



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO BUTANTAN
SÃO PAULO, SP — BRASIL

Memórias do Instituto Butantan

VOLUME 55, NÚMERO 2, 1993
• NESTA EDIÇÃO
BOLETIM DE
BIOTECNOLOGIA, V. 4

As "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" têm por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos das Ciências Biológicas, Médicas e Químicas, elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros.

São publicados sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores.

The "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" are the vehicle of communication for original papers written by national and foreign specialists who contribute to the progress of Biological, Medical and Chemical Sciences.

They are published under the direction of the Editorial Board which assumes no responsibility for statements and opinions advanced by contributors.

Diretor do Instituto Butantan

Dr. Isaias Raw

Comissão Editorial

Henrique Moisés Canter — Presidente

Ivan Mota — Membros

Tetsuo Yamani

Maria Nazareth Rabello-Gay

Luciana Cezar de C. Leite

Renata Lara Paes de Barros — Bibliotecária

Indexado/Indexed: Biosis Data Base, LILACS.

Periodicidade: irregular

Permuta/Exchange: são feitas entre entidades governamentais, com publicações congêneres, mediante consulta prévia. Exchanges with similar publications can be settled with academic and governmental institutions through prior mutual agreement.

Endereço/Address. Instituto Butantan — Biblioteca. Av. Vital Brasil, 1.500

05503 — 900 — São Paulo, SP — Brasil

Telefone/Telephone: (011) 813-7222 — R. 2129 — Telex: (011) 83325 BUTA-BR

Telefax: (011) 815-1505



Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Estado da Saúde
Coordenação dos Institutos de Pesquisa
Instituto Butantan — São Paulo — SP — Brasil

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

Volume 55, número 2, 1993

São Paulo, SP — Brasil
1993

MEMÓRIAS do INSTITUTO BUTANTAN. (Secretaria de Estado da Saúde).
São Paulo, SP — Brasil, 1918 —

1990, 52 (1—3, supl.)

Em apenso, a partir de 1990, 52(3): BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA

1991, 53(1, Supl. 1,2)

1992, 54 (1,2)

1993, 55(1,2)

ISSN 0073-9901
MIBUAH

CDD 614.07205

Solicita-se permuta/Exchange desired

SUMÁRIO/CONTENTS

Criação de camundongos "nude".
Nude mice breeding.

V.L. PETRICEVICH, V.R.F. FERREIRA, M. de SOUSA, F. G. de LANGLADA 41

Efeitos comparados da suplementação alimentar em coelhos durante os períodos de lactação e crescimento.
Comparative effects of supplemented feeding in rabbits during lactation and growing periods.

F. SOGORB S., U.P. RODRIGUES, S.B. DAMY, L. CHAGURI 53

Estudo da microbiota aeróbica de serpentes, *Bothrops* sp. (Serpentes, Viperidae), recém-capturadas.
Study of aerobic microbiota of recently captured snakes *Bothrops* sp. (Serpentes, Viperidae).

S. C. MAVRIDIS, M. HIPÓLITO, L. BALDASSI, A.A.P. MOULIN, E.M.B. CALIL, M.L. BARBOSA 59

Acidente por *Micrurus frontalis*: primeiro relato de envenenamento elapídico no Rio Grande do Sul.
Accident by *Micrurus frontalis*: the first description of an elapidic envenomation in Rio Grande do Sul.

R. SELIGMAN 65

COLETÂNEA DE RESUMOS DE TRABALHOS PUBLICADOS PELOS PESQUISADORES DO INSTITUTO BUTANTAN (1992) 71

BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA 17

Toxina tetânica: produção e purificação em escala industrial.
Tetanus toxin: production and purification in large scale.

F. FRATELLI, S.M.A. PRADO, M.D.C. VANCETTO, H.G. HIGASHI 19

ÍNDICE do v. 55

CRIAÇÃO DE CAMUNDONGOS "NUDE"

Vera Lucia PETRICEVICH*

Vera Regina Farago FERREIRA**

Monica de SOUSA***

Francisco Garcia de LANGLADA***

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo estabelecer normas de criação de camundongos "nude" da linhagem BALB/c, em alta escala, nas condições de nosso meio. Foram introduzidas as seguintes condições de nosso meio. Foram introduzidas as seguintes modificações nas normas gerais de criação: a) controle ambiental (temperatura entre 26 e 28°C, com renovação do ar interno a cada 3 horas, períodos alternados de 12 horas com luz e sem luz, utilização de mineral micáceo lamelar para a forragem das gaiolas); b) a alimentação foi suplementada com frutas e grãos; c) a amamentação dos filhotes foi de 35-40 dias e não 21 como usual até o desmame; d) o barulho nas salas de criação, foi minimizado através de treinamento especial de pessoal; e) a água foi esterilizada, acidificada e fornecida "ad libidum"; e f) controle permanente de infecções virais, principalmente, para o vírus hepatite murina tipo 3 (MHV3). Observou-se aumento significativo das taxas de natalidade e do número de filhotes que chegavam ao desmame. A mortalidade dos filhotes "nude", com 15 dias de idade, foi 40,3% e a taxa de mortalidade das fêmeas "nude" entre 31 a 210 dias de idade foi 54,3%. Em contraste, a mortalidade de machos, com a mesma idade, foi de 99%. A ausência de timo nos camundongos "nude", foi sempre monitorada por exames de animais de colônia escolhidos ao acaso.

UNITERMOS: camundongo "nude" (nu/nu), camundongo normal (Nu/nu), gene "nu".

* Laboratório de Imunoquímica

** Centro de Biotecnologia

*** Serviço de Fisiopatologia

Instituto Butantan, Caixa Postal 65 — CEP 01059-970

São Paulo — Brasil.

Recebido para publicação em 03.08.92 e aceito em 25.05.93.

INTRODUÇÃO

Os camundongos "nude" surgiram, pela primeira vez, no Virus Laboratory do Ruchill Hospital, em Glasgow, Escócia, em 1962⁷. A característica mais marcante dos camundongos "nude", independentemente da linhagem da qual se tenham originado, é a falta de pêlos no corpo, embora áreas esparsas com pêlos possam ser, ocasionalmente, observadas².

São pouco férteis, o que dificulta sua criação. Contudo, cruzando-se macho "nude" com fêmea heterozigota é possível obter uma prole constituída, em cerca de 50%, por camundongos "nude". Em geral, as fêmeas "nude" cruzadas com machos heterozigotos, têm poucos filhotes e estes são mais fracos que os camundongos normais. Além disso, elas não amamentam os filhotes. Uma outra característica descrita para estes animais é o curto período de vida. Flanagan², em 1966, verificou que nenhum destes animais sobrevive por um período maior que 25 semanas, sendo que 55% dos animais morrem com duas semanas de idade. O padrão de herança indica que o gene "nu" é um gene autossômico recessivo único².

Os camundongos "nude" não apresentam timo, em contraste com os camundongos heterozigotos, que apresentam timo normal¹². Apresentam extrema leucopenia, devida, principalmente, a uma linfopenia. Os camundongos "nude" devem ser mantidos isolados de outros animais, particularmente, outros camundongos. Em geral, os camundongos, convivem com algumas viroses e, possivelmente, outros germes patogênicos, os quais não são capazes de afetar a sobrevivência e o crescimento do animal. Portanto, em uma colônia de camundongos "nude" estes microorganismos podem causar doenças graves levando-os à morte⁴, sendo pois, indicado que estes animais sejam criados em condições especiais garantindo as características sanitárias dos animais e sua sobrevivência. Em especial, o camundongo "nude" é um instrumento útil para estudos do sistema imune.

O principal objetivo deste trabalho foi a produção de camundongos atípicos da linhagem BALB/c.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais:

Camundongos heterozigotos (Nu/nu) da linhagem BALB/c, oriundos da França, foram adquiridos pelo Serviço de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

2. Ambiente:

As salas, onde a colônia foi mantida, possuíam uma área de 15m². A iluminação destas salas foi feita com lâmpadas fluorescentes, acesas durante 12 horas/dia. A temperatura da sala foi mantida a 27°C³, por instalação de aquecedores elétricos. A ventilação das salas foi realizada por exaustor do tipo "industrial". As gaiolas de aço inoxidável e de polipropileno, com dimensões de 30 x 20 x 12 cm, foram preparadas com camas constituídas por maravalha, algodão hidrófobo e mineral micáceo lamelar¹⁰, sendo que a limpeza das gaiolas constituiu-se trocas semanais. Todo material utilizado para as trocas foi esterilizado pelo calor.

3. Alimentação:

Durante todo o período de observação, a ração para camundongos teve a mes-

ma procedência (Nuvilab, Curitiba, Brasil). Além disso, durante o período de set./86 a Ago./87, a alimentação do plantel foi suplementada com aveia em grão, semente de girassol, quirera de milho, germe de trigo, cevada em grão, trigo em grão, soja texturizada, cenoura e frutas frescas (maçã, pêra, banana e coco). A água era filtrada e acidificada com ácido clorídrico, pH 2,5-2,8^{8,11}, e esterilizada.

4. Acasalamentos:

Foram realizados dois tipos de acasalamentos:

a) Monogâmico (para cada macho "nude" uma fêmea heterozigota).

b) Heterogâmico (para cada macho heterozigoto, 3 - 4 fêmeas heterozigotas).

Para os dois tipos de acasalamento foram escolhidas fêmeas e machos Nu/nu com 60 dias de idade, enquanto os camundongos "nude" tinham 75 dias de idade^{15,13}. Através do método não-intensivo, após a verificação da prenhez, as fêmeas foram separadas dos machos.

5. Lactação:

Foi utilizado o método não-intensivo. Portanto, quando confirmada a prenhez das fêmeas Nu/nu, elas foram separadas dos machos e colocadas em caixas, aos pares⁹. Após o nascimento, os filhotes Nu/nu foram separados dos filhotes "nude". Desta forma, uma fêmea amamentava os filhotes heterozigotos, enquanto que a outra fêmea amamentava os filhotes atípicos.

6. Desmame:

Os filhotes heterozigotos foram desmamados com 21 dias de idade e os Nu/nu com 35 a 40 dias de idade.

7. Análise estatística:

Todos os animais existentes no plantel foram observados diariamente com anotações de natalidade e mortalidade. A análise estatística foi constituída dos seguintes indicadores:

$$\begin{aligned} \text{a) Taxa de natalidade} &= \frac{\text{nº de filhotes nascidos no mês}}{\text{nº de fêmeas acasaladas no mês}} \times 100 \\ \text{b) Taxa de desmame} &= \frac{\text{nº de filhotes desmamados no mês}}{\text{nº de fêmeas acasaladas no mês}} \times 100 \\ \text{c) Taxa de mortalidade} &= \frac{\text{nº de filhotes mortos}}{\text{nº de filhotes nascidos}} \times 100 \\ \text{d) Porcentagem} &= \frac{\text{número de óbitos}}{\text{nº total animais observados}} \times 100 \end{aligned}$$

8. Cálculo da probabilidade de diferenças:

A probabilidade, valor de "t" foi calculado:

$$t = \frac{(n_1 - n_2)}{\sqrt{e_1^1 + e_2^2}}$$

onde n_1 e n_2 representam as taxas analisadas e e_1 e e_2 correspondem ao erro padrão Poisson, o qual foi obtido através da Tabela III de Fisher e Yates¹.

9. Controle da infecção por MHV3

A infecção por vírus da hepatite murina provoca algumas doenças como hepatite, encefalite, pneumonite intersticial, nefrite e enterite, dependendo da linhagem e da idade do camundongo, da via de infecção e do tipo de MHV. Mensalmente, grupos de 10 camundongos foram sacrificados como controle de uma possível infecção por MHV3 na colônia.

10. Controle do barulho

O barulho nas salas, onde a colônia foi mantida, foi minimizado através de treinamento especial de pessoal.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados de acasalamentos de camundongos (heterozigotos e "nude") nos períodos de Setembro/85 a Agosto/86 e de Setembro/86 a Agosto/87. Dos acasalamentos entre fêmeas Nu/nu e machos nu/nu, aproximadamente 50% dos filhotes são nu/nu, e 50% Nu/nu. De acasalamento entre fêmeas e machos heterozigotos, os filhotes que apresentavam pelos foram separados e, em seguida, testados, para garantir a preservação do gene nu. Este teste constituiu-se em acasalamentos destes animais com camundongos atípicos. Os resultados destes testes mostraram que 25% dos animais apresentavam características Nu/Nu e 50 Nu/nu. todos os animais portadores do gene nu foram mantidos para substituição das matrizes, enquanto que os animais com genótipos Nu/Nu foram desprezados.

TABELA 1

Produção de camundongos "nude" no Biotério do Serviço de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

PERÍODO	TOTAL DE ACASALAMENTOS		TOTAL DE NASCIMENTOS	NÚMERO DE FILHOTES		
	Nu/nu c/ Nu/nu	855		Nu/Nu	Nu/nu	Nu/nu
Set./85 a Ag./86	Nu/nu c/ nu/nu	96	386	—	193	193
	Nu/nu c/ Nu/nu	1.849	11.478	2.620	6.238	2.620
Set./86 a Ag./87	Nu/nu c/nu/nu	911	7.896	—	3.948	3.948

Os resultados obtidos no primeiro período estudado, correspondente a Setembro/85 a Agosto/86, estão representados na Tabela 2. Durante este período foi possível observar um aumento da taxa de natalidade, principalmente entre os meses de Outubro/85, Fevereiro e Março/86. A maior taxa de desmame observada,

Tabela 2
Camundongos heterozigotos e "nude" segundo indicadores de produção e meses do período Set./85 a Ag./86

MÊS	NÚMERO DE FÊMEAS ACASALADAS	TOTAL DE FILHOTES NASCIDOS	TAXA DE NATALIDADE %	NÚMERO DE FILHOTES DESMAMADOS	TAXA DE DESMAME %	NÚMERO DE FILHOTES nu/nu MORTOS	TAXA DE MORTALIDADE DE FILHOTES "NUDE" %
Set./85	62	52	83,9	22	35,3	30	57,7
Out./85	27	213	788,9	—	—	43	20,2
Nov./85	41	111	270,7	—	—	10	9,0
Dez./85	21	61	290,5	17	81,0	14	22,9
Jan./86	42	200	476,2	9	21,4	7	3,5
Fev./86	31	244	787,1	3	9,7	50	20,5
Mar./86	31	215	693,3	34	109,7	87	40,5
Abr./86	77	329	55	71,4	40	40	12,2
Mai./86	132	622	46	34,8	173	27,8	39,2
Jun./86	95	296	46	48,4	116	116	45,0
Jul./86	180	444	34	18,9	200	190	16,4
Ago./86	242	1.159	478,9	50	20,7	316	960
Total	981	3.945					
Média/Mês	81,75	328,75	443,87	10,25	45,15	80,00	26,35

Tabela 3

Camundongos "nude" segundo os indicadores de produção e meses do período Set./86 a Ago./87

MÊS	NÚMERO DE FÊMEAS ACASALADAS	TOTAL DE FILHOTES NASCIDOS	TAXA DE NATALIDADE %	NÚMERO DE FILHOTES DESMAMADOS	TAXA DE DESMAME %	NÚMERO DE FILHOTES nu/nu MORTOS	TAXA DE MORTALIDADE DE FILHOTES "nude" %
Set./86	173	1.909	1.103,5	185	106,9	556	29,1
Out./86	118	1.486	1.259,3	161	136,4	346	23,3
Nov./86	111	781	703,6	177	159,5	318	40,7
Dez./86	100	886	886,0	128	128,0	334	37,7
Jan./87	339	1.379	406,8	585	172,6	325	23,5
Fev./87	150	1.712	1.141,3	176	117,3	396	23,1
Mar./87	228	987	432,9	490	214,9	350	35,5
Abr./87	312	2.270	727,6	525	168,3	337	14,8
Mai./87	350	1.882	537,7	968	276,6	315	16,7
Jun./87	545	1.968	361,1	332	60,9	301	15,3
Jul./87	342	2.407	703,8	538	157,3	301	12,5
Ag./87	263	1.707	649,0	749	284,8	284	16,6
Total	2.760	19374		5.014		4.163	
Média/Mês	252,58	1.614,5 ^(a)	772,71	200,41 ^(b)	165,29	346,9 ^(a)	24,06

a) significativamente diferente do período de Set./85 — Ago./86 $p = 0,001$.
 b) significativamente diferente do período de Set./85 — Ago./86 $p = 0,02$.

neste período, foi durante o mês de Março/86. As menores taxas de mortalidade dos filhotes para este período, foram observadas durante os meses de Novembro/85, Janeiro, Abril e Agosto/86.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos no decorrer do segundo período observado (Setembro/86 - Agosto/87). Com aplicação dos métodos de prolongar o período de lactação e o fornecimento de suplementos alimentares, foi possível obter um maior número de camundongos "nude" em idade de acasalamento. Conseqüentemente, para este período, observaram-se aumentos nas taxas de natalidade e desmame.

A longevidade dos camundongos "nude" está mostrada nas Tabelas 4 e 5. A Tabela 4 mostra que de 4.602 nascimentos, 2.562 (55,6%) atingiram a idade do desmame (35 - 40 dias de idade). Na Tabela 5, mostram-se as idades quando ocorreram os óbitos. A maior incidência de morte (40,3%) ocorreu nos 15 primeiros dias. O índice de mortalidade caiu com o avanço da idade.

Tabela 4
Estudo do tempo de vida de camundongos "nude".

ACASALAMENTOS	TOTAL DE FILHOTES NASCIDOS		FILHOTES "NUDE" DESMAMADOS	
	Nu/nu	nu/nu	MACHOS	FÊMEAS
1:1 1677 fêmeas Nu/nu c/macho nu/nu	4602	4602 ^a	1312 ^b	1250 ^b

^a número de filhotes "nude" que foram observados.

^b número de camundongos "nude" que atingiram a idade de desmame.

Tabela 5
Mortalidade de filhotes "nude" entre 0 e 30 dias de idade.

FAIXA DE IDADE (EM DIAS)	MORTALIDADE N°	PORCENTAGEM
0 — 5	872	18,9
6 — 10	720	15,6
11 — 15	268	5,8
16 — 20	121	2,6
21 — 25	31	0,7
26 — 30	28	0,6
TOTAL	2040	44,3

A Tabela 6 mostra a mortalidade de camundongos "nude" entre 31 e 210 dias de idade. Aproximadamente 42% das fêmeas e 72% dos machos morreram entre o 31º e o 90º dias de idade. Durante o período de 91 a 210 dias, a porcentagem de mortalidade encontrada foi de, aproximadamente, 12 e 26% para fêmeas e machos, respectivamente.

Para investigar a presença de MHV3 na colônia, grupos de camundongos "nude" eram sacrificados. Durante os dois períodos estudados, cerca de 10% destes animais apresentaram fígados com consistência flácida e áreas de tonalidade amarelada, entremeadas de áreas avermelhadas. Ao exame microscópico, os fígados apresentaram o parênquima hepático com sua citoarquitetura alterada por processo inflamatório, caracterizado por focos de necrose e degeneração celular, exsudato neutrófilo focal nas áreas necróticas, além de proliferação de células fagocitárias e infiltrado linfocitário característico de hepatite.

DISCUSSÃO

Este trabalho descreve os resultados obtidos na criação de camundongos "nude", nos períodos de set./85 — ag./86 e de set./86 — ag./87. Todos os fatores ambientais foram cuidadosamente controlados para a obtenção de melhores resultados quanto ao desenvolvimento e ao crescimento dos camundongos "nude". A utilização destes métodos, bastante simplificados, foi muito importante para a manutenção da colônia de camundongos "nude". No decorrer do segundo período estudado, foi possível observar aumentos significativos quanto ao número de nascimentos e ao número de filhotes desmamados. Vários fatores contribuíram para estes resultados:

1. Controle ambiental

a) Gaiolas

As gaiolas utilizadas para a criação dos camundongos "nude" foram de aço inoxidável e de polipropileno. Estas gaiolas foram trocadas 3 vezes por semana. A característica principal dos camundongos atípicos é a ausência de pêlos e, quando colocados em gaiolas com "cama" constituída por maravalha, foi observado ressecamento da pele e vários ferimentos ao longo do corpo dos animais. Estes problemas foram minimizados com a substituição por "cama" preparada com algodão hidrófobo, embora a taxa de mortalidade do plantel, principalmente filhotes, continuasse bastante elevada.

Na tentativa de diminuir a perda de filhotes, foi testado, ainda, um mineral micáceo lamelar, para o preparo das gaiolas. Com a utilização deste material, o qual é capaz de absorver umidade e odor, também foi possível observar uma redução de mortalidade dos filhotes, consequentemente, um aumento do número de animais desmamados.

b) Temperatura

A maioria das linhagens de camundongos é criada a uma temperatura entre 25 e 26°C. A temperatura ideal para a criação de camundongos "nude" é de 26 — 28°C³. Devido à falta de pêlos, o camundongo "nude" perde calor mais rapidamente que os camundongos normais. A temperatura da sala de criação foi mantida a 27°C, por instalação de aquecedores elétricos.

c) Ventilação

Os camundongos "nude" foram mantidos em salas do tipo sistema conven-

cional. Na tentativa de reduzir o nível de contaminantes atmosféricos ou microorganismos, através da instalação de exaustor do tipo "industrial", ligado a cada 3 horas.

d) Iluminação

Os períodos de iluminação e escuridão devem ser bem estabelecidos. Os animais atípicos devem ser mantidos em ambientes com ciclos de luz constantes. Lâmpadas fluorescentes foram instaladas em diferentes pontos da sala de criação, de modo a proporcionar a uniformidade da iluminação. Nas salas onde os camundongos atípicos foram criados, havia reostatos que permitiam acender e apagar gradualmente as luzes, simulando crepúsculo e amanhecer. Desta forma, procurou-se manter estes animais em condições mais semelhantes às naturais, evitando, assim, choques produzidos por escuridão ou iluminação bruscas. O período de iluminação para a criação de camundongo "nude" foi de doze horas, seguido por doze horas de escuridão.

2. Nutrição

a) Alimentação

Foi observado que as necessidades nutricionais dos camundongos "nude" são semelhantes às de camundongos normais. A ração utilizada foi especial para camundongos e de boa procedência, descrita em Materiais e Métodos. O desenvolvimento do camundongo "nude", quando comparado ao camundongo normal, é mais lento. Portanto, para tentar suprir esta deficiência, a alimentação foi suplementada como descrito em Materiais e Métodos. O peso corporal dos camundongos "nude", no momento do desmame, foi de 14g e 11g para machos e fêmeas, respectivamente. Em contraste, para os grupos de camundongos atípicos tratados com a alimentação suplementar, o peso encontrado foi 17g e 13g para machos e fêmeas, da mesma idade, possibilitando uma melhor seleção de matrizes.

b) Água

Ocasionalmente, na água, são encontrados baixos níveis de várias bactérias não patogênicas, incluindo *P. aeruginosa*. Para prevenir a contaminação da colônia de camundongo "nude", é recomendado que a água seja acidificada com adição de ácido clorídrico a um pH de 2,5 a 2,8^{6,8,11}. Na tentativa de eliminar a presença de alguns tipos de microorganismos prejudiciais a esses animais imunologicamente deficientes, o controle do pH da água foi muito importante para a manutenção da colônia.

3. Produção Animal

a) Acasalamentos, Lactação e Desmame

Vários tipos de sistemas de produção de animais são descritos^{3,10}. Os sistemas de acasalamentos utilizados neste trabalho estão descritos em Materiais e Métodos. Após a cobertura, as fêmeas foram separadas dos machos e colocadas duas por gaiola, no máximo. No momento do nascimento, todos os filhotes são muito semelhantes. Devido ao lento desenvolvimento do camundongo atípico, apenas após o 3º dia do nascimento é possível distingui-lo dos filhotes normais. Neste ponto, foi feita uma nova separação entre as fêmeas. Assim, uma das fêmeas amamentava apenas filhotes heterozigotos, enquanto a outra fêmea amamentava os filhotes atípicos. Esta separação de filhotes, durante o período de lactação, foi importante para proporcionar um crescimento mais rápido do camundongo imunologicamente mais fraco. Cerca de 40% dos filhotes "nude" mor-

reram durante os primeiros quinze dias de vida. Estes resultados são muito semelhantes aos de Flanagan², cuja mortalidade entre os filhotes nas duas primeiras semanas de vida foi 55%. Além disso, também foi verificado que o camundongo "nude" inicia sua alimentação sólida de 3 a 5 dias mais tarde quando comparado com camundongos normais.

Tabela 6

Mortalidade de fêmeas e machos "nude" entre 31 e 210 dias de idade.

DIAS DE VIDA	MORTALIDADE			
	FÊMEAS		MACHOS	
	Nº OBSERVADO	%	Nº OBSERVADO	%
31 — 50	85	6,8	107	8,2
51 — 70	284	22,7	358	27,3
71 — 90	159	12,7	488	37,2
91 — 110	95	7,6	160	12,2
111 — 130	33	2,6	71	5,4
131 — 150	14	1,1	65	4,9
151 — 170	8	0,6	34	2,6
171 — 190	1	0,08	9	0,7
191 — 210	4	0,3	6	0,5
TOTAL	683	54,3	1298	99,0

Em geral, os camundongos são desmamados com 21 dias de idade. Em contraste, os camundongos "nude" quando desmamados com esta idade não se desenvolvem mais, morrendo entre 5 — 10 dias após. Portanto, foi necessário aumentar o período de lactação (35 — 40 dias), o que tornou possível a obtenção de um maior número de camundongos da linhagem BALB/c. A mortalidade das fêmeas "nude" entre 31 e 210 dias de idade foi menor que a encontrada para os machos com a mesma idade.

4. Controle da infecção por MHV3

A grande maioria dos camundongos "nude" desenvolvem hepatite necrótica ocasionando sua morte². Flanagan², em 1966, sugeriu que as lesões encontradas no fígado destes animais resultaram de efeitos pleiotrópicos do gene "nu". Posteriormente, foi demonstrada a susceptibilidade de camundongos "nude" às infecções causadas por viroses murinas, especialmente MHV⁴. Durante os períodos estudados (set./85 — ag./86 e set./86 — ag./87), foi possível observar que dos 120 camundongos "nude" examinados 12 apresentaram infecção causada por MHV. Este vírus foi isolado a partir das lesões encontradas nos fígados

PETRICEVICH, V.L. et al. Criação de camundongos "nude". Mem. Inst. Butantan, v. 55, n.2, p. 41-52, 1993.

examinados e propagados "in vitro" em culturas de células L-929, dados que este trabalho não mostra.

Resultados semelhantes foram encontrados para o período de set./87 a ag./91, dados que este trabalho não mostra.

CONCLUSÕES

Durante o segundo período estudado os resultados obtidos quanto à produção de camundongos "nude" foram:

1. Aumento significativo do número de nascimentos e de filhotes desmamados.
2. Diminuição da taxa de mortalidade.
3. A mortalidade observada entre filhotes com duas semanas de idade foi de 40,3%.
4. A mortalidade de fêmeas e machos "nude" com 31 a 210 dias de idade foi de 54,3% e 99%, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva (Chefe do Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan) pelas críticas e sugestões no preparo deste manuscrito; Dra. C. Rosana Duarte Prisco (Serviço de Informática e Análise de Dados, Universidade de São Paulo) pela análise estatística da faixa etária.

ABSTRACT: The aim of the present work was to establish the parameters of breeding nude mice in our conditions. The following modifications of housing standard conditions, the care and the maintenance of the colonies were introduced: a) environmental control (temperature of 26-28°C, a regular diurnal lighting cycle, air renovation at each 3 hours and utilization of "mineral micáceo lamelar" used as bedding for animals; b) enrichment of the normal food with fresh fruits and grains; c) extention of the suckling period to 30 days; d) the noise inside the animal house was minimized by appropriate training of personnel; e) sterilized and acidified was administrered "ad libidum" and f) the surveillance for the virus infection was permanent, specially for MHV3 virus. It was observed that under these conditions, the rates of birth survival and the weaning were significantly increased. The percentage of death of the offspring at the age of 15 days was 40.3%, whereas the female between 31-210 days, was 54.3%. In contrast, the male death at the same age was 99%. The absence of thymus in nude mice was monitored by examining animals at random selected.

KEYWORDS: Nude mice (nu/nu), normal mice (Nu/Nu), "nu" gene.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FISHER, R.A., YATES, F. *Statistical methods for biological agricultural and medical workers*. London: Oliver & Boyd, 1943.
2. FLANAGAN, S.P. Nude a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Gent. Res.*, v.8, p. 295-309, 1966.

PETRICEVICH, V.L. et al. Criação de camundongos "nude". Mem. Inst. Butantan, v. 55, n.2, p. 41-52, 1993.

3. FOGH, J., GIOVANELLA, B. C. *The nude mouse in experimental and clinical research*. New York: Academic Press, 1978.
4. FUJIWARA, K., TAMURA, T., UEDA, K. Nude mice. In: INT. WORKSHOP, 2, 1976. *Proceedings ...* 1977. p. 53-60.
5. GIOVANELLA, B. C., STEHLIN, J. S. Heterotransplantation of human malignant tumors in "nude" thymus-less. I Breeding and maintenance of "nude" mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 51, p. 615-619, 1973.
6. INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington. DHEW Publ. n. (NIH) 74-23 Public Health Serv. Inst. Health, 1976.
7. ISAACSON, J.M., CATTANACH, B. M. Report mouse. *News Letter*, v. 27, p. 31-32, 1962.
8. LES, E.P. Effect of acidified-chlorinated water on reproduction in C3H/HeJ and C57BL/6J mice. *Lab. Anim. Care*, v. 18, p. 210-213, 1968.
9. LES, E.P. Cage population density and efficiency of feed utilization in inbred mice. *Lab. Anim. Care*, v. 18, p. 305-313, 1968.
10. MACHADO-SANTELLI, G. M., MORI, L. Avaliação preliminar do uso da vermiculita expandida na criação de animais de laboratório. *Ciênc. Cult.*, v. 38, p. 916-919, 1986.
11. MCPHERSON, C.W. Reduction of *Pseudomonas aeruginosa* and coliform bacteria in mouse drinking water following treatment with hydrochloric acid or chlorine. *Lab. Anim. Care*, v. 13, p. 737-744, 1963.
12. PANTELOURIS, E.M. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature*, v. 217, p. 370-371, 1968.
13. POILEY, S.M., OVEJERA, A.A., OTIS, A.P., REEDER, C.R. Nude mice. In: WORKSHOP NUDE MICE, 1, 1973. *Proceedings ...* p. 189-202.

