

CONCENTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONTROLE FÍSICO-QUÍMICO DOS SOROS ANTITÓXICOS E ANTIPEÇONHENTOS

POR GÜNTER HÖXTER & DORIVAL DECOUSSAU

(Da Secção de Concentração de Soros do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

INTRODUÇÃO

Desde o começo da soroterapia estudaram-se os meios para a purificação e concentração dos soros terapêuticos. As pesquisas neste sentido foram motivadas pelo desejo de se obter os princípios curativos, com o menor teor possível de substâncias inertes, e aumento de elemento específico, adquirindo assim efeito terapêutico superior. Procurava-se, com a purificação destes produtos, baixar a percentagem de certos sintomas, tão desagradáveis, conhecidos por doença do soro, tão frequente com a aplicação de soros impuros. Era ainda objetivo da purificação, elevar o efeito terapêutico do soro (1). Enquanto a concentração de um soro eleva-lhe a dosagem específica, a purificação o expurga de todas as substâncias desprovidas de valor curativo.

O soro antitóxico é uma solução estável de proteínas que neutralizam a ação destruidora das toxinas microbianas e das fitotoxinas. As proteínas do soro anti-peçonhento neutralizam as peçonhas de animais venenosos. As proteínas neutralizantes específicas são produzidas no organismo animal depois da injeção da toxina ou do veneno correspondente. Tais substâncias provocadoras da formação de anticorpos produzem estímulos bem específicos; o anticorpo geralmente só neutraliza aquele antígeno que provocou a sua formação. Os anticorpos encontram-se nas proteínas plasmáticas e são preparados partindo-se do sangue de animais imunizados. O valor neutralizante é dado em unidades por ml para os soros antitóxicos, e em mg de veneno neutralizado para os soros anti-peçonhentos.

Os processos que têm sido usados para este fim baseiam-se em princípios físico-químicos de fracionamento de uma mistura cujas partes mostram diferenças de solubilidade, de precipitabilidade, de ponto iso-elétrico, de velocidade eletroforética, de resistência à desnaturação por agentes químicos ou físicos, de liotropia, de estabilidade termodinâmica, ou de comportamento em presença da

Recebido para publicação em 7 de dezembro de 1948.

ação de agentes proteolíticos. Estas diferenças dependem da estrutura e do tamanho da molécula. A composição química das frações proteicas do plasma sanguíneo é bem semelhante em todas, mas o tamanho molecular varia, sendo as maiores moléculas menos solúveis, mais precipitáveis e mais facilmente desnaturáveis que as menores.

A divisão clássica reconhecia — à base de diferenças de solubilidade — a presença, no plasma, das seguintes frações proteicas: fibrinogênio, euglobulina, pseudoglobulina, e serina ou albumina do soro. Por estudos electroforéticos sabemos entretanto, que esta classificação semi-empírica é melhor substituída pela divisão electroforética, do plasma normal: γ — globulina, fibrinogênio, β — globulina, α globulina, e albumina. No plasma de cavalos imunizados, os anticorpos aparecem na fração da γ — globulina, ou como uma nova fração entre a β — globulina e a γ — globulina. Não há paralelismo entre a precipitação salina e a separação electroforética. A primeira depende da relação entre a liotropia da proteína e a liotropia do ion precipitante, enquanto que a velocidade electroforética depende da carga da proteína e de sua difusibilidade. A carga externa da proteína é mínima ou praticamente nula no ponto iso-elétrico, crescendo com o afastamento daquele ponto. Abaixo do ponto iso-elétrico (lado ácido) a proteína tem carga positiva, acima d'ele predomina a carga negativa. Como todas as frações electroforéticas do plasma têm pontos isoeletricos diferentes, o processo ideal para a obtenção do anticorpo puro, tal como êle existe no plasma do animal imunizado, seria a electroforese do plasma num pH bem afastado do ponto iso-elétrico, mas dentro dos limites de estabilidade do anticorpo. Preparamos várias partidas de anticorpos electroforeticamente puros, mas ainda existem dificuldades técnicas para a aplicação do processo em escala industrial.

