

* Departamento de Zoologia

** Instituto de Biologia

*** Departamento de Zoologia

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Caixa Postal 20861 - 21261-900

Rio de Janeiro, RJ, Brasil