Este trabalho avaliou os efeitos da suplementação com forragem rami em coelhos em lactação e crescimento. Foram utilizadas quatro rações com diferentes níveis protéicos (normoprotéica e hipoprotéica) e com ou sem suplementação com forragem rami. Os resultados mostraram que a suplementação com forragem rami favorece o aleitamento, mesmo no grupo com níveis protéicos normais, demonstrando um ganho de peso dos láparos superior aos demais grupos e taxa de mortalidade praticamente nula.

EFEITOS COMPARADOS DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR EM COELHOS DURANTE OS PERÍODOS DE LACTAÇÃO E CRESCIMENTO

Fernando SOGORB S.*
Ubirama Pereira RODRIGUES **
Sueli Blanes DAMY **
Luziane C.A.G. CHAGURI **

RESUMO: Foram analisados ganhos ponderais e mortalidade em coelhos, comparando-se dados obtidos de rações com diferentes valores protéicos, suplementadas ou não com forragem verde. Os animais foram observados durante as fases de lactação e crescimento. Dois grupos de reprodutoras receberam ração normoprotéica (21,85%) e dois grupos hipoprotéica (9,7%), sendo que nas duas formulações um dos grupos foi suplementado com forragem rami. O ganho ponderal e a taxa de mortalidade entre os grupos foram submetidos aos testes de Tukey e qui quadrado, com nível de rejeição de 5%. Os resultados demonstram que a suplementação com forragem verde favorece o aleitamento, mesmo no grupo com níveis protéicos normais, demonstrando um ganho de peso dos láparos superior aos demais grupos e taxa de mortalidade praticamente nula.

UNITERMOS: *Coelhos, lactação, crescimento, alimentação.*

INTRODUÇÃO

Sendo herbívoros não ruminantes, possuem os coelhos um sistema digestivo simples com funções do ceco e intestino grosso bem desenvolvidas¹³. Estudos

* Liderança Científica, PQ-C6 e Diretor Técnico da Divisão Biotério Central do I. Butantan.

** Pesquisador Científico PQ-C2 do Biotério Central do I. Butantan.

Instituto Butantan, Caixa Postal, 65, 01059-970 São Paulo-SP, Brasil.

Recebido para publicação em 22-3-93 e aceito em 16-7-93.

sobre o fenômeno de coprofagia nesta espécie, concluíram que a mesma produz dois tipos de fezes: uma forma suave à noite e uma cíbala firme, durante o dia. As fezes noturnas são virtualmente reingeridas diretamente do ânus e representam 30 a 80% do excreta diário total^{7, 14}, sendo composta por proteínas, vitaminas, minerais e fibras, em porcentagens semelhantes ao conteúdo normal do ceco^{7, 12}.

Em consequência desta peculiaridade, a determinação das necessidades protéicas de coelhos torna-se difícil, devido à síntese bacteriana de amino ácidos e reingestão de nitrogênio modificado presente nas fezes noturnas. O efeito do metabolismo de nitrogênio na reciclagem do conteúdo intestinal é análogo à digestão de ruminantes e há evidências, que, ao contrário de outros mamíferos, os coelhos absorvem considerável quantidade de amino ácidos no intestino grosso¹².

Dados referentes às necessidades nutricionais revelam generalidades e imprecisões; alguns testes indicam que há certos níveis adequados para as fases vulneráveis de crescimento, reprodução e lactação¹⁴.

Por necessidade de padronização e praticidade, geralmente opta-se por alimentar esta espécie com ração farelada ou granulada produzida comercialmente, que pode apresentar flutuação em sua formulação, eliminando-se o fornecimento de forragens verdes que constituem o alimento natural dos coelhos, os quais transformam cerca de 80% da celulose presente nas mesmas²².

O rami (*Boehmeria nivea*, var. Murakami) é uma forragem rica em fibras e nutrientes^{13, 15, 18}. A suplementação com rami aumenta o nível de proteína ingerida em 3,8g/100g de verde²¹ e favorece a secreção láctea¹⁰.

Além de sua utilização como fonte de proteína na alimentação humana e em fins industriais, os coelhos também são usados como animais de laboratório convencionais, na produção e controle de imunobiológicos, em ensaios biomédicos, no controle de qualidade de fármacos, assim como modelo animal em estudos de medicina, cirurgia comparada e como meio auxiliar de diagnóstico laboratorial^{5, 9, 19, 23}.

Sendo, portanto, maiores as exigências sanitárias, genéticas e nutricionais na produção desta espécie em biotérios, este trabalho teve como objetivo estudar o aspecto nutricional em criação de coelhos, analisando resultados de ganhos ponderais e mortalidade, comparando-se os dados obtidos de rações com diferentes valores protéicos, suplementadas ou não com forragem verde.

MATERIAL E MÉTODOS

De uma colônia de coelhos fechada, da raça Branco Nova Zelândia (BNZ), foram aleatoriamente formados 4 grupos experimentais de 5 reproduutoras primíparas.

Para alimentação, ficou estabelecida como ração normoprotéica, a formulada com 21,85% de proteína, suficiente para assegurar crescimento máximo, de acordo com o descrito por outros autores^{2, 4, 6, 13, 16, 17}. Como ração hipoprotéica, a formulação continha 9,7% de proteína.

Desde um mês antes do acasalamento, dois grupos de reproduutoras receberam ração normoprotéica e dois grupos hipoprotéica, sendo que nas duas formulações um dos grupos foi suplementado com forragem rami (*Boehmeria nivea*, var. Murakami) em torno de 100g por dia até 21 dias após o parto; a partir de então, foram fornecidos mais 50g por láparo até a sexta semana de idade e a seguir aumentada para 100g *diem/capita* até o desmame. A ração foi fornecida *ad libitum* e diariamente pesada a quantidade ingerida. As reproduutoras e as ni-

nhadas eram pesadas individualmente no dia do parto e uma vez por semana até o desmame, feito aos 60 dias²⁰.

Os quatro grupos estiveram sujeitos às mesmas condições ambientais e de manejo, exceto no que se refere ao teor de proteína e suplementação com rami.

Foram utilizados para análise estatística os testes de Tukey e de qui quadrado⁸, com nível de rejeição adotado de 5%.

RESULTADOS

O comportamento do peso das reproduutoras e láparos, mantidos durante o período de aleitamento em ração normoprotéica e hipoprotéica suplementados ou não com forragem verde, está representado nas Figs. 1 e 2.

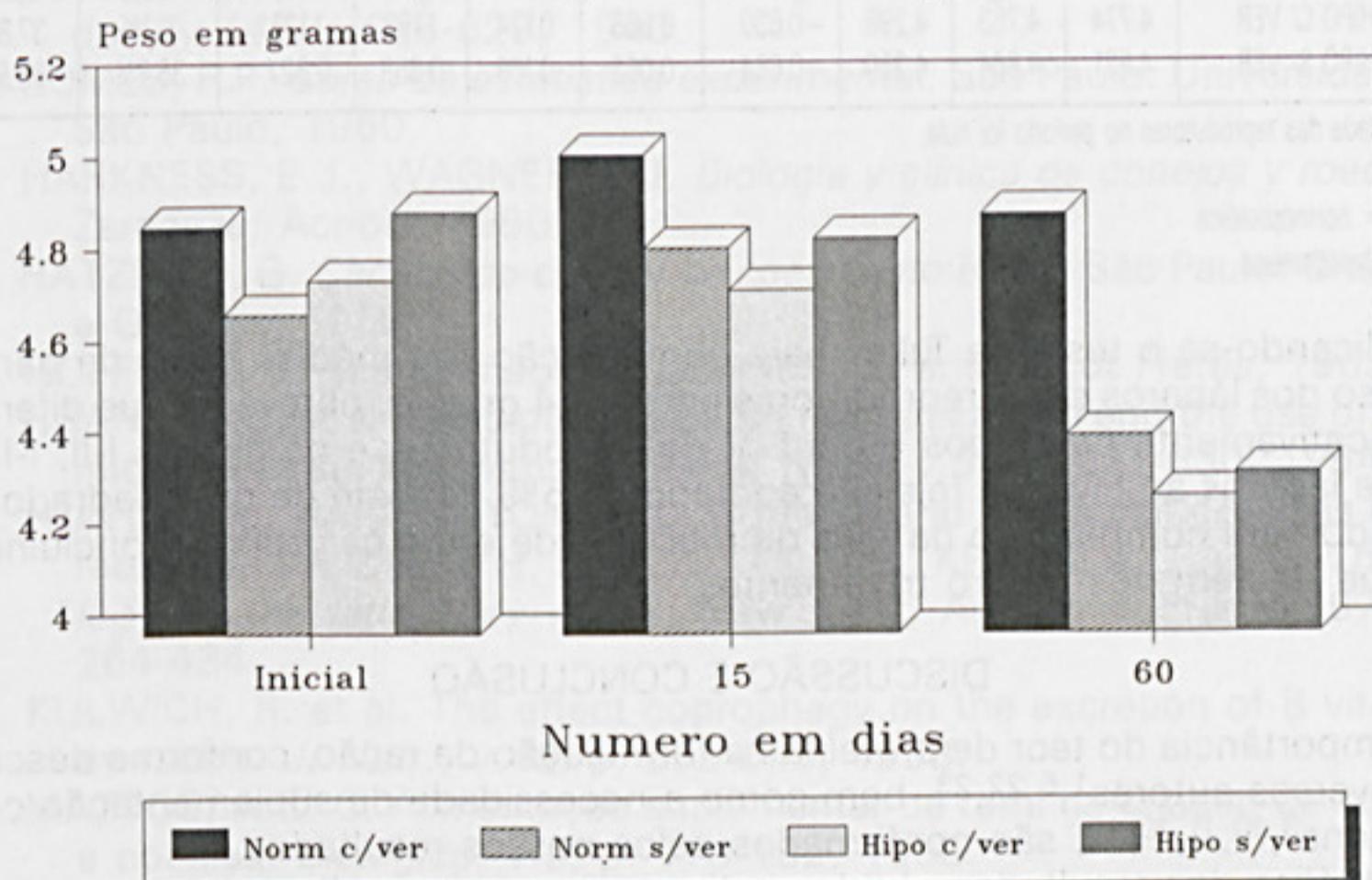


FIG. 1: Peso das reproduutoras durante o período de aleitamento

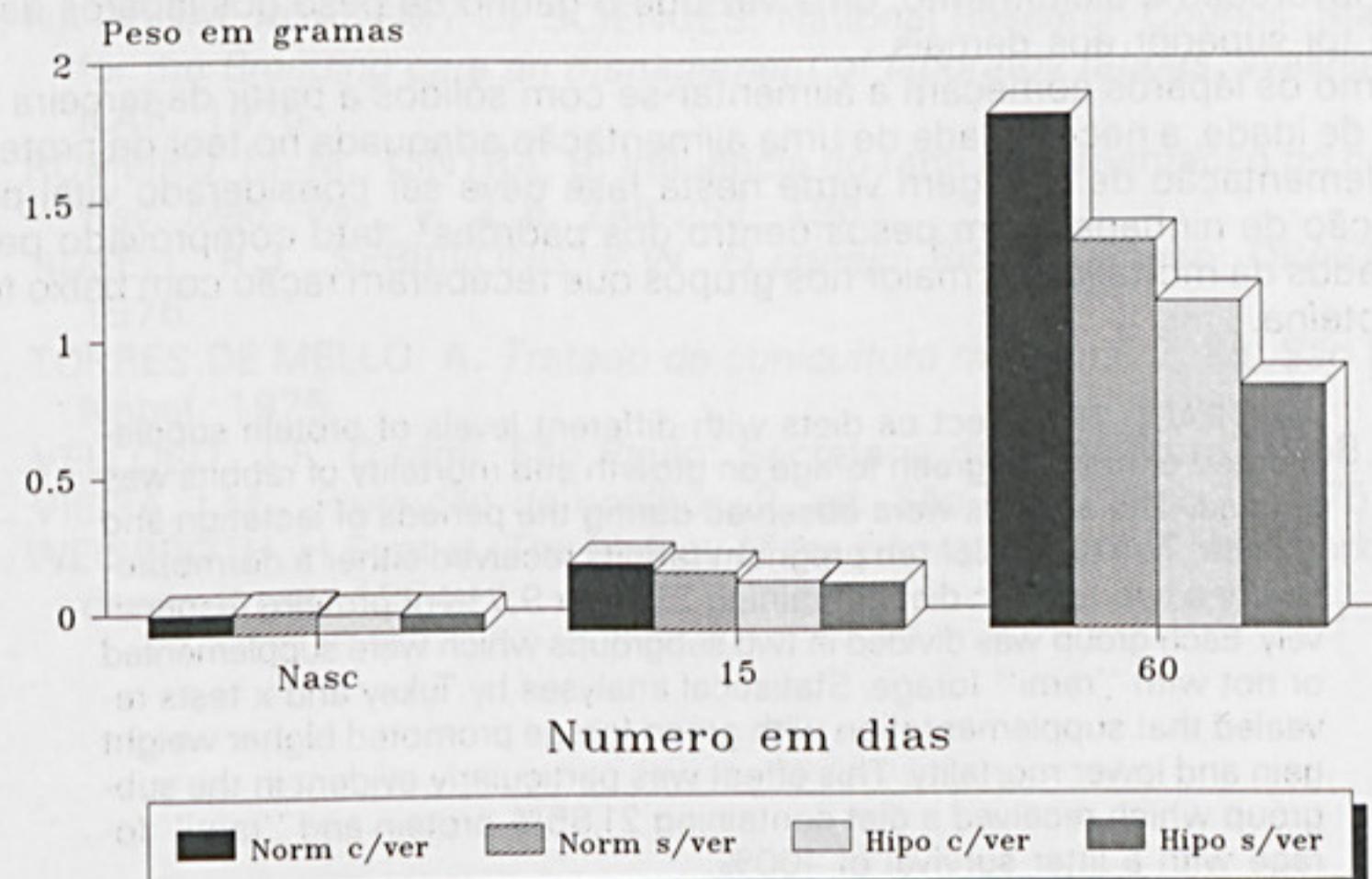


FIG. 2: Peso dos láparos em diferente alimentação durante os dois meses de aleitamento

Na Tabela 1 estão representados os valores ponderais, indicando a média do peso inicial, a média do peso final e a taxa de mortalidade.

TABELA 1

PESO CORPORAL E MORTALIDADE, DE REPRODUTORAS E LÁPAROS EM DIFERENTE ALIMENTAÇÃO DURANTE OS DOIS MESES DE ALEITAMENTO

ALIMENTAÇÃO*	MÉDIA PESO REPRODUTORA (G)				MÉDIA PESO LÁPAROS (G)				MORTALID/LÁPAROS	
	INICIA	15DIAS	60DIAS	VARIAC	NASCIM	15DIAS	60DIAS	GANHO	15DIAS	60DIAS
I NORMO C/VER	4.892	5.047	4.915	+0.023	0.072	0.243	1.874	1.802	0%	0%
II NORMO S/VER	4.700	4.844	4.430	-0.270	0.075	0.211	1.413	1.338	2,8%	8,3%
III HIPO C/VER	4.774	4.753	4.298	-0.630	0.065	0.174	1.193	1.128	31,1%	37,8%
IV HIPO S/VER	4.921	4.864	4.350	-0.664	0.062	0.169	0.889	0.827	35,7%	53,5%

A mortalidade das reprodutoras no período foi nula.

NORMO = normoprotéica

HIPO = hipoprotéica

Aplicando-se o teste de Tukey para comparação das médias finais de ganho de peso dos láparos e das reprodutoras entre os 4 grupos, obteve-se que diferem significativamente os grupos I-III e I-IV de reprodutoras, e os grupos I-II, I-III e I-IV de láparos ao nível de rejeição adotado de 5%. O teste de qui quadrado foi aplicado para comparação da taxa de mortalidade entre os grupos, concluindo-se que diferem nos quatro tratamentos.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A importância do teor de proteína na formulação da ração, conforme descrito por diversos autores^{1, 5, 22, 23}, bem como a necessidade de suplementação com forragens^{3, 10, 11, 19, 23}, são confirmados pelos nossos resultados.

A análise dos resultados obtidos indicam que mesmo alimentando-se as reprodutoras com níveis adequados de proteína, a suplementação com forragem verde favoreceu o aleitamento, uma vez que o ganho de peso dos láparos deste grupo foi superior aos demais.

Como os láparos começam a alimentar-se com sólidos a partir da terceira semana de idade, a necessidade de uma alimentação adequada no teor de proteína e suplementação de forragem verde nesta fase deve ser considerado vital para obtenção de ninhadas com pesos dentro dos padrões², fato comprovado pelos resultados da mortalidade, maior nos grupos que receberam ração com baixo teor de proteína.

ABSTRACT: The effect of diets with different levels of protein supplemented or not with green forage on growth and mortality of rabbits was studied. The animals were observed during the periods of lactation and growth. Two groups of ten pregnant rabbits received either a normoproteic or a hypoproteic diet containing 21,85 or 9,7% of protein, respectively. Each group was divided in two subgroups which were supplemented or not with "rami" forage. Statistical analyses by Tukey and x tests revealed that supplementation with green forage promoted higher weight gain and lower mortality. This effect was particularly evident in the subgroup which received a diet containing 21,85% protein and "rami" forage with a litter survival of 100%.

KEYWORDS: Rabbit, proteic level, lactation, weight gain.

SOGORB S., F. et al. Efeitos comparados da suplementação alimentar em coelhos durante os períodos de lactação e crescimento. *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n. 2, p. 53-57, 1993.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, T.J. *Nutrición animal y dietética veterinaria*. Zaragoza: Acribia, 1965.
2. ANDRIGUETTO, J.M. et al. *Normas e padrões de nutrição e alimentação animal*. São Paulo: Nobel, 1988.
3. ARANHA, R.E.S. *Coelho dá lucro*. Brasília: Ministério da Agricultura, 1959.
4. CASADY, R.B., GILDW, E.M. Rabbit nutrition. *Prod. An. Care Panel*, v.9, p.9-30, 1959.
5. CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. *Animales de laboratório: manual para técnicos*. Buenos Aires: OPAS/OMS, 1974.
6. DUMAS, J. *Les animaux de laboratoire*. Paris: Medicinales Flammarion, 1953.
7. EDEN, A. Coprophagy in the rabbit: origin of "night" faeces. *Nature London*, v. 145, p.628-629, 1940.
8. GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1960.
9. HARKNESS, E.J., WAGNER, E.J. *Biología y clínica de conejos y roedores*. Zaragoza: Acribia, 1980.
10. HATZFELD, G. *Cartilha do criador de coelhos no Brasil*. São Paulo: Chácaras e Quintais, 1958.
11. HOFFMAN, G. *Les animaux de laboratoire*. Paris: Vigot Freres, 1963.
12. HUANG, T.C. et al. Antibiotics, growth, food utilization and the use of chromic oxid in studies with rabbits. *J. Nutr.*, v.54, p.621-630, 1954.
13. HUNT, C.G., HARRINGTON, D.D. Nutrition and nutritional diseases of the rabbit. In: WEISBROTH, S.H., FLATT, R.E., KRAUS, A.L., eds.. *The biology of the laboratory rabbit*. New York: Academic Press, 1974. p. 264-434.
14. KULWICH, R. et al. The effect coprophagy on the excretion of B vitamins by rabbit. *J. Nutr.*, v.49, p. 639-645, 1953.
15. MATTOS, A.C. C. Alimentação suplementar de rami na criação de coelhos e cobaias. *Biológico*, v.9, p. 179-182, 1958.
16. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. *Nutrients requirements of rabbits*. Washington: National Research Council, 1966.
17. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. National Research Council. Standards for the *Breeding care an management of laboratory rabbits*. Washington: ILAR, 1976.
18. ROMEIRO, M. M., CINTRA, B. Influência do rami na alimentação do coelho. *Rev. Med. Vet.*, v. 2, p. 246-251, 1967.
19. RUSELL, R.J., SEBRILLING, P.W. *El conejo*. Rio de Janeiro: OPAS/OMS, 1976.
20. TORRES DE MELLO, A. *Tratado de cunicultura moderna*. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1975.
21. VELLOSO, J.F. *O rami*. São Paulo: Secretaria da Agricultura, 1958.
22. VIEIRA, I.M.. *Produção de coelhos*. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1975.
23. WEISBROTH, H.S. et al. *The biology of the laboratory rabbit*. New York: Academic Press, 1974.

ESTUDO DA MICROBIOTA AERÓBICA DE SERPENTES *BOTHROPS* SP (SERPENTE, VIPERIDAE), RECÉM-CAPTURADAS*

Sofia C. MAVRIDIS**
Márcio HIPÓLITO***
Lucia BALDASSI***
Aurelia A.P. MOULIN***
Ercilia M.B. CALIL***
Maria L. BARBOSA***

RESUMO: Pesquisou-se a microbiota oral, cloacal, pulmonar e intestinal de 12 serpentes recém-capturadas e aparentemente sadias de 6 espécies do gênero *Bothrops*. Os principais achados foram: *Staphylococcus* coagulase negativa, *Corynebacterium* sp, *Aeromonas salmonicida*, *Streptococcus* sp, *Pseudomonas* sp, *Vibrio* sp, *Enterobacter* sp e *Achromobacter* sp nas amostras bucais. Nas amostras de vias aéreas identificou-se *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Pseudomonas* sp e *Shigella* sp. Nas amostras intestinais foram isoladas *E. coli*, *Edwardsiella tarda*, *Salmonella* sp, *Pseudomonas* sp, *A. salmonicida* e *A. hydrophila*. Nas coletas cloacais verificou-se *Salmonella* sp, *E. tarda* e *Citrobacter freundii*. Estes resultados revelam que há predominância de bactérias Gram-positivas na microbiota bucal e de vias aéreas e de bactérias Gram-negativas na cloacal e fecal.

UNITERMOS: Serpente, *Bothrops* sp, microbiota aeróbica.

* Trabalho apresentado na 39ª Reunião Anual da SBPC, 1987, Brasília, D.F.

** Seção de Febre Aftosa, Instituto Biológico, CP 7119 — CEP 01064-970

*** Seção de Bacteriologia Animal, Instituto Biológico

Recebido para publicação em 13.11.92 e aceito em 22.07.93.

INTRODUÇÃO

O tratamento dos acidentes ofídicos só atinge seus objetivos quando se lança mão de soros antiofídicos específicos. A produção destes, porém, está ligada, entre outros fatores, à qualidade e quantidade de venenos disponíveis para tal fim.

Os venenos são obtidos por extrações periódicas de serpentes mantidas em cativeiro, cujas condições de manutenção devem se aproximar às naturais de vida livre. A primeira extração de veneno deve ser feita somente quando o animal já estiver adaptado, caso contrário, devido à influência de diversos fatores, haverá a queda de resistência orgânica, que irá favorecer a instalação de várias doenças, entre elas os processos bacterianos, podendo com isto alterar a produção de venenos^{2,9,13,14,20}.

Estudos da microbiota fecal^{3,17}, oral de venenos extraídos^{3,4,6,7,10,12,19,21} e vias aéreas superiores⁸ de várias espécies de serpentes demonstram que grande parte dos agentes bacterianos responsáveis por infecções em répteis comportam-se como oportunistas^{3,8}, além de constatar que estes, na natureza, se apresentam como reservatórios de zoonoses^{1,15,16}.

O presente trabalho objetiva contribuir para o conhecimento da microbiota aeróbica de serpentes do gênero *Bothrops*, do nosso meio, recém-capturadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudadas, escolhendo-se, ao acaso, doze serpentes do gênero *Bothrops*, recém-capturadas, que chegaram em um mesmo lote para permanecerem em cativeiro. Todos os espécimes apresentavam-se aparentemente saudáveis, e o grupo foi assim constituído: duas *B. alternatus*; uma *B. cotiara*; quatro *B. jaracara*; uma *B. jararacussu*; três *B. moojeni* e uma *B. neuwiedi*.

Os animais eram imobilizados manualmente e com auxílio de zaragatoas esterilizadas era coletado material da cavidade bucal e mantido em meio conservador. O conteúdo cloacal era obtido através de massagens na região ventral correspondente ao terço final do intestino, enquanto que fragmentos de pulmão, incluindo partes de brônquios e traquéia e porções da alça intestinal eram obtidos após o sacrifício dos animais.

Os conteúdos cloacais e os fragmentos de órgãos eram acondicionados individualmente em frascos esterilizados. Todos os materiais eram processados logo após a coleta, semeando-se os de origem bucal e das vias respiratórias, em caldo simples, ágar sangue e ágar Mac Conkey, os conteúdos cloacal e intestinal em caldo simples e caldo tetratônico, sendo todos eles incubados aerobicamente a 37°C por 24 a 48 horas. Os caldos simples, com crescimento, eram repicados em ágar sangue e ágar Mac Conkey e os caldos tetratônico em ágar verde brilhante e incubados nas mesmas condições anteriores. Dos crescimentos em meios sólidos, colônias eram isoladas e identificadas de acordo com as características bacterioscópicas apresentadas na coloração de Gram e perfil bioquímico^{5,12}.

RESULTADOS

Os agentes bacterianos encontrados e suas freqüências, nos quatro tipos de materiais examinados, são vistos na Tabela 1.

DISCUSSÃO

O estudo da microbiota oral de serpentes apresenta, como é relatado, resultados variados e conflitantes^{3,4,6,7,10,12,19,21}. Estes dados são aparentemente desiguais por estarem sujeitos a uma gama muito grande de variáveis que podem interferir na flora bacteriana, tais como a espécie, o local geográfico de origem da serpente, seu estado de nutrição, tipo de alimento consumido e sua higidez, entre outros^{6,7,12,19,21}. Outra causa de variação provém das técnicas laboratoriais empregadas, que também contribuem para a variabilidade dos resultados^{8,12,19}, além do número de animais examinados⁸.

Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com os de outros autores onde é citada a predominância de bactérias Gram-negativas, como as *Pseudomonas* sp, *Enterobacter* sp e *Aeromonas* sp, sobre as Gram-positivas, na cavidade oral de animais clinicamente sadios, seja para serpentes cativeiras^{4,6,18}, seja para espécimes recém-capturadas^{12,19,21}. Outros estudos revelam a inversão destes dados, com maior ocorrência de cocos, seguida pelos difteróides^{3,4,7,10}.

Entre as bactérias Gram-negativas isoladas da cavidade bucal, algumas podem tornar-se agentes de conhecidas patologias de répteis, sendo apresentadas como agentes invasores oportunistas^{3,13}, situação particularmente válida para as *Pseudomonas* sp, que aparecem como únicos¹⁴, ou em associação com outros agentes causando infecções⁹. A ausência de *Aeromonas hydrophila* nos materiais de origem oral das serpentes estudadas, confirma o status deste microorganismo como agente de estomatite necrosante em animais mantidos em cativeiro¹⁸, ausência também observada por outros autores em trabalhos com serpentes recém-capturadas^{4,10,12,19}. Outras bactérias Gram-negativas isoladas destes materiais como *Escherichia coli*, *Edwardsiella tarda*, *Salmonella* sp, *Providencia* sp, são também relatadas em achados anteriores^{7,10,12,19}.

Com relação ao isolamento de bactérias Gram-positivas, o observado é coincidente com outras citações quanto a uma predominância de *Staphylococcus* sp coagulase negativa^{3,4,6,7,12,19,21}. Foi também verificada baixa freqüência de *Streptococcus* sp, o que se soma às observações de alguns autores^{3,6,19} em detrimento daquelas que apresentam os estreptococos como a espécie de maior freqüência de isolamento^{4,10,12}. Aspecto também comentado em outras referências^{3,6,7,21} é o isolamento de difteróides (*Corynebacterium* sp) e *Bacillus* sp.

A presença de levedura na cavidade bucal em serpentes brasileiras⁴ é relatada, e uma única vez, como *Monilia* sp⁴, sendo no presente trabalho identificada como *Candida* sp. Na literatura estrangeira não há citações sobre o isolamento deste agente.

As microbiotas de vias aéreas e oral apresentaram os mesmos agentes, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Bacillus* sp, entre os Gram-positivos e *E. coli*, *Pseudomonas* sp, *Shigella* sp, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio* sp e *Enterobacter* sp, para os Gram-negativos, e isto provavelmente tenha ocorrido por técnica de necrópsia que incluiu a retirada de brônquios e traquéia juntamente com os pulmões, achado este coincidente quanto à presença de estafilococcus coagulase negativa, *E. coli* e *Pseudomonas* sp em vias aéreas superiores⁸. Esta presença de mesmos agentes a nível de boca e de orofaringe (e não especificamente pulmonar) também é relatada^{7,19}. A presença bacteriana nas vias aéreas é quase uma constante em animais sadios⁸.

A flora cloacal foi motivo de estudos já relatados, estes, porém, não contemplam a flora intestinal, o que foi realizado no presente trabalho. A microbiota da cloaca, com a predominância de bactérias Gram-negativas é fato também já observado^{3,17}.

TABELA 1

Agentes aeróbios e suas freqüências em quatro materiais oriundos de serpentes do gênero *Bothrops*, São Paulo, 1986.

