

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO IMUNOQUÍMICO DE VENENOS BOTRÓPICOS

III. Análise dos componentes antigênicos comuns através da dupla difusão em gel de ágar.

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

RESUMO: A análise dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos botrópicos e as suas respectivas identidades imunológicas, através da técnica de dupla difusão em gel de ágar, permitiu aos autores verificarem que os venenos das espécies *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. insularis* e *B. cotiara*, apresentam um maior número de componentes imunogênicos em comum e, a maioria, com identidade completa. Por outro lado, os venenos das espécies *B. jararacussu* e *B. moojeni* apresentam, em relação aos quatro venenos citados, menor número de componentes imunogênicos em comum, possuindo, porém, maior número de linhas indicativas com identidade completa entre si. Tais observações permitiram concluir a existência de dois grupos imunologicamente distintos, entre os seis venenos estudados.

UNITERMOS: Venenos botrópicos; dupla difusão em gel de ágar de venenos botrópicos; componentes imunogênicos comuns em venenos botrópicos.

INTRODUÇÃO

Em trabalho anterior, Siles Villarroel e col.¹⁰ (1974 b), utilizando das técnicas de dupla difusão e imunoelétroforese em gel de ágar, estabeleceram comparações entre o veneno de *B. jararaca* e os venenos das espécies *B. alternatus*, *B. insularis*, *B. cotiara*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*. Concluíram, então, que o veneno da espécie *B. alternatus* era, dentre os venenos testados, aquele que apresentava um maior número de componentes antigênicos comuns ao veneno de *B. jararaca*, ao passo que o veneno da espécie *B. jararacussu* era aquele que apresentava um menor número desses componentes.

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

** Professor Catedrático do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas e atual Diretor do mesmo Instituto.

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

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

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

Naquela oportunidade, os autores citados destacaram, em sua introdução, que "inexistem na literatura consultada, trabalhos que estabeleçam uma análise comparativa entre os resultados observados com os venenos botrópicos", pois, conforme esclareceram os trabalhos realizados pelos diversos autores^{4, 5, 6, 7}, somente objetivaram uma análise individual entre seus componentes.

Pelo presente trabalho, no qual é utilizada a técnica de Ouchterlony^{2, 3} (1948, 1949), os autores se propõem a realizar um estudo comparativo entre os seis venenos botrópicos e seus respectivos antivenenos, procurando estabelecer os componentes antigênicos comuns e suas respectivas identidades imunológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizados os mesmos materiais e os mesmos métodos já descritos em trabalhos anteriores^{9, 10}, necessários à realização da técnica de dupla difusão em gel de ágar, em lâminas de microscopia comum. Cada série experimental era constituída pelas reações realizadas entre um dado veneno e o seu respectivo antiveneno frente aos demais venenos estudados.

Consideramos ainda ser necessário acrescentar que:

- 1) foram utilizadas soluções a 2% dos seguintes venenos: *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. insularis*, *B. cotiara*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*;
- 2) foram utilizados os antivenenos específicos purificados, dos quais 1,0 ml neutralizava 4 mg de veneno;
- 3) em todas as reações, foi padronizada a colocação do antiveneno na perfuração inferior; no orifício superior esquerdo foi colocada a solução de veneno específico e o orifício superior direito recebia a solução do veneno não específico. O volume das soluções de veneno e dos antivenenos depositados nos orifícios era sempre de 0,02 ml.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados obtidos e sumarizados pelas tabelas 1, 2, 3, 4 e 5, correspondem às reações de dupla difusão em gel de ágar a que foram submetidos os seis venenos botrópicos combinados entre si dois a dois, frente aos vários antivenenos. A utilização desta metodologia permitiu demonstrar o número de componentes antigênicos comuns entre dois venenos, bem como determinar as suas identidades imunológicas.

A tabela 1, que corresponde aos resultados das reações entre o antiveneno de *B. alternatus* frente ao veneno específico e frente aos demais venenos estudados, demonstra que as peçonhas de *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. cotiara* são os que apresentam um maior número de componentes antigênicos em comum e um maior número de componentes com identidade completa com o veneno de *B. alternatus*, ao passo que os venenos de *B. jararacussu* e *B. moojeni* são os

TABELA 1

RESULTADOS DAS REAÇÕES DE DUPLA DIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR, ENTRE O VENENO DE *B. ALTERNATUS* FRETE AO RESPECTIVO ANTIVENENO E OS DEMAIS VENENOS BOTRÓPICOS ESTUDADOS.

