

MARCO ANTONIO STEPHANO

ATIVIDADE DO VENENO DE *Lachesis muta muta*
SOBRE A RESPOSTA IMUNE HUMORAL A
ANTÍGENOS NÃO RELACIONADOS

Campinas

2000

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Médico Veterinário Marco Antonio Stephano.

Campinas, 12 de setembro de 2000.

Prof. Dr. Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna
- Orientador -

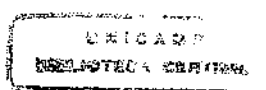
Marco Antonio Stephano

**ATIVIDADE DO VENENO DE *Lachesis muta muta*
SOBRE A RESPOSTA IMUNE HUMORAL A
ANTÍGENOS NÃO RELACIONADOS.**

Dissertação de Mestrado, apresentada no
Programa de Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Mestre em
Farmacologia

Orientador: *Prof. Osvaldo Augusto Sant'Anna*

**Campinas
2000**



UNIDADE Be
N.º CHAMADA: T/UNICAMP
St 43a
V. _____ Ex. _____
TOMBO BC/ 46388
PROC. 16-392101
C ☐ D ☒
PREÇO R\$ 11,00
DATA 15/09/01
N.º CPD _____

CM00159595-2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTÉCA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

St43a

Stephano, Marco Antonio

Atividade do veneno de *Lachesis muta muta* sobre a resposta imune humoral a antígenos não relacionados / Marco Antonio Stephano. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador: Osvaldo Augusto Sant'Anna

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Antivenenos. 2. Imunossupressão. 3. Venenos 4.
*Soroterapia. I. Osvaldo Augusto Sant'Anna. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora:

Prof. Dr. Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna

Membros:

1. Prof. Dr. Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna

2. Dr. Rosalvo Guidolin

3. Profa. Dra. Léa Rodrigues Simioni

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/09/2000

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

DEDICATÓRIA

À Elisa, minha filha.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Hisako Gondo Higashi, que me incentivou em todos os momentos, que não mediu esforços para a formação da minha pessoa, sempre confiando no trabalho a ser desenvolvido, não só na visão científica, mas, principalmente, na contribuição institucional e produtiva que este trabalho tem a oferecer.

Ao Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna, pela maturidade e experiência transmitidas para conclusão deste trabalho e que, acima de tudo, contribuiu para o meu projeto, não só um projeto de trabalho, mas, principalmente, o meu projeto de vida.

Ao Dr. Rosalvo Guidolin, pela ajuda do trabalho e pela experiência transferida durante toda a execução do projeto. Agradeço pela minha formação profissional que, sempre de forma consciente, orientou-me a conciliar o conhecimento científico e as características dos processos produtivos.

À Dra. Josefina Farina Moraes, pela ajuda nos doseamentos *in vivo* e amizade pela qual sou eternamente grato.

Ao Dr. José Roberto Marcelino, pelo apoio e ajuda nos doseamentos *in vitro* e pela amizade desses 13 anos.

Ao Dr. Celso Pereira Caricati, pela ajuda nas imunizações dos cavalos, e por estar sempre acompanhando com interesse este trabalho. Agradeço pela amizade e pela crítica sincera com que sempre tratou este projeto.

À Dra. Ivone Kazuko Yamaguchi, pela ajuda no início deste projeto, e por acreditar, desde o início, que este estudo seria fundamental para a produção de soros hiperimunes de uso terapêuticos.

Aos amigos da Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes (Luiza, Junia, Fátima, Marlene, Inete, Silvio, Cassiano, Luiz, Ademir, Marcos e Maurício), sem os quais teria sido impossível concluir este trabalho. Agradeço pelo carinho e pela amizade em todos os momentos.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas sem os quais teria sido impossível a conclusão deste trabalho.

À Andréia Cristina Souza, por todo apoio e carinho

À Fundação Butantan, pelo apoio financeiro

*Feliz o homem que acha sabedoria e o
homem que adquire conhecimento;
porque melhor é o lucro que ela dá do
que o da prata, e melhor a sua renda do
que o ouro mais fino. Mais preciosa é
do que pérolas, e tudo o que podes
desejar não é comparado a ela.
(Pv. 3, 13-15)*

	PÁG.
RESUMO.....	<i>i</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Acidentes ofídicos.....	2
1.2. Atividade biológica dos venenos.....	3
1.3. Propriedades imunológicas dos venenos.....	7
1.4. Sistema imunológico.....	10
1.5. Imunossupressão.....	13
1.6. Atividade imunossupressora dos venenos.....	17
1.7. Soros antivenenos.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Animais.....	25
3.1.1. Cavalos.....	25
3.1.2. Carneiros.....	25
3.1.3. Camundongos.....	25
3.2. Antígenos.....	25
3.2.1. Eritrócitos de carneiro.....	25
3.2.2. Solução de veneno de <i>Lachesis muta muta</i> para imunização	26
3.2.3. Solução de veneno de <i>Lachesis muta muta</i> para ELISA.....	26

3.2.4. Solução de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> para imunização	26
3.2.5. Solução de veneno “pool” <i>Bothrops sp</i> para imunização de cavalos.....	27
3.3. Imunizações.....	27
3.3.1. Camundongos.....	27
3.3.2. Cavalos.....	27
3.3.2.1. Imunização experimental.....	27
3.3.2.2. Imunização para produção.....	30
3.4. Determinação dos títulos de anticorpos.....	31
3.4.1. Títulos de aglutininas Anti-EC.....	31
3.4.2. Título de anticorpos antiveneno.....	31
3.4.2.1. Ensaio <i>in vitro</i>	31
3.4.2.2. Ensaio <i>in vivo</i>	32
3.4.2.2.1. Determinação da DL ₅₀	32
3.4.2.2.2. Neutralização da atividade letal do veneno de <i>Lachesis muta muta</i>	32
3.4.3. Título de anticorpos anti-fosfolipase A ₂	33
3.5. Fracionamento por cromatografia do veneno de <i>Lachesis muta muta</i>	34
3.5.1. Aplicação da amostra.....	34
3.5.2. Doseamento de proteína.....	34
3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida de 6 a 20% na presença de SDS.....	34
3.7. Análise estatística.....	35

4. RESULTADOS.....	36
4.1. Efeito do veneno de <i>Lachesis muta muta</i> sobre a resposta primária eritrócitos de carneiro, em camundongos.....	37
4.2. Efeito dose-resposta do veneno de <i>Lachesis muta muta</i> sobre a resposta imune a EC em camundongos H _{GP}	43
4.3. Fracionamento do veneno de <i>Lachesis muta muta</i>	48
4.4. Resposta secundária a antígenos não relacionados.....	54
4.5. Atividade supressora do veneno <i>Lachesis muta muta</i> em eqüinos soro produtores.....	56
4.5.1. Testes iniciais.....	56
4.5.2. Aplicação na produção de plasmas hiperimunes.....	59
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÕES.....	74
7. SUMMARY.....	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ALG	globulina antilinfócito T
APCs	célula apresentadora de antígeno
ATG	globulina antitimocitária
B. jararaca	<i>Bothrops jararaca</i>
B.jar	<i>Bothrops jararaca</i>
BCG	bacilo de calmette-guérin (<i>Micobacterium bovis</i>)
C.d. terrificus	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
C.d.t.	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
C2	componente do sistema complemento
C3	componente do sistema complemento
C4	componente do sistema complemento
C5	componente do sistema complemento
C9	componente do sistema complemento
cAMP	adenosina monofosfato cíclica
CD28	marcador de linfócito T
CD3	marcador de linfócito T
CD4	marcador de linfócito T auxiliar
CD40	marcador de linfócito B
CD8	marcador de linfócito T citotóxico
CTLA	marcador de linfócito T citotóxico associado a antígenos
CVF	fator de veneno de cobra
DE ₅₀	dose efetiva 50%

DEH ₅₀	dose efetiva hemolítica 50%
DL ₅₀	dose letal 50%
DNA	ácido desoxirribonucleico
EC	eritrócito de carneiro
ELISA	teste imunoenzimático
EMC	emulsão múltipla completa
EMI	emulsão múltipla incompleta
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
H _{GP}	linhagem de camundogo selecionada para boa resposta
HLA-DR	complexo principal de histocompatibilidade II, humano
IgA	imunoglobulina A
IgD	imunoglobulina D
IgE	imunoglobulina E
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
Il-2	interleucina 2
Il-3	interleucina 3
Il-4	interleucina 4
Il-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
INF-β	interferon beta
INF-γ	interferon gama
LHF-I	fator hemorrágico de <i>Lachesis</i> I
LHF-II	fator hemorrágico de <i>Lachesis</i> II

L. muta muta	<i>Lachesis muta muta</i>
Lmm	<i>Lachesis muta muta</i>
Mg ⁺⁺	magnésio
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amônio
OKT3	anticorpo monoclonal anti-CD3
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PBS	tampão salina fosfatada
SHN	soro normal humano
TCR	receptor de linfócito T
TK506	droga imunossupressora sem definição da sigla
TNF α	fator de necrose de tumor alfa

	PÁG.
Figura 1: <i>Lachesis muta muta</i>	3
Figura 2: Efeito do veneno de <i>Lachesis muta muta</i> sobre a produção de anticorpos ao EC, em camundongos H _{GP}	39
Figura 3: Efeito do veneno de <i>Lachesis muta muta</i> sobre a produção de anticorpos ao EC em função do intervalo de tempo entre as imunizações de veneno e EC, em camundongos H _{GP}	40
Figura 4: Estudo do efeito dos venenos de <i>Bothrops jararaca</i> e <i>Crotalus durissus terrificus</i> sobre a produção de anticorpos ao EC, em camundongos H _{GP} ..	41
Figura 5: Efeito das diversas concentrações do veneno de <i>Lachesis muta muta</i> sobre a produção de anticorpos ao EC, em camundongos H _{GP}	45
Figura 6: Efeito do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> e da associação dos venenos de <i>Lachesis muta muta</i> e <i>Bothrops jararaca</i> sobre a produção de anticorpos ao EC.....	46
Figura 7: Curva dose-efeito do veneno de <i>Lachesis muta muta</i> em função da resposta imunossupressora ao EC, em camundongos H _{GP}	47
Figura 8: Cromatografia em Superdex 75 (Pharmacia®) do veneno de <i>Lachesis muta muta</i>	50
Figura 9: Perfil das diversas frações do veneno de <i>Lachesis muta muta</i> obtidas por cromatografia em eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS. Gel na concentração de 6 a 20%.....	51

Figura 10:	Efeito das diversas frações do veneno de <i>Lachesis muta muta</i> em camundongos H _{GP} , obtidas através da cromatografia em Superdex® 75 sobre a produção de anticorpos ao EC.....	52
Figura 11:	Efeito das diversas frações do veneno de <i>Lachesis muta muta</i> , purificadas em Superdex® 75, sobre a resposta imune humoral primária e secundária a antígenos não relacionados, em camundongos H _{GP}	55
Figura 12:	Curva da titulação dos soros de eqüinos, para obtenção da DEIH ₅₀	57
Figura 13:	Curva de titulação dos soros equídeos em teste imunoenzimático, para determinação da dose efetiva 50% (DE ₅₀).....	58
Figura 14:	Curva de titulação em ensaio imunoenzimático dos soros de eqüinos, produtores.....	60
Figura 15:	Ensaio de potência <i>in vivo</i> da mistura dos soros de eqüinos de cada grupo teste.....	61

Tabela 1:	Análise estatística para resposta imunológica a antígenos não relacionados, em função da quantidade de veneno e do período de tempo entre a inoculação do veneno e o EC, em camundongos H _{GP}	42
Tabela 2:	Análise estatística para resposta imunológica a antígenos não relacionados, em função do tempo entre a inoculação do veneno e o EC, em camundongos.....	42
Tabela 3:	Análise estatística para resposta imunológica a antígenos não relacionados, em camundongos imunizados com veneno de <i>Bothrops jararaca</i> e <i>Crotalus durissus terrificus</i>	43
Tabela 4:	Análise estatística da imunização de camundongos H _{GP} , por via intraperitoneal, com diferentes doses de veneno de <i>Lachesis muta muta</i> , com o veneno de <i>Bothrops jararaca</i> e com a associação dos venenos de <i>Bothrops jararaca</i> e <i>Lachesis muta muta</i>	48
Tabela 5:	Concentração protéica e volume recuperado das frações isoladas da cromatografia do veneno integral de <i>Lachesis muta muta</i> em Superdex® 75.....	53
Tabela 6:	Análise estatística da imunização de camundongos H _{GP} , com diversas frações do veneno de <i>Lachesis muta muta</i>	53

RESUMO

Este trabalho objetivou identificar e demonstrar a razão dos baixos títulos neutralizantes da atividade letal, do soro antiveneno de *Lachesis muta*, produzido pelo Instituto Butantan.

O veneno de *Lachesis muta* é responsável por 400 acidentes anuais no Brasil e o único tratamento, comprovadamente eficaz, é a soroterapia com antiveneno específico. Os baixos títulos de anticorpos encontrados nos plasmas de eqüídeos levam a uma descontinuidade de produção ou a um produto com alta concentração de proteína.

Estudaram-se também as possibilidades dos venenos de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* possuírem o mesmo efeito supressor.

Na tentativa de elucidar a possível atividade imunossupressora do veneno de *Lachesis muta*, foram utilizados como modelo experimental, camundongos selecionados para boa resposta imune humoral (linhagens H_{GP}) e um antígeno não relacionado, no caso o eritrócito de carneiro (EC). O teste de hemoaglutinação foi escolhido para se comparar o efeito do veneno de *Lachesis muta* na resposta imune a antígenos não relacionados. Grupos de animais receberam veneno de *Lachesis muta* 24h e 72h antes e concomitante ao EC.

Após os primeiros ensaios, em que se verificou a presença de um fator que inibia a produção de anticorpos a um antígeno não relacionado e que este era dose-dependente, o veneno de *Lachesis muta* foi fracionado por cromatografia de gel filtração em Superdex® 75. Seis frações foram obtidas, porém as frações 4 e 5 apresentaram atividade imunossupressiva.

Os venenos obtidos sem as frações 4 e 5 foram utilizados na imunização de eqüídeos e o título destes animais foi pelo menos, cinco vezes superior ao título obtido por animais imunizados com veneno total.

Os resultados obtidos levam-nos às seguintes conclusões: o veneno de *Lachesis muta muta* apresenta um efeito imunossupressor parcial; pelo menos duas frações distintas apresentam esta atividade; a atividade imunossupressora é dose-dependente; as frações imunossupressoras quando removidas do veneno, faz com que este aumente em cinco vezes os títulos neutralizantes da atividade letal no plasma eqüino.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ACIDENTES OFÍDICOS

A história da humanidade registra um grande número de acidentes ofídicos, tanto em animais como em seres humanos, o que se tornou um problema médico de considerável abrangência, tendo em vista que eles são responsáveis por mais de 40.000 mortes anuais de pessoas no mundo.

Frente a este panorama, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) têm incentivado os estudos na área de ofidismo, principalmente os relacionados às espécies agressoras responsáveis pelos acidentes mais freqüentes. Este incentivo recai, atualmente, em quatro pontos fundamentais: a) melhora do esquema de tratamento, mediante a padronização adequada de antivenenos, único tratamento de eficiência comprovada; b) produção de antivenenos de maior potência e especificidade e em condições rentáveis para os países do terceiro mundo; c) aprimoramento de técnicas que permitem o diagnóstico precoce do agente agressor, que levariam a um tratamento específico; d) aprimoramento de técnicas para a realização de estudos epidemiológicos em campo, para a obtenção de um conhecimento claro e preciso da amplitude do problema (WHO, 1981).

No Brasil, os acidentes ofídicos sempre representaram uns dos principais problemas de saúde pública, porém, somente a partir de 1986, a notificação destes se tornou obrigatória. Assim, no período compreendido entre julho de 1986 a dezembro de 1993, ocorreram ao redor de 152.400 acidentes, ou seja em média 23.750 acidentes por ano, com as seguintes proporções, segundo a espécie envolvida: 62,21% por serpentes do gênero *Bothrops*; 6,19% pelo gênero *Crotalus*; 0,51% pelo gênero *Micrurus*; 2,11% pelo gênero *Lachesis*; e em 28,98% dos casos não houve informação sobre o gênero agressor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1994). Deduz se assim, que pelo menos 501 casos de acidentes ocorrem por ano com serpentes do gênero *Lachesis*. Deste modo, desenvolver antivenenos com maior atividade neutralizante e com baixos custos, além de ser um ponto fundamental de incentivo pela OMS, é de extrema necessidade, em razão do grande número de acidentes ofídicos no Brasil.

Devido à larga distribuição das serpentes sobre todo território nacional e seu diferente hábitat, estas podem possuir em seus venenos várias substâncias com atividades biológicas, farmacológicas e químicas de natureza diversificada.

1.2. ATIVIDADE BIOLÓGICO DOS VENENOS

As principais atividades biológicas, originárias de toxinas específicas dos venenos de serpentes, em geral são: hemorrágica, necrosante, desfibrinante, coagulante, hemolítica indireta, proteolítica, edemaciante e neurotóxica que, associadas, provocam um quadro geral fisiopatológico que pode levar ao efeito letal (WHO, 1981) e este efeito foi o que despertou maior interesse.

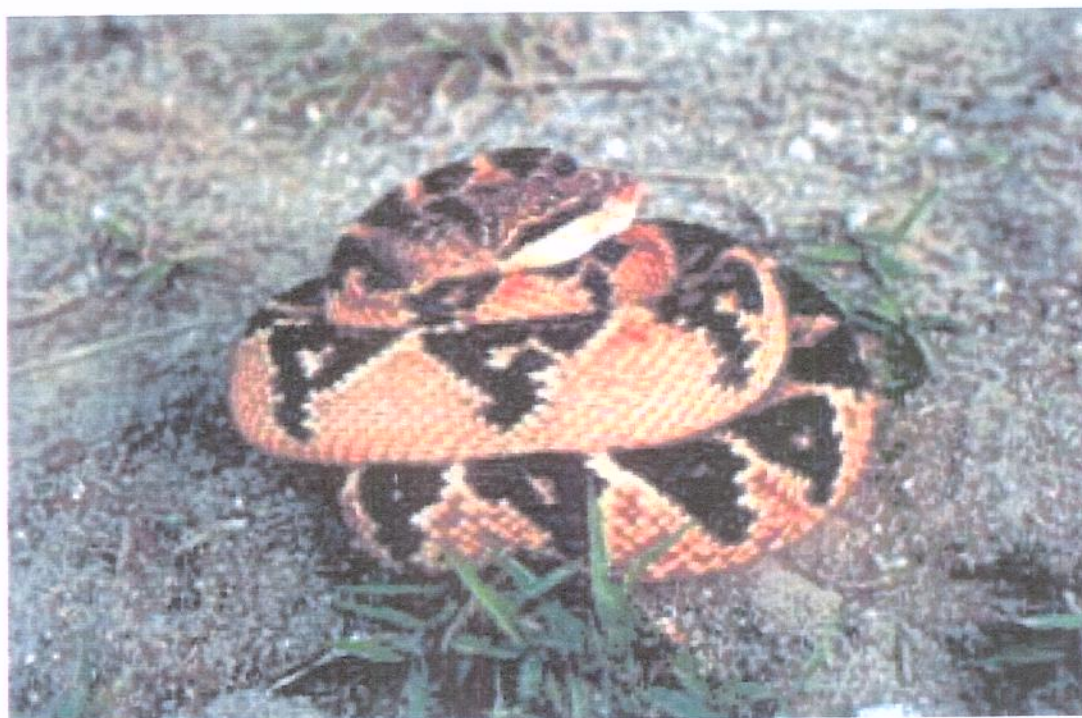


Figura 1: *Lachesis muta muta*

O gênero *Lachesis* (FIGURA 1) apresenta uma única espécie, a *Lachesis muta* e quatro subespécies: *L. muta muta*, *L. muta stenophrys*, *L. muta noctivaga* e *L. muta melanocephala*, que diferem entre si pelas suas características taxonômicas e também por suas distribuições geográficas. Contudo, em recentes estudos da molécula de DNA mitocondrial dessas subespécies, ZAMUDIO & GREENE (1997) propuseram ao gênero apenas três espécies: *L. stenophrys* e *L. melanocephala* na América Central e *L. muta* na América do Sul. As serpentes deste gênero podem apresentar até 2,5 metros de comprimento, sendo encontradas nas regiões tropicais e equatoriais da América do Sul e Central, principalmente em áreas de densa floresta (BOLAÑOS, MUÑOS, CERDAS, 1978).

BOLAÑOS *et al.* (1978) estudaram o efeito letal do veneno de três subespécies de *Lachesis muta*, mostrando as diferentes doses letais 50% (DL₅₀) em relação às espécies e às localizações geográficas: *L. m. stenophrys* (Atlântico) 112,0µg ± 12,0; *L. m. stenophrys* (Pacífico) 152,9µg ± 16,3; *L. m. muta* (Colômbia) 166,6µg ± 15,9; por via intraperitoneal, em camundongos com peso entre 18 a 22 gr.

Os resultados das determinações da DL₅₀ do veneno das subespécies *L. muta. muta* encontradas no Brasil e no Peru foram de 161,4µg e 291,6µg, respectivamente. Estes resultados são indicativos da influência ambiental aos quais os animais estão submetidos, com referência à composição do veneno.

Com relação a outros venenos da família *Crotalidae*, o veneno de *Lachesis muta* é o que apresenta menor toxicidade (SANCHEZ *et al.*, 1992), visto que as espécies mais comuns apresentam as seguintes DL₅₀: *Bothrops jararaca* (referência nacional) 38,7µg e *Crotalus durissus terrificus* (referência FUNED) 2,10µg, em camundongos com peso entre 18 a 22g

As principais atividades biológicas do veneno de *Lachesis muta* são: proteolítica, hemorrágica, mionecrótica, coagulante desfibrinante, fibrinolítica, edemaciante, hemolítica indireta e outras atividades enzimáticas.

A atividade proteolítica destes venenos é intensa e demonstrada em ensaio *in vitro* por meio da hidrólise da caseína (OTERO *et al.*, 1992).

O efeito hemorrágico que ocorre em ratos, com aproximadamente 0,9µg de veneno, quando inoculado por via subcutânea como demonstrado por GUTIÉRREZ & CHAVES (1980); este efeito tem sido atribuído a dois fatores: LHF-I e LHF-II (LHF - Lachesis Hemorrhagic Factor). A LHF-I é uma glicoproteína que possui peso molecular de 100kDa e está associada ao fator proteolítico do veneno (SÁNCHEZ, MAGALHÃES, DINIZ, 1987). A LHF-II de 22,3kDa e ponto isoelétrico de 6,6, possui um efeito proteolítico maior que a LHF-I (SÁNCHEZ *et al.*, 1991).