Materiais	O	C	A	I	Total
Bactérias					
Gram-positivas					
<i>Staphylococcus</i> (c. neg.)	4	—	5	4	13
<i>Corynebacterium</i> sp	3	—	—	—	3
<i>Bacillus</i> sp	1	—	1	—	2
<i>Streptococcus</i> sp	2	—	—	—	2
Gram-negativas					
<i>Escherichia coli</i>	1	1	6	8	16
<i>Edwardsiella tarda</i>	1	3	—	8	12
<i>Salmonella</i> sp	1	6	—	5	12
<i>Aeromonas salmonicida</i>	3	1	1	5	10
<i>Aeromonas hydrophila</i>	—	1	2	4	7
<i>Citrobacter freundii</i>	—	2	2	3	7
<i>Pseudomonas</i> sp	2	1	3	1	7
<i>Shigella</i> sp	1	—	3	2	6
<i>Vibrio</i> sp	2	—	1	3	6
<i>Enterobacter</i> sp	2	—	1	1	4
<i>Providencia stuartii</i>	1	—	—	3	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	—	—	3	4
<i>Klebsiella</i> sp	—	—	2	1	3
<i>Achromobacter</i> sp	2	—	—	—	2
<i>Proteus mirabilis</i>	—	—	1	1	2
<i>Acinetobacter</i> sp	—	—	—	1	1
<i>Pectobacterium</i> sp	—	1	—	—	1
<i>Proteus vulgaris</i>	—	—	—	1	1
<i>Providencia rettigeri</i>	—	—	—	1	1
<i>Pseudomonas diminuta</i>	—	—	—	1	1
<i>Pseudomonas putida</i>	—	—	—	1	1
Levedura					
<i>Candida</i> sp	1	—	—	—	1
Total	28	16	28	57	129

(—) não encontrado

O — oral

C — cloacal

A — vias aéreas

I — intestinal

A flora intestinal apresentou, como era esperado, uma alta variedade de agentes bacterianos Gram-negativos, com a grande maioria constituída por Enterobacteriaceae, como *E.coli*, *Edwardsiella tarda*, *Salmonella* sp, *Citrobacter* sp,^{3,17} entre outras, além de *Aeromonas* sp e *Pseudomonas* sp, situação já comentada em estudos de amostras de material cloacal³.

A presença de *Salmonella* sp nas amostras de cloaca e intestino evidencia, mais uma vez, a condição dos répteis se comportarem como reservatórios natu-

rais e veículos destes agentes para outras espécies animais, incluindo o homem^{1,15,16,17}. O grupo *Salmonella* é raramente incluído como flora normal em serpentes⁸, pois nem todos os animais apresentam coprocultura positiva, indicando, segundo MORENO e cols.¹⁶ não se tratar de flora constante. Fica difícil relacionar a presença de Enterobactérias em animais de sangue frio pelo fator restritivo de temperatura⁴, porém por sua ampla distribuição na natureza estas também podem ser encontradas em répteis¹².

Um baixo índice de isolamento de determinados agentes bacterianos deixa a impressão que existe discreta presença bacteriana em animais recém-capturados^{4,21}.

Novos estudos e monitoramento rotineiro se fazem necessários para que a microbiota deste grupo de ofídeos seja plenamente conhecida e para que se avalie as alterações da flora bucal, em suas variações regionais, nos animais de vida livre e sobretudo naqueles mantidos em cativeiro. Isto poderá auxiliar na obtenção de venenos de melhor qualidade e também nos tratamentos pós-accidentes ofídicos, pois geralmente os agentes presentes na flora bucal, encontrando condições para sua proliferação, são responsáveis por infecções bacterianas secundárias^{4,6,10,11,19}.

ABSTRACT: The research was a study of the oral, airways, intestinal and cloacal microbiota of twelve apparently healthy snakes of *Bothrops* genus. It was found coagulase negative *Staphylococcus*, *Corynebacterium* sp, *Aeromonas salmonicida*, *Streptococcus* sp, *Pseudomonas* sp, *Vibrio* sp, *Enterobacter* sp and *Achromobacter* sp in oral samples. *Escherichia coli*, coagulase negative *Staphylococcus*, *Pseudomonas* sp and *Shigella* sp in the airways. From intestines it was isolated: *E. coli*, *Edwardsiella tarda*, *Salmonella* sp, *Pseudomonas* sp, *A. salmonicida* and *A. hydrophila* and in cloacal samples *Salmonella* sp, *E. tarda* and *Citrobacter freundii*. These results show that the great quantity of Gram-positive bacteria is in the mouth and airways, and the Gram-negative ones are predominant in other materials.

KEYWORDS: Snake, *Bothrops* sp, aerobic microbiota.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHIODINI, R.J., SUNDBERG, J. Salmonellosis in reptiles: a review. *Am. J. Epidemiol.*, v. 113, p. 494-9, 1981.
2. COWAN, D.F. Disease of captive reptiles. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 153, p. 848-59, 1968.
3. DRAPER, C.S., WALKER, R.D., LAWLER, H.E. Patterns of oral bacterial infection in captive snakes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 179, p. 1223-6, 1981.
4. GARCIA-LIMA, E., LAURE, C.J. A study of bacterial contamination of rattlesnake venom. *Rev. Soc. Bras. Med. trop.*, v. 20, p. 19-21, 1987.
5. GLORIOSO, J.C., AMBORSKI, R.L., LARKIN, J.M., AMBORSKI, G.F., CULLEY, D.C. Laboratory identification of bacterial pathogens of aquatic animals. *Am. J. Vet. Res.*, v. 35, p. 447-50, 1974.
6. GOLDSTEIN, E.J.C., CITRON, D.M., GONZALEZ, H., RUSSEL, E., FINEGOLD, S.M. Bacteriology of rattlesnake venom and implications for therapy. *J. Infect. Dis.*, v. 140, p. 818-21, 1979.

MAVRIDIS, S.C. et al. Estudo da microbiota aeróbica de serpentes *Bothrops* sp. (Serpente, Viperidae), recém-capturadas. *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n.2, p. 59-64, 1993.

7. _____, AGYARE, E.O., VAGVOLGYI, A.E., HALPERN, M. Aerobic bacterial oral flora of garter snakes: development of normal flora and pathogenic potential for snakes and humans. *J. Clin. Microbiol.*, v. 13, p. 954-6, 1981.
8. HILF, M., WAGNER, R.A., YU, V.I. A prospective study of upper airway flora in healthy boid snakes and snakes with pneumonia. *J. Zoo Wildlife Med.*, v. 21, p. 318-25, 1990.
9. HIPÓLITO, M., MAVRIDIS, S.C., BALDASSI, L., MOULIN, A.A.P., BARBOSA, M.L. *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de caso de estomatite em *Bothrops alternatus* (Serpente, Viperidae). *Rev. Microbiol. São Paulo*, v. 18, p. 224-8, 1987.
10. JORGE, M.T., MENDONÇA, J.S., RIBEIRO, L.A., SILVA, M.L.R., KUSANO, E.J.U., SANTOS, C.L. Flora bacteriana da cavidade oral, presas e veneno de *Bothrops jararaca*: possível fonte de infecção no local da picada. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 32, p. 6-10, 1990.
11. _____, RIBEIRO, L.A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 36, p. 66-77, 1990.
12. LEDBETTER, E.O., KUTSCHER, A.E. The aerobic flora of rattlesnake fangs and venom. *Arch. Environ. Health*, v. 19, p. 770-8, 1969.
13. MARCUS, L.C. Infectious diseases of reptiles. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 159, p. 1626-31, 1971.
14. MAVRIDIS, S.C., BALDASSI, L., MOULIN, A. A. P., HIPÓLITO, M. *Pseudomonas aeruginosa* como agente causal de abscesso em serpentes (*Bothrops neuwiedi*). *Rev. Microbiol. São Paulo*, v. 17, p. 28-30, 1986.
15. MORENO, G., LOPES, C.A.M., BELLUOMINI, H.E., PESSOA, C.V.A., BIASI, P., ANDRADE, J.C.R. Enterobactérias isoladas de anfíbios e répteis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, v. 15 p. 122-6, 1973.
16. _____, _____, SADATSUNE, T., ANDRADE, J.C.R. Isolamento de *Arizona* a partir de animais de sangue frio. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, v. 40, p. 137-8, 1973.
17. MULLER, H.E. Über die aerobe fakalflora von Reptilien, insbesondere über die Enterobakterien von Schlangen. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. D Infektionskr. Hyg. Erste Abt. Orig. Reihe A Med. Mikrobiol. Parasitol.*, v. 222, p. 487-95, 1972.
18. PAGE, L.A. Experimental ulcerative stomatitis in King Snakes. *Cornell Vet.*, v. 51, p. 258-66, 1972.
19. THEAKSTON, R.D.G., PHILLIPS, R.E., LOOAREESUWAN, S., ECHEVERRIA, P., MAKIN, T., WARREL, D.A. Bacteriological studies of the venom and mouth cavities of wild Malayan pit vipers (*Colloselasma rhodostoma*) in southern Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 84, p. 875-9, 1990.
20. WALLACH, J.D. Medical care of reptiles. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 155, p. 1017-34, 1969.
21. WILLIAMS, E., FREEMAN, M., KENNEDY, E. The bacterial flora of the mouths of Australian venomous snakes in captivity. *Med. J. Australia*, v. 2, p. 190-3, 1934.

ACIDENTE POR *MICRURUS FRONTALIS*: PRIMEIRO RELATO DE ENVENENAMENTO ELAPÍDICO NO RIO GRANDE DO SUL.
Renato SELIGMAN

RESUMO: O presente artigo apresenta o primeiro relato de envenenamento elapídico no Rio Grande do Sul, Brasil. Trata-se da picada de uma serpente *Micrurus frontalis* em uma menina de 12 anos, a qual veio a apresentar sinais e sintomas locais e sistêmicos leves. Foram utilizados soro anti-elapídico e anti-colinesterásico. São sumarizadas algumas características deste tipo de acidente por serpentes brasileiras.

UNITERMOS: Acidente ofídico, Elapidae, *Micrurus*

INTRODUÇÃO

O acidente elapídico é pouco freqüente no Brasil, havendo raros relatos clínicos na literatura. As estatísticas apontam cerca de 1% destes acidentes dentre todos os casos de ofidismo no Brasil^{1,2,10}. Esse artigo é o primeiro relato de caso de envenenamento elapídico no Rio Grande do Sul.

CASO CLÍNICO

JS, 12 anos, sexo feminino, branca, solteira

Queixa principal: picada de cobra coral

HDA: Paciente foi picada no pé esquerdo por cobra identificada como coral quando caminhava em gramado roçado e limpo, no jardim de sua casa na praia de Arroio do Sal, litoral norte do Rio Grande do Sul, a uma quadra do mar, longe de rio ou

Médico do Setor de Clínica Médica do Hospital de Pronto-Socorro da Prefeitura Municipal de Porto Alegre.
Endereço para correspondência: Rua Cel. Lucas de Oliveira, 1831/503, Porto Alegre, RS-Brasil, CEP 90460-001
Recebido para publicação em 29.04.93 e aceito em 20.09.93

córrego. O acidente ocorreu às 17h40min do dia 17.01.93. A cobra ficou enrolada na perna da menina, mordendo seu pé por cerca de 3 minutos, quando seus familiares conseguiram afastá-la com um pau e capturá-la. Procurou atendimento no Posto de Saúde local e foi transferida para Tramandaí, município a cerca de 50 Km de distância. Durante o trajeto queixou-se de diplopia, tonturas, diminuição de sensibilidade no local da picada. Foi observada ptose palpebral bilateral. Em Tramandaí recebeu soro anti-elapídico 10 ampolas EV, prostigmine 4 ampolas e atropina, já tendo decorridos cerca de 90 minutos desde a picada. Após o soro apresentou reação urticariforme, tendo recebido hidrocortisona 1 g EV durante o transporte a Porto Alegre. Chegou ao Hospital de Pronto Socorro às 22h. Na admissão não apresentava ptose ou diplopia. Tinha eritema de membros inferiores, tremores, vômitos, Tax= 37,3°C, PA=110/70, FC=82, FR=22. Durante a internação o quadro clínico evoluiu bem, sem o reaparecimento de sinais ou sintomas neurológicos.

A serpente foi identificada como *Micrurus frontalis* pelas equipes do Centro de Informações Toxicológicas da Secretaria da Saúde e Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul e da Fundação Zoobotânica.

A paciente foi contactada 50 dias após o acidente. Referia dores epigástricas, náuseas e vômitos há cerca de 20 dias. O local da picada permanecia sem sensibilidade, mas os orifícios de inoculação cicatrizaram completamente.

CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *MICRURUS* E DA ESPÉCIE *M. FRONTALIS*

As serpentes do gênero *Micrurus*, pertencentes à família Elapidae, são encontradas nas três Américas. Podem habitar florestas ou matas densas. Seu comprimento varia de 700mm a 1,5m. A maioria das espécies possui um padrão de coloração com alguma combinação de anéis vermelhos, amarelos, brancos e pretos. A cabeça é arredondada. Os olhos são relativamente pequenos, com pupilas subcirculares. Não apresentam fosseta loreal. Têm boca pequena e os dentes inoculadores não são articulados.⁴. São classificadas como proteróglifas (presas que se situam anteriormente no maxilar superior, providas de sulco profundo por onde passa o veneno)⁷.

As corais são descritas como tendo hábitos predominantemente noturnos³. Vivem entocadas. Não são serpentes agressivas, só atacando quando há muito estímulo³.

A *M. frontalis* é simpátrica com a *M. corallinus* e a *M. decoratus*. Apresenta comprimento entre 700 a 900 mm em média, máximo de 1350 mm. É espécie tricolor com 5 a 19 tríades de anéis pretos no corpo e 1 a 1 e 2/3 tríades na cauda. A cabeça é predominantemente preta, com manchas, ou listras pálidas ou vermelhas⁴.

MECANISMO DE AÇÃO DO VENENO

A toxina elapídica é composta de polipeptídios básicos, de baixo peso molecular, destituídos de atividade enzimática, sendo absorvidos rapidamente quando inoculados. A composição varia entre as espécies. A toxicidade é exclusivamente periférica, produzindo bloqueio da transmissão neuromuscular. Provavelmente em virtude do seu baixo peso molecular, o surgimento da sintomatologia costuma ocorrer em minutos. Todas as serpentes elapídicas brasileiras apresentam neurotoxinas pós-sinápticas, as quais se ligam com grande afinidade aos sítios receptores de acetilcolina na placa motora terminal. A paralisia muscular é consequente à competição da toxina com o neurotransmissor pelo receptor

nicotínicos da placa terminal. A peçonha da *M. corallinus* apresenta também atividade pré-sináptica, sendo a exceção conhecida^{11,12,13}.

SINTOMATOLOGIA

Os efeitos costumam iniciar minutos após a picada, podendo levar algumas horas para o efeito máximo ser alcançado. No local da picada não é freqüente ocorrerem edema ou outros sinais inflamatórios, mas parestesia ou anestesia. O primeiro sintoma é a diplopia e o primeiro sinal a ptose palpebral. Esses são seguidos de paralisia da musculatura facial, dificuldade de acomodação visual, oculoplegia, anisocoria, disartria, disfagia, sialorréia e fraqueza muscular generalizada^{6,12}. Em envenenamentos severos, parada respiratória e morte podem ocorrer, a menos que o paciente seja ventilado artificialmente^{3,7}. Casos leves ou mesmo assintomáticos foram descritos⁹.

DISCUSSÃO

As serpentes da espécie *Micrurus frontalis* são encontradas habitualmente no Rio Grande do Sul^{3,4}. No entanto, até o presente não havia notificação de casos de envenenamento por picada de *Micrurus* de qualquer espécie nesse estado. Há relato de três acidentes em humanos ocorridos em Santa Catarina, estado vizinho⁵. De fato, os casos de acidentes elapídicos são pouco freqüentes no Brasil, especialmente se os números forem comparados aos dos acidentes botrópicos e crotálicos^{1,2,3,10}.

No caso aqui descrito a serpente foi molestada, houve a mordedura por um período suficiente para a inoculação do veneno, os orifícios de inoculação ficaram visíveis e a sintomatologia surgiu no tempo esperado. A ptose palpebral e a diplopia costumam ser descritas como as primeiras manifestações de neurotoxicidade sistêmica nestes acidentes^{6,12}. Nos casos leves a ptose pode ser um dos poucos sinais presentes⁹. A perda de sensibilidade no local da picada, apesar de esperada no início do quadro, surpreende por permanecer após 50 dias. Fato semelhante foi observado no envenenamento por *Crotalus durissus*⁸.

O desaparecimento precoce dos sintomas dificilmente pode ser atribuído ao antiveneno aplicado. Sabe-se que o veneno da *M. frontalis* tem ação exclusivamente pós-sináptica^{12,13}. Portanto, é possível que a pouca quantidade de veneno inoculado tenha perdido a competição pelos receptores da juncão neuromuscular devido ao anticolinesterásico.

Pode ser questionada a validade de aplicação do anticolinesterásico, uma vez que se apresentava um caso de acidente leve. De fato, este procedimento poderia ter sido reservado para uma possível deterioração da função respiratória. No entanto, a ausência de recursos para ventilação mecânica no local do atendimento inicial e o iminente transporte para Porto Alegre, a cerca de 120 Km de distância, talvez expliquem esta conduta.

ABSTRACT: The present article presents the first description of an elapidic envenomation in Rio Grande do Sul, Brasil. It describes the effects of a *Micrurus frontalis* bite in a 12 years old girl. She developed minor local and systemic signs and symptoms. Elapidic antivenin and anticholinesterasic were used. The author summarizes some features of this kind of accident caused by Brazilian snakes.

KEYWORDS: Snake bite, Elapidae, *Micrurus*.

SELIGMAN, R. Acidente por *Micrurus frontalis*: primeiro relato de envenenamento elapídico no Rio Grande do Sul. *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n. 2, p. 65-68, 1993

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SNABS. Acidentes ofídicos: contribuição ao estudo da morbidade. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, v. 2, n. 18, 1988.
2. _____ . Acidentes ofídicos: contribuição ao estudo da morbidade. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, v. 3, n. 30, 1989.
3. _____ *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos*. Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1991. 53p.
4. CAMPBELL, J. A., LAMAR, W. W. *Reptiles of Latin America*. Ithaca: Comstock, 1989. 425p.
5. COELHO, L. K., SILVA, E., ESPOSITO, C., ZANIN, M. Clinical features and treatment of Elapidae bites: report of three cases. *Hum. Exp. Toxicol.*, v. 11, p. 135-137, 1992.
6. FAN, H. W., FRANA, F. O. de S. Acidente elapídico. In: SCHVARTSMAN, S. *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1992. p. 167-170.
7. JORGE, M. T., RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, v. 36, p. 66-77, 1990.
8. JORGE, M. T., RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*). *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, v. 34, p. 347-354, 1992.
9. RIBEIRO, L. A., JORGE, M. T. Acidente por serpente do gênero *Micrurus* ("coral"). Análise de sete casos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 19, supl. p. 28, 1986.
10. RIBEIRO, L. A., PIRES DE CAMPOS, V. A. F., ALBUQUERQUE, M. de J., TAKAOKA, N. Y. Acidente ofídico no Estado de São Paulo. *Rev. Ass. Med. Brasil*, v. 39, p. 4-7, 1993.
11. VITAL BRAZIL, O., FONTANA, M. D. Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. *Mem. Inst. Butantan*, v. 47/48, p. 13-26, 1983/84.
12. _____ Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev. Ass. Méd. Brasil.*, v. 26, p. 212-218, 1980.
13. _____ FONTANA, M. D., PELLEGRINI Fº, A. Physiopathologie et thérapeutique de l'envenomation expérimentale causée par le venin de *Micrurus frontalis*. *Mem. Inst. Butantan*, v. 40/41, p. 221-240, 1976/77.

Mem. Inst. Butantan
v. 55, n. 2, p. 71-91, 1993.

**COLETÂNEA DE RESUMOS DE TRABALHOS
PUBLICADOS PELOS PESQUISADORES DO
INSTITUTO BUTANTAN (1992)**

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1992). *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n. 2, p. 71-91, 1993.

1. ALBAS, A., MOURÃO FUCHES, R. M., FRAZATTI GALLINA, N. M., MENDONÇA, R. M. Z., WOE FANG, F. L., GHIURO VALENTINI, E. J.

Termoestabilidade da vacina contra a raiva, tipo Fuenzalida & Palacios, uso humano.

Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, v. 34, n. 1, p. 27-31, 1992.

Abstract: Ten lots of Fuenzalida & Palacios type antirabies vaccine for human use, produced at the Instituto Butantan (São Paulo, Brazil) were stored at temperatures of 45, 37, 28 and 2-8°C. The potency of each lot was determined in samples taken at varied time intervals using the NIH method and lots presenting antigenic values $\geq 0,3$ were considered satisfactory for use. After 2 hours at 45°C the antigenic value of one out of 10 lots tested was found to be less than the minimum required value. At 37°C all lots maintained satisfactory antigenic values until the third day of storage, whilst at 28 and 2-8°C the potency was fully maintained, respectively for 10 and 360 days. At the ideal temperature of 2-8°C, 100% of the tested vaccines maintained the minimum required antigenicity for a longer period (16 months) than the expiry time of 6-12 months usually recommended for this type of biological produced in Latin American and Caribbean countries. Thus, the obtained data suggested that in countries still producing Fuenzalida & Palacios type vaccine, the expiry time could be extended to 16 months, what could prevent the unnecessary discarding of products still in useful condition.

Resumo: Dez lotes de vacina contra a Raiva, tipo Fuenzalida & Palacios, líquida, uso humano, produzidos no Instituto Butantan, foram estocados às temperaturas de 45, 37, 28 e 2-8°C. Amostras de cada lote, colhidas a intervalos de tempo que variavam com a temperatura de estocagem, tiveram sua potência (valor antigenico) determinada pelo método do NIH. Foram consideradas satisfatórias vacinas portadoras de um valor antigenico (VA) $\geq 0,3$. Foi verificado que apenas um dos lotes apresentou VA inferior ao mínimo requerido, após 2 h de exposição a 45°C. Todos os lotes mantiveram VA satisfatório até 3 dias de armazenamento de 37°C, enquanto que, a 28 e 2-8°C, o mesmo ocorreu com 10 e 360 dias, respectivamente. À temperatura ideal de armazenamento (2-8°C), 100% dos lotes retiveram a potência mínima por período de tempo mais longo (16 meses) do que o prazo de validade (12 meses), o que permite sugerir que a validade da vacina contra a Raiva, que nos países da América Latina e Caribe é de 6 a 12 meses, poderia ser ampliada para 16 meses, de modo a evitar o descarte do produto em condições de uso.

2. ASSAKURA, M. T., FURTADO, M. de F., MANDELBAUM, F. R.

Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers *Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*.

Comp. Biochem. Physiol., v. 102B, n. 4, p. 727-732, 1992.

Abstract: Venoms of *B. asper*, *B. atrox*, *B. marajoensis* and *B. moojeni* collected in different regions were analyzed by their enzymatic activity and polyacrylamide gel electrophoreses (acidic, basic and SDS). These species can be recognized and distinguished by their characteristic protein electrophoretic patterns. The venoms of *B. atrox* from different localities, although having similar protein electrophoretic distribution, display distinct proteinase patterns, indicating the presence of possible subspecies. By the composition of the venom, the snake *B. moojeni* must be classified as a species distinct from *B. atrox*. The *B. asper* venoms, from Atlantic and Pacific coasts, have not only different enzymatic activities but also different electrophoretic patterns. The classification of this species must be revised.

Resumo: Venenos de *B. asper*, *B. atrox*, *B. marajoensis* e *B. moojeni* foram coletados em diferentes regiões e analisadas suas atividades enzimáticas e seus perfis por eletroforeses em gel de poliacrilamida (ácida, básica e SDS). Essas espécies podem ser reconhecidas e diferenciadas por seus padrões eletroforéticos característicos. Os venenos de *B. atrox* de diferentes localidades, embora apresentando distribuição eletroforética de proteínas similar, mostram padrões de proteinases distintas, indicando a presença de possíveis subespécies. Pela composição do veneno, a serpente *B. moojeni* deve ser classificada como uma espécie distinta da *B. atrox*. Os venenos de *B. asper* das costas Atlântica e Pacífica, além das atividades enzimáticas distintas, possuem também perfis eletroforéticos diferentes. A classificação dessas espécies deve ser revista.

3. ASSAKURA, M. T., SALOMÃO, M. G., PUORTO, G., MANDELBAUM, F. R.

Hemorrhagic, fibrinogenolytic and edema-forming activities of the venom of the colubrid snake *Philodryas olfersii* (green snake).

Toxicon, v. 30, n. 4, p. 427-438, 1992.

Abstract: The venom of *P. olfersii* has high hemorrhagic, edema-inducing and fibrin(ogen)olytic activities. It is devoid of thrombin-like, procoagulant, phospholipase A₂ and platelet aggregating enzymes. The main activities are metalloproteinases inhibited by metal chelators (EDTA and 1,10-phenanthroline) and sulfhydryl compounds (DTT and cysteine). The hemorrhagic and fibrinogenolytic enzymes were partially purified by gel filtration on HPLC. The hemorrhagic activity of the venom was neutralized by commercial horse antivenoms to *Bothrops* species, as well as by rabbit antisera specific for hemorrhagic factors isolated from these *Bothrops* venoms. No immunoprecipitin reactions were obtained, indicating that the few epitopes of the *P. olfersii* hemorrhagin are involved in these neutralization reactions. The fibrinogenolytic enzyme cleaves A α -chain more quickly than the B- β -chain of human fibrinogen. The venom also solubilizes fibrin. This solubilization appears to occur from the hydrolysis of unpolymerized α -chain and cross-linked γ - γ dimer. The fibrin peptide products are distinct from those produced by plasmin.

Resumo: O veneno de *P. olfersii* possui altas atividades hemorrágica, edematogênica e fibrin(ogen)olítica. Ele não contém enzimas tipo trombina, procoagulante, fosfolipase A₂ e agregante de plaquetas. As principais atividades são metaloproteinases inibidas por metalo-complexantes (EDTA e 1,10-fenantrolina) e compostos sulfidrila (DTT e cisteína). As enzimas hemorrágica e fibrinogenolítica foram parcialmente purificadas por gel filtração em HPLC. A atividade hemorrágica do veneno foi neutralizada pelos antivenenos comerciais de cavalo para as espécies *Bothrops*, assim como pelo anti-soro específico de coelho para fatores hemorrágicos isolados desses

venenos de *Bothrops*. Não foram obtidas reações de imunoprecipitação, indicando que os poucos epitópos da hemorragina de *P. olfersii* estão envolvidos nas reações de neutralização. A enzima fibrinogenolítica corta a cadeia A α do fibrinogênio humano mais rapidamente que a cadeia B β . O veneno solubiliza também a fibrina. Esta solubilização parece ocorrer pela hidrólise da cadeia α não polimerizada e do dímero γ - γ . Os peptídeos produzidos da fibrina são distintos daqueles produzidos pela plasmina.

4. BARBARO, K. C., CARDOSO, J. L. C., EICKSTEDT, V. R. D. von, MOTA, I.
Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom.
Toxicon, v. 30, n. 3, p. 331-338, 1992.

Abstract: *Loxosceles gaucho* spider venom causes a typical dermonecrotic lesion in bitten patients and rarely causes lethal systemic effects. Gel filtration on Sephadex G 100 of *L. gaucho* spider venom resulted in three fractions: fraction A, containing the higher mol. wt components (approximately 35,000); fraction B, containing lower mol. wt components (approximately 15,000); and fraction C, containing very low mol. wt components (probably small peptides). The dermonecrotic and lethal activities were detected exclusively in fraction A. The venom and fraction A produced large dermonecrotic lesions in rabbits with necrosis spreading by gravity to the skin of the lateral body wall. Analysis by SDS-PAGE showed that the proteins contained in fraction A are approximately 35,000 and 33,000 mol. wt. Immunoblotting analysis showed that the proteins responsible for the dermonecrotic and lethal activity are very immunogenic and the first to be detected by antibodies during the course of immunization.

Resumo: O veneno da *Loxosceles gaucho* causa uma típica lesão dermonecrótica nos pacientes picados só raramente causando efeitos sistêmicos letais. Filtração em gel de Sephadex G 100 do veneno da *L. gaucho*, resultou em três frações: fração A contendo componentes de peso molecular elevado (aproximadamente 35.000); fração B, contendo componentes de peso molecular menor (aproximadamente 15.000) e fração C, contendo componente de peso molecular muito baixo (provavelmente pequenos peptídeos). As atividades dermonecrótica e letal foram detectadas exclusivamente na fração A. O veneno e a fração A produziram grandes lesões dermonecróticas em coelhos com a necrose espalhando-se por gravidade para a pele da parede lateral do corpo. Análise por SDS-PAGE, mostrou que as proteínas contidas na fração A têm aproximadamente entre 35.000 e 33.000 de peso molecular. Análise por immunoblotting, mostrou que as proteínas responsáveis pelas atividades dermonecrótica e letal são muito imunogênicas sendo as primeiras a serem detectadas pelos anticorpos no curso da imunização.

5. BARBARO, K.C., CARDOSO, J.L.C., EICKSTEDT, V.R. D. von, MOTA, I.
Short communications IgG antibodies to *Loxosceles* sp. spider venom in human envenoming.
Toxicon, v.30, n.9, p.1117-1121, 1992.

Abstract: The presence and specificity of IgG antibodies produced by patients with loxoscelism were studied. The loxoscelism diagnosis was supported mainly by clinical parameters. A search for IgG antibodies anti *Loxosceles gaucho* venom in patients with loxoscelism submitted to serumtherapy showed antibodies in four out of 20 patients. The IgG antibodies were detected as early as 9 days and as late as 120 days after bite. The highest IgG antibody titer was 1:640 and the lowest was 1:80. Immunoblotting tests showed that human anti-*L. gaucho* IgG antibodies recognize preferentially the components responsible for the dermonecrotic and lethal activities of the venom. A comparison of the clinical picture, the level of serum IgG antibodies and the dose of antivenom administered suggest that there is no relationship between these parameters.

Resumo: Estudou-se a presença e a especificidade de anticorpos IgG produzidos por pacientes com Loxoscelismo. O diagnóstico de loxoscelismo foi feito baseado em parâmetros clínicos. Uma pesquisa mostrou anticorpos IgG antiveneno de *L. gaucho* em 4 pacientes de um total de 20 pacientes examinados. Os anticorpos IgG foram detectados tão cedo quanto 9 dias e tão tarde quanto 120 dias após a picada. O título (ELISA) mais elevado foi de 1:640 e o mais baixo de 1:80. O immunoblotting mostrou que os anticorpos IgG antiveneno reconhecem preferencialmente os componentes responsáveis pelas atividades dermonecróticas e letal. Uma comparação do quadro clínico, do nível de anticorpos IgG e da dose de anti-soro administrado sugere que não parece haver relação entre estes parâmetros.

6. BRENO, M.C., PICARELLI, Z.P.
The vasopressor action of angiotensin in the snake *Bothrops jararaca*.
Com. Biochem. Physiol., v.101A, n.4, p. 819-825, 1992.