Lâminas demonstrativas	Nº de linhas obtidas na reação específica (veneno e antiveneno de <i>B. alternatus</i>)	Venenos comparados frente ao antiveneno de <i>B. alternatus</i>	Nº de linhas obtidas na reação não específica	Identidades antigenéticas		
				Identidade completa	Identidade parcial	Falta de identidade
C-29	9	<i>B. jararaca</i>	9	6	2	1
C-25	9	<i>B. insularis</i>	8	5	2	1
C-95	9	<i>B. cotiara</i>	9	6	2	1
C-47	9	<i>B. jararacussu</i>	7	1	5	1
C-19	9	<i>B. moojeni</i>	6	1	5	—

Fotografias ilustrativas das reações de dupla difusão em gel de ágar, realizadas em lâminas, entre o antiveneno de *B. alternatus* e os vários venenos estudados (Tabela 1).

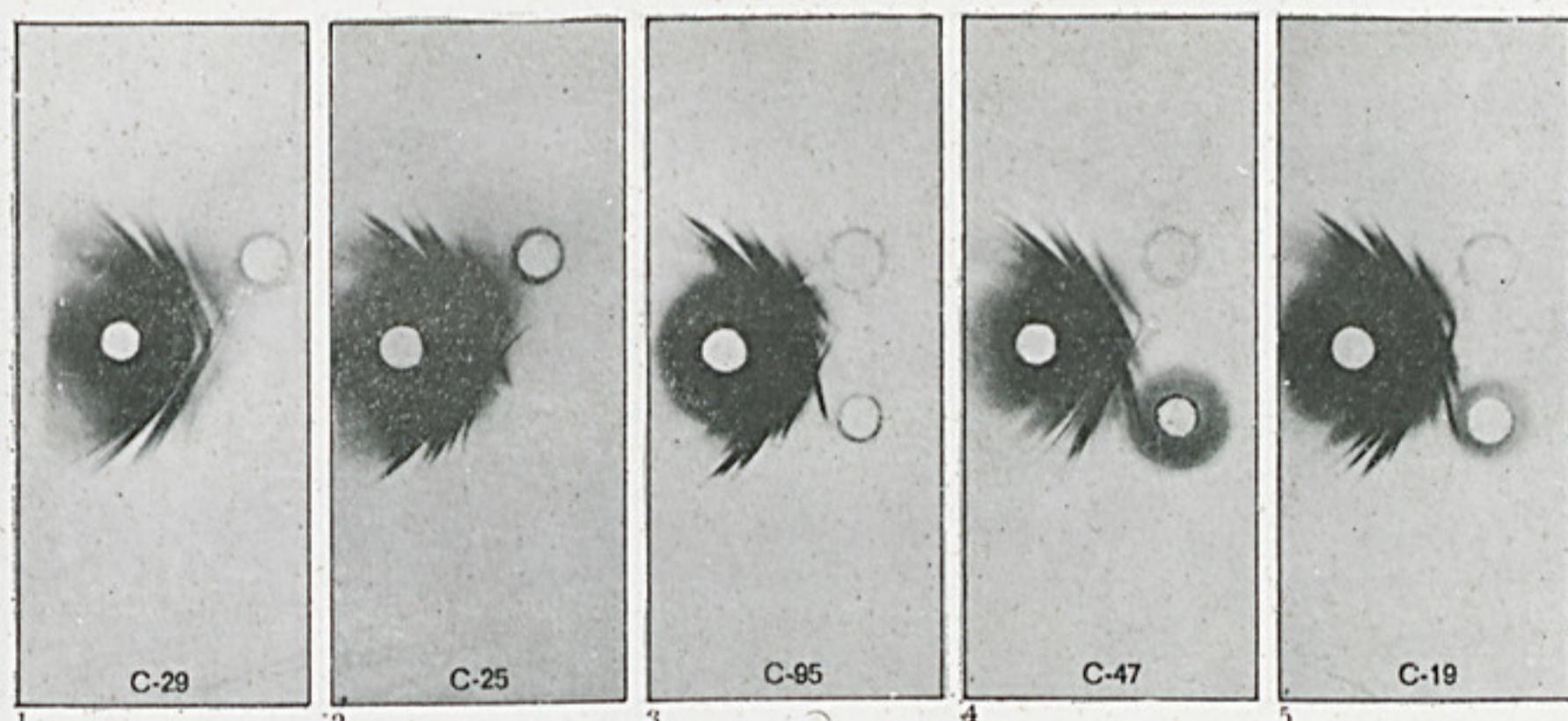


Fig. 1 — Lâmina nº C-29. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. alternatus* e os venenos de *B. alternatus* e *B. jararaca*.

Fig. 2 — Lâmina nº C-25. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. alternatus* e os venenos de *B. alternatus* e *B. insularis*.

Fig. 3 — Lâmina nº C-95. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. alternatus* e os venenos de *B. alternatus* e *B. cotiara*.

Fig. 4 — Lâmina nº C-47. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. alternatus* e os venenos de *B. alternatus* e *B. jararacussu*.

Fig. 5 — Lâmina nº C-19. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. alternatus* e os venenos de *B. alternatus* e *B. moojeni*.