A molécula proteica que constitui o anticorpo pode então ser separada da mistura plasmática pela electroforese ou pelos processos clássicos de precipitação. O mais comum entre êstes últimos emprega o sulfato de amônio que na concentração de 16% precipita fibrinogênio, euglobulina e uma parte inativa da pseudoglobulina, transformada por aquecimento a 60.° C. No filtrado desta primeira precipitação passam a albumina e a pseudoglobulina antitóxica, a última sendo precipitada por uma concentração de 26% de sulfato de amônio. Separando o sulfato de amônio por diálise, a pseudoglobulina entra em solução, juntamente com um complexo lipo-proteico que se torna insolúvel com o tempo ou pode ser retirado por uma precipitação iso-elétrica, pelo ajustamento do pH num meio isento de sais, para o ponto iso-elétrico do complexo lipo-proteico (2). A concentração final destas soluções de pseudoglobulina pode ser aumentada por ultrafiltração ou, com maior facilidade, pela crioconcentração que consiste no degelo fracionado da solução congelada. Nos soros assim puri-

ficados pela precipitação com sulfato de amônio, somente 20% das proteínas são anticorpos, sendo o resto impurezas de pseudoglobulina inativa que tem o mesmo grau de dispersão e a mesma liotropia que os anticorpos e por isso precipitam em conjunto.

Fermentos proteolíticos desdobram a molécula antitóxica em duas frações de tamanho quase igual, uma delas contendo toda a atividade antitóxica da molécula original. Estas frações ainda podem ser termo-desnaturadas, sendo a fração antitóxica mais estável. Utilizando estes princípios, Pope (3) elaborou um processo de purificação que consiste em:

1. Desdobramento com pepsina, da molécula antitóxica em duas frações;
2. Desnaturação térmica em presença de sais e desnaturantes químicos para precipitar a proteína não-antitóxica, deixando a proteína antitóxica modificada em solução. Os anticorpos preparados por este processo são mais puros que a pseudoglobulina antitóxica preparada pelo sulfato de amônio, eles têm peso molecular menor, são mais assimiláveis pelo organismo humano e produzem menos reações séricas em virtude da modificação radical da molécula original. Adotamos o processo de Pope no Instituto Butantan desde agosto de 1947 para a purificação dos seguintes soros: soro antidiftérico, tetânico, crotálico, histolítico, oedematiens, perfringens, vibrião séptico. Estamos estudando as condições para aplicar este processo, também aos outros soros (botrópico, escorpionico, ctênico, licósico) que ainda estão sendo purificados pela precipitação com sulfato de amônio, segundo o processo "Standard Methods" com pequenas modificações, usando p. ex. sulfato de amônio sólido no lugar da solução saturada.

TÉCNICA

1.^a fase: *Mistura dos plasmas e diluição*

Os plasmas citratados e fenicados (0, 4%) de vários cavalos são misturados até dar um volume total de 50 litros. (Todas as medidas do vasilhame usado são conferidas previamente pelo processo abaixo indicado). Se os plasmas não estiverem límpidos, eles devem ser passados através de uma camada de gaze para eliminar os grumos de proteína desnaturada. Juntam-se 90 litros de água da torneira, aquecendo a mistura a 30° por meio de vapor que passa na parede dupla de um caldeirão de aço inoxidável, de capacidade de 400 litros, munido de um agitador eléctrico e de 2 tubos para introdução dos electrodos externos de um potenciômetro e dos termo-elementos de um registrador automático de temperatura. A diluição com água diminui o teor proteico que depois da 2.^a fase, onde o volume total atinge 150 litros, cai para menos de 3%.

2.ª fase: Ajustamento do pH a adição de pepsina

O plasma diluído é acidulado, com ácido clorídrico diluído ao meio, até um pH entre 3,5 e 4,0. Juntam-se 250 g de pepsina 1:10.000 (5 g por litro de plasma) dissolvidos em 9 litros de água, baixando o pH logo em seguida para 3,20 pela adição de mais um pouco de ácido clorídrico. Observa-se que a turvação inicial da mistura vai desaparecer quando o pH se aproxima de 3,2 indicando assim, de uma maneira grosseira, a zona ótima para a atuação da pepsina, que consiste na destruição da albumina e modificação das globulinas α e β e do anticorpo, deixando a γ — globulina e o fibrinogênio intactos. O volume total da mistura é completado para 150 litros com água de torneira, conservando a mistura a 30° com agitação constante, durante 30 minutos, a contar do momento da adição da pepsina.