Abstract: Carotid blood pressure from anesthetized *B. jararaca* snakes was recorded in order to study antiotensin action in this reptile. Whereas [Asn¹, Val⁵] All and AlII were less potent than [Asp¹, Ile⁵] All and [Asp¹, Val⁵] All, [Sar¹, Ile⁵] All was slightly more potent. Captopril abolished the responses to AI (0.01-3 μ g/kg). [Sar¹, Ala⁸] All was ineffective but [Sar¹, Leu⁸] All or phenoxybenzamine were able to reduce All vasopressor responses. These results led to the conclusion that the vasopressor response of All in *B. jararaca* is due to an interaction with its own receptor but, part of the All receptor population seems to be coupled to the sympatho-adrenal system. Moreover, structural requirements seem to be necessary for the All response in *B. jararaca*.

Resumo: O registro da pressão arterial carotídea de serpentes *Bothrops jararaca* anestesiadas foi obtido, para estudar a ação de angiotensina neste réptil. Enquanto [Asn¹, Val⁵] All e AlII foram menos potentes do que [Asp¹, Ile⁵] All e [Asp¹, Val⁵] All, [Sar¹, Ile⁵] All foi ligeiramente mais potente. Captopril aboliu as respostas de AI (0,01 - 3 μ g/Kg) [Sar¹, Ala⁸] All não foi ativa mas [Sar¹, Leu⁸] All ou fenoxibenzamina foram capazes de reduzir a resposta vasopressora de All. Esses resultados levam a concluir que a resposta vasopressora de All na *B. jararaca* é devida a interação com seu próprio receptor mas, parte desta população de receptores parece estar ligada ao sistema simpato-adrenal. Além disso, alguns requisitos estruturais parecem ser necessários para a resposta de All na *B. jararaca*.

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1992). *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n. 2, p. 71-91, 1993.

7. CARNEIRO, S.M., TANAKA, H., KISIELIUS, J.J., SESSO, A.

Occurrence of retrovirus-like particles in various cellular and intercellular compartments of the venom glands from *Bothrops jararacussu*.

Res. Vet. Sci., v.53, p.399-401, 1992.

Abstract: Retrovirus-like particles were detected in venom glands from *Bothrops jararacussu* during electron microscopy. Type C-like particles were found inter-and intracellularly in gland and vessel lumina and scattered in the connective tissue. They were about 100 nm in diameter, with an electron dense core and bilaminar external membrane. Shapes suggestive of a budding process from the plasma membrane were also observed. Less frequently, type A-like particles, about 80 nm diameter with an electronlucent core, appeared in association with the membranes of the endoplasmic reticulum of the secretory cells.

Resumo: Partículas semelhantes a retrovírus foram detectadas em glândulas de veneno de *B. jararacussu*, ao microscópio eletrônico. As partículas semelhantes ao tipo-C foram observadas inter e intracelularmente, nas luzes da glândula e de vasos sanguíneos e dispersas no tecido conjuntivo. Apresentavam 100 nm de diâmetro, nucleóide eletrodenso e membrana externa bilaminar. Observaram-se também partículas em brotamento a partir do plasmalema. Partículas tipo-A, com 80nm de diâmetro, nucleóide elétron transparente foram vistas em associação com membranas do retículo endoplasmático de células secretoras.

8. COSTA ROSA, L.F.B.P., CURY, Y., CURI, R.

Effects of insulin, glucocorticoids and thyroid hormones on the activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, the pentose-phosphate pathway and the krebs cycle in rat macrophages.

J. Endocrinol., v.135, p.213-219, 1992.

Abstract: In the present study the effects of insulin, glucocorticoids and thyroid hormones on macrophage metabolism and function were investigated. The maximum activities of hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutaminase and citrate synthase were determined in macrophages obtained from hormone-treated rats and those cultured for a period of 48 h in the presence of hormones. Macrophage phagocytosis was markedly inhibited by dexamethasone and thyroid hormones, remaining unchanged when insulin was added to the culture medium, however. The changes in the enzyme activities caused by hormone treatments of the rats were very similar to those found in culture. Insulin enhanced citrate synthase and hexokinase activities and diminished those of glutaminase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Dexamethasone had a similar effect except on glucose-6-phosphate dehydrogenase. The addition of thyroid hormones to the culture medium raised the activities of glutaminase and hexokinase and reduced that of citrate synthase. The results presented support the suggestion that the effects of insulin, glucocorticoids and thyroid hormones of immune and inflammatory responses could well be mediated through changes in macrophage metabolism.

Resumo: Efeito da insulina, dos glicocorticoides e dos hormônios tireoidianos na atividade de enzimas-chaves da glicólise, glutaminolise, via das pentoses e ciclo de Krebs de macrófagos de ratos. No presente trabalho, investigou-se a influência da insulina, dos glicocorticoides e dos hormônios tireoidianos sobre o metabolismo e a função de macrófagos. A atividade máxima das enzimas hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase, glutaminase e citrato-sintase foi determinada em macrófagos obtidos de ratos submetidos a disfunções hormonais ou em células cultivadas, durante 48 horas, na presença de hormônios. Dexamestasona e hormônios tireoidianos inibiram marcadamente a capacidade de fagocitose destes macrófagos. A insulina aumentou as atividades da hexoquinase e da citrato sintase e diminuiu a da glutaminase e da glicose-6-fosfato desidrogenase. Dexamestasona, com exceção da glicose-6-fosfato desidrogenase induziu alterações das atividades enzimáticas, de maneira análoga à insulina. Estas alterações foram semelhantes às observadas quando os macrófagos eram cultivados com estes hormônios. A adição de hormônios tireoidianos ao meio de cultura das células aumentou as atividades da glutaminase e hexoquinase, e reduziu a da citrato sintase. Estes resultados sugerem que os efeitos da insulina, dos glicocorticoides e dos hormônios tireoidianos na resposta inflamatória e imunológica podem ser decorrentes de alterações no metabolismo de macrófagos.

9. COSTA ROSA, L. F. B. P., SAFI, D. A., CURY, Y., CURI, R.

Effect of epinephrine on glucose metabolism and hydrogen peroxide content in incubated rat macrophages.

Biochem. Pharmacol., v. 44, n. 11, p. 2235-2241, 1992.

Abstract: The effects of epinephrine on glucose metabolism and hydrogen peroxide content were examined in incubated rat macrophages. An increase in the activities of hexokinase and citrate synthase and a reduction in that of glucose-6-phosphate dehydrogenase was found in resident, inflammatory and activated macrophages incubated for 1 hr in the presence of epinephrine. Glucose utilization by incubated resident, inflammatory and activated macrophages was augmented markedly by the addition of epinephrine, whereas lactate formation was depressed. Under the same conditions, there was a 2.6-fold increment of hydrogen peroxide content and of [^{14}C] glucose decarboxylation in activated macrophages incubated for 40 min. Similar results were obtained when pyruvate and oxoglutarate was substituted for glucose. These findings suggest that epinephrine may increase hydrogen peroxide production in activated macrophages possibly through a mitochondrial mechanism other than the pentose-phosphate pathway. Between 40 and 90 min of incubation, the content of hydrogen peroxide decreased markedly, and there was no detectable glucose utilization in the presence of epinephrine. These observations are consistent with the idea that this catecholamine stimulates both hydrogen peroxide production and metabolism, the first process being dependent on mitochondrial fuels.

Resumo: Efeito da adrenalina no metabolismo de glicose e no conteúdo de peróxido de hidrogênio de macrófagos incubados de ratos. Macrófagos residentes, inflamatórios e ativados, incubados durante 1 hora na presença de adrenalina, apresentaram um aumento na atividade das enzimas hexoquinase e citrato sintase e diminuição da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase. A adrenalina incrementou também a utilização de glicose e reduziu a formação de lactato por estas células. Em algumas condições, ocorreu aumento (2,6 vezes) do conteúdo de peróxido de hidrogênio e da taxa de descarboxilação da [^{14}C] glicose nos macrófagos ativados.

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1992). *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n. 2, p. 71-91, 1993.

Resultados semelhantes foram obtidos após a substituição de piruvato e oxoglutarato por glicose. Estes dados sugerem que a adrenalina aumenta a produção de peróxido de hidrogênio em macrófagos ativados, possivelmente por um mecanismo mitocondrial. Entre 40 e 90 minutos de incubação, há uma queda do conteúdo de H₂O₂ e da utilização de glicose. Estas observações sugerem que a adrenalina estimula tanto a síntese como o metabolismo de peróxido de hidrogênio.

10. DAMY, S. B., VASSÃO, R. C., LUCCHIARI, M. A., PEREIRA, C. A., SANT'ANNA, O. A.
A comparative study of resistance to MHV3 infection in genetically homogeneous and heterogeneous mouse populations.
Brazilian J. Med. Biol. Res., v. 25, p. 1025-1027, 1992.

Abstract: Resistance to MHV3 infection was investigated in genetically homogeneous inbred (A/J, BALB/c) and genetically selected (High, Low) mouse lines. The A/J and L lines are resistant and the BALB/c and H mice are susceptible. The genetic analysis was performed on the F₁ hybrids, as well as on the genetically heterogeneous F₂ populations and backcrosses bred from HxL and A/JxBALB/c lines. The mortality rates of the F₁ hybrids showed codominance of susceptibility and resistance characters. The results indicate that the same MHV3 susceptibility genes are present in isogenic and selected lines and corroborate previous results showing that at least two major genes are involved in the control of this response.

Resumo: Resistência à infecção por MHV3 foi analisada em linhagens de camundongos isogênicos (A/J, BALB/c) e linhagens selecionadas geneticamente (HIII, LIII). As linhagens A/J e LIII se mostraram resistentes e as linhagens BALB/c e HIII suscetíveis. A análise genética foi realizada nos híbridos F₁, segregantes F₂ e retrocruzados das linhagens HIII x LIII e A/J x BALB/c. As taxas de mortalidade dos híbridos F₁ mostraram codominância dos caracteres resistência/susceptibilidade. Os resultados indicaram que os mesmos genes de susceptibilidade ao MHV3 estão presentes nas linhagens isogênicas e selecionadas e corroboram resultados prévios, mostrando que pelo menos 2 genes estão envolvidos no controle desta resposta.

11. DORCE, V. A. C., PALERMO-NETO, J.
Lithium effects on estrogen-induced dopaminergic supersensitivity in rats.
Brain. res. Bul., v. 29, p. 239-241, 1992.

Abstract: The effect of lithium (2.0 mEq/kg, IP) on dopaminergic supersensitivity induced by long-term estrogen treatment (0.25 mg/day, SC) was investigated. Ovariectomized rats were treated for 28 days with estrogen and/or lithium and 6 days after the last administration all animals were observed for apomorphine-induced stereotyped behavior (1.0 mg/kg, SC). The abrupt withdrawal from long-term estrogen treatment increased rats sensitivity to apomorphine but lithium administration was able to prevent this increase. Lithium alone produced no effect on stereotyped behavior. It was suggested that lithium may antagonize the estrogen effect on the nigrostriatal dopamine system.

Resumo: Foi estudado o efeito do lítio (2mEq/Kg, IP) sobre a supersensibilidade dopaminérgica induzida pelo tratamento prolongado com estrógeno (0,25mg/dia, SC). Ratas castradas foram tratadas por 28 dias com estrógeno e/ou lítio e 6 dias após a última administração todos os animais foram observados quanto ao comportamento estereotipado induzido pela apomorfina (1.0mg/Kg, SC). A retirada abrupta do tratamento prolongado com estrógeno aumentou a sensibilidade dos ratos à apomorfina mas a administração do lítio previu este aumento. O lítio isoladamente não produziu efeito sobre o comportamento estereotipado. Foi sugerido que o lítio pode antagonizar o efeito do estrógeno sobre o sistema dopaminérgico nigroestriatal.

12. DORCE, V. A. C., SANDOVAL, M. R. L.
Brazilian scorpion venom: pharmacological aspects.
Ciênc. Cult., v. 44, n. 2/3, p. 187-191, 1992.

Abstract: This review focuses on clinical, epidemiological and therapeutic aspects of envenomation caused by scorpions in Brazil. In addition, it presents studies with the crude venom and neurotoxins isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Such studies show the pharmacological effects of the venom and isolated toxins in experiments that use the scorpion venom and neurotoxins as neurobiological tools to study receptor sites in sodium channels and neurotransmitter release.

Resumo: A presente revisão aborda inicialmente aspectos clínicos, epidemiológicos e terapêuticos do envenenamento causado por escorpiões no Brasil. Em seguida, mostra estudos feitos com o veneno bruto como neurotoxinas isoladas do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*. São abordadas pesquisas mostrando os efeitos farmacológicos do veneno e experimentos que utilizam o veneno escorpiônico e suas frações isoladas como ferramenta neurobiológica para estudar os sítios receptores de canais de sódio e liberação de neurotransmissores.

13. DOS-SANTOS, M.C., GONÇALVES, L.R.C., FORTES-DIAS, C.L., CURY, Y., GUTIÉRREZ, J.M., FURTADO, M. de F.
A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*.
Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 34, n. 2, p.77-83, 1992.

Resumo: A mionecrose é um dos efeitos causados pelo veneno de *Bothrops jararacussu*. Uma miotoxina com homologia estrutural à fosfolipase A₂ (PLA₂), mas sem atividade enzimática, foi isolada desse veneno. O veneno de *Crotalus durissus terrificus* apresenta também atividade miotóxica, que vem sendo atribuída à crotoxina e à PLA₂ (crotoxina B), o componente básico do complexo crotoxina. O veneno de *Bothrops jararacussu* apresenta três proteínas, que têm identidade imunológica com a PLA₂ da crotoxina. O presente trabalho comparou a eficiência dos antivenenos polivalentes comerciais produzidos pelo Instituto Butantan — o antiveneno botrópico (AB) e o antiveneno botrópico-crotálico (AB/C), na neutralização das atividades letal, hemorrágica, coagulante e miotóxica do veneno de *B. jararacussu*. Os dois antivenenos neutralizaram de maneira semelhante

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1992). *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n. 2, p. 71-91, 1993.

a atividade hemorrágica, mas o AB/C foi três vezes mais potente que o AB em neutralizar a ação miotóxica e duas vezes mais potente na neutralização da letalidade e na ação coagulante do veneno de *B. jararacussu*. Os dados sugerem que a utilização do AB/C pode ser vantajosa no tratamento de pacientes picados por serpentes dessa espécie.

Abstract: The efficacy of the Bothropic/Crotalic antivenom on the neutralization of the main *Bothrops jararacussu* venom activities. Myonecrosis is one of the effects of *Bothrops jararacussu* venom, from which a myotoxin was isolated showing structural homology to phospholipase A₂ (PLA₂), but without enzymatic activity. Such myotoxic activity is also present in the *Crotalus durissus terrificus* venom, and is attributed to crotinin and to PLA₂ (crotinin B), the basic component of the crotinin complex. The *Bothrops jararacussu* venom showed three proteins with immunologic identity to PLA₂ from crotinin. The bothropic (AB) and the bothropic/crotalic (AB/C) antivenoms, two commercial polyvalent antivenoms produced at Instituto Butantan, were compared in order to assess their capacity for neutralization of the lethal, hemorrhagic, coagulant and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. Both antivenoms showed the same level of hemorrhagic activity neutralization. However, AB/C was about three times more efficient than AB in neutralizing the myotoxic activity, and two times more potent for neutralization of lethality and coagulant activity of *Bothrops jararacussu* venom. These data suggest that the use of AB/C could be of value in the treatment of patients bitten by snakes of this species.

14. FERREIRA, L.A.F., HENRIQUES, O.B.

Isolation of a bradykinin-potentiating factor from scorpion *Tityus serrulatus* venom.

Recent Prog. Kinins, v. 38, n. 1, p. 462-468, 1992.

Abstract: A bradykinin-potentiating factor was isolated and characterized from the scorpion *Tityus serrulatus* venom by chromatographic techniques and reverse phase followed by biological assays. This factor showed to be able to potentiate the contractile activity of the isolated guinea-pig ileum, inhibited the angiotensin-converting enzyme and potentiated the bradykinin-induced lowering of the arterial blood pressure in the rat.

Resumo: Um fator potenciador de bradicinina foi isolado e caracterizado do veneno de escorpião *Tityus serrulatus* por técnicas cromatográficas e fase reversa seguida por ensaios biológicos. Este fator mostrou ser capaz de potenciar a atividade contrátil do íleo isolado de cobaia, inibiu a enzima-conversora de angiotensina e potenciou o efeito da bradicinina no abaixamento da pressão arterial de rato.

15. FERREIRA, L.A.F., HENRIQUES, O.B., LEBRUN, I., BATISTA, M.B.C., PREZOTO, B.C., ANDREONI, A.S.S., ZELNIK, R., HABERMEHL, G.

A new bradykinin-potentiating peptide (peptide p) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (jararacuçu tapete, urutu dourado).

Toxicon, v. 30, n. 1, p. 33-40, 1992.

Abstract: Several bradykinin potentiators were identified in the venom of *Bothrops jararacussu* by chromatographic techniques and biological assays. One of them which was isolated inhibited the angiotensin-converting enzyme in vitro and potentiated the bradykinin-induced lowering of the arterial pressure in the rat.

Resumo: Vários potenciadores foram identificados no veneno de *Bothrops jararacussu* por técnicas cromatográficas e ensaios biológicos. Um deles foi isolado e inibiu a enzima-conversora de angiotensina in vitro e potenciou o efeito da bradicinina no abaixamento da pressão arterial de rato.

16. FERREIRA, L.A.F., HENRIQUES, O.B., LEBRUN, I., BATISTA, M.B.C., PREZOTO, B.C., ANDREONI, A.S.S., ZELNIK, R., HABERMEHL, G.

Biologically active peptides from *Bothrops jararacussu* venom.

Contrib. Autacoid Pharm., v. 36, p. 209-214, 1992.

Abstract: The venom of the Brazilian snake *Bothrops jararacussu*, was found to contain peptides capable of potentiating the smooth muscle contracting activity of bradykinin (BK). Chromatographic separation on Sephadex G-25 and Sephadex G-10, respectively, yielded an active peptide which at a concentration of 0.6 μg/ml doubled the effect of a single dose of BK on the isolated guinea-pig ileum. HPLC chromatography showed this material to contain one major and 4 minor components. The active peptide was 2-3 times more active than Captopril in the potentiation of the effects of BK on rat arterial blood pressure and on the isolated guinea pig ileum. It also showed marked capacity to inhibit angiotensin I — converting enzyme.

Resumo: O veneno da serpente brasileira, *Bothrops jararacussu*, contém peptídeos capazes de potenciar a atividade de bradicinina (BK) na contração da musculatura lisa. Separação cromatográfica em Sephadex G-25 e Sephadex G-10, separou um peptídeo, o qual com 600 ng/ml dobrou o efeito de uma única dose de bradicinina da contratura de íleo isolado de cobaia. Cromatografia em HPLC mostrou que no veneno contém um componente mais ativo e quatro componentes menos ativos. O componente mais ativo, foi 2-3 vezes mais potente do que o captoperil, na potenciação dos efeitos da bradicinina na pressão arterial de rato e no íleo isolado de cobaia. Este mostrou também grande capacidade para inibir a enzima-conversora de angiotensina.

17. FERREIRA, L.A.F., HENRIQUES, O.B., ANDREONI, A.S.S., VITAL, G.R.F., CAMPOS, M.M.C., HABERMEHL, G.G., MORAES, V.L.G. de.

Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae).

Toxicon, v. 30, n. 10, p. 1211-1218, 1992.

Abstract: A potent antivenom against snakebite was isolated from *Curcuma longa*, a plant commonly used in traditional Brazilian medicine. The fraction consisting of ar-turmerone neutralized both the hemorrhagic activity present in *Bothrops jararaca* venom, and the lethal effect of *Crotalus durissus terrificus* venom in mice. Immunological studies demonstrated that this fraction also inhibited the proliferation and the natural killer activity of human lymphocytes.

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1992). *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n. 2, p. 71-91, 1993.

Resumo: Um potente antiveneno contra picada de serpente foi isolado de *Curcuma longa*, uma planta comumente usada na medicina tradicional brasileira. A fração consiste de ar-turmerona a qual neutraliza a atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops jararaca* e o efeito letal do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em camundongo. Estudos imunológicos demonstraram que esta fração inibiu também a proliferação e a atividade de células NK "natural killer" de limfócitos humanos.

18. FERREIRA, M.L., MOURA-DA-SILVA, A.M., FRANÇA, F.O.S., CARDOSO, J.L., MOTA, I.
Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis.
Toxicon, v.30, n. 12, p.1603-1608, 1992.

Abstract: The comparison of seven toxic activities contained in venoms from nine different species of *Bothrops* and the correlation of each activity with lethality and necrosis was the subject of this study. The haemorrhagic, coagulant, necrotizing, myotoxic, proteolytic and phospholipase activities were not equally distributed among the venoms studied except for the oedema-inducing activity which was almost equally distributed among them. The correlation coefficient was estimated for each activity in relation to lethality and necrosis induced by the venom. Lethality was significantly related to haemorrhagic and oedema-inducing activities, whereas the necrotizing activity showed significant correlation with phospholipase and coagulant activities. Proteolytic activity presented a significant inverse correlation with lethality.

Resumo: A comparação de sete atividades tóxicas contidas no veneno de nove diferentes espécies de *Bothrops* e a correlação de cada atividade com a letalidade e a necrose, foi o assunto deste estudo. As atividades hemorrágica, coagulante, necrosante, miotóxica, proteolítica e fosfolipásica não estão distribuídas de modo igual nos venenos estudados, exceto a atividade edematogênica que está quase igualmente distribuída entre eles. O coeficiente de correlação foi calculado para cada atividade em relação à letalidade e à necrose induzidas pelo veneno. A letalidade estava significativamente relacionada com a atividade hemorrágica e edematogênica enquanto a atividade necrosante mostrava correlação positiva com as atividades fosfolipásica e coagulante. A atividade proteolítica apresentou uma correlação inversa com a letalidade.

19. FERREIRA, M.L., MOURA-DA-SILVA, A.M., MOTA, I.
Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom.
Toxicon, v.30, n.12, p.1591-1602, 1992.

Abstract: Antivenoms are the usual treatment in cases of systemic envenoming by *Bothrops* snakes. However, the neutralization of each venom component by the antivenom is not well established. *Bothrops jararaca* antivenom, produced in rabbits, recognizes the venoms of nine different *Bothrops* species with high ELISA antibody titres. Western blot analysis showed that almost all antigens present on both homologous and heterologous venoms are recognized. Neutralization tests were performed using whole antivenom or its IgG fraction. The antivenom was able to neutralize the haemorrhagic, coagulant and necrotizing activities of the heterologous venoms in the same antivenom/venom proportion as for the homologous venom. Myotoxic activity was only partially neutralized. Neutralization of the proteolytic activity of heterologous venoms required higher amounts of antivenom than for the homologous venom. Phospholipase and oedema-inducing activities were completely neutralized only in the homologous system.

Resumo: O tratamento comum nos casos de envenenamento por serpentes *Bothrops* é a soroterapia. Entretanto, a neutralização de cada componente do veneno pelo antiveneno não é bem conhecida. Antissoro anti-*B. jararaca* produzido em coelhos, reconhece o veneno de 9 espécies diferentes de *Bothrops* com alto título de anticorpos (ELISA). Análises por Western blotting mostraram que quase todos os抗ígenos presentes nos venenos homólogos e heterólogos são reconhecidos. Os testes de neutralização foram feitos usando-se o soro total ou sua fração IgG. O antissoro foi capaz de neutralizar as atividades hemorrágicas, coagulante e necrosante dos venenos heterólogos na mesma proporção antissoro/veneno do soro homólogo. A atividade miotóxica foi neutralizada parcialmente. A neutralização da atividade proteolítica dos venenos heterólogos requereu maiores quantidades de antissoro do que necessário para o veneno homólogo. As atividades fosfolipásica e edematogênica foram neutralizadas completamente apenas no sistema homólogo.

20. GERVITZ, R.K., BRANDI, C.M.W., MONTERO, S.H.C., PICARELLI, Z.P.
Active and inactive renin in the plasma of the snake *Bothrops jararaca*.
Comp. Biochem. Physiol., v.102A, n1, p.27-31, 1992.

Abstract: Complementing the work of Gervitz R. K., Hiraichi E., Fichman M. and Lavras A.A.C. *Comp. Biochem. Physiol.* 86A, 503-507 (1987), conditions have been established for measuring plasma renin activity (PRA) of the venomous snake *Bothrops jararaca* (Bj). It corresponds to 115.9 ± 11.5 ng equivalents of angiotensin II (All) per ml of plasma ($N = 13$). PRA did not increase when Bj plasma was submitted to acid-cryo-trypsin *Bitis arietans* venom activation of inactive renin. This may indicate either absence of inactive renin in this plasma or lack of its activation, due to the already demonstrated (Nahas L., Kamiguti A. S., Betti F., Martins I., S.S. and Rodrigues M. I., *Comp. Biochem. Physiol.* 69A, 739-743, 1981; Prezoto B. C. Hiraichi E., Abdalla F. M. F. and Picarelli Z. P., *Comp. Biochem. Physiol.* 99C, 135-139, 1991) absence of factor XII.

Resumo: Complementando o trabalho de Gervitz R.K., Hiraichi, E., Fichman, M. e Lavras A.A.C. *Comp. Biochem. Physiol.* 86A, 503-507, (1987), foram estabelecidas condições para medir atividade de renina plasmática (PRA) da serpente venenosa *Bothrops jararaca* (Bj). Essa atividade correspondeu a $115,9 \pm 11,5$ ng e equivalentes de angiotensina II (All) por ml de plasma ($N=13$). PRA não aumentou quando o plasma de Bj foi submetido a ativação por ácido, pelo frio, por tripsina e pelo veneno da *Bitis arietans*. Isso pode indicar a ausência de renina inativa no plasma ou a sua não-ativação devido à já demonstrada ausência de fator XII nesse plasma. (Nahas L., Kamiguti, A.S., Betti, F. Martins I.S.S. e Rodrigues M.I., *Comp. Biochem. Physiol.* 69A, 739-743, 1981; Prezoto B.C., Hiraichi. E., Abdalla F.M.F. e Picarelli Z.P., *Comp. Biochem. Physiol.* 99C: 135-139, 1991).

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1992). *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n. 2, p. 71-91, 1993.

21. HIRAICHI, E., SCHIRIPA, L. N., YAMANOUYE, N., ABDALLA, F. M. F., PICARELLI, Z. P.
Effect of chymotrypsin on rat blood pressure.
Gen. Pharmac., v. 23, n. 4, p. 595-599, 1992.

Abstract: Chymotrypsin (Cht) administration (14 mg/kg, i.v.) to rats always caused hypertension; hypotension preceded this effect in 64% of the observations ($n = 11$). A 68% reduction of circulating kininogen but not of angiotensinogen was observed after Cht administration. Cht effects were not affected by captopril, [Sar¹-Leu⁸]-angiotensin II and alpha-adrenoceptor antagonists. In 70% of the observations ($n = 10$) hypotension was abolished by a mixture of histamine H₁ and H₂-antagonists. Therefore histamine release may explain hypotension. Cht released *in vitro* from rat plasma, a substance producing hypertension in the rat and contraction of the guinea-pig ileum. Both effects were antagonized by [Sar¹-Leu⁸]-angiotensin II. In spite of this angiotensin release *in vitro*, the hypertensive component of the *in vivo* response to Cht seems to be due to some other substance.

Resumo: A administração de quimotripsina (Qt, 14mg/Kg i.v.) em ratos sempre provocou hipertensão: em 64% das observações ($n = 11$) este efeito foi precedido por hipotensão. Após a administração de Qt foi observada uma redução de 68% do cininogênio circulante, mas não do angiotensinogênio. Os efeitos da Qt não foram afetados por captopril, Sar¹-Leu⁸-angiotensina II e antagonistas de adrenoceptores alfa. Em 70% das observações ($n = 10$) a hipotensão foi abolida por uma mistura de antagonistas H₁ e H₂ da histamina. Desta forma, a liberação de histamina pode explicar a hipotensão. *In vitro* Qt liberou do plasma de rato, uma substância que produz hipertensão em ratos e contração do ileo de cobaia. Ambos os efeitos foram antagonizados por Sar¹-Leu⁸-angiotensina II. Apesar desta liberação de angiotensina *in vitro*, o componente hipertensor da resposta da Qt *in vivo* parece ser devido a alguma outra substância.

22. HO, P. L., RAW, I.
Cyclic AMP Potentiates bFGF-induced neurite outgrowth in PC12 Cells.
Journal Cell. Physiol., v. 150, p. 647-656, 1992.

Abstract: We report here that basic fibroblast growth factor (bFGF)-elicited neurite outgrowth in PC12 cells is potentiated by dibutyryl cyclic adenosine monophosphate (dbcAMP) or forskolin. This property was also described for nerve growth factor (NGF), suggesting that both NGF and bFGF may share common intracellular events leading to neurite outgrowth and synergism with dbcAMP and forskolin. The synergistic effect of dbcAMP and forskolin is specific, since treatment of PC12 cells with bFGF and dibutyryl cyclic guanosine monophosphate (dbcGMP) or phorbol ester did not change the neurite outgrowth response of cells treated with bFGF alone. Furthermore, neurite outgrowth depends on cellular adhesion. Increasing adhesion by plate treatment with poly-D-lysine increases the neurite outgrowth elicited by bFGF alone or bFGF plus dbcAMP. On the other hand, decreasing cellular adhesiveness by plating PC12 cells in semi-solid agarose renders the cells unable to develop neuritic processes. In addition, ³H-methylthymidine incorporation studies showed that bFGF-treated PC12 cells cease growth only when they become fully differentiated after 3-5 days of treatment. In contrast, dbcAMP, which is a poor differentiation factor, is able to block cellular growth after 24 hour treatment. These results suggest that when PC12 cells become differentiated, they stop growing. However, growth inhibition does not necessarily lead to differentiation.