TABELA 2

RESULTADOS DAS REAÇÕES DE DUPLA DIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR, ENTRE O VENENO DE *B. INSULARIS* FREnte AO RESPECTIVO ANTI-VENENO E AOS DEMAIS VENENOS BOTRÓPICOS ESTUDADOS.

Lâminas demonstrativas	Nº de linhas obtidas na reação específica (veneno e antiveneno de <i>B. insularis</i>)	Venenos comparados frente ao antiveneno de <i>B. insularis</i>	Nº de linhas obtidas na reação não específica	Identidades antigenicas		
				Identidade completa	Identidade parcial	Falta de identidade
C-14	9	<i>B. jararaca</i>	8	6	1	1
C-34	9	<i>B. alternatus</i>	7	5	2	—
C-40	9	<i>B. cotiara</i>	6	4	1	1
C-33	9	<i>B. jararacussu</i>	6	2	4	—
C-7	9	<i>B. moojeni</i>	6	2	3	1

Fotografias ilustrativas das reações de dupla difusão em gel de ágar, realizado em lâmina, entre o antiveneno de *B. insularis* e os vários venenos estudados (Tabela 2).

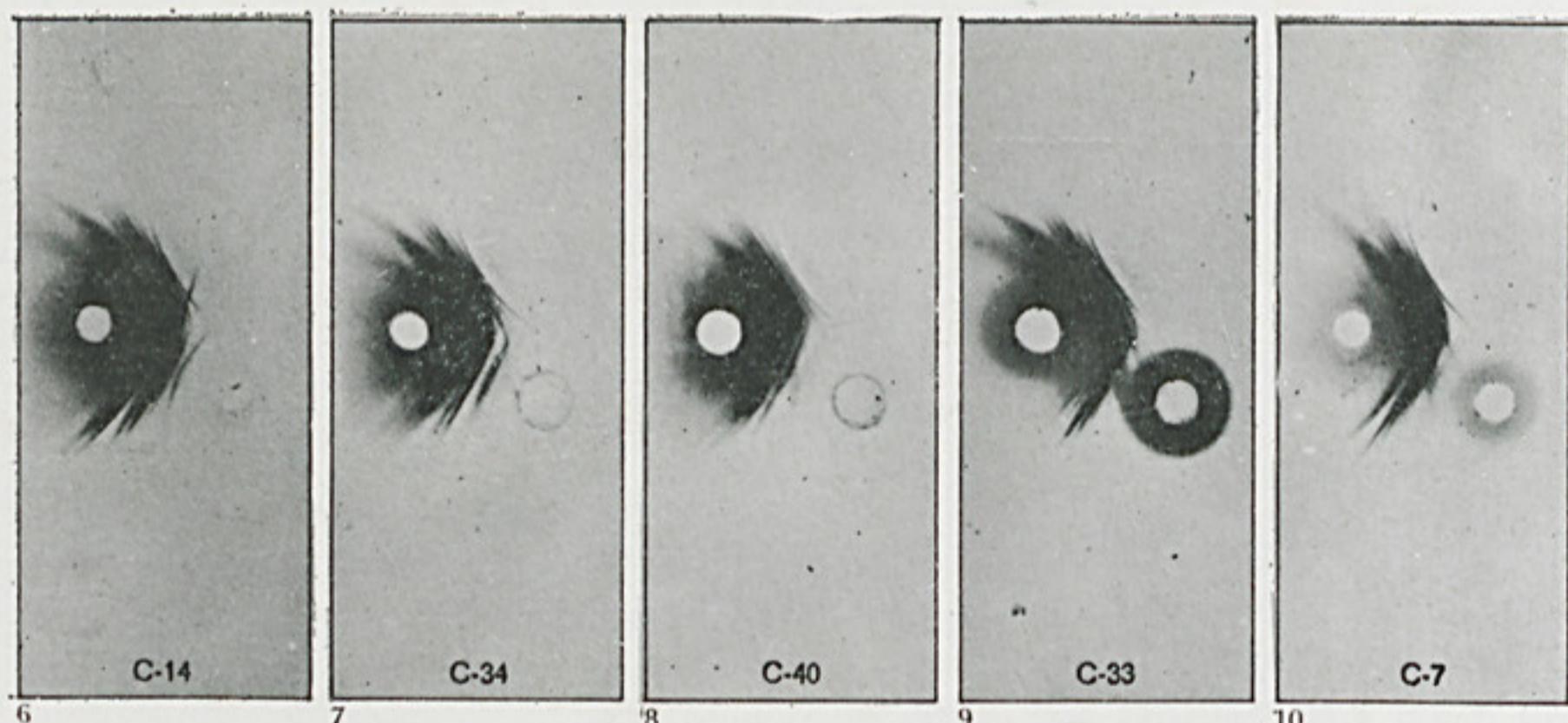


Fig. 6 — Lâmina nº C-14. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. insularis* e os venenos de *B. insularis* e *B. jararaca*.