3.ª fase: Reajustamento do pH e adição de sulfato e toluol

Num estudo sobre a purificação enzimática dos soros, Harms (4) mostrou que o rendimento é maior com pH elevado e quantidade pequena de amônio. O grau de dispersão do precipitado que se forma — e que consiste de pepsina, fibrina, γ — globulina, as frações termocoaguláveis da α e β — globulina, e do anticorpo — não permite a filtração acima de um pH de 4,3 e com menos de 120 g de sulfato de amônio por litro. Harms indica um limite de 130 g por litro, mas nós conseguimos filtração rápida com quantidade menor. Experiências realizadas com outros sulfatos — de sódio, potássio, lítio, magnésio — demonstraram grandes vantagens do sulfato de amônio sobre os demais. Por esta razão, também, substituímos a solução de hidróxido de sódio a 40% que Harms recomenda, elevando o pH para 4,30 com amoníaco concentrado (24%), depois da adição de 18 kg de sulfato de amônio e 150 ml de toluol que facilita a eliminação de lipoides e precipitação das proteínas inativas. O uso de pirofosfato de sódio, que Harms junta nesta fase para evitar a formação de compostos coloridos do cresol e para elevar o pH, é considerado desnecessário por nós, pois não encontramos nas nossas misturas substâncias catalisadoras da oxidação de grupos fenólicos nem ions de ferro; também, as proteínas formam um sistema tampão bastante eficiente e permitem atingir o pH 4,3 pela adição de amônia com relativa facilidade. O uso de sais tampões (citratos, fosfatos), em substituição ao sulfato de amônio, ainda se encontra na fase experimental.

4.^a fase: *Termo-desnaturação e filtração*

Eleva-se a temperatura a 55° o mais rapidamente possível para sustentar a ação da pepsina cuja atividade proteolítica aumenta com a temperatura até 50°. Com um volume inicial de 50 litros de plasma, conseguimos a elevação da temperatura para 55.° em 4 minutos, mas com volumes maiores este tempo aumenta, determinando perda maior de antitoxina, razão pela qual estabelecemos, como limite máximo 50 litros de plasma para o nosso aparelho. Conserva-se a temperatura a 55° durante uma hora para desnaturar 70% da proteína original, eliminando assim a γ — globulina, a maior parte da α — globulina e as frações termolábeis da β — globulina e da globulina antitóxica. O precipitado é separado por filtração da mistura, resfriada a 45°, em carapuços de feltro, deixando, após 24 horas, um resíduo bem ressecado e dando um filtrado de quase 145 litros que contém 50 — 60% das antitoxinas modificadas, além de proteoses formadas pela ação da pepsina sobre albumina e α — globulina. A lavagem do resíduo nos carapuços não compensa o trabalho dispendido, pois a recuperação de anticorpos extraídos foi sempre menor de 3% do total.

5.^a fase: *Precipitação da antitoxina modificada*

No plasma original, toda a pseudoglobulina antitóxica é precipitável por uma concentração de 250 g de sulfato de amônio por litro, mas pelo tratamento com pepsina modificamos, além do tamanho molecular, também o grau de dispersão do anticorpo que agora só precipita totalmente com 340 g de amônio por litro, as frações que precipitam entre 280 e 320 g sendo as mais puras. Entretanto, deve-se limitar a concentração final de sulfatos para evitar a co-precipitação das proteoses formadas pela ação da pepsina sobre a albumina. Juntando 180 g de sulfato de amônio por litro de filtrado da fase anterior, obtem-se uma concentração de mais ou menos 300 g por litro que é suficiente para precipitar quase todo o anticorpo. A perda nesta fase é relativamente pequena ($\pm 6\%$).

6.^a fase: *Filtração e secagem da antitoxina precipitada*

Doze horas após a precipitação separa-se a maior parte do líquido por decantação ou sifonagem, filtrando o resíduo em papel de filtro Whatman No. 50, de 50 cm de diâmetro. Este papel tem a vantagem de ser bem resistente, podendo ser usado cerca de 20 vezes. A massa é retirada dos filtros com espátula

de madeira, preferentemente canela e colocada em pano de brim, de malha bem fechada, para segurar a proteína e deixar passar apenas o excesso de solução de sulfato de amônio e a humidade. O papel Whatman usado é lavado em água corrente até eliminação dos sulfatos, deixando-o secar em temperatura ambiente para nova utilização. Os panos com a massa permanecem 1 a 2 dias na temperatura ambiente, colocando-os depois numa prensa hidráulica a 37° para retirar o resto do líquido.