Resumo: Mostramos neste trabalho que indução do crescimento de neuritos em células PC12 pelo fator de crescimento de fibroblasto de caráter básico (bFGF) é potencializado por monofosfato de adenosina cíclico dibutirato (dbcAMP) ou forskolina. Esta propriedade foi descrita também para o fator de crescimento de nervo (NGF), sugerindo que ambos os fatores devem desencadear eventos intracelulares comuns que levam ao crescimento de neuritos e sinergismo com dbcAMP ou forskolina. O efeito sinergístico do dbcAMP ou forskolina é específico, pois o tratamento das células PC12 com bFGF é monofosfato de guanosina cíclico dibutirato (dbcGMP) ou éster de forbol não modificou a resposta das células quando comparadas com aquelas tratadas apenas com o bFGF. Além disso, o crescimento de neuritos depende da adesão celular. O aumento da adesão celular tratando-se as placas com polid-lisina aumenta o crescimento de neuritos induzidos por bFGF e/ou dbcAMP. Por outro lado, diminuindo-se a adesão celular plaqueando-se as células em agarose semi-sólida impede o desenvolvimento dos processos neuríticos. Também mostramos através de experimentos de incorporação de ³H-metil-timidina que as células PC12 tratadas com bFGF param de crescer quando estão totalmente diferenciadas após 3-5 dias de tratamento. Contudo, dbcAMP, que é um fator neurotrófico fraco, é capaz de bloquear o crescimento celular após 24 horas de tratamento. Estes resultados sugerem que quando as células PC12 tornam-se diferenciadas, elas param de se dividir. Entretanto, a inibição da proliferação celular não necessariamente leva à diferenciação celular.

23. IBANEZ, O. M., STIFFEL, C., RIBEIRO, O. G., CABRERA, W. K., MASSA, S., FRANCO, M. de, SANT'ANNA, O. A., DECREUSEFOND, C., MOUTON, D., SIQUEIRA, M., BIOZZI, G.
Genetics of nonspecific immunity. I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness.
Eur. J. Immunol., v. 22, p. 2555-2563, 1992.

Abstract: The genetic regulation of acute inflammatory reaction (AIR) was studied by the method of bidirectional selective breeding, used to produce a line of mice giving the maximal and a line of mice giving the minimal inflammatory reaction (AIR max and AIR min, respectively). The AIR was triggered by subcutaneous injection of a neutral substrate (suspension of polyacrylamide microbeads), and measured by the leukocyte and serum protein accumulation in the exudate. The two parameters are positively correlated and present a normal frequency distribution. The highly genetically heterogeneous foundation population was produced by the equiposied intercrossing of eight inbred strains of mice, and selective breeding carried out by assortative matings of extreme phenotypes. The response to selection in 11 consecutive generations was highly asymmetrical: a marked AIR increase in the AIR max and no change in the AIR min line occurred. The mean value of realized heritability in the AIR max line was 0.26 and 0.18 for cell and protein concentrations, respectively. The response to selection must have resulted from the interaction of seven to nine independent gene loci endowed with additive

effects. The lack of response to selection of the AIR min line is discussed. The large inter-line difference opens new possibilities for studying the biochemistry and molecular genetics of inflammation, and also for investigating the beneficial or detrimental effect of inflammatory responses.

Resumo: A regulação genética da reação inflamatória aguda (AIR) foi estudada através da utilização do método de Seleção Genética Bidirecional para obtenção de linhagens de camundongos dotados de reatividade máxima (AIRmáx) ou mínima (AIRmín). A reação inflamatória local foi desencadeada por injeção subcutânea de um substrato neutro (suspensão de microesferas de poliacrilamida) e medida pela acumulação de leucócitos e proteínas séricas no exudato. Os dois parâmetros são correlacionados e apresentam freqüência normal de distribuição. A população original, dotada de grande heterogeneidade genética, foi obtida através de cruzamento balanceado de 8 linhagens isogênicas de camundongos e o processo seletivo realizado através de cruzamentos escolhidos entre os fenótipos extremos. A resposta à seleção em 11 gerações consecutivas foi altamente assimétrica: houve aumento marcante de reatividade na linhagem AIRmáx enquanto a intensidade de reação não se modificou em AIRmín. O valor médio da herdabilidade realizada na linhagem AIRmáx foi de 0,26 e de 0,18 para a concentração celular e protéica, respectivamente. A resposta à seleção deve ter resultado da interação de 7 a 9 locigênicos independentes dotados de efeito aditivo. A ausência da resposta à seleção da linhagem AIRmín é discutida. A grande diferença interlinhagens abre novas possibilidades para o estudo da bioquímica e da genética molecular da inflamação e também para investigação dos efeitos benéficos ou deletérios da resposta inflamatória.

24. JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A.

Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, v. 34, n. 4, p. 347-354, 1992.

Resumo: Foram estudados 249 casos de acidentes por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*) atendidos no HVB-IB, São Paulo, Brasil, de 1974 a 1990. Os acidentes foram mais comuns no período da tarde, nos meses de janeiro a abril e de outubro a dezembro. Dentre cem serpentes classificadas quanto à subespécie 99 eram *C. d. terrificus*. Pertenciam ao sexo masculino 80,7% dos pacientes. Os membros inferiores e superiores foram picados em, respectivamente, 66,4% e 29,2% dos casos. As manifestações clínicas mais freqüentes foram dor (61,0%) e edema (55,0%) no local da picada, ptose palpebral (75,9%), escurecimento da urina atribuível à mioglobinúria (38,6%) e myalgie (36,1%). Nove pacientes foram submetidos à diálise devido à insuficiência renal aguda (3,6%), três apresentaram insuficiência respiratória que motivou intubação e/ou traqueostomia e um apresentou acidente vascular cerebral isquêmico. A alteração da coagulação sanguínea ocorreu em 48,1% dos pacientes. Oito amostras de sangue colhidas horas após a picada mostraram leucocitose, sendo seis com desvio à esquerda e, nos dias subsequentes, tendência à normalização do número de leucócitos e aparecimento de eosinofilia. Atividade sérica da creatinoquinase apresentou-se aumentada em 20 dentre 21 pacientes, sendo maior no final das primeiras 24 horas após a picada, chegando a 2.377 vezes o valor de referência. A letalidade foi de 0,8%.

Abstract: Under study were two hundred and forty nine cases of accidents caused by South American rattlesnakes (*Crotalus durissus*) admitted to the Vital Brasil Hospital, São Paulo, Brasil, from 1974 to 1990. The accidents were more common in the afternoon, from January to April and from October to December. Ninety nine out of 100 snakes classified as subspecies were *C. d. terrificus*. Most of the patients were males (80.7%). The inferior and superior limbs were bitten in 66.4% and 29.2% of the cases, respectively. The more frequent clinical manifestations were pain (61.0%) and edema (55.0%) at side of the bite, palpebral ptosis (75.9%), darkening of the urine due to myoglobinuria (38.6%) and myalgia (36.1%). Nine (3.6%) out of 32 patients with acute renal failure were submitted to dialysis, three presented respiratory failure treated with intubation and/or tracheotomy and one presented an ischemic cerebral stroke. Alteration of the blood coagulation was present in 48.1% of the patients. The blood picture of some patients several hours after the accident showed leucocytosis with a left shift and a tendency to normal values with eosinophilia. Serum creatinekinase activity was increased in 20 of 21 patients, with higher values 24 hours after the bite reaching 2,377 times the reference value. Lethality was 0.8%.

25. KAMIGUTI, A.S., RUGMAN, F.P., THEAKSTON, R.D.G., FRANÇA, F.O.S., ISHII, H., HAY, C.R.M., BIASG. The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca* envenoming. *Thromb. Haemostasis*, v. 67, n. 4, p. 484-488, 1992.

Abstract: Thirty-eight patients bitten by *Bothrops jararaca* were investigated. Twenty-six had signs of local or systemic hemorrhage. Twenty-two of these had incoagulable blood, and these patients were found to have low fibrinogen levels (mean 0.17 ± 0.03 g/l), thrombocytopenia, very high thrombin-antithrombin III complex (850 ± 184 μ g/l) and D-dimer (170 ± 44 μ g/ml) antigen levels. Serum venom haemorrhagin levels were significantly higher in patients with clinical signs of hemorrhage (36.4 ± 6.4 ng/ml) than those without (11.7 ± 3.7 ng/ml; $p < 0.002$). Twelve out of 13 patients with thrombocytopenia were bleeding. High levels of thrombomodulin (22.3 ± 1.5 ng/ml) and haemorrhagin (35.7 ± 7.7 ng/ml) were detected in these 12 patients, suggesting vascular endothelial damage. Haemorrhagin levels also correlated inversely with platelet count in these patients. It was concluded the thrombocytopenia is one of the main causes of bleeding in *B. jararaca* victims, possibly as a result of venom haemorrhagin activity.

Resumo: Trinta e oito pacientes picados por *Bothrops jararaca* foram investigados sendo que 26 apresentaram sinais de hemorragia local ou sistêmica. Vinte e dois tiveram sangue incoagulável tendo estes pacientes níveis baixos de fibrinogênio (0.17 ± 0.03 g/l), trombocitopenia, e elevação acentuada dos níveis do complexo trombina-antitrombina III (850 ± 184 μ g/l) e do antígeno D-dímero (170 ± 44 μ g/ml). Níveis séricos de hemorragina foram显著mente maiores em pacientes com sinais clínicos de hemorragia (36.4 ± 6.4 ng/ml) quando comparados com aqueles sem sangramento (11.7 ± 3.7 ng/ml; $p < 0.002$). Doze dos 13 pacientes com trombocitopenia tiveram sangramento. Níveis altos de trombomodulina (22.3 ± 1.5 ng/ml) e hemorragina (35.7 ± 7.7 ng/ml) foram detectados nestes 12 indivíduos, sugerindo lesão do endotélio vascular. Os níveis de he-

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1992). *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n. 2, p. 71-91, 1993.

morragina tiveram, ainda, correlação inversa com a contagem de plaquetas nestes pacientes. Conclui-se que a trombocitopenia representa uma das principais causas de sangramento em picados por *B. jararaca* possivelmente como resultado da atividade da hemorragina.

26. LAING, G.D., THEAKSTON, R.D.G., LEITE, R.P., DIAS DA SILVA, W.D., WARRELL, D.A., BIASG. Comparison of the potency of three Brazilian *Bothrops* antivenoms using *in vivo* rodent and *in vitro* assays. *Toxicon*, v. 30, n.10, p. 1219-1225, 1992.

Abstract: Three Brazilian polyspecific *Bothrops* antivenoms were compared using standard W.H.O. rodent *in vivo* and *in vitro* assays of their ability to neutralize the principal venom activities of pooled whole *Bothrops jararaca* venom. On a volume basis, the antivenoms were equally effective in neutralizing lethal activity in mice, and there were only minor differences in their ability to neutralize venom-induced haemorrhage, necrosis and pro-coagulant activity. Antivenom efficacy in neutralizing defibrinogenation varied. However, when equal amounts of antivenom IgG were compared, it was found that the FUNED antivenom best neutralized lethality, haemorrhage, necrosis and fibrinogen clotting activity. Vital Brazil and FUNED antivenoms were equally effective in neutralizing plasma coagulant activity but Vital Brazil antivenom was the more effective in neutralizing defibrinogenation.

Resumo: Os três soros poliespecíficos produzidos no Brasil contra veneno de serpentes do gênero *Bothrops* foram comparados *in vivo*, utilizando-se metodologia padronizada pela OMS, e em ensaios *in vitro* quanto à capacidade de neutralização das principais atividades do veneno a partir de um pool de veneno total de *Bothrops jararaca*. Em um determinado volume, os antivenenos foram igualmente eficazes na neutralização da atividade letal em ratos, e houve apenas diferenças mínimas na capacidade de neutralizar a hemorragia, a necrose e a atividade procoagulante induzidas pelo veneno. A eficácia do antiveneno na neutralização da atividade desfibrinogenante variou. Entretanto, quando quantidades iguais de IgG no antiveneno foram comparadas, observou-se que o antiveneno FUNED neutralizou melhor a atividade letal, hemorrágica, necrotizante e coagulante. Os antivenenos FUNED e Vital Brazil foram igualmente eficazes na neutralização da atividade coagulante no plasma, porém o soro Vital Brazil foi mais efetivo em neutralizar a desfibrinogênio.

27. LUCCHIARI, M.A., MODOLELL, M., EICHMANN, K., PEREIRA, C.A. *In vivo* depletion of interferon-gamma leads to susceptibility of A/J mice to mouse hepatitis virus 3 infection. *Immunobiology*, v. 185, p. 475-482, 1992.

Abstract: The possible role of interferon-gamma (IFN- γ) in the resistance of A/J mice to MHV3 infection was investigated. Monoclonal antibodies specific for IFN- γ , CD4 and CD8 molecules were administered *in vivo* to deplete selectively the IFN- γ synthesized or the appropriate subset of T cells. The animals were then infected with MHV3 and the course of infection was followed by studying different parameters, such as, the mortality, the virus growth in the tissues and the IFN- γ synthesis in sera and peritoneal exudates. After MHV3 infection, a full resistance of control A/J mice was observed, in contrast to the high mortality rate observed among the depleted animals, where higher virus titers were found in different tissues. The IFN- γ synthesis in sera and peritoneal exudates of depleted mice, after MHV3 infection, drastically decreased when compared to that detected in control mice. The data presented are consistent with the hypothesis that IFN- γ plays an essential role in the resistance of A/J mice to MHV3 infection.

Resumo: O possível papel do interferon (IFN-gama) na resistência de camundongos A/J à infecção por MHV3 foi investigada. Anticorpos monoclonais específicos para IFN-gama, moléculas CD4 e CD8 foram administradas "in vivo" para depleção seletiva do IFN-gama sintetizado ou das subpopulações de células T. Os animais foram infectados com MHV3 e o curso da infecção foi avaliado por estudos de diferentes parâmetros, tal como, a mortalidade, o crescimento do vírus nos tecidos e a síntese do IFN-gama no soro e no exudato peritoneal. Após infecção por MHV3, uma resistência total foi observada nos camundongos A/J controle, em contraste com o alto índice de mortalidade observado entre animais depletados, onde elevados títulos de vírus foram encontrados em diferentes tecidos. A síntese do IFN-gama no soro e exudato peritoneal de camundongos depletados diminuiu drasticamente em comparação com aquela observada nos animais controle. Os dados apresentados são compatíveis com a hipótese do papel essencial do IFN-gama na resistência de camundongos A/J à infecção por MHV3.

28. LUCCHIARI, M.A., PEREIRA, C.A., KUHN, L., LEFKOVITS, I. The pattern of proteins synthesized in the liver is profoundly modified upon infection of susceptible mice with mouse hepatitis virus 3. *Res. Virol.*, v. 143, p. 231-240, 1992.

Abstract: Susceptible BALB/c mice, after experimental infection with mouse hepatitis virus 3 (MHV3), revealed virus titres in the liver that increased gradually to a peak of 8×10^5 PFU/g of tissue after 3 days' infection, when the mice died of acute hepatitis. BALB/c mice were infected with MHV3, subsequently labelled *in vivo* with ^{35}S -methionine, and then the liver preparations from both infected and non-infected animals were subjected to two-dimensional gel electrophoresis. Comparisons of the patterns by computer image analysis revealed 17 gene products which increased, and 8 gene products which decreased, upon virus infection in their two-dimensional gel spot intensity. We conclude that during MHV3 infection of a susceptible strain of mice, a major modification in protein synthesis occurs. The pattern alterations were not related to the virus gene products but were mostly endogenous mouse proteins. Whether these proteins are a result of a defence attempt by the animal, or are dictated by the virus in order to prevent a protective response from happening, remains to be shown.

Resumo: Camundongos BALB/c suscetíveis, após infecção com vírus da hepatite murina 3 (MHV3), apresentam títulos virais que aumentam gradualmente até um pico de 8×10^5 PFU/g de tecido, após 3 dias de infecção, quando os camundongos morrem de hepatite aguda. Camundongos BALB/c foram infectados com MHV3, e posteriormente marcados "in vivo" com ^{35}S -metionina, e então as preparações do fígado de animais infec-

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1992). *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n. 2, p. 71-91, 1993.

tados e não infectados foram submetidos a uma eletroforese em gel de duas dimensões. Comparações das amostras por análise de imagem computadorizada revelaram 17 produtos gênicos que aumentaram e 8 produtos gênicos que diminuíram, após infecção pelo vírus. Nós concluímos que, durante a infecção por MHV3 em camundongos suscetíveis, uma importante modificação na síntese de proteínas ocorreu. As alterações não foram relacionadas com produtos gênicos virais. Se aquelas proteínas são um resultado da defesa empreendida pelo animal, ou se são impostas pelo vírus para prevenir uma resposta protetora, resta a ser determinado.

29. MARUYAMA, M., KAMIGUTI, A.S., TOMY, S.C., ANTONIO, L.C., SUGIKI, M., MIHARA, H. Prothrombin and Factor X activating properties of *Bothrops erythromelas* venom. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 86, n. 5, p. 549-556, 1992.

Abstract: The enzymatic properties of Factor II (FII) and Factor X (FX) activators from *Bothrops erythromelas* venom were investigated. Both activators were inhibited by ethylenediaminetetraacetate (EDTA) and 1,10-phenanthroline, and are thought to be metalloproteinases with molecular weights of 90 kDa and 70-90 kDa, respectively. The activity of the FII activator in the crude venom was about 30 times greater than that in *Oxyuranus scutellatus* venom and level of FX activator activity, which was Ca^{2+} ion dependent, was similar to that in *Daboia russelli* venom. The venom also had two haemorrhagic factors (58 and 105 kDa) and two fibrinolytic enzymes (18 and 58 kDa).

Resumo: Propriedades ativantes de protrombina e fator X do veneno de *Bothrops erythromelas*. As propriedades enzimáticas dos ativadores de fator II (FII) e fator X (FX) foram investigadas no veneno de *Bothrops erythromelas*. Ambos os ativadores são inibidos pelo etilenodiamina tereacetato de sódio (EDTA), pela 1,10 fenantrolina e são metalo proteinases com pesos moleculares de 90 kDa e 70-90 kDa, respectivamente. No veneno bruto, a atividade do ativador de FII foi cerca de 30 vezes maior do que a do veneno de *Oxyuranus scutellatus* e o nível de atividade do ativador de FX, que foi Ca^{2+} dependente, foi semelhante à do veneno de *Daboia russelli*. O veneno também tem dois fatores hemorrágicos (58 e 105 kDa) e duas enzimas fibrinolíticas (18 e 58 kDa).

30. MEIRELLES, M.N.L., JULIANO, L., CARMONA, E., SILVA, S.G., COSTA, E.M., MURTA, A.C.M., SCHAFSTEIN, J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP 57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 52, p. 175-184, 1992.

Abstract: Peptidyl diazomethane (PDAM) derivatives, a class of irreversible inhibitors for cysteine proteinase, were screened for the ability to impair *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development in primary cultures of heart muscle cells (HMC). *T. cruzi* GP 57/51, a purified cysteinyl proteinase, and the substrate Z-Phe-Arg-NHMec were used to determine inhibition rate constants (k_{-2}) by continuous kinetic assays. The k_{-2} values ranged from 25400 to 2800. The best inhibitors of GP 57/51 had bulky hydrophobic residues in the P1 position (in addition to P2), the S1 sub-site specificity of the enzyme being thus similar to mammalian cathepsin L. The effects of these PDAM on parasite infectivity were then investigated. The ability to invade HMC was markedly impaired when trypomastigotes were briefly exposed to 10 μM of Z-(S-Bzl) Cys-Phe-CHN₂. Striking effects were observed when PDAM were added to HMC cultures that had been previously infected with trypomastigotes: Z-(S-Bzl) Cys-Phe-CHN₂ with an IC_{50} of 0,4 μM , and less markedly Z-Phe-Phe-CHN₂ and Z-Tyr-Phe-CHN₂ (ou Z-Phe-Tyr-CHN₂), blocked amastigote replication as well as their transformation into trypomastigotes, thereby arresting intracellular development. Bz-Phe-Gly-CHN₂, in contrast, failed to display antiparasite activity. Direct characterization of the target cysteinyl proteinase was sought, by incubating viable amastigotes or infected HMC with Z-[¹²⁵I] Tyr-Phe-CHN₂. Affinity labeling implicated GP 57/51 as the major cysteinyl proteinase target for this probe. We propose that γ T. cruzi intracellular development is critically dependent on GP 57/51 (cruzipain). Selective inhibitors for this cysteinyl proteinase may have therapeutic potential.

Resumo: Derivados peptidildiazometânicos (PDAM), uma classe de inibidores irreversíveis de cisteíno-proteinases, foram testados quanto a sua capacidade de diminuir a invasão e o desenvolvimento intracelular de *Trypanosoma cruzi* em culturas primárias de células musculares cardíacas (HMC). *T. cruzi* GP 57/51, uma cisteinil-proteinase purificada, e o substrato Z-Phe-Arg-NHMec foram usados para determinação das constantes de inibição (k_{-2}) em ensaios de cinética contínuos. Os valores de k_{-2} variaram de 25400 a 2800. Os melhores inibidores de GP 57/51 possuíam resíduos hidrofóbicos grandes na posição P1 (além de P2), sendo, portanto, a especificidade do subsídio S1 da enzima semelhante a da cathepsina L de mamíferos. Os efeitos desses PDAM na infectividade do parasita foram, então, estudados. A capacidade de invadir HMC foi grandemente diminuída quando trypomastigotas eram expostas rapidamente a Z-(S-Bzl) Cys-Phe-CHN₂ 10 M. Efeitos muito interessantes foram observados quando PDAM eram adicionados a culturas de HMC previamente infectadas com trypomastigotas: Z-(S-Bzl) Cys-Phe CHN₂ bloqueou tanto a replicação de amastigotas como sua transformação em trypomastigotas, parando, portanto, o desenvolvimento intracelular (IC_{50} de 0,4 M); Z-Phe-Phe-CHN₂ e Z-Tyr-Phe-CHN₂ (ou Z-Phe-Tyr-CHN₂) agiram menos acentuadamente. Bz-Phe-Gly-CHN₂, ao contrário, não mostrou atividade antiparasitária. Foi procurada a caracterização da cisteinil-proteinase alvo, através de incubação de Z-[¹²⁵I] Tyr-Phe-CHN₂ com amastigotas viáveis ou HMC infectadas. Marcação por afinidade implicou GP 57/51 como a principal cisteinil-proteinase alvo desta sonda. Propomos que o desenvolvimento intracelular do *T. cruzi* depende criticamente de GP 57/51 (cruzipaina). Inibidores seletivos desta cisteinil-proteinase poderão ter aplicação terapêutica.

31. MELARAGNO, M.I., BRUNONI, D., PATRÍCIO, F.R. das S., CORBANI, M., MUSTACCHI, Z., SANTOS, R. de C.S. dos, LEDERMAN, H.M. A patient with tetrasomy 9p, Dandy-Walker cyst and Hirschsprung disease. *Ann. Genet.*, v. 35, n. 2, p. 79-84, 1992.

Abstract: The authors report on a patient with tetrasomy 9p and 9qh due to a karyotype 47,XY,+dic(9) (q12) in lymphocytes and a normal karyotype in fibroblasts. Clinical and complementary investigation revealed a malformation syndrome with many anomalies like those of trisomy 9p as well as Dandy-Walker cyst and Hirschsprung disease not previously described in tetrasomy 9p.

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1992). *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n. 2, p. 71-91, 1993.

Resumo: Os autores descrevem ocorrência em um paciente de tetrassomia 9p e 9qh devido a cariótipo 47,XY,+dic(9) (q12) em linfócitos circulantes, com cariótipo normal nos fibroblastos. O quadro clínico do afetado apresentou várias anomalias similares àquelas descritas na trissomia 9p, assim como anomalia de Hirschsprung, cisto de Dandy-Walker não descritos na tretrassomia 9p.

32. OLIVEIRA, E.P. de, TANISAKI, M.M.

Effect of proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jaracaca* on coagulant and myotoxic activities of *Bothrops* venoms.

Toxicon, v. 30, n. 2, p. 123-128, 1992.

Abstract: A proteinase inhibitor purified from the plasma of *Bothrops jararaca* was tested for the neutralization of total blood clotting activity, prothrombin activating factor and thrombin-like activity of *B. jararaca* venom and also myotoxic activity of *B. jararacussu* venom. This inhibitor was also tested for neutralization of the lethality induced by the venom of *B. jararaca* and *B. jararacussu*. The inhibitor markedly reduced the total blood clotting activity (95%) and the prothrombin activating factor (98%), and partially decreased the thrombin-like activity of *B. jararaca* venom. The proteinase inhibitor failed to neutralize the myotoxic activity of *B. jararacussu*. Lethality induced by the venom of *B. jararaca* in mice was inhibited by the proteinase inhibitor, whereas the protection on *B. jararacussu* venom was only partial. These results show that the proteinase inhibitor purified from the plasma of *B. jararaca* inhibits different proteinases but not myotoxins of *Bothrops* venoms, and consequently neutralizes the toxic effect due to these proteins.

Resumo: Um inibidor de protease purificado do plasma da *Bothrops jararaca* foi testado para a neutralização da atividade coagulante total, fator ativador da protrombina atividade "thrombin like", e atividade miotóxica. Testou-se também a neutralização do efeito letal do veneno da *Bothrops jararaca* e *Bothrops jararacussu*. O inibidor reduziu 95% a atividade coagulante total, 98% a atividade de ativação da protrombina e parcialmente a atividade "thrombin like". O inibidor não neutralizou a atividade miotóxica do veneno da *B. jararacussu*. A letalidade induzida pelo veneno da *B. jararaca* foi inibida enquanto a proteção contra o veneno da *B. jararacussu* foi apenas parcial. Esses resultados mostram que o inibidor inibe diferentes proteases mas não as miotoxinas e consequentemente neutraliza os efeitos tóxicos dessas proteínas.

33. PICARELLI, Z.P., PREZOTO, B.C., HIRAIKI, E., ABDALLA, F.M.F.

Kallikrein-kinin system in the plasma of snakes.

Agents Actions, Suppl., v. 36, p. 271-281, 1992.

Abstract: Using pharmacological preparations suitable for assay of mammalian kinins, it was shown that *Bothrops jararaca* (Bj) venom and other kininogenases were unable to release kinins from snake plasma. The kallikrein-kinin system presents species-specificity in birds. In order to detect such a specificity in snakes, the effects of Bj venom on snake blood pressure and the effect of incubates of snake plasma with trypsin, on snake blood pressure and snake uterus, were studied. The possibility of activating snake plasma kalokrein with ellagic acid, glass beads or kaolin was also investigated. Whereas plasma of the snakes *Waglerophis merremii* (Wn) and *Crotalus durissus* (Cd), were shown to contain factor XII, prekallikrein, kininogen, Kinases and to present a low but definite activation rate of the kinin system, the plasmas of Bj, *Bothrops moojeni* (Bm) and *Oxyrophus trigeminus* (Ot), yielded only kininogen and kininases. Activation of the system was not even detected by the sensitive substrate Ac-Phe-Arg-Nan (aceptyl-phenylalanyl-arginyl-4nitro-anilide), indicating that the plasma of these species does not possess either factor XII and/or prekallikrein. Snake plasma may constitute an interesting model for the study of blood clotting, fibrinolytic and complement systems.

Resumo: Usando preparações farmacológicas apropriadas para o ensaio de cininas de mamíferos, foi verificado que o veneno de *Bothrops jararaca* (Bj) e outras cininogenases foram incapazes de liberar cininas do plasma de serpentes. O sistema calicreína-cininas apresenta especificidade de espécie em aves. Na tentativa de se detectar esta especificidade em serpentes, foram estudados o efeito do veneno de Bj na pressão arterial de serpentes e o efeito de incubados do plasma de serpentes com tripsina na pressão arterial e no útero de serpentes. A possibilidade de ativação de calicreína no plasma de serpentes com ácido elágico, pérolas de vidro e caolim foi também investigada. Enquanto o plasma das serpentes *Waglerophis merremii* (Wm) e *Crotalus durissus* (Cd) mostraram atividades atribuídas a fator XII, pré-calicreína, cininogênio, cininases e um baixo, mas significativo padrão de ativação do sistema calicreína-cininas, os plasmas de Bj, *Bothrops moojeni* (Bm) e *Oxyrophus trigeminus* (Ot), apresentaram atividades atribuídas apenas a cininases. Ativação do sistema não foi detectada nem com o substrato Ac-Phe-Arg-Nan (acetil-fenil-alanil-arginil-4-nitro-anilida) indicando que o plasma destas serpentes não contém nem Fator XII nem pré-calicreína. O plasma de serpentes pode-se constituir num modelo interessante para o estudo dos sistemas de coagulação sanguínea, fibrinolítico e do complemento.

34. REIS, M.H., IBANEZ, O.M., CABRERA, W.H., RIBEIRO, O.G., MOUTON, D., SIQUEIRA, M., COUDERC, J.

T — helper functions in lines of mice selected for high or low antibody production (Selection III): modulation by anti-CD4+ monoclonal antibody.

Immunology, v. 75, p. 80-85, 1992.

Abstract: T — helper function was evaluated in mice genetically selected for high (H) or low antibody (Ab) responsiveness to *Salmonella* flagellar antigen (Ag) (Selection III). In this Selection as opposed to what was demonstrated in Selections I, II and IV A, the interline difference was not proven to be based upon the modification of Ag processing and presentation at macrophage level. CD4 — CD8 lymph node ratio is similar in HIII and LIII mice, both lines being equally susceptible to *in vivo* depletion of CD4 T cells by GK 1-5 monoclonal antibody (mAb) treatment. Nevertheless, the Ab responsiveness of the two lines was differently modulated by GK 1-5 mAb: the inhibition of Ab responses to various Ag required lower mAb doses and was long lasting in LIII as compared to the transient effect of higher mAb doses observed in HIII. LIII mice were also refractory to *Salmonella*-induced reversion of GK 1-5 mAb inhibition. Moreover, *in vitro* specific T proliferation was constantly lower in LIII, though its IL-2 production was unexpectedly similar to that of HIII T cells. Results of *in vivo* and

in vitro experiments are thus consistent with a defective response of T — helper cells to immunogenic challenge in LIII mice.