Fig. 7 — Lâmina nº C-34. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. insularis* e os venenos de *B. insularis* e *B. alternatus*.

Fig. 8 — Lâmina nº C-40. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. insularis* e os venenos de *B. insularis* e *B. cotiara*.

Fig. 9 — Lâmina nº C-33. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. insularis* e os venenos de *B. insularis* e *B. jararacussu*.

Fig. 10 — Lâmina nº C-7. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. insularis* e os venenos de *B. insularis* e *B. moojeni*.

TABELA 3

RESULTADOS DAS REAÇÕES DE DUPLA DIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR, ENTRE O VENENO DE *B. COTIARA* FRENTE AO RESPECTIVO ANTI-VENENO E AOS DEMAIS VENENOS BOTRÓPICOS ESTUDADOS.

Lâminas demonstrativas	Nº de linhas obtidas na reação específica (veneno e antiveneno de <i>B. cotiara</i>)	Venenos comparados frente ao antiveneno de <i>B. cotiara</i>	Nº de linhas obtidas na reação não específica	Identidades antigenicas		
				Identidade completa	Identidade parcial	Falta de identidade
C-98	9	<i>B. jararaca</i>	8	6	—	2
C-56	9	<i>B. alternatus</i>	9	5	3	1
C-6	9	<i>B. insularis</i>	6	4	1	1
C-100	9	<i>B. jararacussu</i>	5	2	3	—
C-74	9	<i>B. moojeni</i>	7	2	4	1

Fotografias ilustrativas das reações de dupla difusão em gel de ágar, realizadas em lâmina, entre o antiveneno de *B. cotiara* e os vários venenos estudados (Tabela 3).

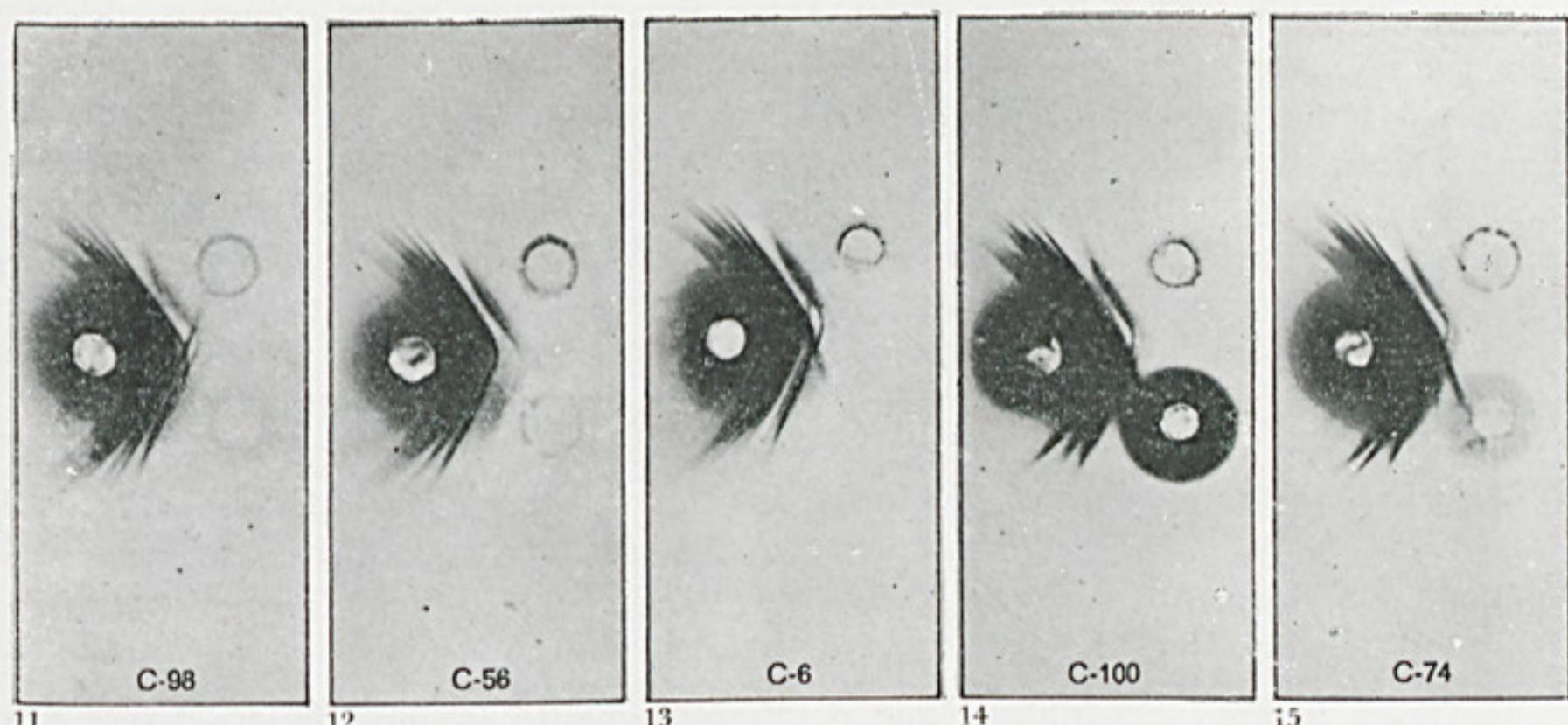


Fig. 11 — Lâmina nº C-98. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. cotiara* e os venenos de *B. cotiara* e *B. jararaca*.