A mionecrose, produzida em camundongos pelo veneno de *Lachesis muta muta*, está associada aos efeitos proteolítico e hemorrágico, porém não foi encontrada correlação direta entre estas atividades (GUTIÉRREZ & CHAVES, 1980). A mionecrose, causada pelos venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis* possuem ações diferentes sobre as fibras musculares em relação a mionecrose exercida pelo veneno do gênero *Crotalus*, pois este exerce uma ação seletiva sobre a fibra muscular, atuando diretamente na destruição do músculo (OWNBY, CAMERON, TU, 1976). Contudo a miotoxina isolada dos venenos de serpente, parece atuar de quatro formas distintas: a) induzindo o influxo celular de cálcio, por afetar primeiramente a integridade da membrana plasmática da célula muscular (Fosfolipase A mionecrotica, notexina, taipoxina, crotoxina e miotoxina de *Bothrops asper*); b) induzindo o influxo celular de sódio, por sensibilizar através da mudança de voltagem (despolarização), do canal de sódio do sarcolema do músculo esquelético (toxinas básicas de baixo peso molecular e crotoxina); c) polipeptídeos básicos que desorganizam a estrutura da membrana e também por romper o sarcolema do músculo esquelético (cardiotoxinas) e d) algumas toxinas com efeito hemorrágico, também pode ter efeito miotóxico, porém acredita-se que neste caso, seja em função da esquia ocasionada pela hemorragia (GUTIERREZ & CERDAS, 1984).

No veneno de *Lachesis muta*, encontra-se uma variedade de efeitos sobre o sangue, entre os quais os mais importantes são: coagulante - na dose mínima de 9,86µg em camundongos (MAGALHÃES, OLIVEIRA, DINIZ., 1981; ARAGÓN-ORTIZ, 1988;

GENÉ *et al.*, 1989; SILVEIRA *et al.*, 1989). Esta atividade está associada à presença de uma protease de ação, semelhante à trombina (Thrombin-like protease) (OREJUELA *et al.*, 1991), que, por sua vez, possui também ação neurotóxica semelhante à giroxina, presente no veneno crotálico (SILVA *et al.*, 1989); desfibrinante - a dose mínima, *in vitro* foi de 10µg (GENÉ *et al.*, 1989); fibrinolítica. - a dose mínima observada *in vitro*, no veneno de *Lachesis muta* foi de 1,80µg.

A formação de edema foi observada e determinada por LOMONTE (1985). No caso do veneno de *Lachesis muta* a dose mínima edemaciante foi de 5µg, em camundongo.

A atividade hemolítica do veneno de *Lachesis muta* é exercida indiretamente pela presença da enzima fosfolipase A₂ (CADILLO, FERREYRA, ZAVALETH, 1991), encontrada também em uma larga variedade de peçonhas e nas secreções pancreáticas (TU, 1977). Nos venenos ofídicos, a fosfolipase A₂ está associada à função de digestão, mas, também, apresenta atividades tóxicas e farmacológicas tais como: neurotoxicidade, miotoxicidade, efeito anticoagulante, efeito hipotensivo e cardiotoxico (ROSENBERG, 1990). A dose mínima hemolítica do veneno foi determinada em 0,76µg ± 0,16, mediante doseamento *in vitro* (VALIENTE *et al.*, 1992).

Outras enzimas foram isoladas, entre estas estão: DNases (SITITTENFELD *et al.*, 1991) enzimas que podem romper as moléculas de DNA; esterase de arginina, que caracteriza a presença de tripsina ou de enzimas que reagem como tripsina, também encontradas em diversas plantas e bactérias. A esterase de arginina, que difere da tripsina por não digerir a caseína e a hemoglobina, geralmente está associada aos fatores de coagulação ou liberadores de cininas nos venenos de serpente. No veneno de *Lachesis muta noctivaga* foram isoladas duas esterases de arginina com pesos moleculares diferentes: uma de massa molecular aproximado de 36kDa, que possui atividade de amidase e está associada à atividade coagulante e outra de 30kDa, que possui baixa atividade de amidase e está associada à liberação de cininas (SILVA, DINIZ, MAGALHÃES, 1985). A oxidase de L-aminoácidos é responsável pela cor amarelada de diversos venenos de serpentes e tem a importante função de ativar peptidases terminais e enzimas proteolíticas (SANCHES & MAGALHÃES, 1991); as cininogenases presentes em venenos têm a função de proteolizar

os cininogênios do plasma, transformando-os em cininas (KOZIN & COCHRANE, 1992). As cininas são hipotensores potentes e interagem, secundariamente, com outros fatores pró-inflamatórios, tais como: prostaglandinas, histamina e catecolaminas (DINIZ & OLIVEIRA, 1992).

Uma lectina de 26kDa que se liga à lactose, purificada do veneno de *Lachesis muta* possui atividade hemaglutinante, mas não tem poder mitogênico sobre linfócitos, quando comparados com concanavalina A e não possui atividade de agregante de plaquetas (LEIVA & ARAGÓN-ORTIZ, 1986; OGILVIE *et al.*, 1986; ARAGÓN-ORTIZ, BRENES-BRENES, GUBENSECK, 1989).

Os envenenamentos em humanos por acidentes com *Lachesis muta*, apesar de não serem freqüentes, são geralmente graves, não pela toxicidade do veneno, pois como já visto este é o menos tóxicos da família *Crotalidae*, mas sim pelas quantidades de veneno, que são elevadas. Os principais sintomas são: lesão local intensa (edema, hemorragia e necrose), coagulopatias, hipotensão, choque e distúrbios renais, bradicardia, diarreia, náusea e vômito (OTERO *et al.*, 1998).

Em razão desta diversidade de atividades fisiopatológicas do veneno de *Lachesis muta* e da gravidade do seu envenenamento torna-se fundamental pesquisar e desenvolver um antiveneno com maior especificidade, potência e menor custo.

1.3. PROPRIEDADES IMUNOLÓGICAS DOS VENENOS

Pelo exposto, os venenos ofídicos evocam diversos efeitos fisiopatológicos através de uma ou mais substâncias e, sobre este ponto de vista, foram considerados como um mosaico de antígenos (NICOLLE & RAPHAEL, 1925). Porém, quando se analisa a composição do veneno de famílias diferentes, este conceito de mosaico não se aplica, pois certos fragmentos podem ter uma estrutura relativamente similar, ou não possuir qualquer semelhança (BAXTER & GALLICHIO, 1974). Deste modo, certo componente é largamente distribuído em várias espécies e outros são restritos a poucas espécies.

Em 1901, Vital Brazil, na Faculdade de Farmácia de São Paulo postula sobre a especificidade dos soros antiofídicos, pois os soros provenientes da Europa, produzidos por Calmette, não neutralizavam a ação dos venenos das serpentes brasileiras, demonstrando que, mesmo entre os venenos das serpentes encontradas na América do Sul, o soro anticrotálico não era capaz de neutralizar a ação letal dos venenos de *Bothrops jararaca* (BRAZIL, 1901). Muitos experimentos demonstram a presença de antígenos comuns nos venenos ofídicos de diferentes famílias, gêneros ou espécies. LAMB & HANNA (1904), pela primeira vez evidenciou, por reação de precipitação entre venenos de *Naja naja* e veneno de *Echis carinatus*, a presença de componentes comuns, condição esta confirmada mais tarde por uma série de experimentos com venenos de outras espécies ou gênero de ofídios.. Com os avanços das técnicas que pudessem demonstrar as reações cruzadas entre os venenos, tais como: imunodifusão em gel de agarose (OUDIN, 1952), ELISA (ENGVALL & PERLMANN, 1972), muitos trabalhos demonstraram a composição ideal de antígenos para a produção de antivenenos (GRASSET, PONGRATZ, BRECHBUHLER, 1956; THEAKSTON & REID, 1979), pois a presença ou não de componentes comuns no veneno de espécies do mesmo gênero faz com que o veneno, de certas espécies, sejam indispensáveis nas formulações antigênicas, enquanto outras se tornam redundantes.

Baseando-se nas possíveis reações cruzadas entre os venenos de serpentes existentes no Brasil, DIAS DA SILVA *et al.* (1989) contribuíram para a formulação do antígeno que é usado na imunização de eqüídeos para produção de soro antibotrópico. Do mesmo modo, o estudo da composição dos venenos elapídicos, para produção de soros, demonstrou que a misturas dos venenos de *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis* foram considerados adequados para produzir anticorpos neutralizantes não só dos venenos específicos, como também os de *M. ibiboboca* e *M. spix* (HIGASHI *et al.*, 1995).

Com a fosfolipase A₂, que é um dos componentes da fração tóxica principal do veneno crotálico (crotoxina = crotapotina + fosfolipase A₂) foram imunizados eqüinos cujos soros neutralizaram a atividade letal do veneno crotálico integral, conforme teste em camundongos (HIGASHI *et al.* 1989). Como demonstrado por SANTOS *et al.*, 1988 a principal contribuição do estudo de HIGASHI *et al.* (1989) foi a de possibilitar a indução da

imunidade básica nos cavalos, os quais apresentaram reações locais ou sistêmicas menos intensas mesmo quando, posteriormente, receberam doses de veneno crotálico integral.

A utilização das frações do veneno ou a formulação do antígeno a ser utilizado na produção de antivenenos é uma forma de melhorar a especificidade e a potência.

Muito pouco tem sido pesquisado da ação dos venenos sobre o sistema imunológica. Sabe-se, no entanto, que entre os fenômenos observados, no sistema imune, causados pelos venenos ofídicos, os que mais despertaram a atenção foram: a atividade inflamatória e a imunossupressão induzida pelo Fator de Veneno de Cobra (Cobra Venom Factor – CVF). O CVF é uma proteína obtida do veneno de *Naja naja* que atua sobre o componente C3 do sistema complemento (COCHRANE, MÜLLER-EBERHARD, AIKIN, 1970). Os venenos da família *Viperidae* são altamente flogísticos, porém, grande parte dos estudos sobre a resposta inflamatória aos venenos são baseados em relatos clínicos e os trabalhos experimentais enfocam, principalmente, a atividade edematogênica (SOUZA E SILVA, 1993).

As características antigênicas dos venenos do gênero *Lachesis* não foram ainda estudadas profundamente, sabe-se, contudo que há reação cruzada entre as toxinas das quatro subespécies (GUTIÉRREZ, ROJAS, CERDAS, 1987).

A composição complexa dos venenos ofídicos, a especificidade e a existência de subespécies, determinou a necessidade do conhecimento das suas relações antigênicas sobre o sistema imunológico dos animais produtores de soro, tendo em vista que os soros heterólogos consistem no único tratamento confiável dos envenenamentos provocados por esses répteis. Sendo assim, cabe-nos entender os mecanismos de ação do sistema imunológico e como ele pode interagir com os venenos ofídicos, tanto para produção de soros como para utilização de farmacoterapêuticos.

1.4. SISTEMA IMUNOLÓGICO

Está perfeitamente estabelecido que uma das principais funções do sistema imune é de discriminar, reagir frente a uma grande variedade de patógenos e moléculas estranhas ao equilíbrio interno, bem como reconhecer e ser permissivo ao que é próprio. Esse reconhecimento, já estudado em humanos e camundongos, é mediado, dentre outros componentes, por linfócitos T e B. As células B, através de suas imunoglobulinas de superfície ou de membrana, podem reconhecer antígenos em sua conformação nativa, livre em soluções e sobre membranas ou células. Já as células T somente reconhecem antígenos na superfície de outras células por meio dos seus receptores (TCR - T cell receptors). Assim, as células T só reconhecem os antígenos processados e associados às moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC - Major Histocompatibility Complex). Logo, estas três moléculas, anticorpos, TCR e MHC controlam o processo da resposta imune (OWEN & LAMB, 1989). Por outro lado, a ativação da resposta imune dependerá de fatores intrínsecos e extrínsecos das partículas imunogênicas (BERZOFSKY, 1985). Consideram-se como fatores intrínsecos à acessibilidade, hidrofiliidade, hidrofobicidade e a mobilidade dos antígenos, os extrínsecos dependerão de fatores ligados ao hospedeiro, tais como: tolerância, genética, rede idiotípica, estrutura dos receptores de imunoglobulina. Deste modo, a ativação da resposta imune pode ser tanto positiva quanto negativa. A resposta positiva levará à produção de mediadores específicos para a eliminação dos antígenos ou patógenos e a resposta negativa determina a paralisação ou perda do reconhecimento do antígeno (tolerância e imunossupressão) (KLEIN, 1991).

A característica mais comum a todos os linfócitos T é a expressão dos receptores glicoproteicos para antígenos (TCR) capazes de reconhecerem os antígenos e as moléculas do MHC. Os receptores possuem uma estrutura heterodímera que apresenta uma fração extracelular de superfície, outra transmembrânica e ainda outra citoplasmática. A extracelular é constituída por uma região variável e outra constante em ambas as cadeias e de grande flexibilidade em razão da presença de pontes de sulfeto na região próxima à membrana citoplasmática, responsáveis por manter as cadeias polipeptídicas unidas. A região transmembrânica apresenta características hidrofóbicas e sem cargas, mantendo as

cadeias estáveis na superfície celular. O domínio citoplasmático consiste de um número variado de aminoácidos, dependendo do tipo particular de cadeia (α , β , γ e δ). As lisinas presentes nas cadeias são responsáveis pela disposição dos domínios na superfície celular e também pela sinalização intracelular, aumentando a expressão dos receptores de Il-2 na membrana celular (OWEN, 1988).

A principal função das moléculas de MHC é de ligar fragmentos de peptídeos que serão reconhecidos por linfócitos T. As moléculas de classe I são compostas por duas cadeias polipeptídicas, uma pertencente ao gene MHC α e outra ao gene β . As cadeias α por sua vez são subdivididas em três regiões distintas: uma região extracelular amino terminal de ligação com o peptídeo, semelhante a imunoglobulina; uma região transmembrânica e outra citoplasmática.

O grupo amino-terminal de ligação com o peptídeo consiste de dois domínios, denominados $\alpha 1$ e $\alpha 2$, apresentando certas variabilidades, porém sempre ligando o peptídeo da mesma forma. O segmento $\alpha 3$ que está entre a porção carboxi-terminal da $\alpha 2$ e a inserção citoplasmática é altamente conservado em todas as moléculas de classe I e possui semelhança com a região constante das imunoglobulinas.

A cadeia β é sintetizada por um gene que não pertence ao complexo MHC e possui uma semelhança muito grande com a $\beta 2$ -microglobulina isolada da urina de humanos. A função da $\beta 2$ -microglobulina na molécula de MHC é de manter a forma estrutural da molécula.

A região transmembrânica é constituída de 25 aminoácidos de características hidrofóbicas. A região citoplasmática possui cerca de 30 aminoácidos e pode ser fosforilada pela adenosina monofosfato cíclica (cAMP) dependente de proteína quinase. A função da região citoplasmática não está completamente definida, contudo, por causa do alto grau de energização pela fosforilação, a sua principal função parece ser a sinalização da molécula de MHC classe I, após a interação com outras proteínas de membrana ou com elementos do citoesqueleto (KLEIN, 1991).

As moléculas de classe II são compostas por duas cadeias polipeptídicas associadas de forma não covalente denominadas α e β . A cadeia α é significativamente maior que a cadeia β (32kDa contra 29kDa) devido a glicosilação. As duas cadeias, altamente polimórficas são codificadas por genes do MHC. As moléculas de classe II são divididas nas regiões: extracelular similar às imunoglobulinas, transmembrânica e citoplasmáticas. As porções extracelulares das cadeias α e β são subdivididas em $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\beta 2$. A região de ligação peptídica corresponde aos conjuntos formados por $\alpha 1$ e $\beta 1$, estas regiões além de serem responsáveis pela ligação do peptídeo, também serão reconhecida pelo linfócito T na superfície celular. As regiões $\alpha 2$ e $\beta 2$ são segmentos das moléculas de classe II que se mantêm constantes e são codificados pela superfamília dos genes de imunoglobulinas. Este segmento tem provável importância na interação não covalente entre as duas cadeias. A porção transmembrânica é hidrófoba e juntamente com a região intracelular é responsável pela sinalização para o interior da célula (BROWN *et al.*, 1988).

O mecanismo de ativação do sistema imunológico é semelhante em todos os mamíferos, não sendo diferente nos eqüídeos produtores de soro de uso terapêutico. A diferença existente entre os mamíferos está em relação aos isótipos de imunoglobulina G (IgG), tanto no número como na característica bioquímica e funcional. Em todos os mamíferos são encontradas as: IgA, IgM, IgE, IgD e IgG. Nos eqüídeos não foi ainda detectada a IgD e quanto à IgG é dividida em IgGa, IgGb, IgGc e a IgG(T), sendo que, esta última caracteriza-se por aparecer em grandes quantidades na produção de soros antitóxicos (antitetânico e antidiftérico) e motilidade eletroforética superior a γ -globulina, aparecendo nas região da β -globulina, justamente por ser rica em polissacarídeos. A presença desses polissacarídeos faz com que a molécula de IgG(T) tenha facilidade de transpor as barreiras celulares, aparecendo, assim, em teores elevados nas secreções naturais (saliva, liquor, lágrima).

Como exposto anteriormente, os processos de reconhecimento do sistema imune são muito semelhantes em todos os animais superiores. A inter-relação antígeno-hospedeiro, no que diz respeito às células e aos seus mediadores, pode levar a uma resposta positiva ou

negativa e, supostamente, os venenos ofídicos também podem interferir no mecanismo de modo positivo ou negativo.

O sistema imune tem como atividade normal o reconhecimento do próprio ou não, e as expressões de suas funções dependem das características genéticas de cada indivíduo, pois a produção de mediadores celulares, a expressão de receptores nas superfícies das células imunes bem como a produção das imunoglobulinas é uma característica fenotípica individual controlada geneticamente. O ambiente também é um fator de expressão fenotípica, ou seja, o uso de adjuvante (AUDIBERT & LISE, 1993), a associação com Il-2 recombinantes (WALDMANN *et al.*, 1993), a depleção de linfócitos T por radiação (ROIT, BROSTOFF, MALE, 1989), são fatores ambientais que influenciam no mecanismo da resposta imune.

Sendo assim, fatores intrínsecos e extrínsecos ao antígeno e também fatores ambientais podem levar a uma resposta imune negativa, seja ela imunossupressão, imunodeficiência ou doença autoimune.

1.5. IMUNOSSUPRESSÃO

Considera-se como imunossupressão a deficiência ou anergia de uma ou mais funções do sistema imunológico, induzida por substâncias moduladoras da resposta imune. Os mecanismos de imunossupressão foram inicialmente observados nas imunodeficiências congênitas ou adquiridas, nas doenças auto-imunes e nos tratamentos das rejeições de transplante.

As observações dos fenômenos de imunodeficiência contribuíram para a elaboração e análise de terapêuticos para a imunossupressão. E, deste modo, houve a possibilidade de determinar que os mecanismos fisiopatológicos da imunodeficiência ocorrem em três estágios da resposta imune: interações das células apresentadoras de antígeno (APCs) e linfócitos T, cooperação de células B e T e produção de imunoglobulinas.

Na interação APCs e linfócitos T, a deficiência pode estar associada a expressão defectiva do gene de MHC nas APCs (GRISCELLI & LISOWSKS-GIOSPIERRE, 1989) e também associada à falta ou à deficiência de CD3 nas células T, principalmente nas cadeias CD3 γ e ϵ (HAMMARSTRÖM, GILLNER, SMITH, 1993). A ausência ou os baixos níveis de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 e β -INF também atuam na diferenciação de macrófagos e linfócitos T, logo a ausência ou a deficiência de alguma citocina pode levar a anergia ou a supressão da resposta imune (FISCHER, 1993).

Na cooperação entre células T e B, a imunodeficiência ocorre principalmente na ausência ou defeito na expressão de moléculas de superfície que fazem a mediação entre os dois linfócitos. Tanto nas CD40, presente nos linfócitos B, células dendríticas interdigitais, células dendríticas foliculares, epitélio do timo e alguns carcinomas e nas gp39, presente junto à molécula do CD4 nos linfócitos T, levam à perda de ativação do linfócito T ou à falta de diferenciação do linfócito B em plasmócito. Outras moléculas associadas a este tipo de imunodeficiência, estão ligadas à família dos co-receptores B7 e dos receptores CD28/CTLA-4. A família B7 está expressa em todas as células APCs e nas células B somente após a ativação. As moléculas de CD28 acham-se expressas em células CD4⁺ e CD8⁺ e têm como co-receptor as moléculas B7-1 e B7-2. Porém, quando as células T são ativadas, estas deixam de expressar a molécula CD28 e passam a expressar um receptor denominado antígeno-associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4 – Cytotoxic Lymphocyte-associated Antigen) que possui uma alta afinidade pelos ligantes B7-1 e B7-2. Tanto o CD28/CTLA-4 como B7-1 e B7-2 traduzem um importante sinal de estimulação para a ativação de células T. A deficiência na expressão de qualquer dessas moléculas leva a uma ativação inadequada dos linfócitos T, resultando em uma proliferação e produção deficiente de linfocinas (LAMAN, CLAASSEN, NOELLE, 1994).

Algumas imunodeficiências estão ligadas direta ou indiretamente à função dos linfócitos B. O exemplo de uma forma direta de imunodeficiência é a ausência da tirosina quinase que impede a ativação, proliferação e formação de células B. Esta enzima citoplasmática promove a fosforilação da tirosina que é responsável pela sinalização no interior das células pré-B. A imunodeficiência ligada à função do linfócito B, de forma indireta, ainda não está esclarecida, porém a deficiência de alguns componentes do sistema

complemento, pode induzir a casos de doenças auto-imunes e à hipogamaglobulinemia (GRUMACH, 1992).

O estudo das imunodeficiências contribuiu significativamente no sentido de esclarecer o mecanismo das doenças em si, como também no modelo de ação de fármacos ou substâncias com ação imunossupressora.

Os primeiros estudos sobre imunossupressão foram realizados através da administração de agentes físicos ou químicos. Um exemplo clássico foi o aumento da sobrevida dos transplantes de pele em coelhos, utilizando como agente imunossupressor a irradiação γ (DEMPSTER, 1953). Este trabalho pioneiro, no que se refere à indução da imunossupressão, ainda não trazia nenhum benefício concreto para o transplante de órgãos, pois as doses de irradiação usadas eram letais, porém contribuiu para o estudo dos mecanismos da rejeição de transplante.