Resumo: A atividade linfocitária foi avaliada em camundongos geneticamente selecionados de acordo com a alta (H) ou baixa (L) resposta humorai a抗ígenos flagelares (agf) de *Salmonella*. Nesta seleção ao contrário do que ocorreu nas seleções I, II e IV_A, a diferença interlinhagens não decorreu de modificações do processamento e apresentação de antígeno pelos macrófagos. A freqüência de linfócitos CD⁺₄ e CD⁺₈ é similar nos camundongos H_{III} e L_{III} e ambas as linhagens são igualmente susceptíveis à depleção de células CD⁺₄ "in vivo", por tratamento com o anticorpo monoclonal GK 1.5 (anti CD₄). Entretanto a resposta de anticorpos é diferentemente modulada pelo monoclonal: A inibição da resposta a vários抗ígenos requereu doses menores e foi mais duradoura em L_{III} quando comparada ao efeito transitório de doses maiores de anti CL₄ em H_{III}. Camundongos L_{III} também se mostraram refratários ao efeito reversivo do tratamento com *Salmonella* sobre a inibição causada por GK 1.5. Além disso, a proliferação T específica "in vitro" foi constantemente menor em L_{III} embora a sua produção de IL-2 tenha sido inesperadamente similar à aquela das células T da linhagem H_{III}. Resultado dos experimentos "in vitro" e "in vivo" são consistentes com a resposta deficiente das células T auxiliares dos camundongos L_{III} à estimulação antigenica.

35. RODRIGUES, M.T.A., GIOIELLI, M.L.R., FRATELLI, F., SAITO, T.

Estabelecimento da concentração antimicrobiana eficaz de tiomersal em toxóide tetânico.
Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo, v. 28, n. 1, p. 43-50, 1992.

Resumo: Amostras de toxóide tetânico, contendo quatro concentrações de tiomersal (0,005; 0,010; 0,015 e 0,020%) dentro dos limites recomendados oficialmente, foram submetidos ao teste de eficácia antimicrobiana do conservante. Com relação às exigências da Farmacopéia Americana XXII, apenas *Staphylococcus aureus* se mostrou resistente às quatro concentrações, enquanto que para *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* o sistema conservador atendeu às exigências oficiais, mesmo na menor concentração. O teor de tiomersal em toxóide tetânico poderá ser de 0,005%.

Abstract: Samples of tetanus toxoid containing four concentrations of thimerosal (0,005; 0,010; 0,015 and 0,020%) chosen between the official limits were submitted to the antimicrobial effectiveness test. Regarding the USP XXII requirements, only *S. aureus* was resistant to the four concentrations, while other three microorganisms were sensitive even to 0,005%. This one can be the concentration in tetanus toxoid.

36. SANO-MARTINS, I.S., DAIMON, T.

Electron microscopic cytochemistry on the distribution of wheat germ agglutinin receptor on the platelet plasma membrane after treatment with convulxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom.
Toxicon, v.30, n.2, p. 141-150, 1992.

Abstract: The effects of convulxin, isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, on the localization and distribution of wheat germ agglutinin (WGA) binding sites on platelet surfaces have been investigated at an ultrastructural level. A post-embedding cytochemical technique using WGA-gold complexes was used and the quantitative intensity of WGA-labeling on the surface membrane of platelets after convulxin stimulation was determined. In the presence of Ca²⁺, convulxin induced platelet release and aggregation, while in its absence, the platelets formed pseudopodia and showed release reaction, but without aggregation. After treatment with convulxin, WGA-labeling on the surface membrane decreased compared with intact washed (control) platelets. In the presence of Ca²⁺, clusters of gold label were often found on the surface membrane. However, the WGA-labeling intensity of the membrane of the open canalicular system increased significantly compared with that of platelets stimulated by convulxin in the absence of Ca²⁺. Direct morphological evidence demonstrates qualitative and quantitative alterations of WGA-labeling on the surface membrane of platelets, after convulxin stimulation. The possibility is considered that WGA-binding glycoproteins on the surface membrane are involved in the aggregation response after convulxin stimulation.

Resumo: Os efeitos da convulxina sobre a localização e a distribuição dos receptores da lectina WGA na membrana plaquetária foram estudados a nível ultra-estrutural, utilizando a técnica do ouro coloidal acoplado a WGA. A convulxina induziu secreção e agregação plaquetária na presença de Ca²⁺ enquanto que na ausência da mesma, as plaquetas humanas lavadas formaram pseudópodos e induziram a secreção, porém, sem a agregação plaquetária. Quando comparadas com as plaquetas lavadas (controle) a quantidade de ligação do complexo WGA-ouro coloidal diminuiu significativamente na superfície da membrana após tratamento com a convulxina. As plaquetas tratadas por convulxina, na presença de Ca²⁺, apresentaram agrupamentos de outro coloidal na membrana; a intensidade de marcação no sistema de canais abertos também está significativamente aumentada em relação às plaquetas estimuladas na ausência de Ca²⁺. Essas evidências demonstram alterações qualitativa e quantitativa dos receptores de WGA na membrana plaquetária após a estimulação por convulxina. A possibilidade dos receptores de WGA presente na membrana das plaquetas humanas estarem envolvidas na agregação induzida por convulxina foi também considerada.

37. SANTOS, R. de C.S. dos, CASTRO, N.H.C., FERRAZ, O.P., WALTER-MOURA, J., MUSTACHI, Z., PAGNAN, N.A.B., GOLLOP, T.R.

Ophthalmological, skeletal, and cardiac abnormalities in sibs born to consanguineous parents: a new syndrome?
Am. J. Med. Genet., v.43, p. 946-948, 1992.

Abstract: We report on a sibship from a consanguineous couple consisting of one boy with anophthalmia, one boy with buphthalmos and multiple congenital skeletal, muscle, and cardiac abnormalities, and a stillborn girl with anophthalmia and cardiac and skeletal abnormalities. A possible new syndrome of autosomal recessive inheritance and variable expressivity is discussed, comparing this report with others.

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1992). *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n. 2, p. 71-91, 1993.

Resumo: O presente trabalho descreve a prole de casal consanguíneo, com um irmão com anoftalmia, um irmão com buftalmia, anomalias múltiplas esqueléticas, musculares e cardíacas e uma irmã natimorta com anoftalmia acompanhada por anomalias esqueléticas e cardíacas. Discute-se a possibilidade de se tratar de uma nova síndrome com herança autossômica recessiva e expressividade variável.

38. SHERMAN, S.L., BARBI, G., BRONDUM-NIELSEN, K., BROWN, W.T., CARPENTER, N.J., CHUDLEY, A.E., FERRAZ, O.P., FERREIRA, P., GUSTAVSON, K-H., HALLIDAY, J., HOCKEY, A., HOWARD-PEEBLES, P.N., JENKINS, E., KENNERKNECHT, I., KÄHKÖNEN, M., LADAÍQUE, P., LEISTI, J., MADDALENA, A., MAZURCZAK, T., MATTEI, J-F., MATTINA, T., MCKINLEY, M.J., MURPHY, P., PELLISIER, M.C., PURVIS-SMITH, S., ROBINSON, H., SCAPAGNINI, U., SCHAAP, T., SHAPIRO, L.R., SMITS, A.P.T., STEINBACH, P., TURNER, G., UCHIDA, I.A., OOST, B.A. von, VOELCKEL, M-A., WEAVER, D.D., WEBB, T.

Collaborative prospective study of the fragile X syndrome: One-yr progress report.

Am. J. Med. Genet., v.43, p. 355-360, 1992.

Abstract: A prospective study of the fragile X syndrome [fra(X)] was initiated one year ago to refine the estimates of recurrence risks based on the phenotype of the mother and the family history of the syndrome. The basic unit of data consists of the description of the conceptus of women known to carry the fra(X) gene or of mothers of isolated cases. To date, information on 261 women and their conceptuses was ascertained primarily through prenatal diagnosis; these data are summarized here. Although tests of significance were limited due to small sample sizes in subgroups, the following trends were observed: 1) the penetrance of fra(X) site expression was 80% in both male and female conceptuses suggesting that fra(X) site expression is equally penetrant early in development; 2) the sex ratio at the time of prenatal diagnosis did not differ from one, indicating that selection against fra(X) fetuses, if any, does not differ among sexes; 3) the recurrence risk among offspring of borderline/mildly retarded mothers was higher than that among offspring of intellectually normal mothers; 4) the recurrence risk in offspring did not differ based on the mother's fra(X) site expression; and 5) the recurrence risk in offspring of mothers with isolated cases was slightly less (34%) than that of obligate carrier mothers (41%) although this was not significant. The potential use of these prospective data on the fra(X) syndrome is emphasized.

Resumo: Este é um estudo prospectivo da síndrome de FRA X iniciado em 1991 para apurar as estimativas de riscos de recorrência, baseados no fenótipo da mãe e histórico familiar da síndrome. A unidade básica de pesquisa consiste da descrição da prole de mulheres sabidamente portadoras do gene do [FRA X] ou de mães de casos isolados. Até o momento, descrevemos 261 mulheres e seus filhos, com informação verificadas primariamente através de diagnósticos pré-natais. Apesar dos testes de significância terem sido limitados devido ao tamanho pequeno das amostras nos subgrupos, algumas tendências puderam ser observadas: 1) penetrância de 80% do sítio FRAX em nascidos de ambos os sexos, sugerindo igual penetrância no desenvolvimento precoce; 2) distribuição entre os sexos ao diagnóstico pré-natal não difere de 1:1, indicando que a seleção contra fetos [FRA X], se existe, não difere entre os sexos; 3) o risco de recorrência entre a descendência de mães limítrofes ou moderadamente retardadas foi verificada maior que entre aqueles descendentes de mulheres intelectualmente normais; 4) o pequeno risco de recorrência na descendência não diferiu de acordo com a expressão do sítio [FRA X] da mãe; 5) o risco de recorrência na descendência de mães de casos isolados foi verificada como discretamente menor (34%) que aquela verificada nas mães portadoras obrigatórias (41%), embora não significante. O estudo enfatiza o uso potencial destes dados prospectivos.

39. SILVEIRA, P.F., SCHIRIPA, L.N., CARMONA, E., PICARELLI, Z.P.

Circulating vasotocin in the snake *Bothrops jararaca*.

Comp. Biochem. Physiol., v.103A, n.1, p. 59-64, 1992.

Abstract: There is biochemical and pharmacological evidence to suggest the presence of vasotocin in the blood and plasma of the snake *Bothrops jararaca* (Bj). XE-64 extracts from Bj blood showed antidiuretic and hypotensive activities in rats and a contractile effect on rat isolated uterus, which was totally dialysable and inhibited by thioglycollate. Extracts from Bj whole plasma presented an antidiuretic activity which was only partially dialysable. The plasma extracts also showed oxytocic properties. When EDTA and Sep-Pak C18 extraction were used, a better recovery and characterization of vasotocin by HPLC was obtained. These results indicate the occurrence of free and bound circulating vasotocin in Bj, in an equilibrium dependent of its enzymatic hydrolysis.

Resumo: Evidências bioquímicas e farmacológicas sugerem a presença de vasotocina no sangue e plasma da serpente *Bothrops jararaca* (Bj). Extratos em colunas XE-64 do sangue de Bj apresentaram atividades antidiurética e hipotensora em ratos e um efeito contrátil sobre o útero isolado de rata, o qual foi totalmente dialisável e inibido pelo tioglicolato. Extratos do plasma total de Bj apresentaram atividade antidiurética apenas parcialmente dialisável. Os extratos plasmáticos também apresentaram propriedades ocitócicas. Melhor recuperação e caracterização da vasotocina por HPLC foram obtidas empregando-se EDTA e extração em coluna de Sep-Pak C18. Estes resultados indicam a ocorrência de vasotocina livre e ligada na circulação de Bj, num equilíbrio dependente de sua hidrólise enzimática.

40. SILVEIRA, P.F., SCHIRIPA, L.N., PICARELLI, Z.P.

Hydrolysis of L-cystine-di- β -naphthylamide and neurohypophyseal peptides by the plasma of the snake *Bothrops jararaca*.

Comp. Biochem. Physiol., v. 102B, n. 1, p. 119-122, 1992.

Abstract: *Bothrops jararaca* plasma or serum hydrolysed L-cystine-di- β -naphthylamide (CNAase activity) at a degree comparable to that of plasma or serum in pregnant women. In adult snakes, activity was less in males. It was not altered in pregnancy but increased after delivery, being higher at pH 6.4 (unspecific enzymes) than at pH 7.9 (true pregnant woman plasma oxytocinase). Its optimum pH was 5.9, different from that of other

known enzymes that hydrolyse the same substrate. *Bothrops jararaca* plasma also hydrolysed vasopressin, oxytocin and vasotocin. These hydrolysing activities were unexpected for an ovoviparous reptile.

Resumo: Plasma ou soro de *Bothrops jararaca* hidrolisaram L-cistina-di-β-naftilamida (atividade CNAase) num grau comparável àquele do plasma ou soro de mulheres grávidas. Em serpentes adultas, a atividade foi menor em machos. Ela não foi alterada na prenhez mas aumentou após o parto, sendo mais elevada em pH 6,4 (enzimas inespecíficas) do que em pH 7,9 (ocitocinase plasmática verdadeira de mulheres grávidas). Seu pH ótimo foi 5,9, diferente daquele de outras enzimas conhecidas que hidrolisam o mesmo substrato. O plasma de *Bothrops jararaca* também hidrolisou vasopressina, ocitocina e vasotocina. Estas atividades hidrolíticas foram inesperadas num réptil ovovíparo.

41. SOARES, M.F.M., MOTA, I.

Effect of purified components of *Ascaris suum* extracts on IgE antibody response in guinea pigs
Brazilian J. Med. Biol. Res., v. 25, p. 1137-1140, 1992.

Abstract: The effect of components P530 and P29, isolated from *Ascaris suum* adult worm extract (ASC), on the heterologous IgE antibody response was studied in guinea pigs. Groups of 7 guinea pigs were immunized *ip* with 50 µg of ovalbumin (OA) alone or mixed with 200 µg of each component precipitated in an alum gel. The primary and secondary IgE antibody response was evaluated by passive cutaneous anaphylaxis reaction (PCA). Immunization of guinea pigs with P29 plus ovalbumin (OA) resulted in a significant increase in the level of serum IgE anti-OA antibodies, especially in the secondary response (almost 8-fold higher when compared with control group). This potentiated response was not observed when the animals received OA plus P530 or the crude extract. Indeed, the P530 component, as well as the crude extract, induced a depression of the anti-OA IgE antibody response (2-3 fold decrease when compared with OA-immunized animals). It was also shown that P29, but not P530 or ASC, was capable of eliciting a strong anti-ASC IgE antibody response. These results demonstrate that in guinea pigs these two *Ascaris suum* components have antagonistic biological effects, one inducing potentiation and the other suppression of the heterologous IgE antibody response.

Resumo: O efeito dos componentes P530 e P29 isolados do extrato de vermes adultos de *Ascaris lumbricoides* sobre a resposta heteróloga de anticorpos IgE foi estudada em cobaias. Grupos de 7 cobaias foram imunizadas via intraperitoneal com 50 µg de ovalbumina pura ou misturada com 200 µg de cada componente precipitado com hidróxido de alumínio. A resposta primária e secundária de anticorpos IgE foi avaliada por PCA. Imunização de cobaias com P29 mais ovalbumina resultou em um aumento significante no nível da IgE anti-ovalbumina no soro, especialmente na resposta secundária (quase 8 vezes maior que a do controle). Esta potenciação da resposta não foi observada quando os animais receberam ovalbumina mais P530 ou extrato cru. De fato, o componente P530, assim como o extrato cru, induziram uma depressão da IgE anti-ovalbumina (diminuição de 2 a 3 vezes quando comparado com os animais imunizados com ovalbumina). Verificou-se também que o P29, porém não o P530 ou o extrato, é capaz de induzir uma forte resposta de anticorpos IgE anti-Ascaris. Estes resultados demonstram que na cobraia os dois componentes isolados do *Ascaris suum* têm efeitos biológicos antagônicos, um induzindo potenciação e o outro supressão da resposta de anticorpos IgE heterólogos.

42. SOARES, M.F.M., MOTA, I., MACEDO, M.S.

Isolation of *Ascaris suum* components which suppress IgE antibody responses.
Int. Arch. Allergy Immunol., v. 97, p. 37-43, 1992.

Abstract: An extract from adult *Ascaris suum* was fractionated on a Sephadex G-200 column and individual elution fractions assessed for their ability to induce or suppress an IgE antibody response in mice immunized simultaneously with a heterologous antigen (ovalbumin). The results showed that, whilst fractions eluted in the first peak suppressed the anti-ovalbumin IgE antibody production, those eluted in the third peak induced a significant anti-*Ascaris* IgE response. The mixture of the two kinds of fractions resulted in suppression of anti-*Ascaris* IgE antibodies. The apparent molecular weight (MW) of the first and third peaks was 530,000 and 29,000 daltons, respectively. After delipidation, the extract still retained most of its biological activities. SDS-PAGE of this material showed selective loss of high-MW components when compared to the whole extract. No bands were observed in SDS-PAGE of peak I in contrast to peak III, which displayed several bands. Immunoblots of all these samples showed at least 3 bands above MW 150,000, which reacted with anti-peak I antiserum, in the unfractionated extracts and in peak I, but not in peak III. When the extract was fractionated by affinity chromatography using anti-peak I antibodies as ligands, the immunogenic components were present in the effluent, whereas the suppressive components were recovered in the eluate.

Resumo: Um extrato de *Ascaris suum* adulto foi fracionado em uma coluna de Sephadex G-200 e as frações individuais testadas quanto a sua capacidade de induzir ou suprimir uma resposta de IgE em camundongos imunizados simultaneamente com um antígeno heterólogo (ovalbumina). Os resultados mostraram que enquanto as frações eluídas com o 1º pico suprimem a produção de IgE anti-ovalbumina, aquelas eluídas no 3º pico induzem a uma resposta significante de IgE anti-*Ascaris*. A mistura das duas frações resultou na supressão dos anticorpos IgE anti-*Ascaris*. O peso molecular (PM) do 1º e 3º picos foi respectivamente de 530.000 e 29.000 Daltons. Após delipidação, o extrato reteve a maioria de suas atividades biológicas. SDS-PAGE deste material mostrou uma perda seletiva dos componentes macromoleculares quando comparado com o extrato total. Nenhuma banda foi observada no pico I por SDS-PAGE em contraste com o pico III, que mostrou várias bandas. Immunoblots de todas estas amostras mostraram que pelo menos 3 bandas de peso molecular acima de 150.000 reagiam com o antípico I no extrato total e no pico I porém não com o pico III. Quando o extrato foi fracionado por cromatografia de afinidade usando anticorpos antípico I como ligante, os componentes imunogênicos foram recuperados no eluado.

COMISSÃO EDITORIAL. Coletânea de resumos de trabalhos publicados pelos pesquisadores do Instituto Butantan (1992). *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n. 2, p. 71-91, 1993.

43. THEAKSTON, R.D.G., FAN, H.W., WARRELL, D.A., DIAS DA SILVA, W.D., WARD, S.A., HIGASHI, H.G., BIASG. Use of enzyme immunoassays to compare the effect and assess the dosage regimens of three Brazilian *Bothrops* antivenoms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 47, n. 5, p. 593-604, 1992.

Abstract: The effect of the three main Brazilian polyspecific antivenoms on venom clearance was assessed in 118 moderately envenomed victims of bites by *Bothrops* species (mainly *B. jararaca*) in São Paulo State, Brazil. Serum samples taken from patients at intervals during their stay in the hospital and at followup approximately four weeks later were tested by enzyme immunoassay for the presence of whole venom and therapeutic antivenom. Results indicated that in patients treated with the standard regimen of either four (40 ml) or eight (80 ml) ampoules of each antivenom, venom was cleared from the circulation within four days of antivenom administration. However, high concentrations of antivenom persisted for approximately 10 days and remained detectable until 30-50 days after administration. This suggests that patients may be being treated with excessive amounts of antivenom in Brazil. This practice increases the national cost of antivenom therapy and may contribute to the high frequency of antivenom reactions. Clinically, there was no obvious difference in the efficacy between the three antivenoms.

Resumo: O efeito dos três antivenenos poliespecíficos produzidos no Brasil no clareamento do veneno foi analisado em 118 pacientes, classificados como de gravidade moderada, picados por serpentes do gênero *Bothrops* (principalmente *B. jararaca*), no Estado de São Paulo, Brasil. Amostras de soro foram obtidas de pacientes em intervalos estabelecidos durante a permanência no hospital, e no seguimento 4 semanas após o acidente, sendo testadas, pelo método imunoenzimático (ELISA), para presença de veneno total e antiveneno. Os resultados indicaram que, em pacientes tratados com o esquema padrão de 4 (40 ml) ou 8 (80 ml) ampolas de cada antiveneno, o clareamento do veneno na circulação ocorreu nos primeiros 4 dias da administração do antiveneno. Entretanto, concentrações altas de antiveneno persistiram por aproximadamente 10 dias e permaneceram detectáveis até 30-50 dias após sua administração. Isto sugere que os pacientes estão sendo tratados com quantidades excessivas de antiveneno no Brasil. Esta prática aumenta o custo nacional de produção do antiveneno e pode contribuir para a maior freqüência de reações adversas. Clinicamente, não houve diferenças evidentes na eficácia entre os três antivenenos.

44. TIMENETSKY, J., MIYAKI, C., MENDES, I.F., RIZZO, E. de Identificação de micoplasmas pela inibição de crescimento de amostras isoladas de culturas celulares. *Rev. Saúde públ. S. Paulo*, v. 26, n.1, p. 17-20, 1992.

Resumo: As culturas celulares devem ser continuamente monitoradas quanto à presença de micoplasmas, pois, embora às vezes eles passem despercebidos, podem causar alterações cromossômicas, interferir na replicação viral, na produção de anticorpos e interferon. A Organização Internacional em Micoplasmologia (IOM) recomenda o isolamento e a identificação de micoplasmas, visando detectar as prováveis origens da infecção e melhorar a qualidade das culturas. Assim, foram analisadas pela inibição de crescimento 37 amostras pertencentes a 27 linhagens celulares contaminadas por micoplasmas. Em nenhuma amostra foi observada a ocorrência de duas espécies. Foram identificados 18 (48,65%) *Mycoplasma arginini*, 15 (40,55%) *Acholeplasma laidlawii*, dois (5,40%) *Mycoplasma orale*, sendo que duas amostras (5,40%) não foram identificadas. Considerando as espécies caracterizadas na pesquisa, os autores sugerem: a) a adoção do teste de isolamento de micoplasmas em caráter de rotina; b) o aprimoramento das técnicas de assepsia e desinfecção; c) a eliminação da pipetagem bucal; d) a utilização de soros e de outros componentes de meios de cultura de qualidade certificada; e) o questionamento da presença de micoplasmas quando linhagens celulares são permutadas pelas instituições; f) a avaliação cautelosa de resultados obtidos quando se utilizam culturas infectadas por esse microrganismo.

Abstract: Cell cultures must be continuously screened for the presence of mycoplasma because, although these microorganisms sometimes pass unnoticed, they may cause chromosomal alterations and interfere with viral replication, antibody and interferon production etc. The International Organization for Mycoplasmology (IOM) recommends the isolation and identification of mycoplasma with a view to the detection of the origin of the infection and the improvement of the quality of the cultures. In this paper, 37 samples belonging to 27 cell lines contaminated with mycoplasma were assayed by the growth inhibition test. It is known that *Mycoplasma orale* is the most common human mycoplasma contaminant of cell cultures, the major vehicle of contamination being mouth pipetting, while commercial bovine serum is the main source for *Mycoplasma arginini* and *Acholeplasma laidlawii*. *M. arginini* was found in 18 (48.65%) of the cell samples tested, *A. laidlawii* in 15 (40.55%), and *M. orale* in two (5.40%). Two other samples could not be identified by the antisera used (antisera against *M. arginini*, *M. orale*, *Mycoplasma hyorhinis* and *A. laidlawii*) their characteristics being "fried egg" colonies, digitonine sensitivity, Dienes stained, positive glucose catabolism, negative arginini hydrolysis, and negative tetrazolium reduction. No more than one type of mycoplasma was found in each cell culture. In the light of the results of the study, it is suggested that: a) cell cultures should be tested for mycoplasma on a routine basis; b) microbial control techniques be improved; c) mouth pipetting be abolished; d) serum and cell culture media components purchased be of certified quality; e) the presence of mycoplasma when cell lines are exchanged among institutions be investigated; f) data obtained when mycoplasma infected cell cultures are used be carefully evaluated.

45. VIEIRA, E.G.J., HENRIQUES, S.B. Comparison of the Lowry and coomassie blue methods for the determination of protein concentration. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, v.25, p. 583-591, 1992.

Abstract: The Lowry and Coomassie Blue methods were compared for precision when applied to *Schistosoma mansoni* proteins, using bovine serum albumin (BSA) as standard. The absorbance of five different concentrations was measured and the experiments were run in parallel to reduce bias in the comparison. Thus, for a given technique, all photometric data were obtained from reaction mixtures (BSA and test solutions) prepared

and analyzed as simultaneously as possible. To interpret the results, polynomial functions of different degrees — up to the third — were calculated to fit the absorbance values to the respective protein concentrations of BSA or worm protein present in the reaction mixtures, and the standard errors of all slopes were also calculated. The protein concentration of worm extracts was calculated by two methods: 1) the ratio of the first-degree slopes of the polynomials applied to absorbance = $f(x)$, with x being either mg BSA or ml worm extract, and 2) the utilization of the BSA function parameters to convert any worm absorbance value to protein concentration. The results obtained with the slope ratio method were variable. However, the function method seemed to be reliable, especially when applied to Coomassie Blue data. When the results were derived from the BSA cubic function the concentration of soluble worm protein was calculated with a coefficient of variation of 1.20%.

Resumo: A precisão dos métodos de Lowry e Coomassie Blue foram comparadas utilizando proteínas de *Schistosoma mansoni* e albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A absorbância de cinco concentrações diferentes foi medida e os experimentos executados em paralelo para reduzir a inclinação na comparação. Desta forma, para a referida técnica, todos os dados fotométricos foram obtidos a partir de misturas de reações (BSA e soluções testes) preparadas e analisadas simultaneamente quanto possível. Para interpretar os resultados, funções polinomiais de diferentes graus — até o terceiro — foram calculados para adaptar os valores das absorbâncias para a respectiva concentração de proteínas de BSA e proteína do verme presente na mistura de reações, e os erros padrão de todas as inclinações foram também calculados. A concentração de proteína dos extratos de vermes foram calculados por dois métodos: 1) O emprego das inclinações de primeiro grau das polinomiais calculadas para absorbância = $f(x)$, com x sendo mg de BSA ou ml do extrato de verme, e 2) foram utilizados os parâmetros da função BSA para converter o valor da absorbância do verme em concentração de proteína. Os resultados obtidos com o método relação da inclinação foram variáveis. Contudo, o método função deu melhor precisão, especialmente quando aplicados para os dados do Coomassie Blue. Quando os resultados foram calculados a partir da função cúbica para BSA a concentração das proteínas solúveis do verme foi calculada com um coeficiente de variação de 1,20%.

46. YAMANOUYE, N., PICARELLI, Z.P.

Characterization of postjunctional alpha-adrenoceptors in the isolated aorta of the snake *Bothrops jararaca*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 103C, n.3, p. 615-618, 1992.

Abstract: To characterize the alpha-adrenoceptors present in *Bothrops jararaca* aorta, selective alpha-adrenoceptor agonists and antagonists were used. The relative order of potency of the tested agonists was noradrenaline > phenylephrine > clonidine. Prazosin was more potent than phentolamine and yohimbine in antagonizing noradrenaline response, since the PA_2 values were 9.91, 7.59 and 7.33, respectively. Yohimbine was also able to block the contraction produced by phenylephrine, an alpha-1 agonist. These results suggest the existence of an alpha-1 subtype of adrenoceptor in this preparation which, however, presents some different characteristics from those described for mammals.

Resumo: Para caracterizar os adrenoceptores alfa presentes na aorta de *Bothrops jararaca* foram utilizados agonistas e antagonistas seletivos para adrenoceptores alfa. A ordem de potência dos agonistas foi: noradrenalina > fenilefrina > clonidina. Prazosin foi mais potente que fentolamina e ioimbina em antagonizar a resposta de noradrenalina, sendo que os valores de pA_2 foram 9,91; 7,59 e 7,33 respectivamente. Ioimbina foi também capaz de bloquear a contração produzida por fenilefrina, um agonista de adrenoceptores alfa-1. Esses resultados sugerem a presença de um subtipo de adrenoceptor alfa-1 nesta preparação, que, entretanto, apresenta algumas características diferentes daqueles descritas em mamíferos.

47. YAMANOUYE, N., SALOMÃO, L.C., PICARELLI, Z.P.

Effects of catecholamines on the isolated aorta of the snake *Bothrops jararaca*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.101C, n.2, p. 197-201, 1992.

Abstract: Effects of catecholamines in snakes have been examined using an aorta preparation isolated from *Bothrops jararaca*. Adrenaline, noradrenaline and isoprenaline produced dose-dependent contractions on this preparation. The relative potency was adrenaline > noradrenaline > isoprenaline. Phentolamine displaced, to the right, the concentration-response curve of the three catecholamines tested, showing the presence of alpha-adrenoceptores in this preparation. Isoprenaline has never produced a relaxation, even when the aorta was first contracted by BaCl_2 and pretreated with phentolamine, indicating that beta-adrenoceptors are absent in this preparation. In this *Bothrops jararaca* preparation, exclusively neuronal uptake was found, thus demonstrating that its existence was preserved during evolution.

Resumo: Os efeitos de catecolaminas foram verificados em aorta isolada de *Bothrops jararaca*. Adrenalina, noradrenalina e isoprenalina produziram contração dependente da dose nessa preparação, sendo a potência relativa: adrenalina > noradrenalina > isoprenalina. Fentolamina deslocou para a direita as curvas concentração-resposta das três catecolaminas testadas, mostrando a presença de adrenoceptores alfa nessa preparação. Isoprenalina não produziu relaxamento, mesmo em aortas pré-contraídas com BaCl_2 e pré-tratadas com fentolamina, indicando a ausência de adrenoceptores beta nessa preparação. Nessa preparação de *Bothrops jararaca*, somente a captação neuronal foi detectada, mostrando que a sua existência foi preservada durante a evolução.

ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX

ABDALLA, F.M.F.	77,81
ALBAS, A.	71
ANDREONI, A.S.S.	75
ANTONIO, L.C.	80
ASSAKURA, M.T.	71
BARBARO, K.C.	72
BARBI, G.	83
BATISTA, M.B.C.	75
B.I.A.S.G.	78,79,85
BIOZZI, G.	77
BRANDI, C.M.W.	76
BRENO, M.C.	72
BRØNDUM-NIELSEN, K.	83
BROWN, W.T.	83
BRUNONI, D.	80
CABRERA, W.H.K.	77,81
CAMPOS, M.M.C.	75
CARDOSO, J.L.C.	72,76
CARMONA, E.	80,83
CARNEIRO, S.M.	73
CARPENTER, N.J.	83
CASTRO, N.H.C.	82
CHUDLEY, A.E.	83
CORBANI, M.	80
COSTA, E.M.	80
COSTA ROSA, L.F.B.P.	73
COUDERC, J.	81
CURI, R.	73
CURY, Y.	73,74
DAIMON, T.	82
DAMY, S.B.	74
DECREEUSEFOND, C.	77
DIAS DA SILVA, W.D.	79,85
DORCE, V.A.C.	74
DOS-SANTOS, M.C.	74
EICHMANN, K.	79
EICKSTEDT, V.R.D. von	72
FAN, H.W.	85
FERRAZ, O.P.	82,83
FERREIRA, L.A.F.	75
FERREIRA, M.L.	76
FERREIRA, P.	83
FORTES-DIAS, C.L.	74
FRANÇA, F.O.S.	76,78
FRANÇO, M. de	77
FRATELLI, F.	82
FRAZATTI GALLINA, N.M.	71
FURTADO, M. de F.	71,74
GERVITZ, R.K.	76
GHIURO VALENTINI, E.J.	71
GIOIELLI, M.L.R.	82
GOLLOP, T.R.	82
GONÇALVES, L.R.C.	74

GUSTAVSON, K.H.	83
GUTIÉRREZ, J.M.	74
HABERMEHL, G.G.	75
HALLIDAY, J.	83
HAY, C.R.M.	78
HENRIQUES, O.B.	75
HENRIQUES, S.B.	85
HIGASHI, H.G.	85
HIRAICHI, E.	77,81
HO, P.L.	77
HOCKEY, A.	83
HOWARD-PEEBLES, P.N.	83
IBANEZ, O.M.	77,81
ISHII, H.	78
JENKINS, E.	83
JORGE, M.T.	78
JULIANO, L.	80
KÄHKÖNEN, M.	83
KAMIGUTI, A.S.	78,80
KENNERKNECHT, I.	83
KISIELIUS, J.J.	73
KUHN, L.	79
LADAÏQUE, P.	83
LAING, G.D.	79
LEBRUN, I.	75
LEDERMAN, H.M.	80
LEFKOVITS, I.	79
LEISTI, J.	83
LEITE, R.P.	79
LUCCHIARI, M.A.	74,79
MACEDO, M.S.	84
MADDALENA, A.	83
MANDELBAUM, F.R.	71
MARUYAMA, M.	80
MASSA, S.	77
MATTEI, J-F.	83
MATTINA, T.	83
MAZURCZAK, T.	83
McKINLEY, M.J.	83
MEIRELLES, M.N.L.	80
MELARAGNO, M.I.	80
MENDES, I.F.	85
MENDONÇA, R.M.Z.	71
MIHARA, H.	80
MIYAKI, C.	85
MODOLELL, M.	79
MONTEIRO, S.H.C.	76
MORAES, V.L.G. de	75
MOTA, I.	72,76,84
MOURA-DA-SILVA, A.M.	76
MOURÃO FUCHES, R.M.	71
MOUTON, D.	77,81
MURPHY, P.	83
MURTA, A.C.M.	80
MUSTACCHI, Z.	80,82

OLIVEIRA, E.P. de	81
OOST, B.A. von	83
PAGNAN, N.A.B.	82
PALERMO-NETO, J	74
PATRÍCIO, F.R. da S.	80
PELLISSIER, M.C.	83
PEREIRA, C.A.	74,79
PICARELLI, Z.P.	72,76,77,81,83,86
PREZOTO, B.C.	75,81
PUORTO, G.	71
PURVIS-SMITH, S.	83
RAW, I.	77
REIS, M.H.	81
RIBEIRO, L.A.	78
RIBEIRO, O.G.	77,81
RIZZO, E. de	85
ROBINSON, H.	83
RODRIGUES, M.T.A.	82
RUGMAN, F.P.	78
SAFI, D.A.	73
SAITO, T.	82
SALOMÃO, L.C.	86
SALOMÃO, M.G.	71
SANDOVAL, M.R.L.	74
SANO-MARTINS, I.S.	82
SANT'ANNA, O.A.	74,77
SANTOS, R. de C.S. dos	80,82
SCAPAGNINI, U.	83
SCHAAP, T.	83
SCHARFSTEIN, J.	80
SCHIRIPA, L.N.	77,83
SESSO, A.	73
SHAPIRO, L.R.	83
SHERMAN, S.L.	83
SILVA, S.G.	80
SILVEIRA, P.F.	83
SIQUEIRA, M.	77,81
SMITS, A.P.T.	83
SOARES, M.F.M.	84
STEINBACH, P.	83
STIFFEL, C.	77
SUGIKI, M.	80
TANAKA, H.	73
TANISAKI, M.M.	81
THEAKSTON, R.D.G.	78,79,85
TIMENETSKY, J.	85
TOMY, S.C.	80
TURNER, G.	83
UCHIDA, I.A.	83
VASSÃO, R.C.	74
VIEIRA, E.G.J.	85
VITAL, G.R.F.	75
VOELCKEL, M-A.	83
WALTER-MOURA, J.	82
WARD, S.A.	85

WARRELL, D.A.	79,85
WEAVER, D.D.	83
WEBB, T.	83
WOE FANG, F.L.	71
YAMANOUYE, N.	77,86
ZELNIK, R.	75

BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA

VOLUME 4 — 1993

ISSN 0103-6548



Secretaria de Estado da Saúde
Coordenação dos Institutos de Pesquisa
Instituto Butantan

COMISSÃO EDITORIAL

Rosalvo Guidolin
Wilmar Dias da Silva
Isaias Raw
Henrique Moisés Canter
Luiz Sebastião Prigenzi
Renata Lara Paes de Barros

SUMÁRIO

Toxina tetânica: produção e purificação em escala industrial

Tetanus toxin: production and purification in large scale.

F. FRATELLI, S.M.A. PRADO, M.D.C. VANCETTO, H.G. HIGASHI..... 19

TOXINA TETÂNICA: PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA INDUSTRIAL

Fernando FRATELLI*
Sally Müller Affonso PRADO*
Mary Dalva Caparroz VANCETTO*
José Marcos de OLIVEIRA*
Hisako Gondo HIGASHI**

RESUMO: A obtenção de toxina tetânica purificada em grandes volumes é um passo fundamental para a produção de Toxóide Tetânico. A utilização de vapor para a esterilização do meio de cultura para a produção desta toxina apresentava títulos baixos de toxina tetânica. O emprego da filtração convencional teve como consequência índices insatisfatórios de pureza ($Lf/mgNP$) e de rendimento (%) do processo. Com o objetivo de encontrar soluções para estas etapas do processo produtivo, foi utilizada a esterilização por cartuchos para o meio de cultura e a filtração tangencial através de um sistema Prostak, associado à ultrafiltração molecular em 30Kd para a toxina tetânica. A nova metodologia trouxe aumentos significativos em pureza ($Lf/mgNP$) e em rendimento (%). A tecnologia empregada e a comparação dos resultados obtidos nos diferentes processos são apresentadas neste trabalho.

UNITERMOS: Filtração tangencial, esterilização, toxina tetânica, toxóide tetânico.

INTRODUÇÃO

O Instituto Butantan vem produzindo toxina tetânica em larga escala para a preparação de Toxóide Tetânico (TT) e vacinas associadas Diftérica-Tetânica adulto (dT), Diftérica-Tetânica infantil (DT) e Diftérica-Pertussis-Tetânica (DPT), como também para a imunização de eqüinos soroprodutores.

* Seção de Vacinas Anaeróbicas do Instituto Butantan

** Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção do Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1.500, CEP 05503-900 — São Paulo, SP — Brasil.
Recebido para publicação em 27.04.93 e aceito em 16.06.93.

A metodologia convencionalmente utilizada baseava-se na obtenção de toxina tetânica por processo fermentativo de *Clostridium tetani* em meio de Müller modificado por Latham¹, esterilizado por vapor no próprio tanque de fermentação. Após o período de crescimento bacteriano, as células eram separadas por filtros de profundidade e a toxina concentrada por ultrafiltração molecular em cartuchos de 10.000 NMWL (Nominal Molecular Weight Limit), destoxicificada pela ação conjunta de formaldeído e calor e purificada por gel filtração.³

Com esta metodologia, o título da toxina bem como os índices de pureza e de rendimento não eram satisfatório, além de obrigar a um consumo de mão-de-obra relativamente elevado.

Face a esses resultados mencionados, foi desenvolvida uma metodologia produtiva de toxina tetânica mais adequada que, basicamente, consistiu em: substituir a esterilização a quente do meio de cultura por filtração, introdução de sistema tangencial de filtração para eliminação das células bacterianas e, concentração da toxina por ultrafiltração em membrana de 30.000 NMWL.

O objetivo deste trabalho é de relatar detalhadamente as técnicas utilizadas e demonstrar, comparativamente, os resultados que podem ser obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de toxina tetânica: lotes semanais de 360 litros em fermentador "Bilthoven — Unit System — Tetano Paljas" empregando o meio de cultura Müller modificado por Latham¹ e a cepa *Clostridium tetani* Harvard. Tempo de incubação de 5 dias com temperatura de crescimento de 35°C e pH 7,0.

Processos de esterilização do meio de cultura:

Esterilização convencional: o meio de cultura era preparado no tanque do fermentador, esterilizado por vapor a 118°C/35min. e resfriado com água corrente até a temperatura de 36°C para posterior inoculação.

Esterilização por filtração: o meio de cultura era preparado em um tanque auxiliar e pressurizado para filtração através de cartuchos clarificante e esterilizante da Millipore, catálogo nº CP03 01 TP3 e CVGL 03 TP3, respectivamente. Este meio era recolhido no tanque do fermentador previamente esterilizado (vazio) com vapor e procedia-se então à semeadura.

Processos de filtração da toxina tetânica:

Filtração convencional: a toxina tetânica era separada da massa bacteriana através do sistema de filtração CUNO, contendo 3 cartuchos clarificantes (Zeta-Plus ZP 30S) e 3 cartuchos esterilizantes (Zeta-Plus ZP 90S), todos de 12 polegadas. A toxina tetânica era em seguida recolhida em um tanque de 300 litros para ser concentrada simultaneamente em cartuchos de 10.000 NMWL. Após a filtração, os cartuchos eram esterilizados por vapor a 120°C/60 min. e, desprezados (Fig. 1).

Filtração tangencial: utilização de sistema Prostak Millipore Process System PSK 1MF — MSP005172, 67120 Molsheim-France, de 4,65m² de área filtrante, com módulos de 0,22μm, interligado ao fermentador. A suspensão de células (360 litros) era concentrada no equipamento mencionado até um volume de 20 litros. Esta massa celular era lavada 5 vezes com porções de 25 litros de solução fisiológica 0,85%. O filtrado, ou seja, a toxina tetânica era recolhida em um tanque intermediário para concentração por ultrafiltração molecular. Utilizávamos neste

processo, cartuchos de 10.000 NMWL que posteriormente foram substituídos por outros de 30.000 NMWL.

Após a lavagem da massa celular, o sistema Prostak era drenado e lavado com 3 porções de 25 litros de solução fisiológica 0,85% para a remoção de resíduos de células do sistema.

Todo o material contaminado, após a sua drenagem, era acondicionado em recipientes de 40 litros e esterilizado por autoclavagem a 120°C/90 min.

O sistema Prostak era desinfectado com 50 litros de solução de hipoclorito de sódio (1.000 ppm) durante 60 min. à temperatura ambiente. Após a desinfecção e limpeza do sistema, o hipoclorito de sódio era removido com aproximadamente 400 litros de água destilada.

A limpeza efetiva das membranas era comprovada através de medição do "clean water flux" ("fluxo com água limpa"), restabelecendo-se o fluxo antes de cada processo por passagem de água limpa, até que o mesmo tenha a vazão normal (35,5 litros/m²/hora).

A integridade das membranas era comprovada após cada processo através de testes indicados pelo fabricante.

Após os processos de filtração descritos acima, o tanque de fermentação era esterilizado à 120°C/45min. para permitir segurança na limpeza e preparo do mesmo para o próximo lote do processo de produção (Fig. 2).

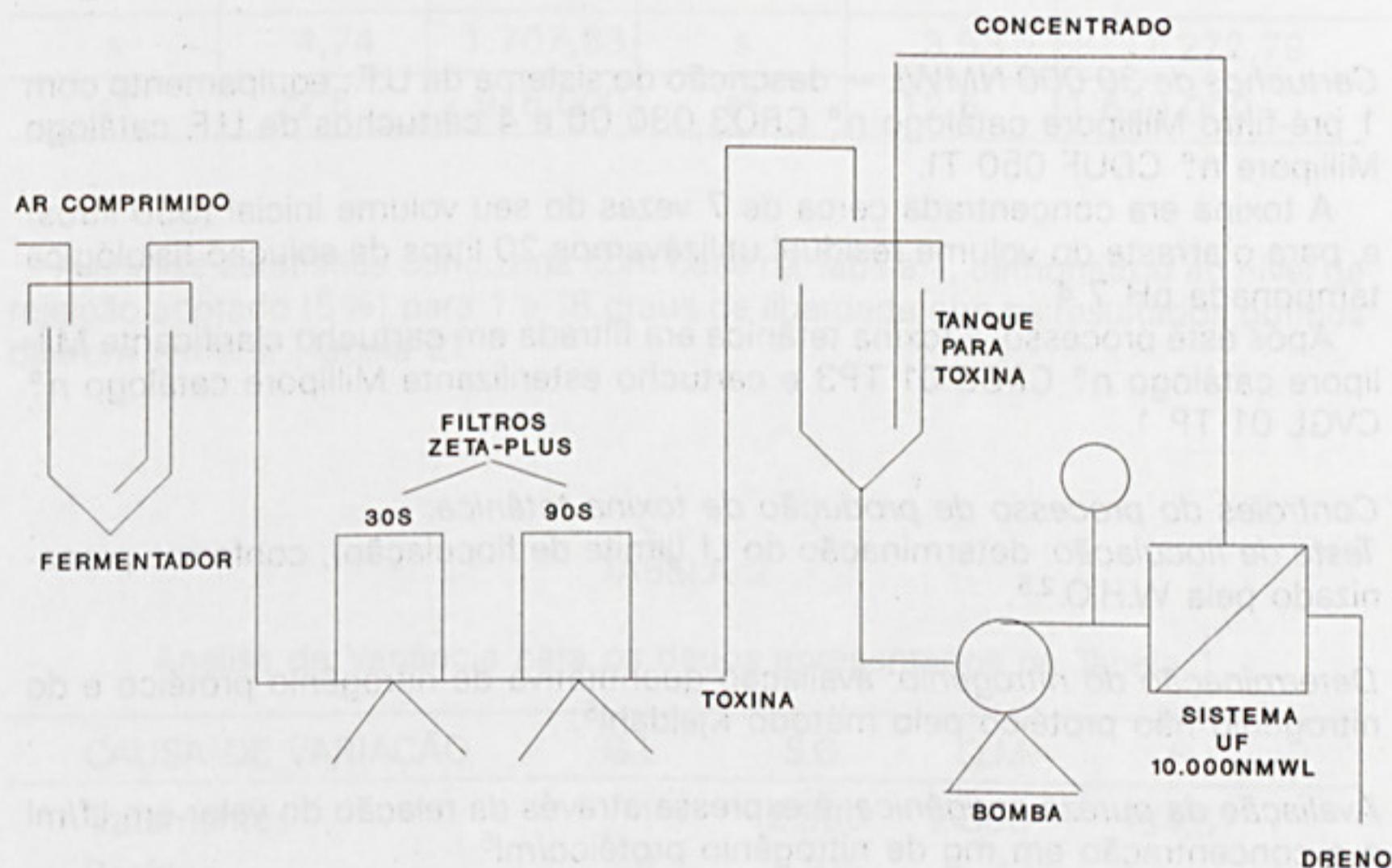


FIG. 1: Fluxograma do sistema de filtragem convencional

Processos de concentração da toxina tetânica por ultrafiltração molecular (U.F.): Cartuchos de 10.000 NMWL — descrição do sistema de U.F.: equipado com 1 pré-filtro Millipore catálogo nº CDPR 012 F4 e 3 cartuchos de U.F. Millipore catálogo CDUF 050 G1.

A toxina tetânica era concentrada cerca de 10 vezes ao seu volume inicial (350 litros) e para o arraste do volume residual utilizávamos 20 litros de água destilada.

Após este processo, a toxina era filtrada em cartuchos clarificantes Millipore catálogo nº CP19 01 12 W3, CP06 01 TP3 e CPO3 01 TP3 e em um cartucho esterilizante Millipore catálogo nº CVGL 01 TP1.

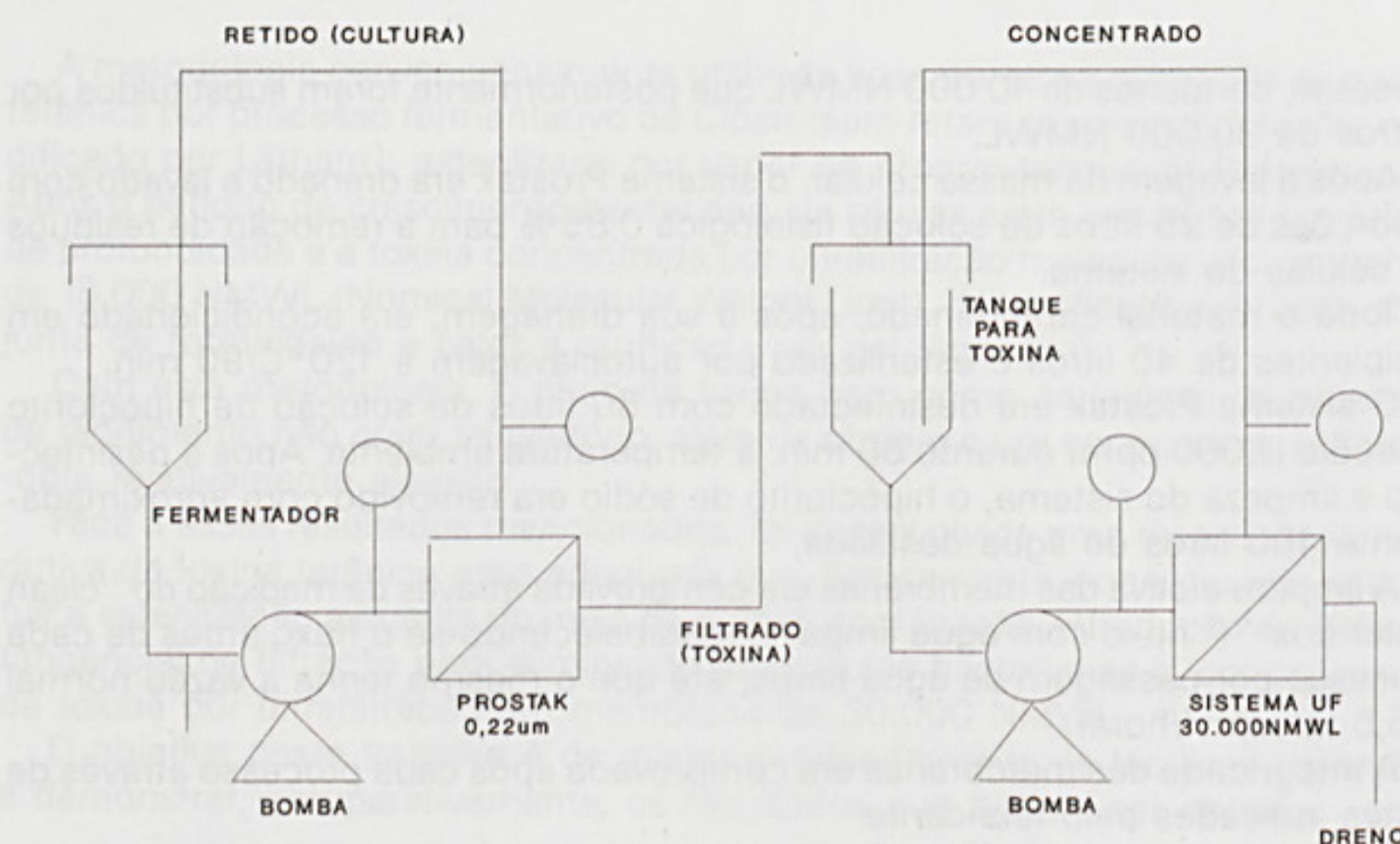


FIG. 2: Fluxograma do sistema de filtração tangencial

Cartuchos de 30.000 NMWL — descrição do sistema de U.F.: equipamento com 1 pré-filtro Millipore catálogo nº CRO3 030 06 e 4 cartuchos de U.F. catálogo Millipore nº CDUF 050 T1.

A toxina era concentrada cerca de 7 vezes do seu volume inicial (350 litros) e, para o arraste do volume residual utilizávamos 20 litros de solução fisiológica tamponada pH 7,4.

Após este processo, a toxina tetânica era filtrada em cartucho clarificante Millipore catálogo nº CPO3 01 TP3 e cartucho esterilizante Millipore catálogo nº CVGL 01 TP 1.

Controles do processo de produção de toxina tetânica:

Teste de floculação: determinação do Lf (limite de floculação), conforme preconizado pela W.H.O.^{2,5}.

Determinação do nitrogênio: avaliação quantitativa de nitrogênio protéico e do nitrogênio não protéico pelo método Kjeldahl⁵.

Avaliação da pureza antigênica: é expressa através da relação do valor em Lf/ml e a concentração em mg de nitrogênio protéico/ml⁵.

Análise estatística: conduzida através da Análise de Variância seguida pela aplicação do teste "F"⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de esterilização do meio de cultura Latham-Müeller¹, por filtração em cartuchos, apresentou resultados em média de 52,5 Lf/ml contra os 28,5 Lf/ml obtidos quando o mesmo meio era esterilizado por vapor à 118°C/35 min. (Tabela 1).

FRATELLI, F., PRADO, S.M.A., VANCETTO, M.D.C., OLIVEIRA, J.M. de, HIGASHI, H.G. Toxina tetânica: produção e purificação em escala industrial. *Bol. Biotecnol.*, v.4, p. 19-29, 1993.

TABELA 1

Valores de limite floculante (Lf) de toxina tetânica segundo a utilização de vapor ou cartucho para esterilização do meio de cultura Latham — Müller

VAPOR 118 °C/35 min.			FILTRAÇÃO EM CARTUCHOS ESTERILIZANTES		
Nº LOTE TOX.TET.	Lf/ml INICIAL	Lf INICIAL $\times 10^{-3}$	Nº LOTE TOX.TET.	Lf/ml INICIAL	Lf INICIAL $\times 10^{-3}$
91/44	35	12.600	92/23	50	18.000
91/45	30	10.800	92/24	50	18.000
91/46	25	9.000	92/25	50	18.000
91/47	30	10.800	92/26	55	19.800
91/48	35	12.600	92/27	55	19.800
92/02	20	7.200	92/37	60	21.600
92/09	25	9.000	92/38	50	18.000
92/11	30	10.800	92/41	55	19.800
92/15	30	10.800	92/42	50	18.000
92/22	25	9.000	92/43	50	18.000
\bar{x}	28,5	10.260	\bar{x}	52,5	18.900
s	4,74	1.707,63	s	3,53	1.272,79
s^2	22,5	2.916.000	s^2	12,5	1.620.000

A análise estatística conduzida com base na Tabela 1, demonstrou ao nível de rejeição adotado (5%) para 1 e 18 graus de liberdade que os resultados obtidos diferem entre si (Tabela 2).

TABELA 2

Análise de Variância para os dados apresentados na Tabela 1

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	2.880	2.880	164,57
Resíduo	18	315	17,5	
Total	19	3.195		

A diferença dos resultados obtidos quanto às metodologias empregadas para a esterilização do meio Latham-Müller é demonstrada na Fig. 3.

O processo de produção de toxina tetânica em nosso laboratório, que consumia no mínimo 8 horas ininterruptas nos processos de filtração e concentração deste produto, apresentava também resultados inferiores como: rendimento médio de 59,21% e pureza a níveis médios de 537,57 Lf/mgNP (Tabela 3).

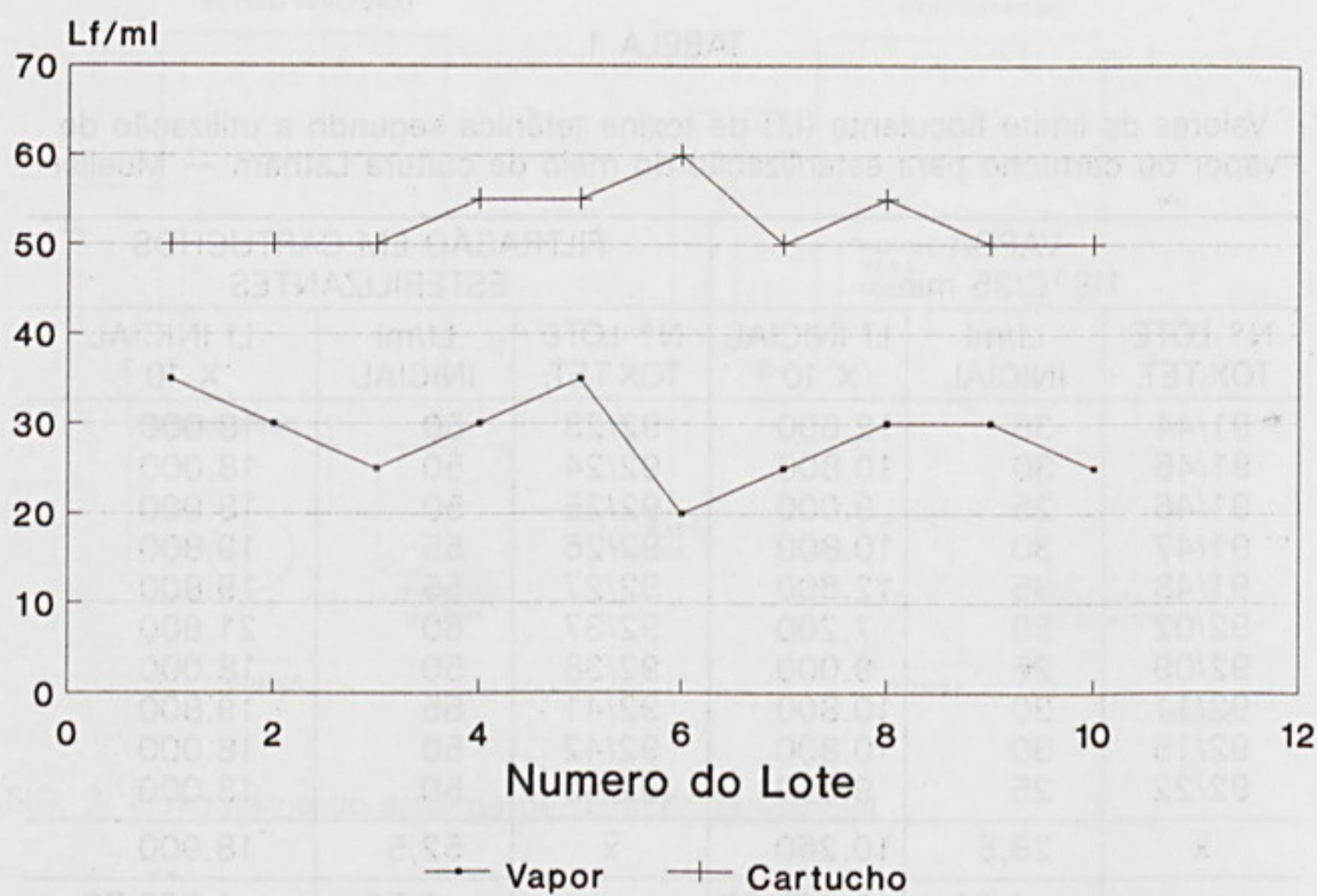


FIG. 3: Processos de esterilização do meio de Müller mod. por Latham

TABELA 3

Valores de rendimento (%) e pureza (Lf/mgNP) de toxina tetânica segundo a utilização de filtração convencional e ultrafiltração molecular com cartuchos de 10.000 NMWL

Nº LOTE TOX.TET.	Lf TOTAL INICIAL $\times 10^{-3}$	FILTRAÇÃO CONVENCIONAL		ULTRAFILTRAÇÃO MOLECULAR		PUREZA Lf/mgNP	PROCESSO TOTAL RENDIMENTO %
		Lf TOTAL $\times 10^{-3}$	RENDIMENTO %	Lf TOTAL $\times 10^{-3}$	RENDIMENTO %		
90/22	10.080	7.000	69,4	5.700	81,4	555,5	50,9
90/31	14.400	10.500	72,9	8.648	82,4	529,4	55,3
90/41	14.400	12.250	85,1	11.000	89,8	389,6	74,9
90/46	10.800	8.750	81	7.600	86,8	197,7	67,8
91/32	10.800	7.000	64,8	6.580	94	736,8	58,8
91/34	14.400	10.500	72,9	9.072	86,4	578,9	59,3
91/35	10.800	8.750	81	7.452	85,2	828	66,2
91/36	9.000	5.250	58,3	5.040	96	233,3	54,3
91/46	9.000	5.250	58,3	4.752	90,5	521	48,8
92/03	14.400	10.500	72,9	8.700	82,9	805,5	55,8
\bar{x}	11.808	8.575	71,66	7.454,4	87,54	537,57	59,21
s	2.325,65	2.398,06	9,24	1.976,53	4,95	218,12	8,15
s^2	5.408.640	5.750.694,4	85,43	3.906.678	24,46	47.576,29	66,38

A introdução do sistema Prostak para filtração tangencial da toxina tetânica associado à U.F. com cartuchos de 10.000 NMWL elevou a média de rendimento para 84,39% incrementando também os índices de pureza que alcançaram uma média de 777,38 Lf/mgNP (Tabela 4).