Fig. 12 — Lâmina nº C-56. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. cotiara* e os venenos de *B. cotiara* e *B. alternatus*.

Fig. 13 — Lâmina nº C-6. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. cotiara* e os venenos de *B. cotiara* e *B. insularis*.

Fig. 14 — Lâmina nº C-100. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. cotiara* e os venenos de *B. cotiara* e *B. jararacussu*.

Fig. 15 — Lâmina nº C-74. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. cotiara* e os venenos de *B. cotiara* e *B. moojeni*.

que possuem um menor número de componentes em comum e, destes, somente um pode ser considerado como tendo identidade completa com o veneno de *B. alternatus*.

As tabelas 2 e 3, relativas às reações entre os antivenenos e os venenos de *B. insularis* e *B. cotiara* combinadas com os demais venenos, apresentam as mesmas características reacionais daquelas observadas na tabela 1. Dessa forma, podemos, a "priori", estabelecer serem os venenos das espécies *B. alternatus*, *B. insularis* e *B. cotiara* os que mais se aproximam antigenicamente ao veneno da espécie *B. jararaca*.

As tabelas 4 e 5, que sumarizam os resultados observados quando das reações em que participam venenos e os antivenenos de *B. jararacussu* e *B. moojeni* comparados com as demais peçonhas, notamos uma inversão das características anteriormente observadas. Somente o veneno da espécie *B. moojeni* pode ser considerado como antigenicamente mais próximo ao da espécie *B. jararacussu*, pois, dos oito componentes antigenéticos em comum, cinco apresentaram identidade completa (tabela 4). O mesmo pode-se observar na tabela 5, quando da reação do veneno e do antiveneno de *B. moojeni*, em comparação ao veneno de *B. jararacussu*; neste caso, dos oito componentes comuns, quatro foram por nós considerados como possuindo identidade completa.

Embora estas observações, associadas às de Siles Villarroel e col.¹⁰ (1974b) reflitam os resultados obtidos apenas em relação a seis venenos botrópicos, as serpentes correspondentes são as mais freqüentes entre nós, com exceção da espécie *B. insularis* que é segregada, pois ocorre somente na ilha de Queimada Grande, no litoral do Estado de São Paulo¹.

A análise comparativa das tabelas 1, 2, 3, 4 e 5, autoriza-nos a admitir a existência, no gênero *Bothrops*, de dois grupos com características imunogênicas distintas. O primeiro deles seria representado pelos venenos de *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. insularis* e *B. cotiara*, entre os quais pode ser observada u'a maior aproximação, por apresentarem um maior número de componentes antigenéticos comuns e maior número de componentes com identidade completa; o segundo grupo é representado pelos venenos *B. jararacussu* e *B. moojeni*, que guardam entre si uma estreita relação imunogênica, com características próprias que os afastam do primeiro grupo. Tais verificações, vieram a confirmar as observações de Siles Villarroel e col.⁸ (1973), pois o número de frações eletroforéticas e os respectivos eletroferogramas já determinados para os mesmos venenos, permitiram antever estes dois grupos. Também Hoge*, de acordo com seus estudos da sistemática dessas serpentes, acredita na existência dessa separação. A imunoelétroforese desses mesmos venenos, posteriormente realizada⁹, reforçou ainda mais aquelas observações iniciais que, agora, foram definitivamente estabelecidas.

Dessa forma, acreditamos que o comportamento imunoquímico desses venenos, anteriormente demonstrado^{9, 10}, associado aos atuais resultados, possam constituir-se em valioso recurso utilizável em estudos taxonômicos, para a classificação de espécies de serpentes, principalmente as do gênero *Bothrops*. Estamos também inclinados a admitir da possibilidade de serem utilizados somente dois venenos na mistura imunogênica para a produção do antiveneno botrópico

* Hoge, A. R. — Informe pessoal.

TABELA 4

RESULTADOS DAS REAÇÕES DE DUPLA DIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR, ENTRE O VENENO DE *B. JARARACUSSU* FREnte AO RESPECTIVO ANTIVENENO E AOS DEMAIS VENENOS BOTRÓPICOS ESTUDADOS.