As tentativas de solução para este problema são antigas e derivadas da experimentação casual e superficial. Atualmente, para se testar um agente imunossupressor são exigidos vários ensaios que comprovem a atividade específica da droga. Para isso é necessário estudar os diversos níveis de dosagem, vias de administração, combinações com outros agentes e um programa de administração e biodisponibilidade. Sendo assim, tornou-se necessário conhecer os mecanismos pelos quais os agentes imunossupressores atuam no sistema imunológico.

As principais funções das drogas imunossupressoras são: diminuir os sinais clínicos evidentes nas doenças auto-imunes e evitar as rejeições a transplantes.

As doenças auto-imunes ocorrem por falha do sistema imunológico em reconhecer o que é próprio. Estas falhas ocorrem tanto por processos inerentes ao hospedeiro como, por exemplo: o não reconhecimento de um antígeno próprio (tiroidite auto-imune), como através de agentes externos (vírus, citomegalovírus – reação cruzada com moléculas expressas pelo locus HLA-DR) (KLEIN, 1991).

Já nas rejeições de transplantes, as moléculas de MHC do tecido transplantado não são reconhecidas como antígenos próprios e por isso são rejeitadas, por mais que haja homologia entre o hospedeiro e doador.

Deste modo, as drogas imunossupressoras atuam de cinco modos diferentes:

a) Neutralizando receptores de superfície celular que participam do reconhecimento antigênico. Estes processos podem ser obtidos com: anticorpos anti-TCR, anticorpos anti-CD4, anticorpos anti-MHC classe II, antagonistas de MHC classe II (moléculas semelhante ao TCR que competirá com o TCR de superfície celular dos linfócitos T reativos), antagonistas de TCR (moléculas semelhantes ao MHC classe II, que competirá com MHC da superfície celular que está expondo o peptídeo auto-reativo). Todos estes mecanismos já foram testados, porém só o anticorpo anti-CD4 tem sido empregado clinicamente. (ADORINI *et al.*, 1993);

b) Desviando os receptores celulares: para o desvio desses receptores, no caso o TCR, usam-se peptídeos similares aos expressos pelo MHC classe II, para interagir com o TCR, e o peptídeo auto-reativo deve ser reconhecido. Este tipo de terapia é dependente da quantidade e da via de administração do imunossupressor, e pode levar a tolerância ao auto-antígeno ou induzir à formação de células reguladoras (ADORINI *et al.*, 1993);

c) Bloqueando a expressão de uma interleucina ou de um receptor de interleucina; atualmente, diversas drogas imunossupressoras usadas, clinicamente, agem desta forma. Assim, a ciclosporina A e o FK506 ligam-se aos seus respectivos receptores, cyclophilin e FKBP-FK, formando um complexo com a calcineurina, inibindo a atividade das fosfatases e impedindo a expressão de proteínas que regulem a ativação das células T, entres estes a IL-2, e os receptores de IL-2. Já no caso dos corticosteróides ocorre a inibição de proliferação de células T através do bloqueio da transcrição gênica das IL-1, IL-2, IL-6, INF- γ e TNF α e, deste modo a síntese de qualquer das citocinas é completamente inibida. A Rapamicina atua de modo semelhante ao FK506, mas segundo um mecanismo molecular diferente;

d) Destruindo algum tipo de célula responsável pela auto-imunidade ou rejeição: a destruição de células auto-reativas pode ser feita por meio de anticorpos contra células T, como atualmente são usados clinicamente, o OKT3 (monoclonal anti-CD3), o ATG (Anti-Thymus Globulin) e o ALG (Anti-Lymphocyte Globulin), que reagem exclusivamente com células T;

e) Inibindo a atividade proliferativa: as drogas que inibem diretamente a atividade proliferativa das células atuam no sistema de síntese das bases nucleotídicas (SHARMA *et al.*, 1994). Estas drogas são: a Azathioprina (AZT), que atua como antagonista das purinas; o RS-61443, que inibe duas enzimas na biossíntese de purinas e de guanosinas; a Mizoribina, um imidazole inibidor da biossíntese de purinas e a Brequinina de sódio que bloqueia a síntese de pirimidina.

1.6. ATIVIDADE IMUNOSSUPRESSORA DOS VENENOS

Não existe, até o momento, relato bibliográfico que identifique a ação imunossupressora de venenos ou de toxina proveniente de peçonhas que, de algum modo, atue no mecanismo básico de ativação do sistema imunológico. Contudo a presença de qualquer elemento nos venenos ofídicos, que atue como imunossupressor, é um forte responsável pela perda de potência na produção de soros hiperimunes.

Por outro lado, existem substâncias que atuam no sistema complemento de modo a consumir, em curto espaço de tempo, o componente C3 da cascata, e entre estas está o CVF (Cobra Venom Factor), uma enzima extraída do veneno de *Naja naja*, que atua sobre C3 e que leva a uma hipogamaglobulinemia (GEWURZ *et al.*, 1966). MARTINELLI, MATSUDA, OSLER, (1978a) descreveram a atividade imunossupressora da glicoproteína extraída do veneno *Naja naja*. Os resultados deste trabalho sugerem que, devido à sua atividade anticplementar, o CVF possui atividade imunossupressora, pois diversos estudos já haviam demonstrado a função do sistema complemento na regulação da resposta imune. Todavia, este efeito só foi verificado para antígenos T-dependentes, enquanto para os

antígenos T-independentes a imunossupressão só é observada quando são administradas doses baixas de antígeno (MATSUDA, MARTINELLI, OSLER, 1978).

Usando camundongos deficientes em componente C5 do sistema complemento, MARTINELLI *et al.* (1978b), observaram que tratando estes animais com CVF, ocorria um tipo de resposta imune humoral como entre os animais não C5 deficientes. Estes autores verificaram, no entanto, que a via de administração do antígeno induzia ou não deficiência de um isótipo de imunoglobulina, ou seja, quando o antígeno era administrado por via endovenosa, somente ocorria supressão da IgG. Contudo, quando o antígeno era administrado por via intraperitoneal não havia supressão aparente de nenhum isótipo de imunoglobulina. O estudo mostrou que a imunossupressão induzida por CVF não estava relacionada com a ativação dos chamados componentes tardios do sistema complemento (C4 a C9).

BÖTTGER *et al.* (1986) obtiveram os mesmos resultados de MARTINELLI *et al.* (1978a) e MATSUDA *et al.* (1978), porém, descreveram que o mecanismo de imunossupressão induzido pelo CVF era dependente da quantidade de antígeno usado, em contraste com isto, verificou-se que animais portadores de deficiência no componente C2 da cascata do complemento não apresentavam imunossupressão, quando tratados com CVF, mesmo que houvesse variação nas doses de antígenos. Deste modo foi postulado que o CVF suprime a resposta imune humoral pela depleção do componente C3.

O modo de ação do CVF consiste na sua interação com o fator B na presença de Mg^{++} , resultando num complexo CVF-B, que é transformado enzimaticamente em CVF-Bb pela clivagem do Fator B pelo Fator D. O complexo CVF-Bb cliva o componente C3 em C3a e C3b e o C3b se liga ao complexo formando CVF-BbC3b, com capacidade enzimática de formar o complexo citolítico de C5b a C9 (TAMBOURGI *et al.*, 1992).

A relação de regulação da resposta imune em função da depleção do componente C3 do sistema complemento ainda não está esclarecida. WEILER & HOBBS (1987) descreveram as seguintes características do componente C3: a) o C3 faz parte de ambas as vias de ativação do sistema complemento (clássica e alternativa) e atua na amplificação da

resposta imune; b) o C3, está presente em altas concentrações no soro e o seu isolamento é relativamente simples; c) a depleção do C3 com CVF altera a resposta imune; d) receptores para o C3 estão presentes nos linfócitos e macrófagos, e estes, por sua vez, participam da resposta imune celular e humoral. Estes receptores são, portanto, descritos como participantes efetivos na regulação da resposta imune.

Recentemente foi sugerido que o C3b, ou peptídeos dele derivados poderiam influenciar especificamente na seleção de epítomos antigênicos para a apresentação no mecanismo das APCs (GERMAIN & MARGULIES, 1993). A ligação covalente entre a cadeia α do C3b e o antígeno, pode influenciar na estabilidade da geração do peptídeo imunogênico, pois foi demonstrado que pequenos haptenos que se ligam ao C3b, via região thiol-ester, passam a ser imunogênicos *in vivo* e os anticorpos específicos para estes são sintetizados por influência direta das células T (MILETIC & FRANK, 1995).

As serpentes existentes no Brasil não apresentam, em seus venenos, proteína relacionada, imunologicamente, ao CVF (CALICH *et al.*, 1977).

Os venenos de *Micrurus* (*M. ibiboboca* e *M. spixii*), de *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. mogeni* e *B. cotiara*) serpentes existentes no Brasil e de *Naja* (*N. melanoleuca* e *N. nigricollis*) encontradas na Índia fazem com que o soro humano normal (SHN) perca a atividade hemolítica via sistema complemento. Porém, somente a *N. melanoleuca* apresenta uma proteína semelhante ao CVF no veneno. A clivagem do componente C3 do SHN, pelos venenos de *Bothrops* é feita através de proteases que digerem a caseína e a gelatina e, conseqüentemente, podem induzir à clivagem de C3 purificado. Já os venenos de *Micrurus* e *N. nigricollis* não possuem estas proteases com capacidade de clivar a caseína e a gelatina, mas possuem atividade “thrombin-like”, que são capazes de interagir com C3 e dar origem ao complexo C5b a C9 (TAMBOURGI *et al.*, 1992).

Em 1979, BOQUET descreveu a atividade imunossupressora dos venenos de serpentes como sendo relacionada à competição antigênica, já que os venenos ofídicos são misturas complexas de substâncias tais como: proteínas, glicosídeos, lipídios e nucleosídeos. A competição antigênica caracteriza-se, quando a aplicação de um determinado antígeno

inibe a resposta imune a um segundo antígeno inoculado, num espaço de 1 a 10 dias após o primeiro (PROSS & EIDINGER, 1974). Existem dois mecanismos pelos quais ocorre a competição antigênica: um intermolecular e outro intramolecular. A competição intermolecular ocorre com duas moléculas diferentes e a intramolecular com dois epítomos de uma mesma molécula (KLEIN, 1991).

1.7. SOROS ANTIVENENOS

Os estudos sobre a atuação dos venenos no sistema imunológico são escassos e, ainda, não completamente compreendidos. Todavia, os venenos de serpentes podem atuar nos animais soros produtores de modo incerto e, por muitas vezes, são incapazes de produzir as respostas necessárias à produção de soro antiofídico na concentração desejável.

Os soros hiperimunes heterólogos começaram a ser utilizados no final do século passado por Roux e Kitazato na terapia contra o tétano e difteria. A aplicação desses soros, no tratamento de acidentes ofídicos, foi iniciada por CALMETTE (1894), pelo uso de soro de cavalos imunizados com doses subletais de veneno.

No Brasil, Vital Brazil produziu os primeiros lotes de soro antiveneno descobrindo a especificidade em relação às espécies de serpentes. Com isso, iniciou-se a produção de soro antibotrópico, anticrotálico e antiofídico (antibotrópico e crotálico). Os soros antibotrópicos, anticrotálicos e antibotrópico-crotálico eram feitos de modo simplificado e o produto era administrado nos indivíduos acidentados sem nenhuma purificação (VITAL BRAZIL, 1987).

Com a evolução da química e da imunoquímica, diversos métodos começaram a ser utilizados para o aprimoramento da obtenção de soros heterólogos, entre estes: a purificação de imunoglobulinas com sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ e a clivagem de imunoglobulina por pepsina (PEPIN *et al.*, 1995).

Atualmente, os soros são produzidos em sistemas fechados e automatizados, levando em conta a utilização das boas práticas de produção, preconizadas por órgãos internacionais de controle de medicamentos (RAW *et al.*, 1991).

O Instituto Butantan vem, nos últimos 10 anos, pesquisando formas adequadas de imunização através de esquemas peculiares a cada tipo de veneno, modificações nas formulações de adjuvantes, purificação de venenos, buscando metodologias específicas, de baixo custo ou de custo coerente ao benefício, como por exemplo: identificação e seleção de cavalos bons produtores de anticorpos a determinados imunógenos, toxinas ou venenos.

O maior problema enfrentado na produção dos soros antiofídicos de modo geral, está na qualidade da matéria-prima, especificamente no título do plasma sanguíneo a ser purificado. É de conhecimento dos laboratórios produtores que rendimentos acima de 40% são raros, pois os métodos de purificação, a sensibilidade das IgG aos tratamentos e as perdas mecânicas inerentes ao processo fazem com que os rendimentos sejam relativamente baixos. Deste modo é perfeitamente coerente que, para obtermos um produto final de boa qualidade, ou seja, com bons títulos, baixa proteína e sem formação de agregados protéicos é necessário que os plasmas tenham excelentes títulos.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) Estudar as atividades do veneno de *Lachesis muta muta* sobre a produção geral de anticorpos;
- b) Esclarecer a razão da obtenção de teores relativamente baixos de anticorpos antiveneno laquéutico em cavalos hiperimunizados;
- c) Melhorar os rendimentos na preparação dos plasmas destinados à produção comercial do soro antibotrópico-laquéutico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

3.1.1. Cavalos

Cavalos com peso entre 350 – 400kg, clinicamente sadios, vacinados contra tétano, encefalomielite eqüina, influenza e raiva livres de anemia infecciosa eqüina, criados em regime de semiconfinamento, usados para a produção de soros hiperimunes de uso terapêutico, pertencentes à Seção de Obtenção de Plasmas Hiperimunes do Instituto Butantan.

3.1.2. Carneiros

Carneiros com peso médio de 80kg, clinicamente sadios, vacinados contra raiva, doadores de eritrócitos (EC) para preparo de meio de cultura, criados em regime de semiconfinamento, pertencentes à Seção de Obtenção de Plasmas Hiperimunes do Instituto Butantan.

3.1.3. Camundongos

Camundongos selecionados para a alta produção de anticorpos, linhagem H_{GP} (High General Primary Response), criados e mantidos em biotério convencional, pertencentes ao Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan.

3.2. ANTÍGENOS

3.2.1. Eritrócitos de carneiro

Para determinação do efeito supressor do veneno de *Lachesis muta muta*, foi utilizado um antígeno não correlacionado, eritrócito de carneiro (EC), coletado com assepsia em solução de Alsever. Após três lavagens sucessivas em solução salina 0,85%, a suspensão

de EC foi padronizada espectrofotometricamente ($\lambda = 545\text{nm}$). Os camundongos receberam a dose de 5×10^8 células em 0,5ml de solução salina tamponada pH 7.2 (PBS), por via intraperitoneal.

3.2.2. Solução de veneno de *Lachesis muta muta* para imunização

Foi obtido 1048mg de veneno de uma única serpente *Lacheis muta muta* que, imediatamente após a extração, foi centrifugado a 900g e liofilizado. Para inoculação em camundongos preparou-se uma solução na concentração de 10mg/ml do veneno, em PBS pH 7.2. Para inoculação em eqüinos foi preparada uma solução, na concentração de 20mg/ml do veneno, em solução fisiológica 0,85%.

3.2.3. Solução de veneno de *Lachesis muta muta* para ELISA.

Veneno de *Lachesis muta muta* na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ em Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,1M pH 9.6 foi usado para “coating” e foram adicionados 100 μl desta solução em cada cavidade, com exceção das cavidades da coluna 1, que ficou como branco da reação.

3.2.4. Solução de veneno de *Bothrops jararaca* para imunização

Foram obtidos 400mg por várias extrações de serpentes do gênero *Bothrops jararaca* que, imediatamente após, foi centrifugado a 900g e liofilizado. Para inoculação em camundongos, preparou-se uma solução na concentração de 10mg/ml de veneno, em PBS pH 7.2. Para inoculação em eqüinos, foi preparada uma solução na concentração de 20mg/ml de veneno, em solução fisiológica 0,85%.

3.2.5. Solução de veneno “pool” *Bothrops* sp. para imunização de cavalos

Foram obtidos 100mg de veneno extraído de várias serpentes do gênero *Bothrops* e o “pool” foi composto com os seguintes venenos: *B. jararaca* 50%, *B. jararacussu* 12,25%, *B. alternatus* 12,25%, *B. moojeni* 12,25% e *B. neuwiedi* 12,25%, que, imediatamente após a extração individual, foram centrifugados a 900g, liofilizados e depois misturados nas proporções descritas. Para inoculação em cavalos, foi preparada uma solução na concentração de 20mg/ml do “pool”, em PBS pH 7.2.

3.3. IMUNIZAÇÕES

3.3.1. Camundongos

Na maioria dos esquemas de imunização, os camundongos H_{GP} foram imunizados com uma única dose de ½DL₅₀ de veneno integral de *Lachesis muta muta*, para determinação da resposta primária e 72hs depois receberam o EC. Os animais foram sangrados em intervalos médios de 5 a 7 dias para titulação. Após o fracionamento do veneno de *Lachesis muta muta*, as frações foram utilizadas também na imunização de camundongos, obedecendo ao mesmo protocolo anterior, porém utilizando dois grupos de controle, um só com EC e outro com veneno integral e EC. Para teste da resposta secundária, 130 dias após a primeira dose de veneno, os animais foram imunizados novamente com veneno integral ou frações de veneno e após 72hs receberam o EC, sendo o grupo-controle imunizado apenas com EC.

3.3.2. Cavalos

3.3.2.1. Imunização experimental

Dez miligramas (10mg) de veneno foram diluídos em 2,5ml de solução fisiológica 0,85% e emulsificados com 5ml emulsão múltipla completa - EMC (Marcol

100ml; Montanide 900ml; BCG 10mg) ou emulsão múltipla incompleta -EMI (Marcol 100ml; Montanide 900ml). Após a emulsificação foram adicionados 2,5ml de solução fisiológica 0,85% com 2% de Tween 20. Para a imunização dos animais com veneno associado de *Lachesis muta muta* e *Bothrops jararaca*, foram utilizados 5mg de cada veneno. O veneno purificado, ou seja o veneno sem as frações que, supostamente, possuem atividade supressora, foi utilizado nas mesmas proporções com os mesmos veículos. Os esquemas de imunização foram os seguintes:

Grupo A - 2 cavalos

1º dia - 10mg de veneno de *L. m. muta* purificado em 10ml de EMC

15º dia - 10mg de veneno de *L. m. muta* purificado em 10ml de EMI

25º dia - 10mg de veneno de *L. m. muta* purificado em 10ml de PBS pH 7.2

30º dia - 10mg de veneno de *L. m. muta* purificado em 10ml de PBS pH 7.2

37º dia - Sangria Exploradora

38º dia - 1º. Sangria definitiva + Plamaferese

39º dia - 2º. Sangria definitiva + Plasmaferese

40º dia - 3º. Sangria definitiva

Grupo B - 2 cavalos

1º dia - 5mg de veneno Total de *L. m. muta* em 10ml de EMC

2º dia - 5mg de veneno Total de *B. jararaca* em 10ml de EMC

15º dia - 5mg de veneno Total de *L. m. muta* em 10ml de EMI

16º dia - 5mg de veneno Total de *B. jararaca* em 10ml de EMI

25º dia - 5mg de veneno Total de *L. m. muta* em 10ml de PBS pH 7.2

26º dia - 5mg de veneno Total de *B. jararaca* em 10ml de PBS pH 7.2

30º dia - 5mg de veneno Total de *L. m. muta* em 10ml de PBS pH 7.2

31º dia - 5mg de Veneno Total de *B. jararaca* em 10ml de PBS pH 7.2

37º dia -Sangria Exploradora

38º dia - 1º. Sangria + Plasmaferese

39º dia - 2º. Sangria + Plasmaferese

40º dia - 3º. Sangria

Grupo C - 2 cavalos

1º Dia - 10mg de veneno Total de *L. m. muta* em 10ml de EMC

15º dia - 10mg de veneno Total de *L. m. muta* em 10ml de EMI

25º dia - 10mg de veneno Total de *L. m. muta* em 10ml de Solução PBS pH 7.2

30º dia - 10mg de veneno Total de *L. m. muta* em 10ml de Solução PBS pH 7.2

37 dia - Sangria Exploradora

38º dia - 1º. Sangria + Plasmaferese

39º dia - 2º. Sangria + Plasmaferese

40º dia - 3º. Sangria

3.3.2.2. Imunização para produção

Doze cavalos foram imunizados com 10mg veneno de *Lachesis muta muta* purificado, diluídos em 2,5ml de solução fisiológica 0,85% e emulsificados com 5ml emulsão múltipla completa - EMC (Marcol 100ml; Montanide 900ml; BCG 10mg) ou emulsão múltipla Incompleta -EMI (Marcol 100ml; Montanide 900ml). Após a emulsificação foram adicionados 2,5ml de solução fisiológica 0,85% com Tween 20.

1º dia - 2,5mg de veneno purificado de *L. m. muta* em 10ml de EMC

2º dia - 2,5mg de veneno Pool do gênero *Bothrops* em 10ml de EMC

15º dia - 2,5mg de veneno purificado de *L. m. muta* em 10ml de EMI

16º dia - 2,5mg de veneno Pool do gênero *Bothrops* em 10ml de EMI

25º dia - 5mg de veneno purificado de *L. m. muta* em 10ml de PBS pH 7.2

26º dia - 5mg de veneno Pool do gênero *Bothrops* em 10ml de Sol. PBS pH 7.2

30º dia - 5mg de veneno purificado de *L. m. muta* em 10ml de PBS pH 7.2

31º dia - 5mg de Veneno Pool do gênero *Bothrops* em 10ml de PBS pH 7.2

37º dia - Sangria Exploradora

38º dia - 1º. Sangria + Plasmaferese

39º dia - 2º. Sangria + Plasmaferese

40º dia - 3º. Sangria

3.4. DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS

3.4.1. Títulos de aglutininas Anti-EC.

Para a quantificação dos anticorpos contra EC, foi utilizada a técnica de hemaglutinação direta em microplacas (HUDSON & HAY, 1989). A 25µl das diluições em série (razão 2) dos soros individuais em PBS pH 7.2 contendo 0,1% de gelatina, foram adicionados 25µl de suspensão de eritrócitos, numa concentração de 10^8 células/ml no mesmo diluente. A leitura da reação foi feita após 2 horas, a temperatura ambiente.