7.^a fase: *Diálise e ajustamento final*

A massa prensada e bem seca é a seguir fragmentada a mão, formando grumos irregulares os quais se colocam no centro de uma folha de papel celofane. Cada folha, com 400 g de massa, dobrada em forma de saco, cuja boca se amarra, é colocada em tanque de água corrente, refrigerada ou não, de tal modo que somente o fundo do saco esteja em contato com a superfície de água. A diálise se processa até que uma amostra da água, adicionada de solução de cloreto de bário acidulada com ácido clorídrico, dê apenas uma leve turvação, o que leva em média 6 dias. Neste tempo, a massa ensacada dissolve-se na água que penetrou pelos poros do papel celofane. Retira-se esta solução de antitoxina do tanque dialisador, mede-se o volume e junta-se 8 g por litro de cloreto de sódio e 20 ml por litro de uma suspensão de fenol a 20%, em água, dando assim uma concentração final de 0,4% de fenol. Acerta-se o pH para um valor de 7,2 pela adição de solução de carbonato de sódio a 18,5%. Embora este pH não seja o mais indicado para a conservação do anticorpo, que é mais estável num pH mais baixo, nós preferimos deixar o soro em 7,2 para fins de estabilização do estado coloidal; pois o soro terapêutico devia ter uma reação na região do pH fisiológico (7,4). Wadsworth na última edição dos "Standard Methods" (5) recomenda uma outra fase suplementar de purificação usando alumen para adsorver mais algumas impurezas que possam existir no soro, mas verificamos que este procedimento não contribui para aumentar a pureza e é até prejudicial, dando uma perda muito maior. O soro ajustado é diluído com solução fisiológica fenicada até o valor antitóxico ou antipeçonhento desejado e então colocado numa câmara fria a 4°C, onde ele permanece durante 2-4 meses. Durante este tempo processa-se uma leve precipitação e uma queda na dosagem biológica até atingir um valor estável. Além desse tempo de armazenamento que serve para estabilizar o soro e garantir-lhe contra a perda de atividade posterior à saída, damos ainda um excesso de 50% sobre a dosagem indicada e uma garantia de 5 anos a partir da data de doseamento, pois, o anticorpo é um dos poucos remédios onde não se pode pecar por excesso.

Depois de estabilizado, o sôro é submetido a um rigoroso contrôle físico-químico e novo doseamento biológico. Após a esterilização por filtração, em veia e distribuição na ampola, um serviço especializado de contrôle procede ao exame final que consiste de 4 partes:

1. Verificação da esterilidade por incubação durante 14 dias em 3 meios de cultura diferentes.
2. Verificação da inocuidade por injeção em camundongos.
3. Verificação comparativa da dosagem biológica com padrões internacionais, ou, no caso das peçonhas, com os padrões estabelecidos pela Secção de Venenos Animais do Instituto Butantan.
4. Verificação dos caracteres físico-químicos.

Esta última parte consiste na determinação de densidade, viscosidade, pH, concentração de fenol, concentração de cloreto de sódio, pesquisa de sulfatos e de metais pesados e da dosagem do teor proteico e do azoto não-proteico.

Damos em seguida um resumo de várias técnicas que estão sendo usadas no Instituto Butantan, durante o preparo de soros.

- 1) *Aferição de vasilhames por processos químicos*: Encher o vasilhame com água até um pouco abaixo da marca de volume, juntar uma certa quantidade bem pesada de cloreto de sódio que ia dar uma concentração de 1g por litro, completar o volume com água até a marca e dosar os cloretos em 10 ml da solução.

$$\text{Volume do vasilhame} = \frac{\text{Cloreto posto} \times 10}{\text{Cloreto encontrado nos 10 ml}}$$

- 2) *Determinação da concentração de sulfatos durante a purificação*: Reativo: Suspende 2 g de benzidina em 80 ml de água destilada, juntar 5 ml de ácido clorídrico concentrado, completar o volume de 100 ml com água destilada e juntar solução de hidróxido de sódio a 40% até obter um título ácido de aproximadamente 0,2 normal, titulando contra hidróxido de sódio decinormal, Filtrar. Técnica: Num balão volumétrico de 50 ml, colocar uns 10 ml de água e juntar 0,2 ml da solução a dosar. Aquecer um pouco, juntar 10 ml da solução de benzidina, completar o volume de 50 ml com água destilada e filtrar. Tirar 10 ml do filtrado límpido, juntar algumas gotas do indicador de púrpura de bromocresol e titular contra hidróxido de sódio decinormal.