Lâminas demonstrativas	Nº de linhas obtidas na reação específica (veneno e antiveneno de <i>B. jararacussu</i>)	Venenos comparados frente ao antiveneno de <i>B. jararacussu</i>	Nº de linhas obtidas na reação não específica	Identidades antigenicas		
				Identidade completa	Identidade parcial	Falta de identidade
C-88	10	<i>B. jararaca</i>	7	1	3	3
C-18	10	<i>B. alternatus</i>	7	—	5	2
C-24	10	<i>B. insularis</i>	7	2	3	2
C-38	10	<i>B. cotiara</i>	5	—	2	3
C-84	10	<i>B. moojeni</i>	8	5	1	2

Fotografias ilustrativas das reações de dupla difusão em gel de ágar, realizadas em lâmina, entre o antiveneno de *B. jararacussu* e os vários venenos estudados (Tabela 4).

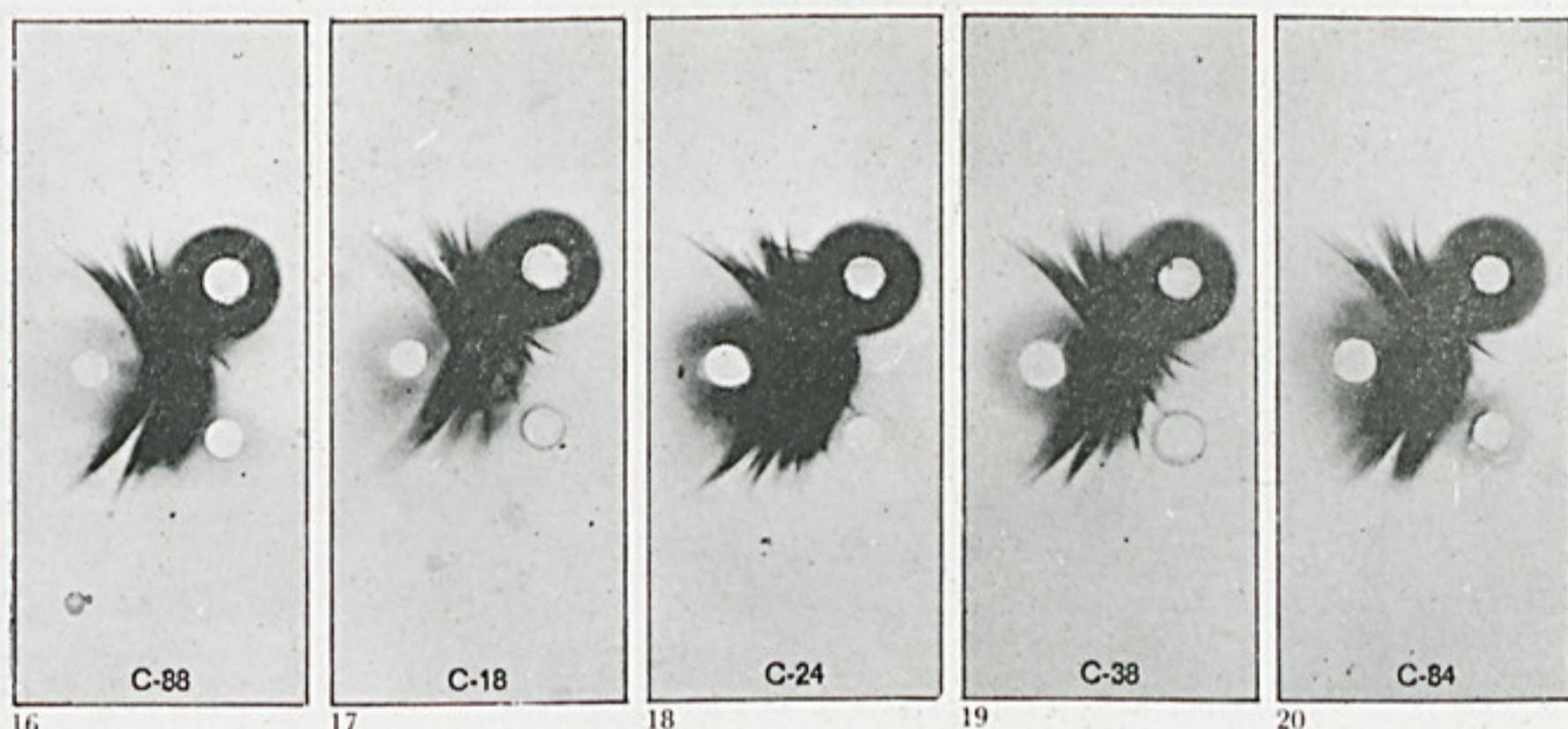


Fig. 16 — Lâmina nº C-88. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. jararacussu* e os venenos de *B. jararacussu* e *B. jararaca*.

Fig. 17 — Lâmina nº C-18. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. jararacussu* e os venenos de *B. jararacussu* e *B. alternatus*.

Fig. 18 — Lâmina nº C-24. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. jararacussu* e os venenos de *B. jararacussu* e *B. insularis*.