3.4.2. Título de anticorpos antiveneno

3.4.2.1. Ensaio *in vitro*.

Os títulos individuais de anticorpos contra o veneno de *Lachesis*, em cavalos, foram determinados pela técnica de reação imunoenzimática (ELISA) indireta (ENGVALL, 1980). Microplacas de 96 cavidades (Corning®) foram sensibilizadas com veneno laquétrico, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9.6 na concentração de 10µg/ml de veneno, sendo colocado em cada cavidade 100µl e incubado durante uma noite à 4°C. Os sítios livres de cada cavidade foram bloqueados por 2 horas à temperatura ambiente com 100µl de uma solução de gelatina a 1% em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9.6. Após a adição de 100µl das diluições em série (razão 2) dos soros de cavalo e incubação à 37°C por 2 horas, foi empregado anticorpo de cabra anti-IgG de cavalo conjugado à peroxidase (Sigma Chemical CO.®). Como substrato, utilizando-se O-phenylenediamine (Sigma Chemical CO.®) e peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida após 15 minutos, pela adição de ácido sulfúrico a 2,5N e a densidade óptica foi medida, usando-se um leitor de ELISA com filtro de 492nm. Os títulos foram obtidos através do processamento das densidades ópticas obtidas *versus* o inverso do logaritmo da diluição, de modo a obter a dose efetiva 50% (DE₅₀) (LEINIKKI & PASSILA, 1977).

3.4.2.2. Ensaio *in vivo*

3.4.2.2.1. Determinação da DL₅₀ (DALMORA *et al.*, 1992)

Para a determinação da dose letal 50% (DL₅₀) dos venenos de *Lachesis muta muta*, *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissimus terrificus*, grupos de 6 camundongos com peso entre 18 e 22gr, foram injetados, por via intraperitoneal com 0,5ml por animal, de diferentes concentrações de veneno, com o limite de: 140µg até 290,3µg para o veneno de *Lachesis muta muta*, de 25µg a 51,84µg para o veneno de *Bothrops jararaca* e de 1,3µg a 2,7µg para o veneno de *C. d. terrificus*, usando a razão de 1,2 como fator de escala de dose. Após observação por 48h, foi computado o número de animais mortos pelo número total de animais inoculados por dose e a DL₅₀ foi calculada através da Análise de Probitos (FINNEY, 1971). As DL₅₀ dos venenos foram: 10,06mg/Kg ± 0,61mg para o veneno de *L. muta muta*, de 1,81mg/Kg ± 0,09mg para o veneno de *B. jararaca* e de 0,08mg/Kg ± 0,005mg para o veneno de *C. d. terrificus*.

3.4.2.2.2. Neutralização da atividade letal do veneno de *Lachesis muta muta* (DALMORA *et al.*, 1992).

A capacidade neutralizante da atividade letal do antiveneno laquéutico foi determinada mediante a incubação de uma mistura fixa de veneno (5DL₅₀), com diferentes volumes de antiveneno obtidos do plasma individual dos eqüinos imunizados, após 30 minutos à 37°C. Após a incubação, 0,5ml das misturas veneno/antiveneno foram injetadas, por via intraperitoneal, em camundongos com peso entre 18-22g, divididos em 5 grupos de 6 animais e representava uma dose de antiveneno. Foram computados os números de animais vivos por dose e a dose efetiva 50% (DE₅₀) foi calculada através da Análise de Probitos (FINNEY, 1971). A potência do antiveneno é reportada na quantidade de veneno (mg) neutralizada por 1ml de antiveneno segundo a fórmula:

$$\text{Potência(mg / ml)} = \frac{5DL_{50} - DL_{50}}{DE_{50}}$$

3.4.3. Título de anticorpos anti-fosfolipase A₂ (GUTIERREZ *et al.*, 1988)

A hemólise indireta é uma propriedade de alguns venenos de serpentes que possuem Fosfolipase A₂ e que, na presença da lecitina, formam uma hemolisina capaz de interagir com os eritrócitos de carneiro, dependendo da dose de veneno.

Uma solução tampão fosfato-salina pH 7.2 aquecida a 56°C, preparada com: 0,8% de agarose, 1,2% de papa de hemácia de carneiro lavadas, 1,2% de gema de ovo diluída 1:4 em solução fisiológica e 1% de cloreto de cálcio a 0,01M, é depositada sobre placas plásticas transparentes de 135 X 80 mm, de modo a formar uma camada de 3mm de espessura. Após o resfriamento, são feitos 12 orifícios de 3mm de diâmetro no gel, espaçados de 25mm.

Em cada orifício das placas foram colocados 15µl das diluições em PBS pH 7.2 (razão 2) do veneno de *Lachesis muta muta* com concentração inicial de 20mg/ml até 9,76 X 10⁻³mg/ml e estas incubadas em câmara úmida por 18h. Após a incubação, foram medidos os diâmetros dos halos hemolíticos e plotados em um gráfico logaritmo da dose X diâmetro do halo em milímetro, de modo a se calcular a dose efetiva hemolítica 50% (DEH₅₀). A DEH₅₀ é a dose que forma um halo de hemólise com 50% da área de hemólise máxima.

Após a determinação da DEH₅₀, foram feitas diluições seriadas (razão 2) em PBS pH 7.2, dos soros dos cavalos a serem testados. Adicionou-se 100µl da solução de veneno com 2 vezes a concentração da dose hemolítica 50%, de modo que, quando fosse adicionado os soros dos cavalos em diluições seriadas, a concentração final de veneno fosse igual à concentração obtida para a DEH₅₀. A mistura (veneno + soro) permaneceu por 30 minutos a 37°C em repouso e, em seguida, 15µl de cada diluição foram colocados nos orifícios da placa de hemólise. As placas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 18hs. Os diâmetros dos halos de hemólise foram medidos para se determinar a dose neutralizante por método de Probitos.

3.5. FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA DO VENENO DE *LACHESIS MUTA MUTA*

3.5.1. Aplicação da amostra

Uma coluna de 26mm de diâmetro e 100cm de altura (modelo XK 26/100 – Pharmacia®) foi empacotada com 500ml de Superdex 75 diluído em PBS pH 7.4, na proporção de 1:3, para obtenção de um volume total de 1.500ml. Com um adaptador para empacotamento, o gel foi adicionado à coluna de modo a obter um fluxo de 8ml/minuto (90cm/h). Após 3 horas, a coluna estava empacotada e equilibrada com o eluente e altura de gel de 90cm.

A amostra (123µg de veneno de *Lachesis muta muta* em 200µl de PBS pH 7.4), foi aplicada através de um “looping” com capacidade de 200µl. A eluição foi feita com PBS pH 7.4. O fluxo de trabalho foi de 5ml/minuto (57cm/h), com registrador de eventos com velocidade de 0,05cm/ml e coletado o eluente em volumes de 5ml durante toda a cromatografia. O ensaio, realizado em 2h20, recuperou um volume de 700ml, do qual foram obtidas 6 frações distintas.

3.5.2. Doseamento de proteína

Para determinar a concentração protéica das frações obtidas na cromatografia utilizou-se o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951)

3.6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE 6 A 20% NA PRESENÇA DE SDS

Para determinação do peso molecular das proteínas existentes nas diversas frações obtidas por cromatografia, fez-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida, em gradiente de 6 a 20% na presença de SDS, segundo NEVILLE (1971). A coloração das diversas frações protéicas foi feita com nitrato de prata

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Além da Análise de Probitos (FINNEY, 1971), para determinação da DL_{50} dos venenos e da DE_{50} do antiveneno, foi utilizada a análise de variância para independência dos termos e para o paralelismo das retas (BEIGUELMAN, 1991), na cinética de produção de anticorpos contra EC.

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DO VENENO DE *Lachesis muta muta* SOBRE A RESPOSTA PRIMÁRIA A ERITRÓCITOS DE CARNEIRO, EM CAMUNDONGOS.

Em camundongos, a resposta primária a antígenos não correlacionados, foi obtida através da ação do veneno sobre a produção de anticorpos contra eritrócito de carneiro (EC), usando-se os soros coletados em 7 e 14 dias após a imunização com EC e titulando-os em ensaio de hemaglutinação.

Como foi possível observar, a resposta ao EC foi significativamente reduzida nos animais que receberam $\frac{1}{2}DL_{50}$ e $\frac{1}{4}DL_{50}$ do veneno, respectivamente, 24h antes da administração do EC ($\frac{1}{2}DL_{50}$ 24hs antes EC - 7 dias $0,05 < P < 0,02$ e 14 dias $P=0,01$; $\frac{1}{4}DL_{50}$ 24hs antes EC - 7 dias $0,01 < P < 0,001$). Os soros obtidos dos animais do grupo $\frac{1}{2}DL_{50}$ junto EC, nos quais o veneno foi aplicado juntamente com os EC, não apresentaram títulos de anticorpos significativamente diferentes em relação ao grupo-controle. A tabela 1 mostra os resultados estatísticos para cada grupo em relação ao controle.

Em função desses resultados, um segundo experimento foi realizado, variando o intervalo de tempo entre a administração do veneno e o antígeno não relacionado (EC). Em três grupos de camundongos H_{GP} , cada um com 8 animais foram inoculados por via intraperitoneal com $\frac{1}{2}DL_{50}$ de veneno e 24h, 72h depois e concomitantemente receberam EC. Neste segundo experimento pudemos observar a cinética da produção de anticorpos para EC, em função da administração prévia do veneno, em diferentes intervalos de tempo (FIGURA 3). Os resultados mostram que os títulos hemaglutinantes dos soros obtidos de animais que receberam previamente o veneno foram significativamente reduzidos em relação aos animais controle e que, quanto maior o intervalo de tempo entre as inoculações do veneno e do EC, menor foi o título hemaglutinante. A tabela 2 refere-se à análise estatística de cada grupo em relação ao controle

Esses resultados mostram que o veneno de *Lachesis muta muta* possui uma atividade supressora sobre a produção de anticorpos contra antígenos não relacionados.

Os experimentos subseqüentes foram realizados para verificar se os venenos obtidos de outros membros da família *Crotalidae* também exibiam o mesmo efeito observado com o veneno de *Lachesis muta muta*, na resposta imune dos camundongos.

Assim, utilizando-se veneno de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca*, por via intraperitoneal, em 3 grupos com 8 camundongos cada, utilizando-se as doses de 0,8µg e 18µg por animal equivalente a $\frac{1}{2}$ DL₅₀, para os respectivos venenos e os EC inoculados 72h após a inoculação do veneno, observamos que, ao contrário do que ocorria com o veneno de *Lachesis muta muta*, a resposta dos animais ao EC foi significativamente maior do que o grupo-controle (FIGURA 4).

A tabela 3 mostra os resultados da análise estatística, comparando os animais inoculados com veneno, em relação aos animais de controle.

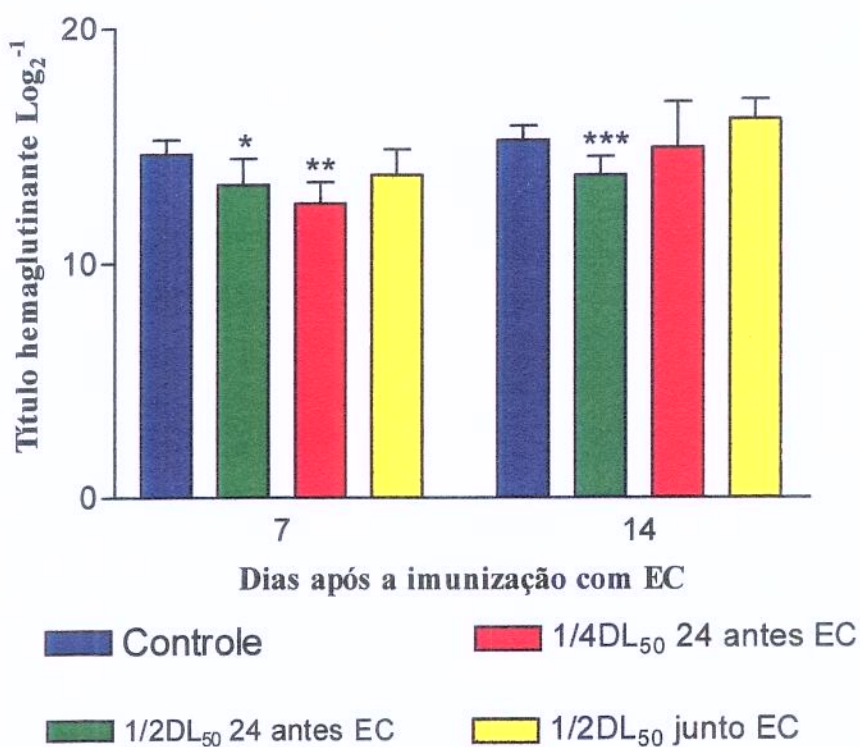


Figura 2: Efeito do veneno de *Lachesis muta muta* sobre a produção de anticorpos ao EC em camundongos H_{GP}.

Controle – controle só EC; **½ DL₅₀ 24 antes EC** – Inoculação intraperitoneal de ½DL₅₀ de veneno 24h antes do EC; **¼ DL₅₀ 24 antes EC** – Inoculação intraperitoneal de ¼DL₅₀ de veneno 24h antes do EC; **½ DL₅₀ junto EC** – Inoculação intraperitoneal de ½DL₅₀ de veneno concomitantemente ao EC,.

1 DL₅₀ do veneno de *Lachesis muta muta* = 200µg

* 0,02 < P < 0,05 ** 0,001 < P < 0,01 *** P = 0,01

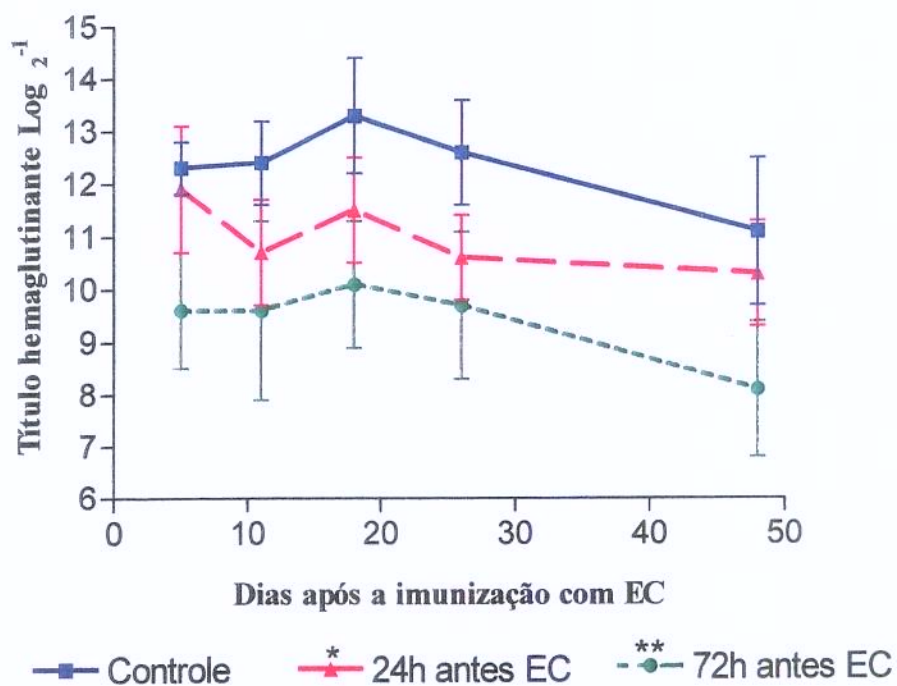


Figura 3: Efeito do veneno de *Lachesis muta muta* sobre a produção de anticorpos ao EC, em função do intervalo de tempo entre as imunizações de veneno e EC, em camundongos H_{GP}.

Controle – Controle só EC; **24h antes EC** – Inoculação intraperitoneal de $\frac{1}{2}$ DL₅₀ de veneno 24h antes do EC; **72h antes EC** – Inoculação intraperitoneal de $\frac{1}{2}$ DL₅₀ de veneno 72h antes do EC.

1 DL₅₀ do veneno de *Lachesis muta muta* = 200μg

* 0,001 < P < 0,01 ** P < 0,001

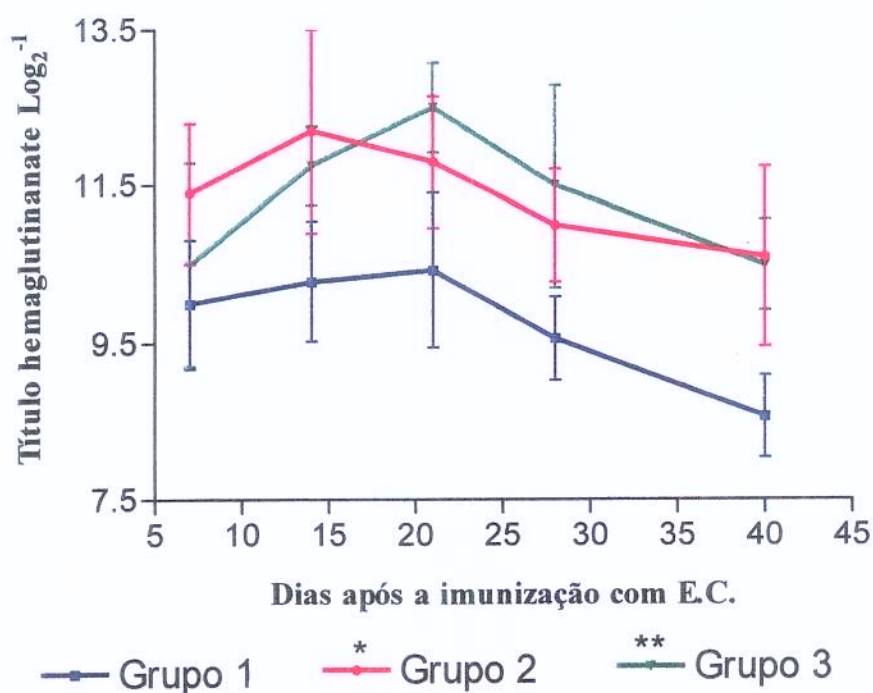


Figura 4: Estudo do efeito dos veneno de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* sobre a produção de anticorpos ao EC, em camundongos H_{GP}.

Controle - Controle só EC; **1/2DL₅₀ B.jar.** – Inoculação intraperitoneal de ½ DL₅₀ (0,8µg) do veneno *Bothrops jararaca* de 72h antes do EC; **1/2DL₅₀ C.d.ter.** – Inoculação intraperitoneal de ½ DL₅₀ (18µg) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* 72h antes do EC.

* P < 0,001 ** 0,01 < P < 0,02

TABELA 1: Análise estatística para resposta imunológica a antígenos não relacionados, em função da quantidade de veneno e o período de tempo entre a inoculação do veneno e o EC, em camundongos H_{GP}.

GRUPOS	GL	<i>P</i> para 7 dias	<i>P</i> para 14 dias
½ DL ₅₀ 24 antes EC X Controle	8	0,02 < <i>P</i> < 0,05	<i>P</i> =0,01
¼ DL ₅₀ 24 antes EC X Controle	8	0,001 < <i>P</i> < 0,01	0,7 < <i>P</i> < 0,8
½ DL ₅₀ junto EC X Controle	8	0,8 < <i>P</i> < 0,9	0,05 < <i>P</i> < 0,1

½ DL₅₀ 24 antes EC – Aplicação intraperitoneal de ½ DL₅₀ de veneno de *Lachesis muta muta* 24h antes do EC; ¼ DL₅₀ 24 antes EC – Aplicação intraperitoneal de ¼ DL₅₀ de veneno de *Lachesis muta muta* 24h antes do EC; ½ DL₅₀ junto EC – Aplicação intraperitoneal de ½ DL₅₀ de veneno de *Lachesis muta muta* concomitantemente ao EC, Controle – controle só EC. *P* - probabilidade das diferenças significativas entre os grupos. GL – Graus de liberdade.

TABELA 2: Análise estatística para resposta imunológica a antígenos não relacionados, em função do tempo entre a inoculação do veneno e o EC, em camundongos.

GRUPOS	Teste de comparação de retas			
	Teste para os termos			
	Valor de <i>t</i>	G.L	<i>t</i> crítico	Valor de <i>P</i>
Controle X 24 h antes EC	3.77	7	3.143	0,001 < <i>P</i> < 0,01
Controle X 72 h antes EC	8.06	7	5.408	<i>P</i> < 0,001

Controle – Controle só EC; 24h antes EC – Aplicação intraperitoneal de ½ DL₅₀ de veneno de *Lachesis muta muta* 24h antes do EC; 72h antes EC – Aplicação intraperitoneal de ½ DL₅₀ de veneno de *Lachesis muta muta* 72h antes do EC; GL - Graus de Liberdade; *t* - valor da distribuição de Student; *P* - probabilidade em qual ocorre as diferenças significativas entre os grupos.

TABELA 3: Análise estatística para resposta imunológica a antígenos não relacionados, em camundongos imunizados com veneno de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*

GRUPOS	Teste de comparação de retas			
	Teste para os termos			
	Valor de t	G.L	t crítico	Valor de P
Controle X 1/2 DL ₅₀ C.d.Ter	3.25	7	3.499	0,01 < P < 0,02
Controle X 1/2DL ₅₀ B.jard.	5.49	7	5.408	P < 0,001

Controle - Controle só EC; **1/2DL₅₀ C.d.ter** – Aplicação intraperitoneal de ½ DL50 (0,8µg) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* 72h antes do EC; **1/2DL₅₀ B.jar.** – Aplicação intraperitoneal de ½ DL50 (18mg) do veneno de *Bothrops jararaca* 72h antes do EC; **GL** - Graus de Liberdade; t - valor da distribuição de Student; P - probabilidade em qual ocorre as diferenças entre os grupos

4.2. EFEITO DOSE-RESPOSTA DO VENENO DE *Lachesis muta muta* SOBRE A RESPOSTA IMUNE A EC EM CAMUNDONGOS H_{GP}.

Tendo em vista os resultados obtidos nos experimentos anteriores, procuramos investigar se o efeito supressor do veneno de *Lachesis muta muta* sobre a resposta imune de camundongos H_{GP} obedecia a um padrão dose-resposta.

Pela necessidade de se produzir o soro antibotrópico-laquéutico estudou-se também o efeito da combinação dos venenos de *Bothrops jararaca* (18µg) e de *Lachesis muta muta* (100µg) por animal, sobre a resposta ao EC, pois acreditava-se que a associação deste dois venenos resultava em uma melhor produção de anticorpos antiveneno de *Lachesis ssp.*.

Assim foi possível observar que, em doses por animal a partir de 20µg, o veneno de *Lachesis muta muta* apresenta um claro efeito inibitório, dose-dependente, sobre a resposta contra EC. Nas doses menores (6µg e 1µg) esse efeito não foi observado, ao

contrário, na dose de 1µg o veneno de *Lachesis muta muta* parece ter favorecido a resposta contra o antígeno não relacionado (FIGURA 5 e TABELA 4).