TABELA 4

Valores de rendimento (%) e pureza (Lf/mgNP) de toxina tetânica segundo a utilização de filtração tangencial e ultrafiltração molecular com cartuchos de 10.000 NMWL

Nº LOTE TOX.TET.	Lf TOTAL INICIAL $\times 10^{-3}$	FILTRAÇÃO TANGENCIAL	ULTRAFILTRAÇÃO MOLECULAR	PROCESSO TOTAL	
		Lf FINAL $\times 10^{-3}$	Lf TOTAL $\times 10^{-3}$	RENDIMENTO %	PUREZA Lf/mgNP
92/06	14.400	14.400	12.300	84,4	1266
92/07	12.600	5.400	4.500	85,7	833,3
92/09	9.000	9.000	6.900	78,8	547,6
92/11	10.800	10.800	10.500	97,2	530,3
92/13	12.600	10.800	10.200	80,9	944,4
92/21	12.600	10.800	10.880	86,3	888
92/22	9.000	9.000	7.680	85,3	960
92/24	18.000	16.200	14.190	78,8	895,8
92/25	18.000	18.000	15.600	86,7	525,2
92/26	19.800	18.000	15.600	78,8	382,3
\bar{x}	13.680	12.240	10.835	84,39	777,38
s	3.813,66	4.225,64	3.725,30	5,60	271,44
s^2	14.544.000	17.856.000	13.877.850	31,4	73.679,18

As tabelas 5 e 6 demonstram os resultados de Análise de Variância para os itens rendimento (%) e pureza (Lf/mgNP), respectivamente, dos processos de filtração convencional e tangencial, quando associados a ultrafiltração molecular com cartuchos de 10.000 NMWL, comprovando, estatisticamente, que os resultados diferem entre si significativamente.

TABELA 5

Análise de Variância para os dados referentes à rendimento (%) para os dados apresentados nas Tabelas 3 e 4

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	810,26	810,26	13,87
Resíduo	18	1.051,44	58,41	
Total	19	1.861,7		

TABELA 6

Análise de Variância para os dados referentes à pureza (Lf/mgNP) para os dados apresentados nas Tabelas 3 e 4.

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	287.544,1	287.544,1	4,74
Resíduo	18	1.091.299,33	60.627,73	
Total	19	1.378.843,43		

A utilização do sistema Prostak no processo de filtração da toxina tetânica quando a mesma era concentrada com cartuchos de 30.000 NMWL, apresentou um rendimento médio de 90,62% (Tabela 7), resultado estatisticamente semelhante ao encontrado quando utilizamos cartuchos de 10.000 NMWL (Tabela 8), como se observa na Fig. 4. O tempo total consumido nesta etapa de produção é de 2 horas.

TABELA 7

Valores de rendimento (%) e pureza (Lf/mgNP) de toxina tetânica segundo a utilização de filtração tangencial e ultrafiltração molecular com cartuchos de 30.000 NMWL

Nº LOTE TOX. TET.	Lf TOTAL INICIAL $\times 10^{-3}$	FILTRAÇÃO TANGENCIAL Lf FINAL $\times 10^{-3}$	ULTRAFILTRAÇÃO MOLECULAR Lf TOTAL $\times 10^{-3}$	PROCESSO TOTAL	
				RENDIMENTO %	PUREZA Lf/mgNP
92/36	10.800	10.800	13.035	120,7	1.208,3
92/37	21.600	19.800	16.640	77	2.363,6
92/38	18.000	14.400	17.100	95	2.400
92/39	10.800	9.000	9.450	87,5	1.333,3
92/40	10.800	10.800	9.900	91,7	1.375
92/41	19.800	16.200	18.400	92,9	1.111,1
92/42	18.000	12.600	14.850	82,5	1.222,2
92/43	18.000	12.600	14.400	80	1.185,2
92/44	16.200	12.600	14.400	88,9	969,7
92/46	7.200	5.400	6.300	90	1.750
\bar{x}	15.120	12.420	13.447,5	90,62	1.491,84
s	4.814,98	3.929,89	3.824,82	12,05	511,52
s^2	23.184.000	15.444.000	14.629.251	145,29	261.652,78

TABELA 8

Análise de Variância para os dados referentes a rendimento (%) para os dados apresentados nas Tabelas 4 e 7

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	194,06	194,06	2,19
Resíduo	18	1.590,23	88,34	
Total	19	1.784,29		

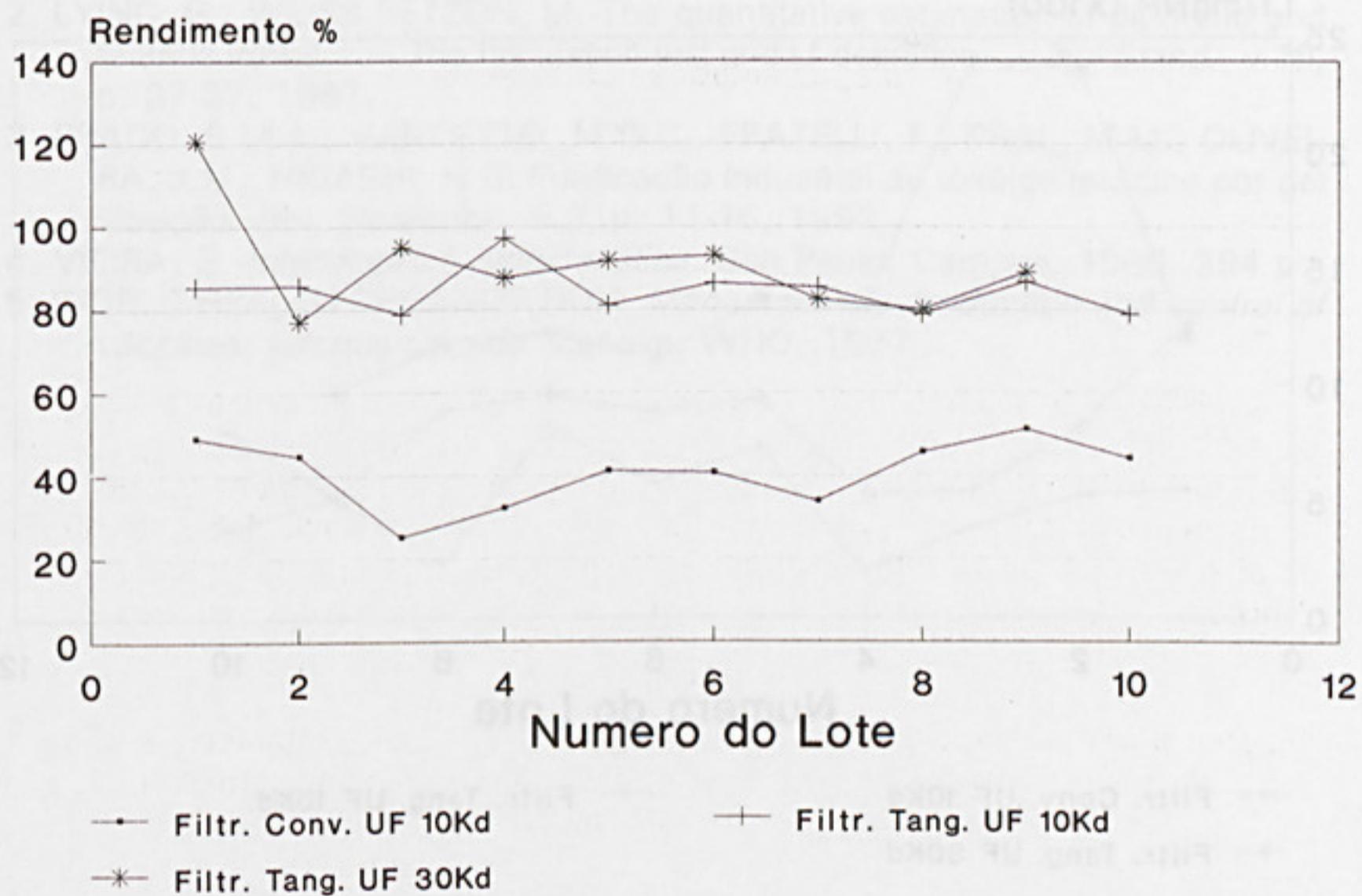


FIG. 4: Índices de Rendimento (%) dos diferentes processos de filtração

Todavia, observa-se estatisticamente que os índices de pureza ($L_f/mgNP$) obtidos quando utilizamos cartuchos de ultrafiltração molecular de 10.000 e 30.000 NMWL, ou seja, 777,38 e 1.491,84 $L_f/mgNP$ (Tabelas 4 e 7) têm valores de F significantes para o nível de rejeição adotado (5%) e para 1 e 18 graus de liberdade (Tabela 9).

TABELA 9

Análise de Variância para os dados referentes à pureza ($L_f/mgNP$) para os dados apresentados nas Tabelas 4 e 7

CAUSA DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	25.698.309,41	25.698.309,41	153,27
Resíduo	18	3.017.980	167.665,53	
Total	19	28.716.297,13		

A Fig. 5 evidencia que os melhores resultados quanto ao grau de pureza ($L_f/mgNP$) foram obtidos quando a toxina foi filtrada pelo sistema de filtração tangencial Prostak e posteriormente concentrada por ultrafiltração molecular com cartuchos de 30.000 NMWL.

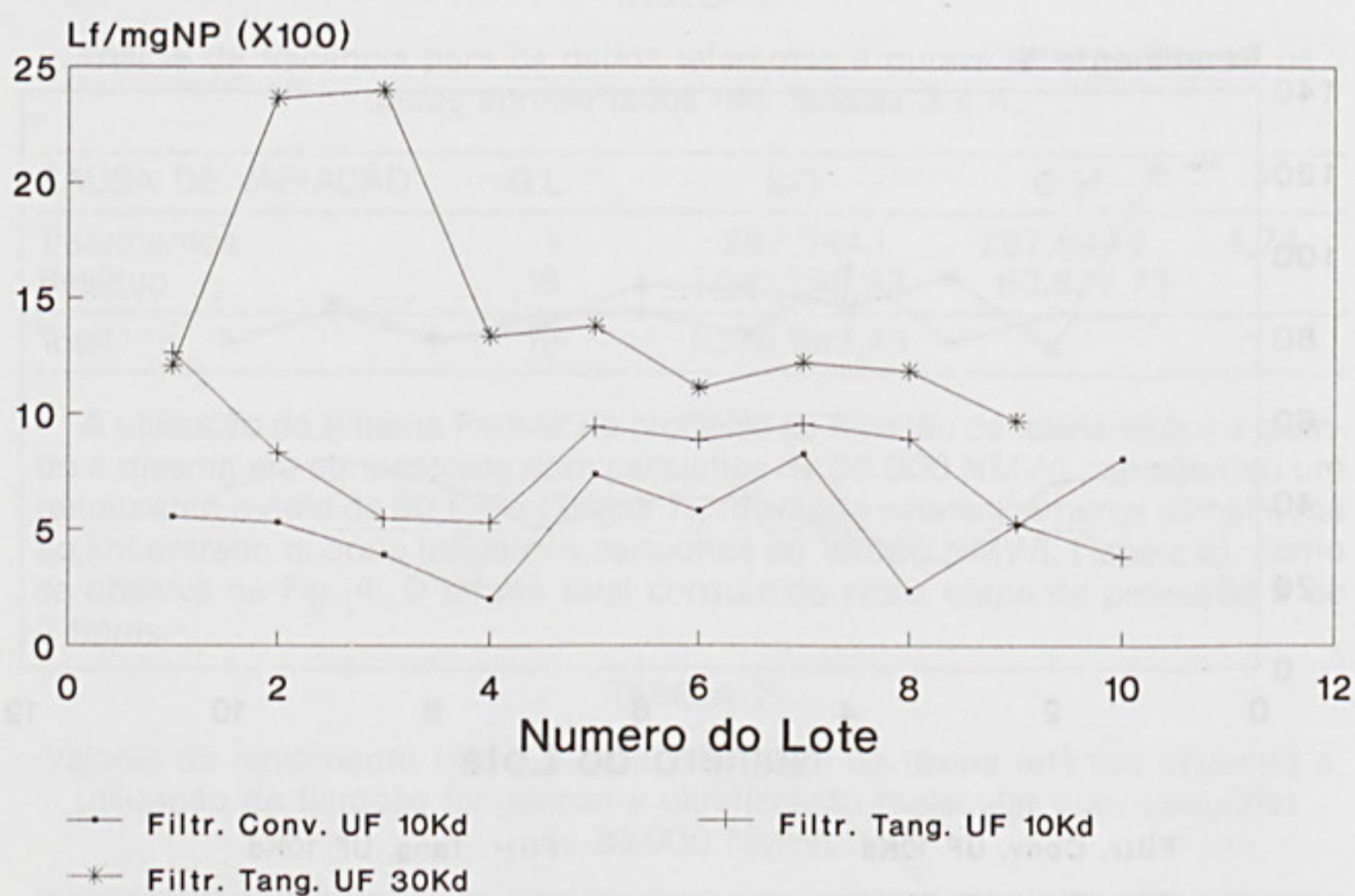


FIG. 5: Índices de Pureza (Lf/mgNP) — Filtração Tangencial

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rosalvo Guidolin pela leitura crítica do texto e sugestões. À Millipore Ind. e Com. Ltda. pelo suporte técnico, e aos funcionários da Seção de Vacinas Anaeróbicas pela colaboração no decorrer do desenvolvimento do presente trabalho.

ABSTRACT: The obtention of a large scale volumes of purified Tetanus Toxin is a fundamental step in order to produce Tetanus Toxoid for human use. It has been shown that the culture medium sterilized by steam under pressure provided insatisfactory results of purity degrees (Lf/mgPN) and percentage yields (%). In order to solve these two problems in production, the culture medium was sterilized by drawing it through a inert membrane cartridge and the final toxin filtered in a Prostak system, connected to a 30Kd molecular ultrafiltration equipment. The new methodology applied had the merit to increase significantly the purity (Lf/mgPN) and the yields (%). This paper presents the tecnology employed and the comparisom of results obtained in the different process studied.

KEYWORDS: Tangencial filtration, esterilization, tetanus toxins, tetanus toxoids.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LATHAM, W.C., BENT, B.F., LEVINE, L. Tetanus toxin production in the absence of protein. *Appl. Microbiol.*, v. 10, p. 146-152, 1962.

FRATELLI, F., PRADO, S.M.A., VANCETTO, M.D.C., OLIVEIRA, J.M. de, HIGASHI, H.G. Toxina tetânica: produção e purificação em escala industrial. *Bol. Biotecnol.*, v.4, p. 19-29, 1993.

2. LYING, G., WEISS BETZON, M. The quantitative estimation of diphtheria and tetanus toxins: I — The flocculation test and Lf-definition. *J. Biol. Stand.*, v. 15, p. 27-37, 1987.
3. PRADO, S.M.A., VANCETTO, M.D.C., FRATELLI, F., PRAL, M.M., OLIVEIRA, J.M., HIGASHI, H.G. Purificação industrial de toxóide tetânico por gel filtração. *Bol. Biotecnol.*, v.3, p. 11-16, 1992.
4. VIEIRA, S. *Introdução à bioestatística*. São Paulo: Campus, 1988. 294 p.
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Manual for the production and control of vaccines: tetanus toxoids*. Geneva: WHO, 1977.

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

Volume 55, 1993

ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX
VOL. 55

ABDALLA, F.M.F.	77,81
ALBAS, A.	71
ANDREONI, A.S.S.	75
ANTONIO, L.C.	80
ASSAKURA, M.T.	71
BALDASSI, L.	59
BARBARO, K.C.	72
BARBI, G.	83
BARBOSA, M.L.	59
BATISTA, M.B.C.	75
B.I.A.S.G.	78,79,85
BIOZZI, G.	77
BRANDI, C.M.W.	76
BRENO, M.C.	72
BRONDUM-NIELSEN, K.	83
BROWN, W.T.	83
BRUNONI, D.	80
CABRERA, W.H.K.	77,81
CALIL, E.M.B.	59
CAMPOS, M.M.C.	75
CAMPOS, V.A.F.P. de	19
CARDOSO, J.L.C.	72,76
CARICATI, C.P.	9
CARMONA, E.	80,83
CARNEIRO, S.M.	73
CARPENTER, N.J.	83
CASTRO, N.H.C.	82
CHAGURI, L.	27,53
CHUDLEY, A.E.	83
CORBANI, M.	80
COSTA, E.M.	80
COSTA ROSA, L.F.B.P.	73
COUDERC, J.	81
CURI, R.	73
CURY, Y.	73,74
DAIMON, T.	82
DAMY, S.B.	27,53,74
DECREEUSEFOND, C.	77
DIAS DA SILVA, W.D.	9,79,85
DORCE, V.A.C.	5,74
DOS-SANTOS, M.C.	74
EICHMANN, K.	79
EICKSTEDT, V.R.D. von	19,72
ENTRES, M.	19
FAN, H.W.	85
FARIAS, E.C.	33
FERRAZ, O.P.	82,83
FERREIRA, L.A.F.	75
FERREIRA, M.L.	76
FERREIRA, P.	83
FERREIRA, V.R.F.	41
FORTES-DIAS, C.L.	74

FRANÇA, F.O.S.	76,78
FRANCINI, F.	11
FRANCO, M. de	77
FRATELLI, F.	3,19,82
FRAZATTI GALLINA, N.M.	71
FURTADO, M. de F.	71,74
GERVITZ, R.K.	76
GHIURO VALENTINI, E.J.	71
GIOIELLI, M.L.R.	82
GOLLOP, T.R.	82
GONÇALVES, L.R.C.	74
GRISOLIA, C.S.	11
GUIDOLIN, R.	9
GUSTAVSON, K-H.	83
GUTIÉRREZ, J.M.	74
HABERMELH, G.G.	75
HALLIDAY, J.	83
HANDAR, Z.	19
HAY, C.R.M.	78
HENRIQUES, O.B.	75
HENRIQUES, S.B.	85
HIGASHI, H.G.	3,9,19,85
HIPÓLITO, M.	59
HIRAICHI, E.	77,81
HO, P.L.	77
HOCKEY, A.	83
HOWARD-PEEBLES, P.N.	83
IBANEZ, O.M.	77,81
ISHII, H.	78
JANEIRO - CINQUINI, T.R.F.	33
JENKINS, E.	83
JORGE, M.T.	19,78
JULIANO, L.	80
KAHKONEN, M.	83
KAMIGUTI, A.S.	78,80
KENNERKNECHT, I.	83
KISIELIUS, J.J.	73
KNOLSAISEN, J.F.	19
KUHN, L.	79
LADAIQUE, P.	83
LAING, G.D.	79
LANGLADA, F.G. de	41
LEBRUN, I.	75
LEDERMAN, H.M.	80
LEFKOVITS, I.	79
LEINZ, F.F.	33
LEISTI, J.	83
LEITE, R.P.	79
LUCCHIARI, M.A.	74,79
MACEDO, M.S.	84
MADDALENA, A.	83
MANDELBAUM, F.R.	71
MARUYAMA, M.	80
MASSA, S.	77
MATHIAS, S. de J.D.	3

MATTEI, J.F.	83
MATTINA, T.	83
MAVRIDIS, S.C.	59
MAZURCZAK, T.	83
MCKINLEY, M.J.	83
MEIRELLES, M.N.L.	80
MELARAGNO, M.I.	80
MENDES, I.F.	85
MENDONÇA, R.M.Z.	71
MENDONÇA, R.Z.	13
MIHARA, H.	80
MIYAKI, C.	85
MODOLELL, M.	79
MONTEIRO, S.H.C.	76
MORAES, V.L.G. de	75
MORAIS, J.F.	9
MOTA, I.	72,76,84
MOULIN, A.A.P.	59
MOURA-DA-SILVA, A.M.	76
MOURÃO FUCHES, R.M.	71
MOUTON, D.	77,81
MURPHY, P.	83
MURTA, A.C.M.	80
MUSTACCHI, Z.	80,82
OLIVEIRA, E.P. de	81
OLIVEIRA, J.M. de	3
OOST, B.A. von	83
PAGNAN, N.A.B.	82
PALERMO-NETO, J.	74
PATRÍCIO, F.R. da S.	80
PELLISSIER, M.C.	83
PELUSO, F.O.	11
PEREIRA, C.A.	13,74,79
PETRICEVICH, V.L.	41
PICARELLI, Z.P.	72,76,77,81,83,86
PRADO, S.M.A.	3,19
PREZOTO, B.C.	75,81
PUORTO, G.	71
PURVIS-SMITH, S.	83
RAW, I.	77
REIS, M.H.	81
RIBEIRO, L.A.	19,78
RIBEIRO, O.G.	77,81
RIZZO, E. de	85
ROBINSON, H.	83
ROCHA DA SILVA, A.P.	27
RODRIGUES, M.T.A.	82
RODRIGUES, U.P.	27,53
RUBIO, G.B.G.	19
RUGMAN, F.P.	78
SAFI, D.A.	73
SAITO, T.	82
SALOMÃO, L.C.	86
SALOMÃO, M.G.	71
SANDOVAL, M.R.L.	5,74

SANO-MARTINS, I.S.	82
SANT'ANNA, O.A.	74,77
SANTOS, R. de C.S. dos	80,82
SCAPAGNINI, U.	83
SCHAAP, T.	83
SCHARFSTEIN, J.	80
SCHIRIPA, L.N.	77,83
SELIGMAN, R	65
SESSO, A.	73
SHAPIRO, L.R.	83
SHERMAN, S.L.	83
SILVA, S.G.	80
SILVEIRA, P.F.	83
SIQUEIRA, M.	77,81
SMITS, A.P.T.	83
SOARES, M.F.M.	84
SOGORB S., F	27,53
SOUSA, M. de	41
STANCHI, N.O.	11
STEINBACH, P.	83
STIFFEL, C.	77
SUGIKI, M.	80
TANAKA, H.	73
TANISAKI, M.M.	81
THEAKSTON, R.D.G.	78,79,85
TIMENETSKY, J.	85
TOMY, S.C.	80
TURNER, G.	83
UCHIDA, I.A.	83
VANCETTO, M.D.C	3,19
VASSÃO, R.C.	74
VIEIRA, E.G.J.	85
VITAL, G.R.F.	75
VOELCKEL, M.A.	83
WALTER-MOURA, J.	82
WARD, S.A.	85
WARRELL, D.A.	79,85
WEAVER, D.D.	83
WEBB, T.	83
WOE FANG, F.L.	71
YAMAGUSHI, I.K.	9
YAMANOUYE, N	77,86
ZELNIK, R.	75

CONTEÚDO/CONTENTS Volume 55 1993

Nº 1

The envenomation by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat: age and sex influence.

Efeitos do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*: influência do sexo e da idade.

Maria Regina L. SANDOVAL, Valquiria A.C. DORCE 5

Influencia de la temperatura sobre la digestión en *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae).

Influence of temperature on digestion in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae).

Flavia FRANCINI, Carlos S. GRISOLIA, Nestor O. STANCHI, Fabio O. PELUSO 11

Epidemiología do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* (Heinecken & Lowe) no Estado do Paraná (Brasil).

Accidents by spiders of the genus *Loxosceles* (Heinecken & Lowe) in the Paraná state, Brazil: epidemiologic data.

Lindioneza A. RIBEIRO, Vera Regina D. von EICKSTEDT, Gisélia B.G. RUBIO, José F. KNOLSAISEN, Zuhrer HANDAR, Marlene ENTRES, Vera A. Fischer Pires de CAMPOS, Miguel Tanús JORGE 19

Diagnosis and treatment of acariasis in mice.

Diagnóstico e tratamento de acaríase em camundongos.

Fernando SOGORB S., Sueli Blanes DAMY, Ana Paula ROCHA DA SILVA, Ubimara Pereira RODRIGUES, Luziani CHAGURI 27

Ovarian cycle of the snake *Bothrops jararaca*.

Ciclo ovariano de serpentes *Bothrops jararaca*.

Thélia R.F. JANEIRO-CINQUINI, Frederico F. LEINZ, Eduardo C. FARIAS 33

BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA 1

Otimização do processo de purificação industrial de toxoide tetânico por gel filtração.

Improvement in the industrial purification of tetanus toxoid by gel filtration.

Sally M.A. PRADO, Mary D.C. VANCETTO, José M. de OLIVEIRA, Fernando FRATELLI, Sandra de J.D. MATHIAS, Hisako G. HIGASHI 3

Esquema de hiperimunização eqüina mais conveniente à produção de plasma antiveneno Botrópico-Crotálico.

A more suitable equine hyperimmunization schedule for antivenom Bothrops-Crotalus plasma production.

Celso P. CARICATI, Rosalvo GUIDOLIN, Ivone K. YAMAGUSHI, Josefina F. MORAIS, Wilmar DIAS DA SILVA, Hisako G. HIGASHI 9

BHK cellgrowth on microcarriers in a bioreactor.

Crescimento de células BHK em microcarregadores utilizando bioreactores.

Ronaldo Z. MENDONÇA, Carlos A. PEREIRA 13

Nº 2

Criação de camundongos "nude".

Nude mice breeding.

V.L. PETRICEVICH, V.R.F. FERREIRA, M. de SOUSA, F.G. de LANGLADA

41

Efeitos comparados da suplementação alimentar em coelhos durante os períodos de lactação e crescimento.

Comparative effects of supplemented feeding in rabbits during lactation and growing periods.

F. SOGORB S., U.P. RODRIGUES, S.B. DAMY, L. CHAGURI

53

Estudo da microbiota aeróbica de serpentes *Bothrops* sp. (Serpentes, Viperidae), recém-capturadas.

Study of aerobic microbiota of recently captured snakes *Bothrops* sp. (Serpentes, Viperidae).

S.C. MAVRIDIS, M. HIPÓLITO, L. BALDASSI, A.A.P. MOULIN, E.M.B. CALIL, M.L. BARBOSA

59

Acidente por *Micrurus frontalis*: primeiro relato de envenenamento elapídico no Rio Grande do Sul.

Accident by *Micrurus frontalis*: the first description of an elapidic envenomation in Rio Grande do Sul.

R. SELIGMAN

65

COLETÂNEA DE RESUMOS DE TRABALHOS PUBLICADOS PELOS PESQUISADORES DO INSTITUTO BUTANTAN (1992)

71

BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA

17

Toxina tetânica: produção e purificação em escala industrial.

Tetanus toxin: production and purification in large scale.

F. FRATELLI, S.M.A. PRADO, M.D.C. VANCETTO, H.G. HIGASHI

19

ÍNDICE do v. 55

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. Somente serão aceitos trabalhos inéditos e que se destinem exclusivamente à revista. É proibida a reprodução com fins lucrativos. Os artigos de revisão serão publicados a convite da Comissão Editorial.
2. Os trabalhos deverão ser redigidos em português, inglês ou francês, datilografados preferencialmente em máquina elétrica, em espaço duplo em 3 (três) vias, em papel formato ofício e numerados no ângulo superior direito.
3. No preparo do original será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura: **Página de rosto:** título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e filiação científica. **Texto:** introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referência bibliográfica. **Material de referência:** resumos (em português e inglês); **unitermos:** palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo; devem ser incluídas até um limite máximo de três, em português e inglês.
4. As referências bibliográficas deverão ser ordenadas alfabeticamente e numeradas.

Exemplos:

Para livros: autor, título, edição, local de publicação, editor, ano, páginas.

7. BIER, O. *Microbiologia e imunologia*. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234 p.

Para artigos: autor, título do artigo, título do periódico, volume, página inicial e final, ano.

8. MACHADO, J.C., SILVEIRA Fº, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. *Mem. Inst. Butantan*, v. 40/41, p. 1-9, 1976/77.

As citações no texto devem ser por números-índices correspondentes às respectivas referências bibliográficas.

Exemplos:

...método derivado de simplificação de armadilha de Disney¹

...segundo vários autores^{2,3,4}

5. As ilustrações (fotos, tabelas, gráficos, etc.) deverão ser originais e acompanhadas de legendas explicativas. As legendas serão numeradas e reunidas em folha à parte. Os desenhos deverão ser a nanquim e as fotografias bem nítidas, trazendo no verso o nome do autor e a indicação numérica da ordem a ser obedecida no texto. As ilustrações deverão ser organizadas de modo a permitir sua reprodução dentro da mancha da revista (22 x 12,5cm).
6. Os artigos deverão conter no máximo 6 (seis) ilustrações (em branco e preto).
7. Os textos originais não serão devolvidos e os originais das ilustrações estarão à disposição dos autores.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. Manuscripts submitted to the Editorial Board should be unpublished texts and should not be under consideration for publication elsewhere. Reproduction for commercial purposes is not allowed. The Editorial Board will plan the publication of revision articles.
2. The original and two copies of papers should be typewritten in Portuguese, English or French, double spaced, on typing paper (31x21cm). Pages should be numbered consecutively at the upper right corner.
3. The following structure should be considered in the preparation of the manuscript: **Title page:** with article title, name of author(s), professional address. **Text:** with introduction, material and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments, references, abstracts (in Portuguese and English), and keywords. A maximal number of 03 keywords should be included in Portuguese and English.
4. References in alphabetical order should be numbered consecutively.

Examples:

Books:

7. BIER, O. *Microbiologia e imunologia*. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234 p.

Articles:

8. MACHADO,J.C., SILVEIRA Fº, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. *Mem. Inst. Butantan*, v. 40/41, p. 1-9, 1976/77.

Citations in the text should be identified by the reference number.

Examples:

...método derivado de simplificação de armadilha de Disney¹

...segundo vários autores^{2,3,4}

5. Illustrations (photographs, tables, figures etc.) should be the originals and legends should be submitted typewritten on a separate sheet. Line-drawings should be with China ink and photographs must be of top quality. On the back of each figure of photograph the name of the author(s) should be lightly written and the number indicating the sequence in the text. Illustrations should fit in a page measuring 22 x 12,5cm.
6. No more than 6 illustrations will be accepted and photographs should be black and white.
7. Submitted manuscripts will not be returned to the author(s) but the original illustrations are available to author(s) by request.

ISSN 0073 — 9901



IMPRENSA OFICIAL
DO ESTADO S.A. IMESP
SÃO PAULO - BRASIL
1994



GOVERNO DE SÃO PAULO
CONSTRUINDO UM FUTURO MELHOR