CÁLCULO:

| | |
|---|------|
| NaOH para neutralizar 10 ml da sol. benzidina | A ml |
| " " " 50 ml do filtrado | D ml |
| Pêso equivalente do sulfato na solução | P.E. |

$$\text{Sulfatos em g por litro} = \frac{1}{2} (A-D) \times \text{P.E.}$$

$$\text{Sulfato de amônio em g por litro} = (A-D) \times 33$$

$$\text{Grau de saturação (Aproxim.) \%} = (A-D) \times 6,6$$

- 3) *Determinação da densidade*: É suficiente determinar este valor a 20.º até a 3.ª casa decimal por qualquer processo. Nós usamos a balança de Westphal ou um areômetro sensível, para volumes grandes, e a pesagem direta de 2,00 ml, para pequenas quantidades. O teor proteico aproximado é calculado pela fórmula:

$$\text{Proteína em \%} = 348 (\text{densidade} - 1,007).$$

Para sôros com muita proteína recomenda-se a determinação da densidade na diluição a 50% com solução fisiológica.

- 4) *Determinação da viscosidade*: Esta medida é de grande importância indicando a estabilidade do estado cooidal das proteínas do sôro. A determinação é feita no viscosímetro de Ostwald, dando o valor da viscosidade cinemática.
- 5) *Determinação do pH*: Um potenciômetro Beckman com electródios de vidro e de calomelano é ajustado antes de cada determinação com o seguinte tampão de fosfatos:

Solução A = 9,078 g por litro de fosfato mono-potássico KH_2PO_4

Solução B = 9,465 g por litro de fosfato di-sódico Na_2HPO_4

Misturando partes iguais destas soluções — que podem ser conservadas separadamente na geladeira durante vários meses obtem-se um pH de 6,80 que serve de ponto de referência para o pontenciômetro.

- 6) *Determinação da concentração de fenol*:

REATIVOS: a) Solução decinormal de bromo: Dissolver exatamente 2,7837 g de bromato de potássio KBrO_3 e 10 g de brometo de potássio KBr em água destilada e completar o volume para 1000 ml.

b) Solução decinormal de tiosulfato de sódio.

c) Solução de ácido tricloracético a 20%.

d) Solução de iodeto de potássio a 10%.

e) Ácido clorídrico concentrado.

f) Solução de amido.

TÉCNICA: Diluir exatamente 2,00 ml de sôro a dosar com uns 20 ml de água distilada, juntar 5 ml de ácido tricloracético a 20%, ferver e filtrar. Lavar o filtro com mais 5 ml de ácido tricloracético, reunindo lavagem e filtrando num frasco de 250 ml com rolha de esmeril. Juntar exatamente 10,00 ml da solução de bromo e 10 ml de ácido clorídrico. Deixar num lugar escuro durante 30 minutos, juntar depois 15 ml da solução de iodeto de potássio e titular contra a solução de tiosulfato de sódio, usando o indicador de amido.

CÁLCULO:

$$\text{Fenol em g por litro} = (10 - N) \times 0,78$$

$$\text{Tiosulfato de sódio gasto} = N \text{ ml}$$

- 7) *Determinação da concentração de cloretos:* Misturar exatamente 5,00 ml do sôro a dosar com álcool a 90° G.L. até completar o volume de 50 ml num balão volumétrico. Centrifugar a mistura durante 2 minutos. Tirar 10 ml do sobrenadante límpido, juntar algumas gotas da solução de cromato de potássio a 5% e titular contra a solução decinormal de nitrato de prata.

$$\text{Nitrato de prata gasto} = N \text{ ml}$$

$$\text{Cloreto de sódio em g por litro} = N \times 5,85$$

- 8) *Pesquisa de sulfatos e de metais pesados:* Precipitando as proteínas com ácido tricloracético, como na determinação do fenol, obtem-se um filtrado que serve para pesquisa direta de sulfatos pelo cloreto de bário e de metais pesados pelo sulfureto de sódio.
- 9) *Doseamento do azoto:* Determina-se o azoto total no Micro-Kjeldahl em 0,1 ml de sôro, juntando 1 g de oxalato neutro de potássio e 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado para transformar o azoto em sulfato de amônio. A distilação é feita com adição de 15 ml de solução de hidróxido de sódio a 40%, recebendo o distilado em 20 ml de uma solução de ácido bórico a 2% que contém algumas gotas do indicador de vermelho metila. O borato de amônio formado é titulado contra ácido sulfúrico centinormal.

Para determinar o azoto não-proteico, precipitam-se as proteínas com ácido tricloracético, dosando o azoto no filtrado pelo Micro-Kjeldahl. A diferença entre azoto total e azoto não-proteico dá o azoto proteico que, multiplicado pelo fator 6,25 indica o teor proteico do sôro.