Fig. 19 — Lâmina nº C-38. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. jararacussu* e os venenos de *B. jararacussu* e *B. cotiara*.

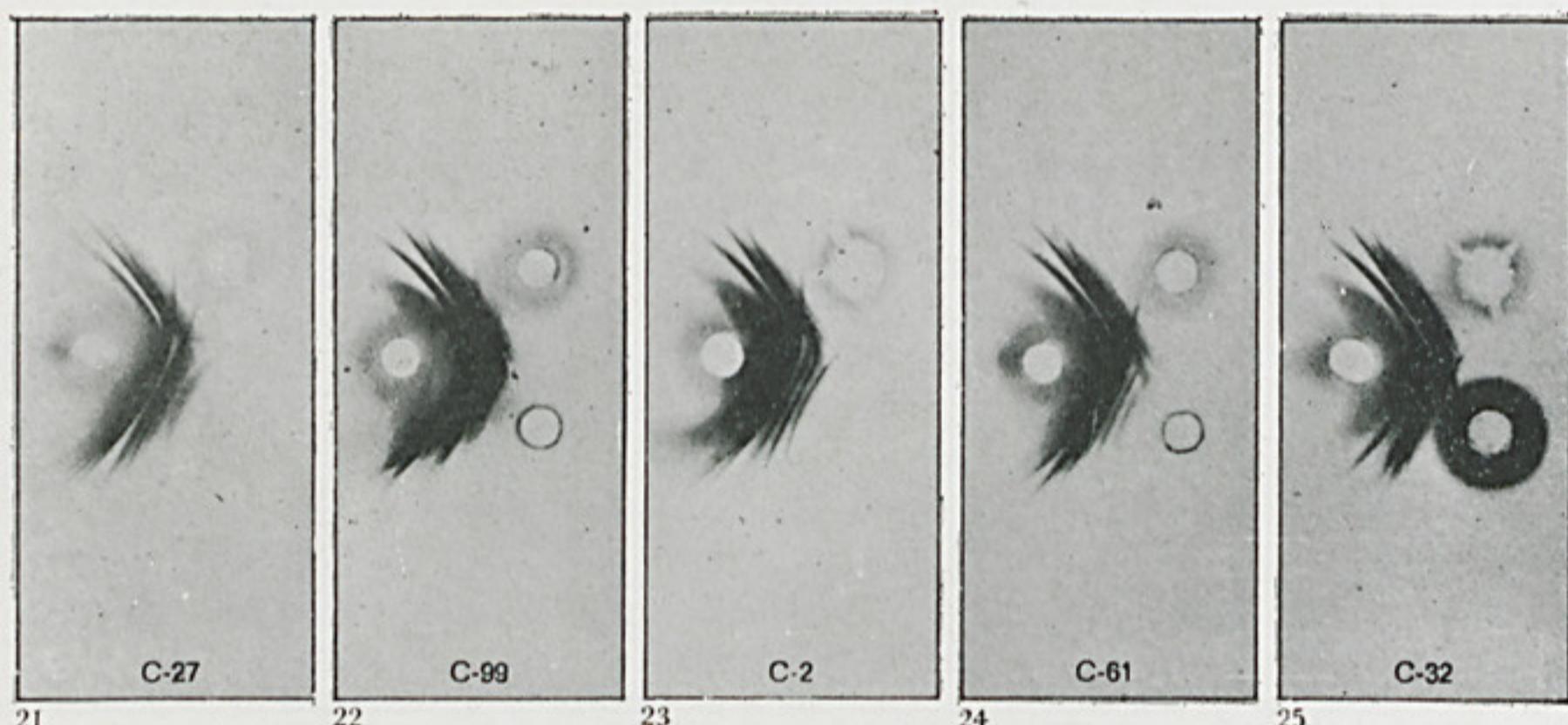
Fig. 20 — Lâmina nº C-84. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. jararacussu* e os venenos de *B. jararacussu* e *B. moojeni*.

TABELA 5

RESULTADOS DAS REAÇÕES DE DUPLA DIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR, ENTRE O VENENO DE *B. MOOJENI* FRENTE AO RESPECTIVO ANTI-VENENO E AOS DEMAIS VENENOS BOTRÓPICOS ESTUDADOS.

Lâminas demonstrativas	Nº de linhas obtidas na reação específica (veneno e antiveneno de <i>B. moojeni</i>)	Venenos comparados frente ao antiveneno de <i>B. moojeni</i>	Nº de linhas obtidas na reação não específica	Identidades antigenicas		
				Identidade completa	Identidade parcial	Falta de identidade
C-27	8	<i>B. jararaca</i>	8	1	4	3
C-99	8	<i>B. alternatus</i>	7	1	4	2
C-2	8	<i>B. insularis</i>	7	1	4	2
C-61	8	<i>B. cotiara</i>	8	2	4	2
C-32	8	<i>B. jararacussu</i>	8	4	3	1

Fotografias ilustrativas das reações de dupla difusão em gel de ágar, realizadas em lâmina, entre o antiveneno de *B. moojeni* e os vários venenos estudados (Tabela 5).