A combinação dos venenos de *Bothrops jararaca* (18µg) e de *Lachesis muta muta* (100µg) também resultou na produção elevada de anticorpos contra EC, em relação ao controle, sugerindo um efeito sinérgico ou de natureza adjuvante dos dois venenos (FIGURA 6 e TABELA 4).

Para observar o efeito dose-resposta, foram somadas as médias dos títulos hemaglutinantes para cada dose, independente dos dias de imunização, ou seja, a soma dos títulos hemaglutinantes para a dose de 100µg de veneno das sangrias do 5º, 11º, 18º e 26º dia e dividindo por 4; a soma dos títulos hemaglutinantes para a dose de 50µg de veneno das sangrias do 5º, 11º, 18º e 26º dia e dividindo por 4 e o mesmo para as doses de 20µg, 6µg e 1µg, divididas pelo número de sangrias. Com isso observamos que existe um efeito supressor diretamente proporcional à dose aplicada (FIGURA 7).

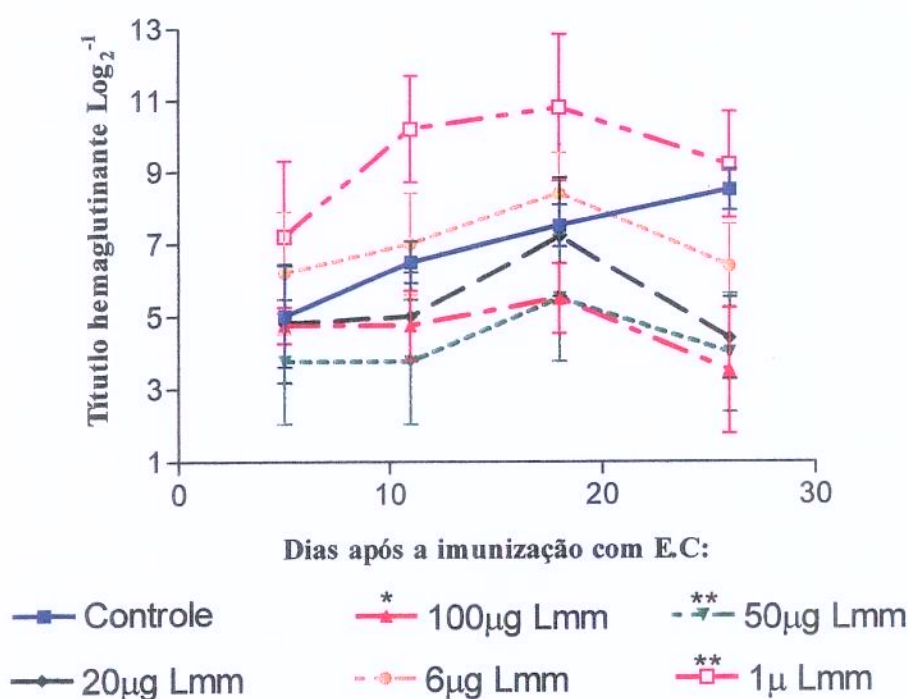


Figura 5: Efeito das diversas concentrações do veneno de *Lachesis muta muta* sobre a produção de anticorpos ao EC em camundongos H_{GP}

Controle - Controle só EC; **100µg Lmm** – Inoculação intraperitoneal do veneno de *Lachesis muta muta* (100µg) 72h antes do EC; **50µg Lmm** - Inoculação intraperitoneal do veneno de *Lachesis muta muta* (50µg) 72h antes do EC; **20µg Lmm** - Inoculação intraperitoneal do veneno de *Lachesis muta muta* (20µg) 72h antes do EC; **6µg Lmm** - Inoculação intraperitoneal do veneno de *Lachesis muta muta* (6µg) 72h antes do EC; **1µg Lmm** - Inoculação intraperitoneal do veneno de *Lachesis muta muta* (1µg) 72h antes do EC.

* 0,01 < P < 0,02

** 0,001 < P < 0,01

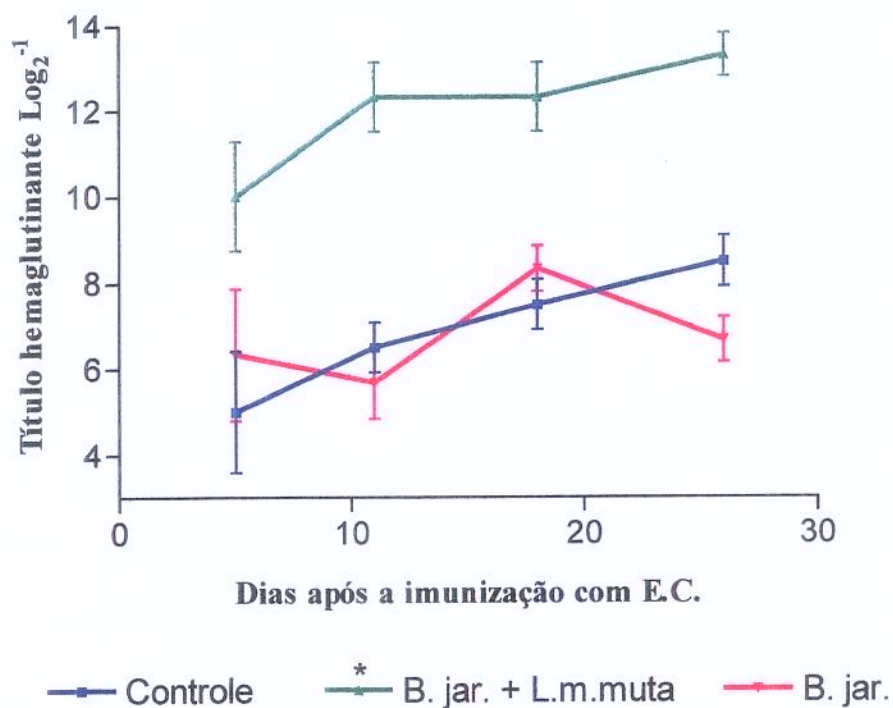


Figura 6: Efeito do veneno de *Bothrops jararaca* e da associação dos venenos de *Lachesis muta muta* e *Bothrops jararaca* sobre a produção de anticorpos ao EC

Controle – Controle só EC; **B.Jar. + L.m.muta** – Veneno de *B. jararaca* (18µg) associado ao veneno de *L. muta muta* (100µg) 72h antes do EC; **B.jar.** – Veneno de *B. jararaca* (18µg) 72h antes do EC.

* $P < 0,001$

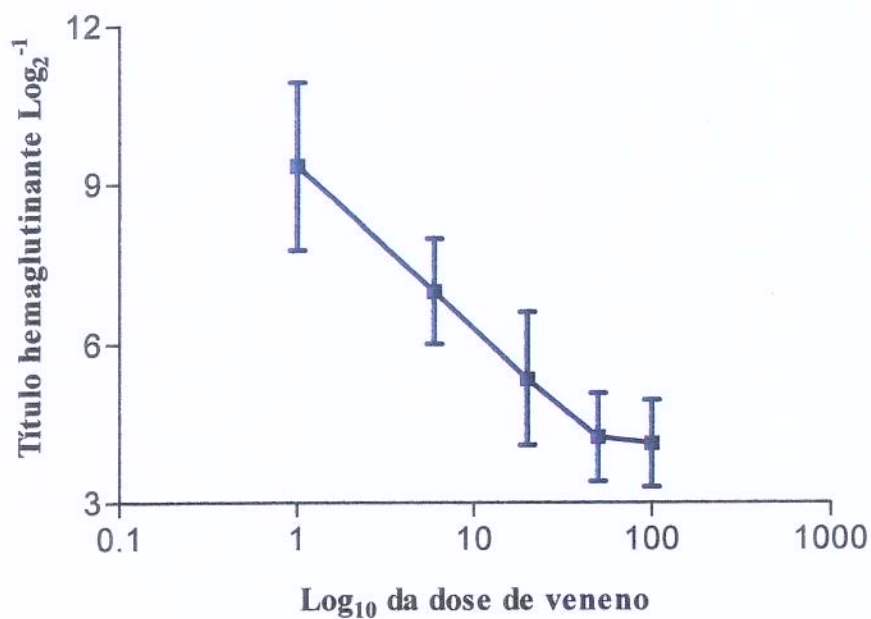


Figura 7: Curva dose-efeito de veneno de *Lachesis muta muta* onde o efeito é a resposta imunossupressora ao EC, causado pelo veneno, em camundongos H_{GP}

A dose está expressa em logaritmo das concentrações de veneno; o efeito ou resposta é expresso em média das médias dos títulos hemaglutinantes para cada dose.

TABELA 4: Análise estatística da imunização de camundongos H_{GP}, por via intraperitoneal, com diferentes doses de veneno de *Lachesis muta muta*, com o veneno de *Bothrops jararaca* e com a associação dos venenos de *Bothrops jararaca* e *Lachesis muta muta*.

GRUPOS	Teste de comparação de retas			
	Teste para os termos			
	Valor de <i>t</i>	G.L	<i>t</i> crítico	Valor de <i>P</i>
Controle X B.Jar. + Lmm	13.43	5	6.869	$P < 0,001$
Controle X B.jar	0.18	5	0.267	$0,08 < P < 0,9$
Controle X 100µg Lmm	2.67	5	3.365	$0,01 < P < 0,02$
Controle X 50µg Lmm	4.08	5	6.869	$0,001 < P < 0,01$
Controle X 20µg Lmm	1.72	5	2.015	$0,1 < P < 0,2$
Controle X 6µg Lmm	0.17	5	0.267	$0,8 < P < 0,9$
Controle X 1µg Lmm	3.04	5	3.365	$0,01 < P < 0,02$

Controle - Controle só EC; **B.Jar. + Lmm** – Veneno de *B. jararaca* (18µg) associado ao veneno de *L. muta muta* (100µg), 72h antes do EC; **B.jar.** – Veneno de *B. jararaca* (18µg), 72h antes do EC; **100µg Lmm** – Veneno de *L. muta muta* (100µg) 72h antes do EC; **50µg Lmm** - Veneno de *L. muta muta* (50µg), 72h antes do EC; **20µg Lmm** - Veneno de *L. muta muta* (20µg), 72h antes do EC; **6µg Lmm** - Veneno de *L. muta muta* (6µg), 72h antes do EC; **1µg Lmm** - Veneno de *L. muta muta* (1µg), 72h antes do EC.

4.3. FRACIONAMENTO DO VENENO DE *Lachesis muta muta*

Após a comprovação de que o veneno de *Lachesis muta muta* possui uma ação imunossupressora a antígenos correlacionados e que é dose-dependente, este foi fracionado em coluna de cromatografia contendo como fase fixa Superdex 75 (Pharmacia®), na tentativa de se isolar um ou mais componentes com atividade imunossupressora (FIGURA 8). De 123,32mg de veneno aplicados na coluna de cromatografia, 109,56 foram recuperados em 6 frações distintas. A tabela 5 mostra a recuperação de proteína e os volumes obtidos de cada fração.

Para a determinação do peso molecular das diversas proteínas existentes em cada fração, realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de 6 a 20%.

Na eletroforese (FIGURA 9), observamos que o veneno de *Lachesis muta muta* apresenta proteínas de peso molecular entre 80kDa e 3kDa. Sendo que na fração 1 temos proteínas entre 66kDa e 14kDa; na fração 2a de 45kda até 14kDa; na fração 2 de 29kDa até 10kDa; na fração 3 de 25kDa até 10kDa; na fração 4 de 24kDa até 3kDa. As frações 5 e 6 devem apresentar peptídios com peso molecular inferior a 3kDa e que, por muitas vezes, não são coradas pelos métodos tradicionais de coloração de gel como o Nitrato de Prata, o Comassie Blue e Pounsau S, apesar de absorverem a luz ultravioleta, indicativo da presença de aminoácidos com anel aromático, estes também não possuem aminoácidos com capacidade de fixar os corantes oxidativos.

As frações obtidas na cromatografia foram, posteriormente, inoculadas em grupos com quatro camundongos H_{GP}, para a determinação da fração com possível efeito supressor a antígenos não relacionados, através de ensaio de hemaglutinação.

A figura 10 mostra a cinética de produção da resposta imune humoral para EC, em que é visível a ação supressora das frações 4, 5 e do veneno total. Esta atividade é confirmada através de análises estatísticas (TABELA 6).

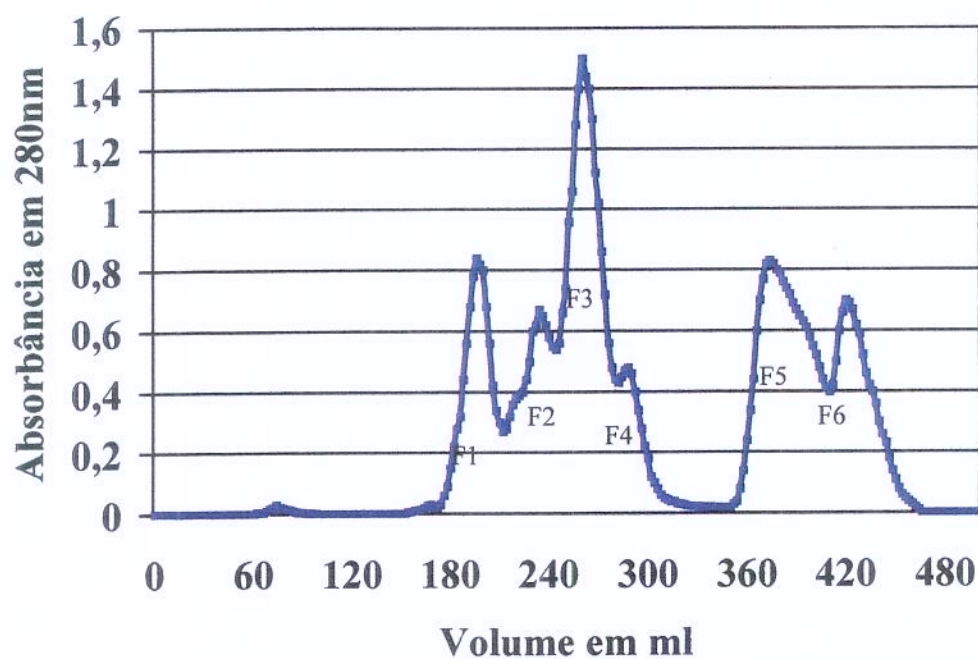


Figura 8: Cromatografia em Superdex 75 (Pharmacia®) do veneno de *Lachesis muta- muta*

Coluna XK 26 (Ø 26mm e altura (h) 90cm), fluxo de 5ml/minuto, volume da amostra 0,20ml, concentração protéica 616,6 mg/ml.

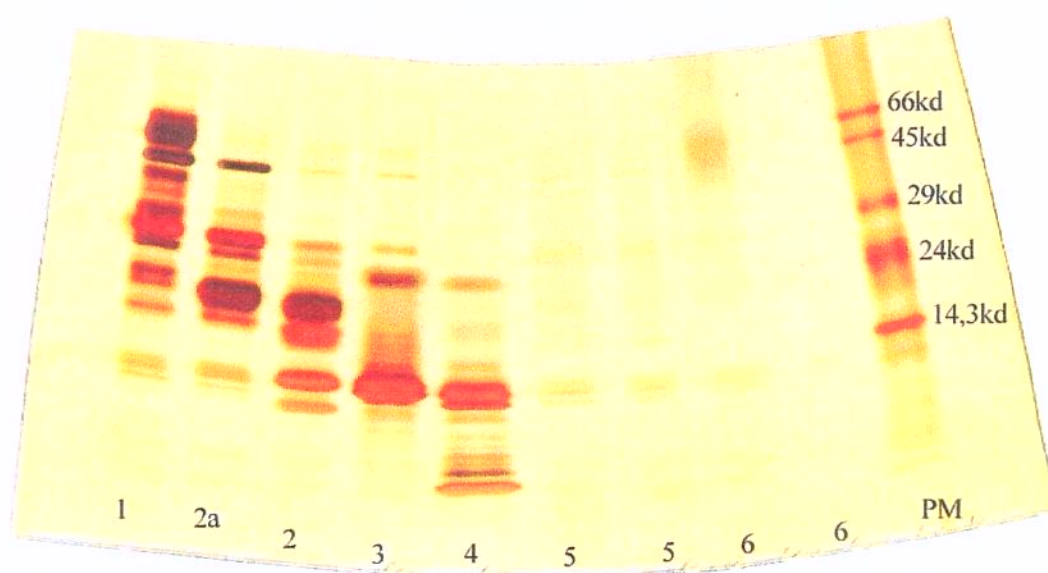


Figura 9: Perfil das diversas frações do veneno de *Lachesis muta muta*, obtidas por cromatografia em eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, gel na concentração de 6 a 20%

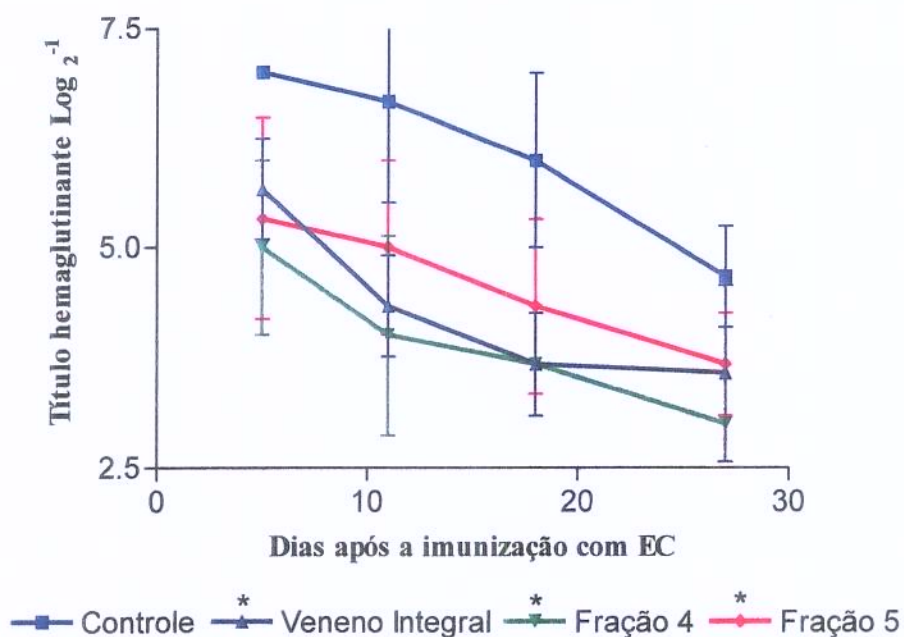


Figura 10: Efeito das diversas frações do veneno de *Lachesis muta muta* em camundongos H_{GP}, obtidas através da cromatografia em Superdex® 75 sobre a produção de anticorpos ao EC.

Controle – Controle só EC; **Veneno Integral** - Veneno integral de Lmm (100µg); **Fração 4** - 50µg da Fração 4 do veneno de Lmm; **Fração 5** - 50µg da Fração 5 do veneno de Lmm;.

* P < 0,001

TABELA 5: Concentração protéica e volume recuperado das frações isoladas da cromatografia do veneno integral de *Lachesis muta muta* em Superdex® 75

FRAÇÃO	Proteína (mg/ml)	Volume (ml)	Proteína Total (mg)
Fração 1	0,211	35	7,39
Fração 2 ^a	0,264	20	5,28
Fração 2	0,238	20	4,76
Fração 3	2,049	30	61,47
Fração 4	0,495	30	14,85
Fração 5	0,105	50	5,25
Fração 6	0,264	40	10,56

TABELA 6: Análise estatística da imunização de camundongos H_{GP}, com diversas frações do veneno de *Lachesis muta muta*. C = Controle; VT = Veneno Total; Fr(n) = Fração número

GRUPOS	Teste de comparação de retas			
	Teste para os termos			
	Valor de t	G.L	t crítico	Valor de P
Controle X Veneno Integral	7,60	5	6,869	P < 0.001
Controle X Fração 1	1,50	5	2,015	0,1 < P < 0,2
Controle X Fração 2	1,87	5	2,015	0,1 < P < 0,2
Controle X Fração 3	2,44	5	2,571	0,05 < P < 0,1
Controle X Fração 4	12,30	5	6.869	P < 0,001
Controle X Fração 5	9,60	5	6.869	P < 0,001
Controle X Fração 6	1,29	5	1.476	0,2 < P < 0,3

4.4. RESPOSTA SECUNDÁRIA DO VENENO A ANTÍGENOS NÃO RELACIONADOS

As frações com atividade imunossupressora sobre antígenos não relacionados foram estudadas, quanto à sua ação supressora sobre a resposta secundária aos antígenos não relacionados. Assim as frações 1, 2 e 3, que não são supressoras e o veneno total e as frações 4 e 5 que são imunossupressoras, foram inoculadas 72h antes dos EC em camundongos selecionados (H_{GP}). E amostras dos soros foram coletadas com 7, 14 e 35 dias após a inoculação do EC. Foram obtidos os soros destes animais e congelados para determinação do título hemoaglutinante. Aos 130 dias, após a última inoculação, foram repetidas as inoculações da mesma forma anterior e coletadas amostras com 137, 144 e 165 dias, após a inoculação do EC.

A figura 11 mostra o efeito supressor do veneno total, da fração 4 e da fração 5 tanto na resposta primária como na secundária. A frações 1, 2 e a 3 configuram ausência de fator supressor para os dois tipos de resposta.

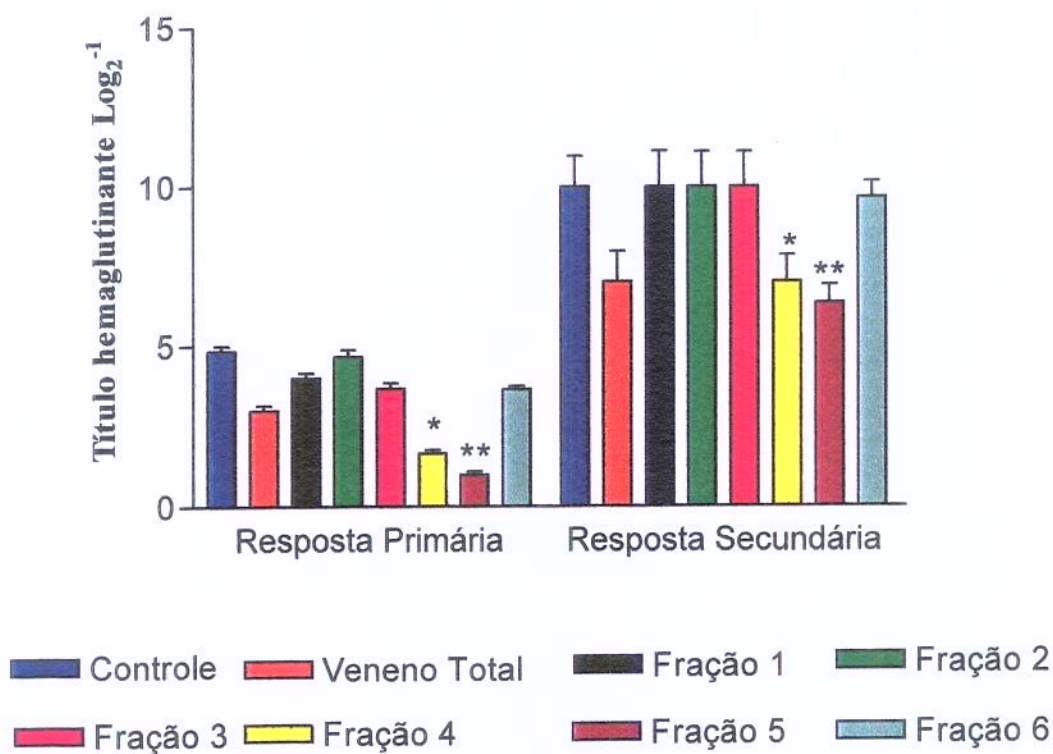


Figura 11: Efeito das diversas frações do veneno de *Lachesis muta muta* purificadas em Superdex 75, sobre a resposta imune humoral primária e secundária a antígenos não relacionados em camundongos H_{GP}.