Estabelecemos os seguintes limites para os caracteres físico-químicos dos nossos soros: (Valor máximo)

| | |
|---|---------------|
| Densidade a 20° | 1,045 |
| Viscosidade cinemática a 20° | 4 centistokes |
| pH a 20° (mínimo 7,0) | 7,8 |
| Fenol (mínimo 3g/1) | 5 g por litro |
| Cloreto de sódio (mínimo 7,5 g/1) | 9,5g " " |
| Sulfatos | 0,2% |
| Metais pesados | 0,001% |
| Proteína | 15% |
| Azoto não-proteico | 0,3% |

DISCUSSÃO

Os processos de purificação baseiam-se nos seguintes fatos:

1) O anticorpo é uma proteína nova que se forma no plasma no decurso da imunização. É estável e conserva suas propriedades terapêuticas mesmo quando separado de outras proteínas plasmáticas.

2) As frações proteicas do plasma são corpos distintos, cada um com sua composição química, com seu ponto iso-elétrico, com sua solubilidade, e outras propriedades físico-químicas bem definidas.

3) Os anticorpos dos plasmas equinos (anti-diftéricos, tetânicos, histolíticos, oedematiens, perfringens, vibrião-sépticos, botrópicos, crotálicos, elapídicos, escorpiônicos, licósicos, e ctênico), encontram-se na fração que precipita em conjunto com a γ e uma grande parte da β — globulina acima de uma concentração de 150 g por litro de sulfato de amônio.

4) Pelas precipitações com sulfato de amônio consegue-se isolar o anticorpo, contaminado pelas frações adjacentes de β e γ — globulina, mas relativamente puro, sem modificar as suas propriedades físico-químicas e biológicas.

5) Pela ação controlada de pepsina pode-se desdobrar a molécula do anticorpo, em duas frações diferentes, a maior das quais retém toda a atividade terapêutica e é mais termo-estável que a menor.

O processo de Pope que se baseia nestes fatos, modifica completamente a molécula do anticorpo, reduzindo-lhe o tamanho e o peso molecular pela metade. A fração ativa tem mais valências secundárias que a outra fração. Em virtude disso ela retém quase 90% dos carboidratos da molécula original, tornando-a mais estável e mais resistente contra a ação lítica da pepsina e a desnaturante do calor. De especial interesse são as observações de Glenny e Llewellyn-Jones (6) que verificaram que a molécula do anticorpo modificado pelo processo de Pope é absorvida com maior rapidez e eliminada mais lentamente que o anticorpo integral. A diminuição do peso e do tamanho molecular faci-

lita a absorção e a passagem do anticorpo pelos vasos, pois a sua contribuição à viscosidade do sangue é menor. A menor velocidade de eliminação, entretanto, não tem explicação simples; provavelmente há um aumento das valências secundárias da molécula modificada que desta maneira se liga com maior força aos tecidos ou a outras substâncias do sangue que dificultam a eliminação. Outra vantagem terapêutica do anticorpo modificado é a eliminação parcial da especificidade do animal produtor dos anticorpos. Quando separado das outras frações proteicas pelo sulfato de amônio, o anticorpo ainda conserva todas as características das proteínas do cavalo e pode provocar reações em pessoas sensíveis a estas proteínas. O tratamento pelo processo de Pope provoca uma modificação da molécula, destruindo quase totalmente as características da espécie equina. Temos assim quatro grandes vantagens do anticorpo modificado sobre o anticorpo comum:

- a) Absorção mais rápida;
- b) Eliminação mais lenta;
- c) Menor incidência de sintomas de doença de soro;

d) Possibilidade de administrar em volume menor de soro, maior quantidade de anticorpo, pois a diminuição do peso molecular (na difteria: de 184.000 para 98.000) e o conseqüente enriquecimento em unidades por grama de proteína permitem atingir uma dosagem mais elevada. O tratamento pela pepsina, também, diminui a assimetria da molécula do anticorpo; na difteria, a relação entre o eixo maior e o menor, que, no anticorpo não modificado é de 7,0 passa a ser de 3,3. Isto significa sensível diminuição da viscosidade das soluções antitóxicas, facilitando a administração e a absorção. Fizemos a observação que o anticorpo anidro, obtido por liofilização da solução aquosa congelada, dissolve-se na água quase sem discontinuidade de fase entre o solvente, a solução saturada e o sólido.