F.g. 21 — Lâmina n.º C-27. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. moojeni* e os venenos de *B. moojeni* e *B. jararaca*.

Fig. 22 — Lâmina n.º C-99. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. moojeni* e os venenos de *B. moojeni* e *B. alternatus*.

Fig. 23 — Lâmina N.º C-2. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. moojeni* e os venenos de *B. moojeni* e *B. insularis*.

Fig. 24 — Lâmina n.º C-61. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. moojeni* e os venenos de *B. moojeni* e *B. cotiara*.

Fig. 25 — Lâmina n.º C-32. Dupla difusão em gel de ágar entre o antiveneno de *B. moojeni* e os venenos de *B. moojeni* e *B. jararacussu*.

polivalente. Estes venenos seriam representantes de cada um dos grupos básicos por nós caracterizados, isto é, grupo *B. jararaca* e grupo *B. moojeni*. Todavia, a adoção desta conduta, requer maiores estudos.

CONCLUSÕES

- 1) Os atuais resultados confirmando os dados emanados de trabalhos anteriores permitiram caracterizar a existência de dois grupos imunologicamente distintos, nos quais podem ser enquadrados os seis venenos botrópicos estudados.
- 2) Os venenos de *B. jararaca*, *B. insularis*, *B. cotiara* e *B. alternatus* são, dentre os seis venenos estudados, aqueles que mais se aproximam imunologicamente entre si.
- 3) Os venenos de *B. jararacussu* e *B. moojeni* são, dentre os seis venenos estudados, aqueles que mais se distanciam imunologicamente dos demais venenos.

ABSTRACT: An analysis of the antigenic components of six venoms from different species of *Bothrops* and their respective immunological identities using the double diffusion in agar-gel technique, allowed the authors to verify that the venoms of the species *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. insularis* and *B. cotiara*, have a larger number of immunogenic components in common and among these most have a complete identity. On the other hand the venoms of two other species, *B. jararacussu* and *B. moojeni* show in relation to the four cited venoms a lesser number of common immunogenic components, but at the same there are a greater number of indicative lines of completely identical components between these two venoms.

These observations point to the existence of two distinct immunological groups among the six venoms studied.

UNITERMS: *Bothrops* venoms; double diffusion in agar-gel of *Bothrops* venoms; common immugenic components in *Bothrops* venoms.

BIBLIOGRAFIA

1. HOGE, A.R. & ROMANO, S.A. — Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Serpentes Elapidae e Viperidae. *Mem Inst. Butantan*, 36: 109-208, 1972.
2. OUCHTERLONY, O. — In-vitro method for testing the toxin producing capacity of diphtheria. *Acta path. microbiol. Scand.*, 25: 186-89, 1948.
3. OUCHTERLONY, O. — Antigen-antibody reactions in gels. *Acta path. microbiol. Scand.*, 26: 507-15, 1949.
4. SCAVINI, L. M. & FERRARESI, R.W. — Capacidad de protección y coincidencias antigenicas de sueros antiofídicos, *An. Soc. cient. Argent.*, 174: 87-99, 1962.
5. SCHENBERG, S. — Estudo comparativo da composição do veneno de *Bothrops neuwiedi* em placas de Ouchterlony. *Ciência e Cultura*, 10:163-64, 1958.
6. SCHENBERG, S. — Análise imunológica (micro-difusão em gel) de venenos individuais de *Bothrops jararaca*. *Ciência e Cultura*, 13:225-30, 1961.
7. SCHENBERG, S. — Immunological (Ouchterlony method) identification of intra-subspecies qualitative differences in snake venom composition. *Toxicon*, 1:67-75, 1963.

SILES VILLARROEL, M.; FURLANETTO, R.S.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. III. Análise dos componentes antigenicos comuns através da dupla difusão em gel de ágar. *Mem. Inst. Butantan*, 40/41:241-250, 1976/77.

8. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; FURLANETTO, R.S. & ZELANTE, F. — Estudo eletroforético com "Cellogel" de venenos do gênero *Bothrops*. *Mem. Inst. Butantan*, 37:83-90, 1973.
9. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; FURLANETTO, R.S. & ROLIM ROSA, R. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. I. Análise comparativa de componentes antigenicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos através das técnicas de dupla difusão e imunoelioforese em gel de ágar. *Mem. Inst. Butantan*, 38:13-30, 1974a.
10. SILES VILLARROEL, M.; FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F. & NAVAS, J. — Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. II. Análise comparativa dos componentes antigenicos comuns de seis espécies de venenos botrópicos. *Mem. Inst. Butantan*, 38:31-40, 1974b.