* 0,001 < P < 0,01

** P < 0,001

4.5. ATIVIDADE SUPRESSORA DO VENENO *Lachesis muta muta* EM EQUINOS SORO PRODUTORES.

4.5.1 Testes iniciais

Os resultados obtidos em camundongos selecionados indicaram nos a importância de estudos de suas aplicações práticas na produção de soro antilaquético em eqüinos, com o intuito de obtenção de títulos mais elevados.

Seis cavalos, divididos em 3 grupos de 2 animais foram imunizados com veneno de *Lachesis muta muta* purificado por cromatografia, sem a fração supressora, (Lmm s/ Fração 4 e 5); veneno de *Lachesis muta muta* integral (Lmm Integral) e veneno de *Lachesis muta muta* associado ao veneno de *Bothrops jararaca* (Lmm + B.jar.). Os soros destes animais foram testados quanto à sua capacidade de inibir a atividade hemolítica do veneno através de ensaios *in vitro*. Nestes ensaios foi utilizada uma dose do veneno correspondente a 1 DH₅₀, calculada em 0,082mg/ml, capaz de formar um halo de hemólise com diâmetro de 12,59mm. A figura 12 mostra a titulação dos soros de cada grupo, para inibição da hemólise indireta de cada grupo.

Deste modo, pode se calcular a dose efetiva de inibição da hemólise 50% (DEIH₅₀) para cada grupo, em que foram observadas diferenças significativas entre o Lmm s/ Fração 4 e 5 X Lmm Integral e Lmm + B.jar. X Lmm Integral.

Ensaio imunoenzimáticos também foram realizados para quantificar os títulos de IgG produzidos durante a imunização dos eqüinos. A figura 13 mostra a curva da média da titulação dos soros dos eqüinos imunizados com veneno purificado, veneno integral e veneno de *Lachesis muta muta* associado ao veneno de *Bothrops jararaca*.

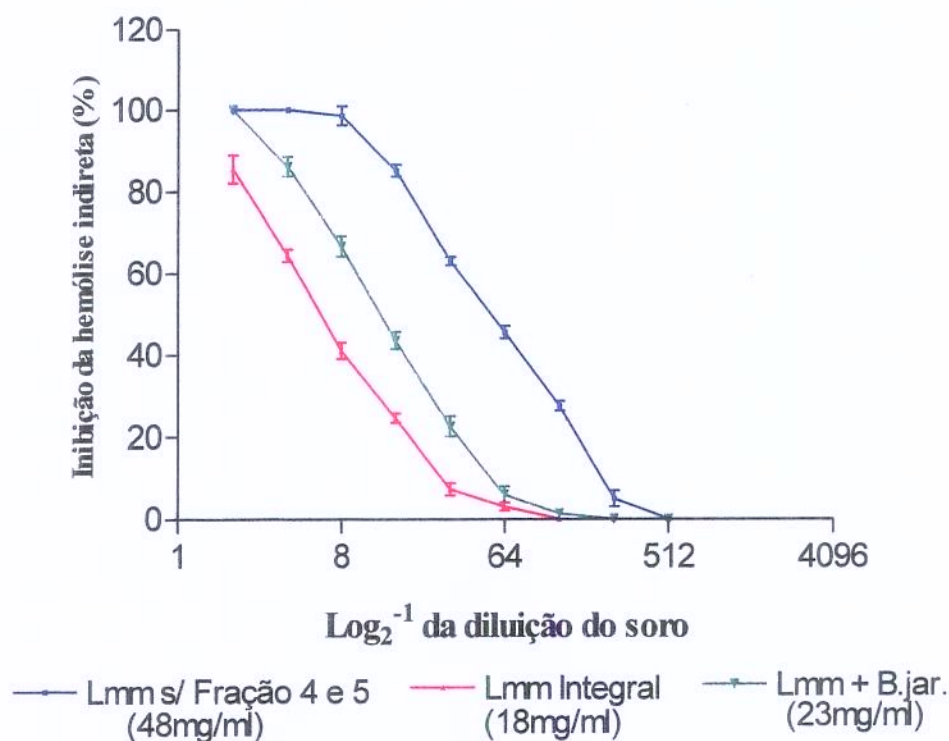


Figura 12: Curva de titulação dos soros de equínos para obtenção da DEIH₅₀.

Lmm s/ Fração 4 e 5 – média de inibição de hemólise do soro de animais imunizados com veneno de *Lachesis muta muta*, purificado por cromatografia sem as frações supressoras (fração 4 e 5); **Lmm Integral** - média de inibição de hemólise do soro de animais imunizados com veneno integral de *Lachesis muta muta*; **Lmm + B.jar.** – média de inibição de hemólise do soro de animais imunizados com veneno de *Lachesis muta muta* integral, associado ao veneno de *Bothrops jararaca*.

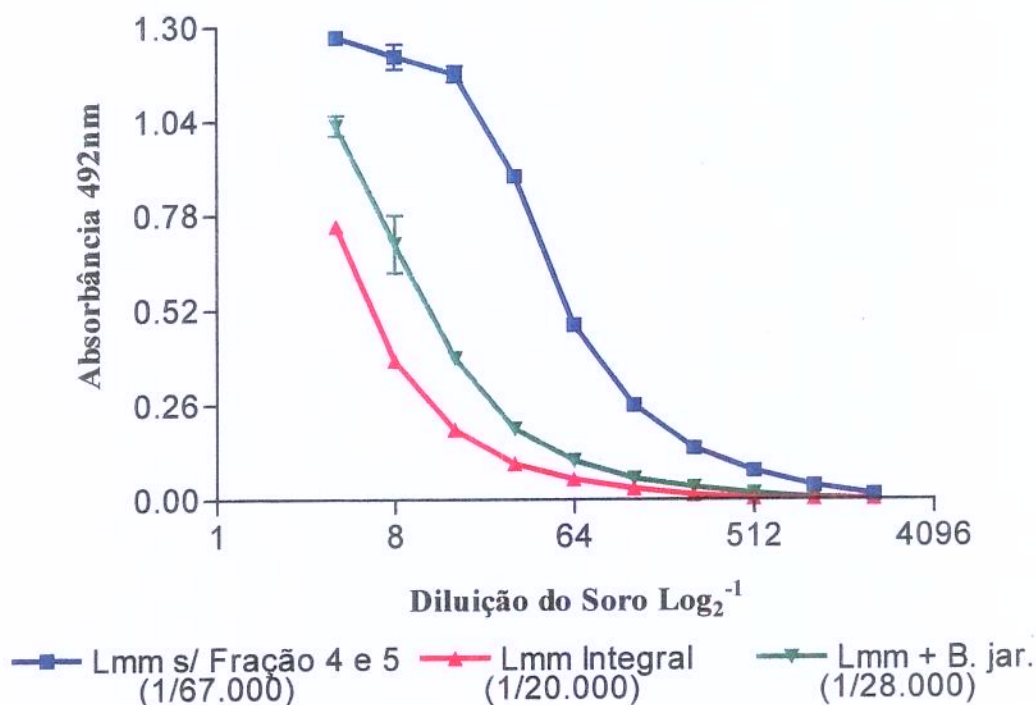


Figura 13: Curva de titulação dos soros de eqüídeos em teste imunoenzimático para determinação da dose efetiva 50%.

Lmm s/Fração 4 e 5 – Eqüinos imunizados com veneno de *Lachesis muta muta* purificado por cromatografia sem as frações supressoras (frações 4 e 5); **Lmm Integral** – Eqüinos imunizados com veneno integral de *Lachesis muta muta*; **Lmm + B.jar.** – Eqüinos imunizados com veneno integral de *Lachesis muta muta* associado ao veneno de *Bothrops jararaca*.

4.5.2. Aplicação na produção de plasmas hiperimunes

Após testes realizados em eqüinos, para estudo da viabilidade da produção do soro antibotrópico-laquéutico, um grupo de 10 eqüinos foi imunizado com veneno de *Lachesis muta muta* (5mg) purificado em coluna de cromatografia, para eliminação das frações supressoras (frações 4 e 5). O Instituto Butantan produz, normalmente, o plasma misto, antibotrópico-laquéutico e, no sentido de seguir essa linha de produção já estabelecida, o veneno de *Lachesis muta muta* (5mg) foi inoculado junto aos venenos de *Bothrops jararaca* (2,5mg), *Bothrops cotiara* (0,625mg), *Bothrops newidee* (0,625mg), *Bothrops erythromelas* (0,625mg) e *Bothrops jararacussu* (0,625 mg), ou seja, de um lado do dorso do animal foi inoculado o veneno de *L. muta muta* e do outro lado a mistura de venenos do gênero *Bothrops*. Os resultados foram comparados com ensaios semelhantes aos dos animais em produção há pelo menos 2 anos. A figura 14 mostra a curva de titulação média, com desvio-padrão em ensaio imunoenzimático, após o ciclo de imunização. Verifica-se, que realmente, o veneno integral possui uma ação imunossupressora parcial na produção de anticorpos contra o veneno de *Lachesis muta muta*.

Os resultados dos testes de soroneutralização *in vivo* concluem este trabalho no que diz respeito ao aumento da produção de soro antibotrópico-laquéutico, demonstrando que há um aumento de produtividade de anticorpos neutralizantes para o veneno laquéutico. A figura 15 representa, graficamente, a potência do *in vivo* de cada grupo.

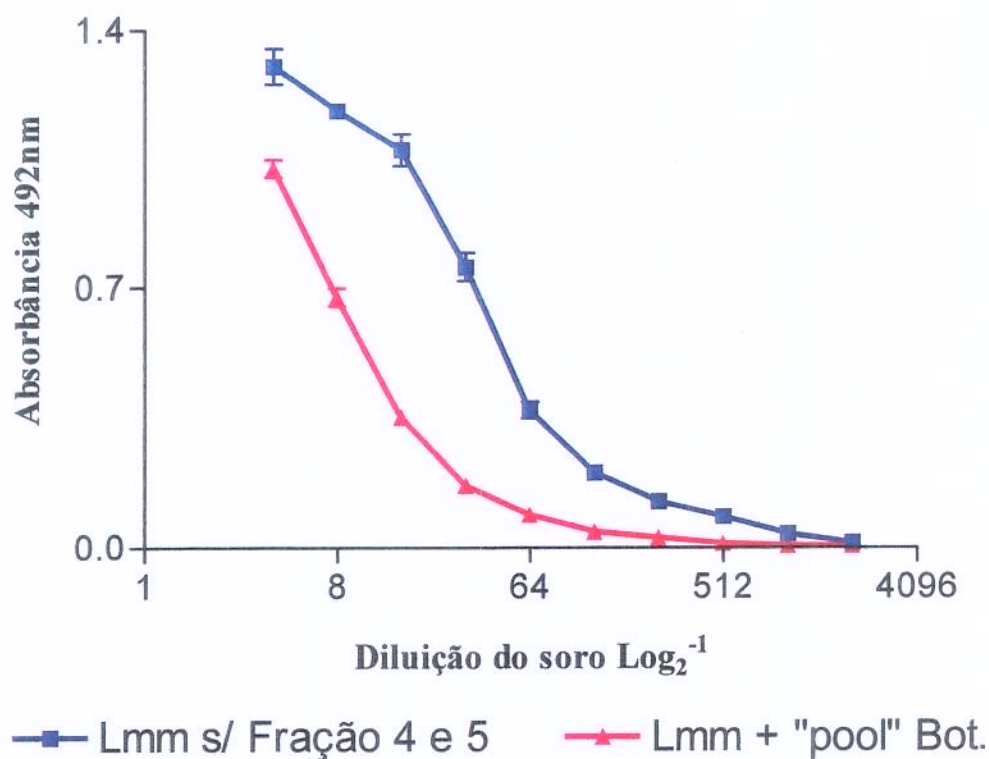


Figura 14: Curva de titulação em ensaio imunoenzimático dos soros de eqüinos.

Lmm s/ Fração 4 e 5 – média e desvio-padrão da soma dos títulos dos animais imunizados com veneno de *Lachesis muta muta* purificado, associado ao “pool” de venenos do gênero *Bothrops*. **Lmm + “pool” Bot.** – média e desvio-padrão da soma dos títulos dos animais imunizados com veneno de *Lachesis muta muta* integral, associado ao “pool” de venenos do gênero *Bothrops*.

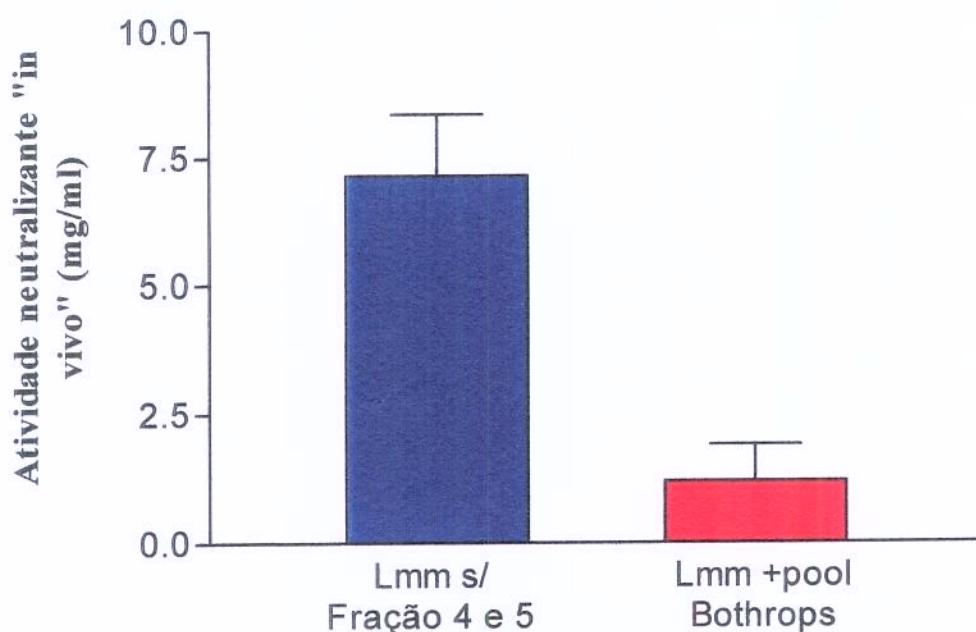


Figura 15: Teste de potência da mistura dos soros de eqüinos de cada grupo.

Lmm s/ Fração 4 e 5 – média e desvio-padrão da potência dos soros dos animais imunizados com veneno de *Lachesis muta muta* purificado, associado ao “pool” de venenos do gênero *Bothrops*. **Lmm + pool Bothrps** – teste de potência dos animais imunizados com veneno de *Lachesis muta muta* integral, associado ao “pool” de venenos do gênero *Bothrops*.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da produção de soros antipeçonhentos, de uso terapêutico, baseou-se, principalmente, na observação de fenômenos biológicos nem sempre explicados à luz da ciência. Assim, o retardo na melhoria da qualidade dos soros não se deu pela falta de meios e técnicas científicas, mas sim pelo limitado conhecimento das funções biológicas dos venenos e do sistema imunológico. Muitas inovações obtidas nos processos industriais ocorreram em função das tentativas e erros e não pelas observações e conhecimento dos sistemas biológicos envolvidos (CHIPPAUX & GOYFFON, 1998).

Muitas vezes, a descoberta científica requer anos para ser aplicada e aproveitada nos processos industriais. Um exemplo prático destas descobertas, diretamente ligada à produção de soros, está na utilização da pepsina, não só para a redução das imunoglobulinas como também para a obtenção de um produto final com maior estabilidade. A aplicação da pepsina foi iniciada por POPE (1939), e só foi utilizada, no Brasil, em processos industriais na década de 50 no Instituto Pinheiros e, na década de 60, no Instituto Butantan (LATIFI & MANHOURI, 1966).

Na atualidade, os principais fenômenos biológicos, envolvidos na produção de soros hiperimunes, estão ligados à resposta imunológica do animal utilizado e conseqüentemente aos mecanismos químicos e físicos para a purificação dos plasmas hiperimunes.

As respostas imunológicas nos animais superiores são muito semelhantes, existindo poucas diferenças nas respostas humorais e celulares entre os mamíferos. As poucas diferenças existentes estão ligadas aos receptores de superfícies celulares ou às subclasses de imunoglobulina, que na verdade são tão distintas quanto é a distância entre o filogenético.

Apesar de diferenças em receptores ou subclasses de imunoglobulinas, eles não se diferenciam quanto ao mecanismo de ação do sistema imunológico.

Neste sentido, as seleções genéticas bidirecionais, obtidas para a resposta imune apresentam-se como modelo indispensável para o estudo da participação dos vários segmentos da resposta imunológica, além de ser um instrumento interessante para o estudo das imunizações (MOUTON *et al.*, 1988).

Entre os modelos experimentais desenvolvidos para a caracterização dos fatores genéticos que regulam a complexa série de fenômenos que participam da resposta imune, destacam-se aqueles que utilizam animais isogênicos e os que utilizam linhagem geneticamente selecionada para uma determinada reatividade imunológica.

O desenvolvimento de linhagens isogênicas de animais de laboratório, camundongos em particular, fornece um modelo para o estudo de interações moleculares e celulares e do controle genético da resposta imune.

Entretanto, apesar da possibilidade de fornecer esclarecimento, o modelo apresenta restrições, já que estes animais não foram selecionados com base em parâmetros imunológicos. Assim, é provável que a diferença entre animais isogênicos para um determinado caráter seja devida aos efeitos de um ou poucos alelos defectivos (BIOZZI *et al.*, 1985; BRIGTON, 1985; FESTING, 1985; MOUTON *et al.*, 1985).

O outro modelo, introduzido por BIOZZI *et al.* (1968), utiliza linhagens de camundongos boas e más respondedoras a imunógenos naturais complexos, administrados em doses ótimas. Nestas condições, a fase de reconhecimento a epítomos imunodominantes não é restritiva. Essas linhagens foram obtidas por cruzamento seletivo bidirecional, a partir de populações de camundongo geneticamente heterogêneas, tendo como caráter fenotípico selecionador, a produção máxima e mínima de anticorpos, em resposta aos antígenos escolhidos sem condições previamente estabelecidas (BIOZZI *et al.*, 1979, 1980).

Os laboratórios de Imunogenética do Instituto Curie em Paris e do Instituto Butantan em São Paulo, trabalhando conjuntamente, obtiveram seis seleções independentes, usando diferentes antígenos: eritrócito heterólogo (Seleção I – BIOZZI *et al.*, 1974; Seleção II – FEINGOLD *et al.*, 1976; Seleção IVa – CABRERA *et al.*, 1982), antígenos flagelares e somáticos de (Seleção III e Seleção IV – SIQUEIRA *et al.*, 1976) e proteínas heterólogas (Seleção V – PASSOS *et al.*, 1977).

Em cada uma das seleções, as linhagens de boa (H) e má (L) resposta divergiram progressivamente, evidenciando a poligenia do caráter. A separação máxima interlinhagem-limite de seleção – foi alcançada entre as gerações F₇ e F₁₆ dos diferentes processos seletivos. Uma vez atingido o limite de seleção, a continuidade dos cruzamentos seletivos não alterou as diferenças interlinhagem e as variações fenotípicas mantiveram-se constantes,

indicando homozigose dos alelos 'bons respondedores' nas linhagens H e dos alelos 'maus respondedores' nas linhagens L (BIOZZI *et al.*, 1979, 1980).

Em cada seleção, os títulos de anticorpos produzidos contra os imunógenos de seleção são muito mais elevados nas linhagens H, cerca de 80 a 900 vezes, do que nas linhagens L. Essas diferenças são também observadas, em grau maior ou menor nas diferentes seleções, para antígenos não relacionados aos de seleção (efeito multi-específico), demonstrando que a modificação induzida nas linhagens é geral e em grande parte independente da especificidade do imunógeno empregado durante o processo seletivo (SIQUEIRA *et al.*, 1977; BIOZZI *et al.*, 1979; BIOZZI *et al.*, 1982). Entretanto a análise comparativa desse efeito multi-específico mostrou que, provavelmente, diferentes grupos gênicos foram afetados nas várias seleções (SANT'ANNA *et al.*, 1979; IBANEZ *et al.*, 1988; DE FRANCO, 1989).

Na tentativa de reunir os alelos envolvidos nas seleções originais e amplificar a capacidade máxima e mínima de produção de anticorpos, duas novas seleções foram realizadas. Como população inicial para as linhagens H e L foram utilizadas as linhagens H das seleções originais cruzadas entre si e as L homólogas cruzadas entre si. Assim, populações boas e más, com frequência balanceada dos genes operando nas cinco linhagens homólogas originais foram produzidas, como F₀H e F₀L, contendo partições genéticas equivalentes das seleções originais.

A partir destes híbridos, as duas novas seleções foram desenvolvidas, escolhendo-se animais que apresentavam fenótipo extremo para a resposta a todos imunógenos utilizados nas seleções originais, quais sejam: eritrócito heterólogo, antígenos flagelares e somáticos de *Salmonella* e de proteínas heterólogas administrados simultaneamente e sendo considerado a resposta primária – Seleção GP – ou separadamente, a resposta secundária – Seleção GS. A seleção GP foi desenvolvida e vem sendo mantida no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan em São Paulo, enquanto a GS foi desenvolvida e vem sendo mantida no laboratório de Paris (MOUTON *et al.*, 1988).