As vantagens apontadas compensam perfeitamente as perdas relativamente elevadas que os anticorpos sofrem, quando tratados pelo processo Pope: justifica-se plenamente essa perda, pois os resultados qualitativos da purificação, mais importantes que o rendimento quantitativo, cabem no plano estabelecido pelo Instituto Butantan que se bate principalmente pela qualidade do produto. Não poupamos esforços para reduzir as perdas e conseguimos verificar que o processo de Pope rende pouco, quando aplicado a plasmas de cavalos recém-imunizados, melhorando consideravelmente no decurso da imunização. Esta observação encontra apoio nos seguintes fatos: Na imunização há inicialmente um aumento da γ — globulina, com formação de um anticorpo muito ávido mas de pequena estabilidade. Depois de um certo tempo de imunização, e na reimunização, forma-se um novo anticorpo que pelas características está mais próximo da β — globulina, apresentando, porém, peso molecular mais elevado. Este último anticorpo (às vezes também chamado "fração T") é mais estável,

entretanto menos resistente à ação da pepsina e por isso pode ser desdobrado com maior facilidade para fornecer o anticorpo modificado.

Plasma de animal não-imunizado

| | | | |
|----------|---------------------|--------------------|---------------------|
| albumina | α -globulina | β -globulina | γ -globulina |
|----------|---------------------|--------------------|---------------------|

Plasma de animal recém-imunizado

| | | | |
|----------|---------------------|--------------------|----------------------|
| albumina | α -globulina | β -globulina | anticorpo + γ |
|----------|---------------------|--------------------|----------------------|

Plasma de animal imunizado

| | | | |
|----------|---------------------|--------------------|---------------------------|
| albumina | α -globulina | β -globulina | anticorpo γ -glob. |
|----------|---------------------|--------------------|---------------------------|

Plasma de animal hiper-imunizado

| | | | |
|----------|---------------------|---------------------|---------------------|
| albumina | α -globulina | β + anticorpo | γ -globulina |
|----------|---------------------|---------------------|---------------------|

A pepsina desdobra estas frações na ordem indicada, da esquerda para a direita, começando pela albumina e terminando com a γ -globulina que é mais resistente. A cisão da molécula do anticorpo pelo processo de Pope produz um novo anticorpo que pelas características electroforéticas aproxima-se mais da γ -globulina e adquire maior resistência contra a ação da pepsina. (Isso explica talvez a eliminação mais lenta quando injetada em outro animal, quando pensamos no papel das enzimas proteolíticas do organismo que tem de destruir a molécula proteica para que ela seja eliminada pelos rins). Também outros autores (7) verificaram que o primeiro passo na digestão é o desaparecimento da albumina e a substituição da fração "T" por uma nova componente γ . Continuando a digestão, a nova γ permanece inalterada, mas as outras frações electroforéticas desaparecem.

RESULTADOS

Na tabela que segue reunimos os resultados obtidos no serviço de concentração e purificação de soros durante os primeiros 10 meses do ano de 1948. Indicamos a espécie de plasma, o volume total de plasma de cada espécie que foi concentrado, o volume total de soro de cada espécie obtida, a média das dosagens, em unidades por grama de proteína para os soros antitóxicos, e em miligramas de veneno neutralizado por grama de proteína para os soros anti-peçonhentos. Incluímos também os índices médios de purificação que são a relação entre a dosagem por grama de proteína antes e depois da purificação, e uma indicação aproximada do rendimento médio.

| Espécie I | Proc. II | Plasma III | Sêro IV | Dosagem V | I. P. VI | Rendimento VII |
|--------------------|-------------|---------------|------------|--------------|-------------|-------------------|
| Diftérico | Pope | 2.750.000 | 217.300 | 60.000 | 5,2 | 43 |
| Tetânico | Pope | 34.500 | 45.850 | 38.000 | 4,3 | 32 |
| Histolítico | Pope | 600.000 | 2.200 | 35.000 | 6,0 | 48 |
| Oedematiens | Pope | 100.000 | 8.200 | 11.000 | 4,9 | 41 |
| Perfringens | Pope | 200.000 | 14.400 | 6.000 | 3,2 | 24 |
| Vibrião | Pope | 100.000 | 6.000 | 10.000 | 4,0 | 30 |
| Botrôpico | Pope | 450.000 | 33.100 | 40 | 3,0 | 21 |
| Botrôpico | SuAm | 400.000 | 59.900 | 30 | 1,8 | 31 |
| Alternata | SuAm | 9.000 | 1.900 | 27 | 1,1 | 24 |
| Atrox | SuAm | 24.000 | 2.600 | 42 | 2,3 | 29 |
| Cotiara | SuAm | 11.000 | 2.150 | 25 | 1,3 | 25 |
| Insularis | SuAm | 7.200 | 1.050 | 45 | 5,8 | 90 |
| Jararaca | SuAm | 8.300 | 1.200 | 16 | 1,7 | 31 |
| Jararacuçu | SuAm | 10.100 | 1.800 | 9 | 1,4 | 32 |
| Lachesis m. | SuAm | 1.500 | 500 | 18 | 1,5 | 50 |
| Crotálico | Pope | 600.000 | 40.200 | 40 | 8,0 | 57 |
| Crotálico | SuAm | 200.000 | 42.400 | 18 | 2,4 | 57 |
| Escorpiónico | SuAm | 59.200 | 7.650 | 37 | 1,8 | 20 |
| Ctênico | SuAm | 27.000 | 3.200 | 40 | 1,6 | 25 |
| Licósico | SuAm | 39.000 | 4.750 | 400 | 1,4 | 24 |