As linhagens selecionadas para boa e má resposta de anticorpo têm se mostrado, como modelo experimental, bastante apropriadas para estudos genéticos sobre a participação de mecanismos imunes na resistência às infecções, bem como nos mecanismos de aumento e de diminuição da resposta, uma vez que poligenes relevantes para a regulação da produção quantitativa de anticorpos foram acumulados e fixados em extremos de uma população natural, provocando modificações gerais, seja em nível de macrófago ou de resposta celular ou de humoral, que independam da especificidade antigênica (BIOZZI *et al.*, 1985).

Desta forma, a utilização de animais selecionados, especificamente para resposta imune, pode ser um instrumento de avaliação e ensaios para drogas ou substâncias que atuem sobre o sistema imunológico, já que, muitas vezes, os testes em animais isogênicos ou “outbreed” respectivamente, não têm especificidade para a droga ou apresentam uma variância muito ampliada em razão da poligenia.

Seguindo esta linha de raciocínio, usamos os camundongos geneticamente selecionados H_{GP} que respondem muito bem para EC, e assim, qualquer alteração da resposta nestes animais é consequência de fatores externos, ou seja, o efeito do veneno sobre a resposta imune ao EC em nossas experiências.

Deste modo, ter observado primeiramente os efeitos do veneno de *Lachesis muta muta* no sistema imunológico de eqüinos não teria sido a melhor opção, pelo próprio custo do experimento e por princípios éticos de experimentação animal. Nestas condições, o estudo preliminar utilizando camundongos geneticamente selecionados tornou-se o melhor instrumento de observação do comportamento imunológico frente ao veneno de *Lachesis muta muta*, visando a melhora da titulação de anticorpos específico.

Baseado nas observações laboratoriais e também no fato do plasma que dá origem ao antiveneno de *Lachesis muta muta* possuir uma baixa capacidade neutralizante em relação ao número de DL₅₀, quando comparado com os antivenenos de *Bothrops sp.* e *Crotalus sp.*, os delineamentos deste trabalho foram separados em três fases distintas: 1º) Teste com veneno total de *Lachesis muta muta* em camundongos geneticamente selecionados e, conseqüentemente, análise de pelo menos dois outros venenos da família *Crotalidae*; 2º) Purificação parcial do veneno de *Lachesis muta muta* após a observação de

seu efeito supressor; 3º) Ensaios de imunização de eqüinos com intuito de se obter melhores títulos neutralizantes, excluindo o fator supressor dos antígenos de imunização.

Os experimentos iniciais demonstram claramente a ação supressora da resposta imune humoral a antígenos não relacionado, causado pelo veneno de *Lachesis muta muta*. Contudo o efeito supressor foi maior quando aumentou o intervalo de tempo entre a imunização com EC e o veneno. Deste modo quanto maior o intervalo de tempo entre a inoculação dos dois antígenos, maior foi o efeito supressor do veneno. Este efeito permaneceu durante os 47 dias do estudo da cinética de produção de anticorpos da resposta imune humoral primária.

Outros venenos da família *Crotalidae* não apresentaram o mesmo efeito em camundongos, pelo menos nas doses utilizadas. O veneno de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*, nas doses de 18µg e 0,8µg respectivamente, não apresentaram o mesmo efeito do veneno de *Lachesis muta muta*. Estas doses, 1/2DL₅₀, foram utilizadas em função da toxicidade destes venenos, doses superiores poderiam levar à mortalidade dos animais, inviabilizando o experimento.

Poderiam ter sido utilizadas concentrações maiores do veneno de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*, se os venenos fossem destoxificados, porém corria-se o risco de se perder o efeito imunossupressor, caso existisse.

Recentemente, CARDOSO & MOTA (1997) demonstraram o efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a resposta imune celular e humoral, para antígenos não correlacionados, especificamente albumina de ovo de galinha (OVA – chicken ovoalbumin) e albumina humana (HSA - human serum albumin). Todavia o modelo de animal utilizado, BALB/c, não é selecionado para a resposta imune, e a deficiência apresentada para a resposta imune humoral pode ser causada pelo veneno integral ou pela crotoxina que pode estar ligada a uma suscetibilidade do camundongo ao efeito do veneno estudado.

Para elucidar se o efeito imunossupressor encontrado no veneno de *Lachesis muta muta* e demonstrar que este não é decorrente da alta concentração de proteína, doses diferentes deste veneno foram utilizadas em camundongos geneticamente selecionados para

alta resposta imunológica humoral a antígenos não relacionados. Somente as doses de 100µg e 50µg mostraram-se significativamente supressoras, enquanto as doses de 20µg e 6µg não mostraram diferenças significativa, e ainda que doses de 1µg mostraram diferenças significativamente aumentadas. Com estes resultados foi nítido verificar que a atividade imunossupressora é também dose-dependente, e que as maiores doses foram as que apresentaram maior efeito.

No momento o Ministério da Saúde tem grande necessidade de produção do soro antibotrópico-laquélico. Assim camundongos selecionados foram imunizados também com a associação de veneno de *Bothrops jararaca* e *Lachesis muta muta*. Este ensaio demonstrou que esta associação é viável e aumentou a resposta ao EC. O aumento da resposta pode ter ocorrido em função de dois mecanismos: 1º) devido à atividade proteolítica do veneno de *Bothrops jararaca* sobre o veneno *Lachesis muta muta*, inibindo a atividade supressora deste último, por digestão enzimática; 2º) efeito adjuvante do veneno de *Bothrops jararaca*.

Face aos resultados encontrados, tornou-se necessário saber se este efeito seria ocasionado por apenas um ou mais componentes do veneno, ou ainda, se ocorriam em decorrência da soma dos efeitos fisiopatológicos. Sendo assim, 120mg de veneno foi passado em coluna de cromatografia de Superdex® 75, onde foram obtidas seis frações distintas.

Todas as frações obtidas na cromatografia foram analisadas quanto aos seus componentes, em função do peso molecular, através de eletroforese em gradiente de 6% a 20% de gel de poliacrilamida, em presença de Dodecil Sulfato de Amônio (SDS).

O efeito supressor foi encontrado nas frações 4 e 5. A fração 4 apresenta proteínas na faixa de 24kDa à 6kDa. A fração 5 não apresentou nenhuma banda protéica na eletroforese em gel de poliacrilamida, mas devido ao seu tempo de retenção durante a cromatografia, deduz-se que esta possui proteínas na faixa de 6kDa e 3kDa. A ausência de uma banda protéica capaz de fixar a coloração na eletroforese, talvez esteja relacionada à sensibilidade do método, pois a coloração com nitrato de prata ou, “Comassie Blue” ou, Negro de Amido necessitam de aminoácidos redutores, ou seja, doadores de elétrons para a fixação da cor. Muitas vezes a escassez destes aminoácidos ou a acessibilidade ou ainda o

tratamento com SDS podem impedir que o cromógeno se ligue ao peptídeo (OAKLEY, KIRSH, MORRIS, 1980).

Entre todas as frações obtidas somente as frações 1, 2 e 3 apresentam efeito fisiopatológico e letal. As frações 4, 5 e 6 não apresentaram alterações de comportamento dos animais tais como estagnação, hipermotilidade ou rotação, alterações anatomopatológicas ou efeito letal sobre camundongo, em doses de até 300µg (dados ainda não publicados, fornecido pelo Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan).

Além de se estudar a resposta primária das diferentes frações e seus efeitos na modulação da resposta imune, foi realizado teste em camundongos selecionados, de modo a observar a resposta secundária das frações. Tanto o veneno total como as frações 4 e 5, mostraram aumento na resposta secundária, quando comparados à resposta primária, porém significativamente menores do que no controle ou animais imunizados com as frações 1, 2 e 3. Este fato demonstra que o efeito supressor não é total e que há formação de memória imunológica para estas frações.

Muitas espécies animais já foram utilizadas na produção de soros hiperimunes: coelhos, cães, ovinos, caprinos e eqüinos (BISMUTH *et al.*, 1996; CHIPPAUX & GOYFFON, 1998). Mas a produção industrial, ou seja, em larga escala, adotou os eqüídeos como principais doadores de matéria prima para a obtenção de soros hiperimunes de uso terapêutico.

A escolha dos eqüídeos recaiu em três pontos fundamentais: a) fácil decantação dos eritrócitos – conseqüentemente uma boa separação dos elementos sólidos do sangue, levando a um maior rendimento; b) facilidade no manejo diário – apresenta melhores condições de higiene e tratamento, permitindo a obtenção de um produto com qualidade assegurada; c) volume de plasma relativamente elevado – em média um eqüídeo pode ser sangrado em até 4% do seu peso corporal, sendo assim foi o animal que apresentou melhor relação custo/benefício (WILDE *et al.*, 1996).

Até o presente momento, nenhuma outra metodologia de produção de soros antipeçonhentos foi desenvolvida. A produção de anticorpos monoclonais ou híbridos ou quiméricos (SULLIVAN, 1986) e, mais recentemente, a produção de anticorpos sintéticos (HAUPT & MOSBACH, 1998) não tem a possibilidade de serem produzidos por dois

motivos: 1º) a obtenção destes anticorpos tem custo extremamente elevado para a produção em larga escala, ainda se levarmos em conta o número de acidentes ofídicos no Brasil; 2º) incapacidade de se neutralizar todos os efeitos tóxicos dos venenos com apenas um ou dois clones, assim seriam necessários pelo menos dois clones para neutralização de uma única proteína do veneno de escorpião (EL AYEB & ROCHAT, 1988).

Uma vez demonstrada a ação supressora do veneno de *Lachesis muta muta* em camundongos a antígenos não relacionados, tornou-se de extrema necessidade estudar a influência negativa desta fração na produção de soros de uso terapêutico. Se considerarmos que os efeitos fisiopatológicos causados em um acidente ofídico podem estar ligados à associação de uma ou mais substâncias presentes no veneno, e que a produção de anticorpos específicos capazes de neutralizar estes componentes do veneno pode estar sendo influenciada pela fração supressora, é importante, científica e economicamente, verificar a produção de anticorpos em equídeos imunizados com veneno total e com veneno fracionado, ou seja, sem a presença da fração supressora.

Sendo assim ensaios iniciais foram realizados em seis cavalos, separados em três grupos de dois animais, imunizados com veneno purificado, veneno integral e veneno associado ao veneno de *Bothrops jararaca*. Ao compararmos a produção de anticorpos entre os três grupos, aquele que recebeu veneno purificado respondeu 2,6 vezes a mais em teste de inibição da hemólise indireta do que recebeu o veneno integral. E, em ensaio imunoenzimático, o grupo que recebeu veneno purificado teve uma titulação 3,35 vezes maior do que recebeu veneno integral.

O teste de inibição da hemólise indireta mede a capacidade do soro neutralizar a ação da fosfolipase A₂ sobre eritrócitos de carneiro, já que esta enzima em presença de cálcio e lecitina forma uma hemolisina, a qual possui ação dose-dependente, podendo ser quantificada (GUTIERREZ *et al.*, 1988).

Pelo ensaio imunoenzimático, detectamos os anticorpos contra o veneno total de *Lachesis muta muta*, quando, também, foi determinada a dose efetiva 50%, avaliando a diluição ótima do soro de cada cavalo, de modo a permitir a análise das médias entre os grupos (LEINIKKI & PASSILA, 1977).

Frente a estes resultados, decidimos aplicar o esquema de imunização utilizado neste experimento para a produção do soro antibotrópico-laquétrico, utilizando o veneno purificado. em oito cavalos novos de produção, cujos títulos obtidos foram superiores aos de outros cavalos já em imunização há dois anos com veneno integral, tanto em ensaio imunoenzimático como em teste de soroneutralização *in vivo*.

Com a aplicação do veneno livre dos fatores imunossupressores, foi possível um aproveitamento dos plasmas eqüinos 6 vezes superior ao que vinha sendo obtido normalmente, conforme avaliação dos resultados *in vivo* e, conseqüentemente, um aumento do número de ampolas por lote de soro produzido.

Salientamos que pouco ou praticamente nada existe publicado com referência ao efeito de peçonhas sobre o sistema imunológico. O estudo sobre a imunologia dos venenos não primou por visar o efeito destes sobre o sistema de defesa, mas sim sobre a capacidade de reconhecimento e interação, no intuito de se neutralizar os efeitos tóxicos do veneno total ou de suas subfrações. Sendo assim, quatro itens inerentes ao veneno contribuirão para maiores conhecimentos sobre a imunologia específica dos mesmos: a) As respostas às frações dos venenos são altamente específicas, isto quer dizer que os anticorpos podem diferenciar as várias formas de um isômero antigênico; b) A presença de memória imunológica contribui para que em um curto espaço de tempo ocorra produção de anticorpos, após uma primeira exposição ao veneno; c) Amplificação da resposta, tanto em especificidade como em quantidade, depois de repetidas imunizações; d) A perda da própria tolerância ("self-tolerance"), resultando em doenças auto-imunes, em razão do próprio mecanismo de ação tóxica do veneno, levando à exposição de antígenos próprios do hospedeiro, que antes não haviam sido expostos. Todos estes mecanismos não são exclusivos da imunização dos venenos (RUSSELL, 1988).

Contudo, nos últimos 40 anos, a ação destes venenos sobre o sistema complemento e os seus efeitos inflamatórios e, conseqüentemente, as ações fagocitárias, foram os poucos temas explorados e, mais recentemente os efeitos adjuvantes dos venenos foram vistos em alguns trabalhos.

A ação do veneno ofídico sobre o sistema complemento foi bastante explorado, principalmente na capacidade de deletar ou diminuir algum componente da cascata enzimática.

Sabe-se que os venenos que contêm CVF (Cobra Venom Factor) ou substância similar levariam à imunossupressão da resposta imune humoral pela deleção do componente C3 do sistema complemento (MARTINELLI *et al.* 1978a). Na regulação da resposta imune, o componente C3 do sistema complemento não tem um mecanismo definido. Acredita-se que a facilidade de interação com os receptores de complemento nas APCs poderiam mudar a via e a forma de processamento e apresentação do epítipo antigênico ao complexo de histocompatibilidade principal (MILETIC & FRANK, 1995). Também é dado como função do C3 a atividade mitótica sobre os linfócitos T. Deste modo, a deleção do componente C3 poderia levar a diminuição da resposta aos antígenos T-dependentes (WEILER & HOBBS, 1987).

Acreditamos que o mecanismo de ação imunossupressora do veneno de *Lachesis muta muta* seja diferente do que aquele exercido pelo veneno de *Naja naja*, já que até o presente momento não foi encontrado no veneno da família *Crotalidae*, componente que atua diretamente sobre o sistema complemento. O efeito supressor causado pelo veneno de *Naja naja* cessa após 5 dias enquanto que o efeito causado pelo veneno de *Lachesis muta muta* perdura durante toda a cinética de produção de anticorpos em camundongos.

No que diz respeito ao efeito inflamatório, existem divergências quanto ao seu mecanismo, quando induzido por venenos. Alguns autores acreditam que esse efeito seria induzido pela ação edematogênica, enquanto outros, responsabilizam ao efeito hemorrágico e miotóxico que os venenos possuem (LOMONTE, TARKOWSKI, HANSON, 1993; BARROS *et al.*, 1998).

A atividade adjuvante do veneno botrópico já foi demonstrada por GUIDOLIN *et al.* (1998), na imunização de eqüinos para a produção de soros antibotrópico-tetânico, em que houve um aumento significativo nos títulos para anticorpos antitetânicos, nos animais que receberam, concomitantemente, anatoxina tetânica e veneno de *B. jararaca*, quando comparados aos animais que receberam apenas anatoxina tetânica. HELMBOLD *et al.*,

(1986), fazem menção às propriedades mitogênicas de veneno de serpentes (Agkistrodon rhodostoma) para linfócitos T e B, pois é comum a presença de substâncias semelhante às lectinas (glicoproteínas) em venenos de serpente.

Os mecanismos das drogas imunossupressoras já estão bem caracterizados, e os principais fármacos atuam na cooperação celular, seja deletando a célula alvo, diminuindo a expressão de um receptor, ou a produção de alguma citocina, ou alterando o mecanismo de reconhecimento antigênico ou, ainda, diminuindo e alterando a replicação celular, principalmente das células imunocompetentes, como descrito na introdução.

Os receptores das células imunocompetentes e os fatores humorais da imunidade podem ser afetados por diversas substâncias, sendo as principais: os adjuvantes e as drogas imunomoduladoras, tanto para incrementar como diminuir a resposta imune.

Contudo a produção de soros hiperimunes contra venenos ofídicos requer uma resposta dos cavalos a todos os elementos tóxicos presentes. Qualquer outro fator que impeça o máximo de resposta nos eqüídeos é considerado um fator de aumento de custo e perda de qualidade. Caracteriza-se por boa qualidade de um soro hiperimune a sua baixa ou nula concentração de proteína inespecíficas, seu alto grau de pureza, ou seja, que na sua composição haja somente imunoglobulinas e ambos associados a uma atividade neutralizante satisfatória do efeito letal, bem como a outras atividades biológicas do veneno. Estas características só são alcançadas, quando a potência dos plasmas hiperimunes é bem elevada.

Considerando este ponto de vista, este trabalho contribuiu significativamente para a obtenção de um plasma com maior capacidade neutralizante da atividade letal e, conseqüentemente, com maior pureza. Foi possível obter uma redução de custo de pelo menos 50%, visto que, apesar do aumento dos títulos plasmáticos, os níveis de rendimento no processo de purificação dos plasmas para produção de soros comerciais, ainda são baixos, na ordem de 40%.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho concluiu que:

a) O veneno de *Lachesis muta muta* possui ação imunossupressora sobre a produção de anticorpos a antígenos não relacionados.

b) A ação imunossupressora é dose-dependente

c) Há pelo menos dois componentes no veneno que são responsáveis pela imunossupressão.

d) A imunização de camundongos com o veneno de *Lachesis muta muta* sem a fração imunossupressora faz com que a resposta aos antígenos não relacionados seja igual aos animais controles.

e) A imunização de cavalos com o veneno de *Lachesis muta muta* sem a fração imunossupressora faz com que a resposta ao veneno seja superior aos animais imunizados com veneno total.

f) A resposta secundária a antígenos não relacionados é inferior nos animais que receberam veneno total e a fração com atividade imunossupressora.

7. SUMMARY

In order to study the effect of *Lachesis muta* venom on the antibody response to unrelated antigens we first made an experimental analysis on mice genetically selected for high antibodies' production (H_{GP} lines), to determine the effect of *Lachesis muta* venom on the anti-sheep erythrocytes (SE) response.

Groups of mice received 100µg of venom in 0,5ml by intraperitoneal (ip) route 72, 24 hs before or simultaneously with 5×10^8 SE/0,5ml ip. In a second test, we repeated the same experiment as described above with *B. jararaca* and *C. d. terrificus* venoms using 18µg/0,5ml and 0,6µg/0,5ml respectively, in order to observe whether the inhibitory effect was present in venoms of other species.

To elucidate if the depletory effect was present only in a particular venom fraction, around 120mg of *Lachesis muta muta* venom was applied to a Superdex® 75 column. Six fractions were studied for their biological activity and biochemical aspects (polyacrilamide gel electrophoresis).

The results showed that in relation to the control groups (SE only) the total *Lachesis muta* venom promoted a clear, significant ($P < 0.001$) and persistent decrease in the anti-SE antibody response, mainly in the group that received venom 72hs before. The venoms of *B. jararaca* and *C. d. terrificus* did not show any inhibitory effect. After the chromatographic separation fraction 4 (molecular mass between 24 and 30 kDa) and 5 (molecular mass between 10 and 14 kDa) showed a significant suppressive effect ($P < 0.001$ and $P < 0.01$ respectively).

These data showed an inhibitory effect of *Lachesis muta* venom on an unrelated antigen. The activity is dose dependent and is present only in this species of *Crotalidae* family.

The experiment with select mice has got subject to be applied in antivenom production. When horses were immunized with *Lachesis muta* venom without suppressive fractions, the sera were three times more effective than the same sera from the horses which received total *Lachesis muta* venom.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADORINI, L.; GUÉRY, J. C.; RODRIGUEZ-TARDUCHY, G; TREMBLEAU, S. - Selective immunosuppression. **Immunology Today**, **14** (6): 285-289, 1993.
- ARAGÓN-ORTIZ, F. - Isolation and partial characterization of *Lachesis muta melanocephala* coagulant proteinase. Biochemical parameters of the venom. **Revista de Biologia Tropical**, **36** (2B): 387-392, 1988.
- ARAGÓN-ORTIZ, F.; BRENES-BRENES, J.R.; GUBENSEK, F. - Characterization of a lectin-like protein isolated from *Lachesis muta* snake venom.. **Revista de Biologia Tropical** **37**: 79-84, 1989.
- AUDIBERT, F.M. & LISE, L.D. - Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. **Immunology Today** **14**: 281-284, 1993.
- BARROS, S.F.; FRIEDLANSKAIA, I; PETRICEVICH, V.L.; KIPNIS, T.L. - Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Mediators and Inflammation** **7**: 339-346, 1998.
- BAXTER, E.H. & GALLICHIO, H.A. - Cross-neutralization by tiger snake (*Notechis scutalus*) antivenin and sea snake (*Enhydrina schistosa*) antivenene against several sea snake venoms. **Toxicon** **12**: 273-278, 1974.
- BEIGUELMAN, B. - **Curso práctico de bioestadística** Ribeirão Preto, 2ªed., Revista Brasileira de Genética, 1991. 224p.
- BERZOFSKY, J A. - Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. **Science** : 932-940, 1985.
- BIOZZI, G.; CABRERA, W.H.; MOUTON, D.; IBANEZ, O.M. - Restricted and general polygenic regulation of antibody responsiveness. In: BENACERRAF, B. **Immunogenetics and immune regulation**, Milan, Masson, 1982. p. 31-60.
- BIOZZI, G.; MOUTON, D.; SANT'ANNA, O.A.; PASSOS, H.C.; GENNARI, M.; REIS, M.H.; FERREIRA, V.C.A.; HEUMANN, A.M.; BOUTHILLIER, Y.; IBANEZ, O.M.; STIFFEL,

- C.; SIQUEIRA, M. - Genetics of immunesponseveness to natural antigens in the mouse. **Current Topics in Microbiology and Immunology 85**: 31-98, 1979.
- BIOZZI, G.; SIQUEIRA, M.; STIFFEL, C.; IBANEZ, O.M.; MOUTON, D.; FERREIRA, V.C.A. - Genetic selection for relevants immunological functions. In: FOUGEREAU, M. AND DAUSSET, J. **Immunology 80 - Progress in Immunology IV**, London, Academic Press, Inc., 1980. p. 423-457.
- BIOZZI, G.; STIFFEL, C; MOUTON, D.; BOUTHILLIER, Y.; DECREUSEFOND, C. - La régulation génétique de la synthèse des immunoglobulines au cours de la réponse imunolique. **Annales de Immunologie 125C**: 107-142, 1974.
- BIOZZI, G.; STIFFEL, C; MOUTON, D.; BOUTHILLIER, Y.; DECREUSEFOND, C. - Sélection articielle pour la production d'anticorps chez la souris. **Annales du Institute Pasteur 115**: 965-972, 1968.
- BIOZZI, G; MOUNTON, D; SIQUEIRA, M; STIFFEL, C. - Effect of genetic modification of immune responsiveness on anti-infection and anti-tumor resistance. In: SKAMENE, E. **Genetic control of host resistance to infection and malignancy**. New York, Allan R. Liss Inc., 1985. p. 3-18.
- BISMUTH, C.; BAUD, F.J.; BORRON, S.W.; SCHERRMANN, J.M. - Antibodies proposed as therapeutic agents. **Archive of Toxicology Supply 18**: 321-332, 1996.
- BOLAÑOS, R.; MUÑOZ, G.; CERDAS, L. - Toxicidad, neutralizacion e imunolectroforesis de los venenos de *Lachesis muta* de Costa Rica Y Colombia. **Toxicon 16**: 295-300, 1978.
- BOQUET, P. Immunological Prpperties of snake venoms. In: LEE, C.Y. **Snack venoms. Handbook of Experimental Pharmacology 52**. Berlin, Spring-Verlag, 1979. p. 751-854
- BÖTTGER, E. C.; HOFFMANN, T.; MERZGER, S. HADDING, U.; BITTER-SUERMAN, D. - The role and mechanism of cobra venom factor induced supression of the humoral immune response in guinea pigs. **The Journal of Immunology 137**: 1280-1285, 1986.