I = Espécie do sêro

II = Processo usado para a purificação: Pope — Proteólise
SuAm — Sulfato de amônio

III = Volume total de plasma em ml

IV = Volume total de sêro obtido em ml

V = Dosagem em unidade por grama de proteina para os 6 primeiros em mg de veneno neutralizado para os 11 seguintes em doses mínimas mortais para escorp. e ctênico em doses mínimas necrosantes para licósico

VI = Índice de purificação

VII = Rendimento porcentual

CONCLUSÕES

1) O processo de Pope pode ser usado para a purificação de plasmas equinos, antitóxicos e anti-peçonhentos em geral, com reais vantagens.

2) Os plasmas de cavalos recém-imunizados dão um rendimento menor que os de cavalos hiper-imunizados.

3) As vantagens do processo de Pope sobre os processos clássicos de sulfato de amônio são manifestas pelas propriedades terapêuticas e físico-químicas do anticorpo modificado, que é de tamanho menor e quase totalmente despecificado.

4) Um período de estabilização, antes da expedição e saída do soro, o estabelecimento de limites certos para as propriedades biológicas e físico-químicas e um rigoroso controle final garantem a estabilidade e eficiência do soro.

RESUMO

Os autores estudam a concentração e purificação dos soros terapêuticos, a partir do sangue de cavalos imunizados.

Eles mostram as vantagens do processo de proteólise segundo Pope sobre o processo clássico de sulfato de amônio, dando detalhes da técnica usada no Instituto Butantan.

Eles apontam, a necessidade de um controle rigoroso e indicam métodos físicos e químicos que foram aplicados para este fim.

ABSTRACT

1) The Pope process may be used for the purification of antitoxic and antivenomous horse plasma in general, with real advantages.

2) The plasma of freshly immunized horses yields less than that from hyper-immunized animals.

3) The advantages of the Pope process over the classical ammonium sulfate process are evident from the therapeutic and physical-chemical properties of the modified antibody which has a smaller size and lower molecular weight and is nearly completely despeciated.

4) A period of stabilization, before the sending out of the serum, the determination of fixed limits for the biologic and physical-chemical properties and a strict final control guarantee the stability and efficiency of the serum.

RÉSUMÉ

Les auteurs décrivent leurs études sur la concentration et purification des sérums thérapeutiques, procédant du sang de chevaux immunisés.

Ils démontrent les avantages du processus de protéolyse selon Pope sur le processus classique de sulfate d'ammonium, et donnent les détails de la technique employée dans l'Institut Butantan.

Ils affirment la nécessité d'un contrôle rigoureux et indiquent les méthodes physiques et chimiques dont ils se sont servis pour ce fin.

BIBLIOGRAFIA

1. *Gay, Frederick P.* — *Agentes of disease and host resistance*, Springfield, Charles C. Thomas, 1935, p. 1513.
2. *Ratner, Bret* — *Allergy, Anaphylaxis and Immunotherapy*, Baltimore, Williams & Wilkins, 1943, p. 67.
3. *Pope, C. G.* — *Brit. J. Exp. Path.*, 19:245, 1938.
4. *Harms, A. J.* — *Biochem. J.*, 42:390, 1948.
5. *Wadsworth, Augustus B.* — *Standard methods of the division of laboratories and research of the New York State department of health*, 3rd. ed., Baltimore. Williams & Wilkins, 1947, p.
6. *Glenny, A. T. & Llewellyn-Jones, M.* — *J. Bact.*, 47:405, 1938.
7. *Van der Scheer, Wyckoff & Clarke* — *J. Immun.*, 41:349, 1941.