- BRASIL, Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. **Programa Nacional de Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos. Distribuição de Casos Confirmados e Notificados de 1986 a 1993**, Brasília, Fundação Nacional de Saúde, 1994. 36p.
- BRAZIL, V. - Contribuição ao estudo do veneno ophidico, II Veneno de alguns espécies brasileiras. **Revista Médica de São Paulo** 4: 375-380, 1901.
- BRIGTON, M.A. - Genetic control of resistance of viral infections. In: SKAMENE, E. **Genetic control of host resistance to infection and malignancy**. New York, Allan R. Liss Inc., 1985. p. 111-123.
- BROWN, J.H.; JARDETZKY, T.; SAPER, M.A.; SAMRAOVI, B.; BJORKMAN, P.J.; WILEY, D.C. - A hypothetical model of the foreign antigen binding site of classe II histocompatibility molecules. **Nature** 332: 845-850, 1988.
- CABRERA, W.H.; IBANEZ, O.M.; OLIVEIRA, S.L.; SANT'ANNA, O.A.; SIQUEIRA, M.; MOUTON, D. ; BIOZZI, G. - Evidence for distinct polygenic regulation of antibody response to some unrelated antigens in lines of mice selected for high and low response to somatic antigen of *Salmonella*. **Immunogenetics** 16: 583-592, 1982.
- CADILLO, E.M.; FERREYRA, C.B.; ZAVALETA, A. - Actividad hemolitica de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus* y *Micrurus*. **Revista de Biología Tropical** 39: 311-314, 1991.
- CALICH, V.L.G.; KIPNIS, T.L.; DIAS DA SILVA, W.; ALPER, C.A. AND ROSEN, F.S. Brazilian snake serum and venom: Studies of the alternative pathway and C3 in man and serpent. In: 7th International Complement Workshop, St. Petersburg Beach, Florida, 1977, (Abstracts), p. 20-22.
- CALMETTE, A. - Contribution à l'étude du venin des serpents. Immunization des animaux et traitement de l'envenimation. **Annales du Institute Pasteur** 8: 275-971, 1894.

- CARDOSO, D. F. & MOTA, I. - Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. **Toxicon** **35**: 607-612, 1997.
- CHIPPAUX, J.P. & GOYFFON, M. - Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon** **6** (6): 823-846, 1998.
- COCHRANE, C.G.; MÜLLER-EBERHARD, H.J.; AIKIN, B.S. - Depletion of plasma complement in vivo by a protein of cobra venom its effect on various immunologic reactions. **The Journal of Immunology** **105**: 55-69, 1970.
- DALMORA, S.L.; VACCARI, S.F.; SAMPEDRO, A.M.; PEREIRA, J.E.S. - Dosagem biológica do antiveneno botrópico. **Memórias do Instituto Butantan** **54**: 21-30, 1992.
- DE FRANCO, M. - Controle poligênico muçti-específico da resposta imune: estudo comparativo das respostas a proteínas heterólogas em linhagens de camundongos bons e maus respondedores. São Paulo, 1989 (Tese de mestrado, Universidade de São Paulo).
- DEMPSTER, W.J. - Kidney homotransplantation. **British Journal of Surgery** **40**: 320-328, 1953.
- DIAS DA SILVA, W.; GUIDOLIN, R.; RAW, I.; HIGASHI, H.G.; CARICATI, C.P.; MORAIS, J.F.; LIMA, M.L.S.R.; YAMAGUCHI, I.K.; NISHIKAWA, A.K.; STEPHANO, M.A.; MARCELINO, J.R.; PINTO, J.R.; SANTOS, M.J. - Cross-reactivity of horse monovalente antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. **Memórias do Instituto Butantan** **51**: 153-168, 1989.
- DINIZ, M.R.V. & OLIVEIRA, E.B. - Purification and properties of a kininogenin from the venom of *Lachesis muta* (Bushmaster). **Toxicon** **30**: 247-258, 1992.
- EL AYEB, M & ROCHAT, H. - Production of monoclonal antibodies. Scorpion antitoxins: characterization and molecular mechanisms of neutralization. **Archives de Institute Pasteur** **65**: 29-41, 1988.

- ENGVALL, E. - Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. In: VAN VUNAKIS, H. AND LANGONE, J.J. **Methods of Enzymology - Immunochemical Techniques Part A**, New York, Academic Press, 70, 1980. p. 419-438.
- ENGVALL, E. & PERLMANN, P. - Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. **The Journal of Immunology** 109: 129-135, 1972.
- FEINGOLD, N.; FEINGOLD, J.; MOUTON, D.; BOUTHILLIER, Y.; STIFFEL, C.; BIOZZI, G. - Polygenic regulation of antibody synthesis to sheep erythrocytes in mouse: a genetic analysis. **European Journal of Immunology** 6: 43-51, 1976.
- FESTING, M.F.W. - Strategy on the use of inbred strains. In: SKAMENE, E. **Genetic control of host resistance to infection and malignancy**. New York, Allan R. Liss Inc., 1985. p. 19-29.
- FINNEY, D.J. - **Probit analysis**. Cambridge, 3th ed., Cambridge University Press, 1971. 333p.
- FISCHER, A. - Primary T-cell immunodeficiencies. **Currente Opinion in Immunology** 5: 569-578, 1993.
- GENÉ, J.A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; CERDAS, L. - Comparative study on coagulant defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon** 27: 841-848, 1989.
- GERMAIN, R.N. & MARGULIES, D.H. - The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. **Annual Review of Immunology** 11: 403-450, 1993.
- GEWURZ, H.; CLARCK, D.S.; FINSTAD, J.; KELLY, W. D.; VARCO, R.L.; GOOD, R.A.; GRABRIELSEN, A.E. - Role of Complement System in graft rejection in experimental animals and man. **Annales of New York Academic Science** 129: 673-680, 1966.

- GRASSET, E; PONGRATZ, E.; BRECHBUHLER, T. - Analyse immunochemique des constituants des venis de serpents por la methode de precipitacion en milieu gelifie. **Annales de Institute Pasteur** 91: 162-186, 1956.
- GRISCELLI, C & LISOWSKS-GIOSPIERRE, B. - Combined immunodeficiency with defective expression in MHC class II genes. **Immunodeficiency Review** 1: 135-153, 1989.
- GRUMACH, A.S. - Complement deficiencies. In: DIAS DA SILVA, W. - Mini-simpósio, sistema complemento: pesquisa de interface. **Memórias do Instituto Butantan** 54: 15-19, 1992.
- GUIDOLIN, R.; STEPHANO, M.A.; MORAIS, J.F.; SAKAGUTI, E.H.; PRADO, S.M.A.; FRATELLI, F. VANCETTO, M.D.C. & HIGASHI, H.G. - Production of an effective anti-bothrops-tetanus mixed hyperimmune serum of equine origin. **Journal of Venom and Animals Toxins** 4: 70-78, 1998.
- GUTIÉRREZ, J.M. & CERDAS, L. - Mechanism of action of myotoxins isolated from snake venoms. **Revista de Biología Tropical** 32: 213-222, 1984
- GUTIÉRREZ, J.M. & CHAVES, F. - Efectos proteolitico, hemorragico y mionecrotico de los venenos de serpientes costarricenses de los generos *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. **Toxicon** 18: 315-321, 1980.
- GUTIÉRREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E; CERDAS, L. - An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon** 26: 411-413, 1988.
- GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.; CERDAS, L. - Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new Costa Rican subspecies of the Bushmaster. **Toxicon** 25: 713-720, 1987.
- HAMMARSTRÖM, L.; GILLNER, M. & SMITH, E.C.I. Molecular basis for human immunodeficiencies. **Current Opinion in Immunology** 5: 579-584, 1993.

- HAUPT, K. & MOSBACH, K. - Plastic antibodies: developments and applications. **Trends in Biotechnology** 16: 468-475, 1998.
- HELMBOLD, W.; FEHRES, J.; PROKOP, O.; UHLENBRUCK, G. & JANSSEN, E. - B and T lymphocyte mitogenic properties in a snake venom. **Biomedica and Biochimica Acta** 45: 459-466, 1986.
- HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; CARICATI, C.P.; FERNANDES, I.; MARCELINO, J.R.; MORAIS, J.F.; YAMAGUCHI, I.K.; STEPHANO, M.A.; DIAS DA SILVA, W.; TAKEHARA, H.A. - Antigenic cross-reactivity among components of Brazilian Elapidae snake venoms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 28: 767-771, 1995.
- HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; STEPHANO, M.A.; SANTOS, M.J.; DIAS DA SILVA, W.; UEDA, C.M.M. - Produção de anticorpos antiveneno total de *Crotalus durissus terrificus* em cavalos por fosfolipase A₂. **Memórias do Instituto Butantan** 51: 91-100, 1989.
- HUDSON, L. & HAY, F.C. - **Practical Immunology**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 3th ed., 1989. 507p.
- IBANEZ, O.M.; MOUTON, D.; OLIVEIRA, S.L.; RIBEIRO-FILHO, O.G.; PIATTI, R.; SANT'ANNA, O.A.; MASSA, S.; BIOZZI, G.; SIQUEIRA, M. - Polygenic control of quantitative antibody responsiveness: restrictions of the mutispecific effect related to the selection antigen. **Immunogenetics** 28: 6-12, 1988.
- KLEIN, J. **Immunology**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1991. 508p.
- KOZIN, F & COCHRANE, C.G. - Kinin system. In: ROIT, I.M. & DELVES, P.J. - **Encyclopedia of Immunology**, London, Academic Press, 1992. p. 945-947. v.2.
- LAMAN, J.D; CLAASSEN, E.; NOELLE, R.J. - Immunodeficiency due to a faulty interaction between T cells and B cells. **Current Opinion in Immunology** 6: 636-641, 1994.

- LAMB, G. & HANNA, W. - Specificity of antivenomous sera. **Scientific Memories by officers of the medical and Sanitary Departmente of the Government of India** 10: 1-25, 1904.
- LATIFI, M & MANHOURI, H. - Antivenin production. **Memórias do Instituto Butantan** 33: 893-898, 1966.
- LEINIKKI, P.O. & PASSILA, S. - Quantitative, semiautomated, enzyme-linked immunosorbent assay for viral antibodies. **Journal of Infection Disease** 136: 294-299, 1977.
- LEIVA, M.A.G. & ARAGÓN-ORTÍZ, F. - Purification and some properties of hemagglutinating protein mutina from Bushmaster *Lachesis muta* snake venom. **Revista de Biologia Tropical** 34: 49-53, 1986.
- LOMONTE, B. - Edema-forming activity of Bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) and Central American rattlesnake (*Crotalus durissus durissus*) Venoms and Neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon** 23: 173-176, 1985.
- LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. - Host response to Bothrops asper snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation** 17: 93-105, 1993.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry** 193: 265-275, 1951.
- MAGALHÃES, A.; DE OLIVEIRA, G. J.; DINIZ, C.R. - Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the Bushmaster snake, *Lachesis muta noctivaga*. **Toxicon** 19: 279-294, 1981.
- MARTINELLI, G.P.; MATSUDA, T.; WAKS, H.S.; OSLER, A.G. - Studies on immunosuppression by cobra venom factor. III. On early response to sheep erythrocytes in C5-deficient mice. **The Journal of Immunology** 121: 2052-2055, 1978b.

- MARTINELLI, G.P.; MATSUDA, T.; OSLER, A.G. - Studies on immunosuppression by cobra venom factor. I. On early IgG and IgM responses to sheep erythrocytes and DNP-protein conjugates. **The Journal of Immunology** 121: 2043-2047, 1978a..
- MATSUDA, T.; MARTINELLI, G.P.; OSLER, A.G. - Studies on immunosuppression by cobra venom factor. II. On response to DNP-ficoll and DNP-polyacrylamide. **The Journal of Immunology** 121: 2048-2051, 1978.
- MILETIC, V. D. & FRANK, M. M. - Complement-immunoglobulin interactions. **Current Opinion in Immunology** 7: 41-47, 1995.
- MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; SANT'ANNA, O.A.; BOUTHILIER, Y.; IBANEZ, O.; FERREIRA, V.C.A.; MEVEL, J.C.; REIS, M.H.; PIATTI, R.M.; STIFFEL, C.; BIOZZI, G. - Genetic regulation of multispecific antibody responsiveness: improvement of "high" and "low" characters. **European Journal Immunology** 18: 41-49, 1988.
- MOUTON, D; STIFFEL, G AND BIOZZI, G Genetic factors of immunity against infection. **Annales de Immunologie** 136D: 131-141, 1985.
- NEVILLE, D.M. Jr. - Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. **Journal of Biological Chemistry** 246: 6328-6334, 1971.
- NICOLLE, M. AND RAPHAEL, A. - **Elements de microbiologie générale et d'immunologie**. Paris, Doin, 1925. 268p.
- OAKLEY, B.R.; KIRSH, D.R.; MORRIS, N.R. - A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.** 105: 361-363, 1980.
- OGILVIE, M.L.; DOCKTER, M.E.; WENZ, L.; GARTNER, T.K. - Isolation and characterization of lactose-binding lectins from the venoms of snakes *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamesonii*. **Journal of Biochemistry** 100: 1425-1431, 1986.

- OREJUELA, P.; ZAVALETA, A.; SALAS, M.; MARSH, N. - Thrombin-like activity in snake venoms from peruvian *Bothrops* and *Lachesis* genera. **Toxicon** 29: 1151-1154, 1991.
- OTERO, R.; FURTADO, M.F.D.; GONÇALVES, L.R.C.; NUÑEZ, V.; GARCIA, M.E.; OSORIO, R.G.; ROMERO, M.; GUTIÉRREZ, J.M. - Comparative study of the venoms of three subspecies of *Lachesis muta* (Bushmaster) from Brazil, Colombia and Costa Rica. **Toxicon** 36: 2021-2027, 1998.
- OTERO, R.; OSORIO, R.G.; VALDERRAMA, R.; GIRALDO, A.G. - Efectos farmacologicos y enzimaticos de los venenos de serpentes de Antioquia y Choco (Colombia). **Toxicon** 30: 611-620, 1992.
- LOUDIN, J. - Specific precipitation in gel and its application to immunochemical analysis. In: CORCORAN, A.C. **Methods in Medical Research**. Chicago, Year Book Publishers Inc., 1952. 543p. v.5.
- OWEN, M.J. - The T-cell receptor for antigen. **Immunology** 1: 17-19, 1988
- OWEN, M.J. & LAMB, J.R. - **Immune recognition**. Oxford, IRL Press, Inc., 1989. 73p.
- OWNBY, C.; CAMERON, D.; TU, A.T. - Isolation of myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. electron microscopic analysis of muscle damage. **American Journal of Pathology** 85: 149- 163, 1976
- PASSOS, H.C.; SIQUEIRA, M.; REIS, M.H.; FERREIRA, V.C.A.; IBANEZ, O.M.; SANT'ANNA, O.A.; BIOZZI, G. - Genetic control of immune response to protein antigens. I. Two-way selective breeding of mice for quantitative antibodyresponsiveness to bovine serum albumin and rabbit gamma-globulin. **The Journal of Immunology** 119: 1439-1443, 1977.
- PEPIN, S.; LUTSCH, C.; GRANDGEORGE, M.; SCHERRMANN, J.M. - Snake F(ab')₂ antivenom from hyperimmunized horse: pharmacokinetics following intravenous and intramuscular administrations in rabbits. **Pharmacology Research** 12: 1470-1473, 1995.

- POPE, C.G. - The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. I - True digestion of the proteins. **British Journal of Experimental Pathology**. **20**: 132-149, 1939.
- PROSS, H.F. & EIDINGER, D. - Antigenic competition: A review of nonspecific antigen-induced suppression. **Advance in Immunology** **18**: 133-168, 1974.
- RAW, I.; GUIDOLIN, R.; HIGASHI, H.G.; KELEN, E.M.A. - Antivenins in Brazil: Preparation. In: TU, A. T. - **Handbook of Natural Toxins**. New York, Marcel Dekker, Inc., 1991. p. 557-581. v.5.
- ROIT, I.M.; BROSTOFF, J. ;MALE, D.K. - **Immunology**. London, Gower Medical Publishing, 2^aed., 1989, 180.
- ROSENBERG, P. - Phospholipases. In: SHIER, W.T. & MEBS, D. - **Handbook of Toxicology**, New York, Marcel Dekker, Inc., 1990. p. 67-277.
- RUSSELL, F. E. Snake venom immunology: Historical and practical considerations. **Journal of Toxicology-Toxin Reviews** **7**: 1-82, 1988.
- SÁNCHEZ, E. F.; FREITAS, T.V.; FERREIRA-ALVES, D.L.; VELARDE, D.T.; DINIZ, M. R.; CORDEIRO, M.N.; AGOSTINI-COTTA, N.; DINIZ, C.R. - Biological Activities of Venoms from South American Snakes. **Toxicon** **30**: 95-103, 1992.
- SÁNCHEZ, E.F.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C.R. - Purification of a hemorrhagic factor (LHF-1) from the venom of the Bushmaster snake, *Lachesis muta muta*. **Toxicon** **25**: 611-619, 1987.
- SÁNCHEZ, E.F.; MAGALHÃES, A.; MANDELBAUM; F.R.; DINIZ, C.R. - Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the Bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **Biochimica et Biophysica Acta** **1074**: 347-356, 1991.

- SÁNCHEZ, E.O.F. & MAGALHÃES, A. - Purification and partial characterization of an L-amino acid oxidase from bushmaster snake (surucucu pico de jaca) *Lachesis muta muta* venom.. **Brazilian Journal of Medical. and Biological Research** 24: 249-260, 1991..
- SANT'ANNA, O.A.; BOUTHILLIER, Y.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. - Differences in the genetic control of primary and secondary response. **Immunology** 37: 849-856, 1979.
- SANTOS, M.C.; DINIZ, C.R.; PACHECO, M.A.; DIAS DA SILVA, W. - Phospholipase A2 injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon** 26: 207-213, 1988
- SHARMA, V.K.; LI, B.; KHANNA, A.; SEHAJPAL, P.K.; SUTHANTHIRAN, M. - Which way for drug-mediated immunosuppression? **Current Opinion in Immunology** 6: 784-790, 1994.
- SILVA, L.M.; DINIZ, C.R.; MAGALHÃES, A. - Purification and partial characterization of na arginine ester hydrolase from the venom of the Bushmaster snake, *Lachesis muta noctivaga*. **Toxicon** 23: 707-718, 1985.
- SILVA, N.J.; AIRD, S.D.; SEEBART, C.; KAISER, I.I. - A gyroxin analog the venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*). **Toxicon** 27: 763-771, 1989.
- SILVEIRA, A.M.V.; MAGALHÃES, A. DINIZ, C.R.; OLIVEIRA, E.B. - Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta muta*. **International Journal of Biochemical** 21: 863-871, 1989.
- SIQUEIRA, M.; BANDIERI, A; REIS, M.H.; SANT'ANNA, O.A.; BIOZZI, G. - Selective breeding of mice for antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of *Salmonellae*. **European Journal of Immunology** 6: 241-249, 1976.
- SIQUEIRA, M.; ESTEVES, M.; IBANEZ, O.M.; FERREIRA, V.C.A.; SANT'ANNA, O.A.; REIS, M.H.; BIOZZI, G. - Non specific regulation of antibody responsiveness in the mouse. **European Journal of Immunology** 7: 195-203, 1977.

- SITTENFELD, A.; RAVENTÓS, H.; CRUZ, R.; GUTIÉRREZ, J.M. - Dnase activity in Costa Rican Crotaline venoms. Quantification of activity and identification of electrophoretic variants. **Toxicon** 29: 1213-1224, 1991.
- SOUZA E SILVA, M.C.C. **Resposta inflamatória induzida experimentalmente pelo veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus*. Efeito do veneno sobre algumas funções dos macrófagos peritoneais.** São Paulo, 1993.(Tese de mestrado, Universidade de São Paulo).
- SULLIVAN, J.B.Jr. - Immunotherapy in poisoned patient. Overview of present applications and future trends. **Medical Toxicology** 1: 47-60, 1986.
- TAMBOURGI, D.V.; CAMPOS, A.C.M.R.; FREITAS, M.C.W.; MAGNOLI, F.; DIAS DA SILVA, W.; VON EICKSTEDT, V.R.D.; SANTOS, M.C.; FURTADO, M.F.D.; KIPNIS, T.L. - Manipulation of the complement system by animal venoms. In: DIAS DA SILVA, W. **Mini-simpósio, sistema complemento: pesquisa de interface.** Memórias do Instituto Butantan, 1992. p. 15-19.
- THEAKSTON, R.D.G & REID, H.A. - Enzyme-like immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. **Toxicon** 17: 510-515, 1979.
- TU, A.T. **Venoms: Chemistry and molecular biology.** New York, John Wiley & Sons, 1977. 95p.
- VALIENTE, C.; MORENO, E.; SITTENFELD, A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. - An electrophoretic study on phospholipase A₂ isoenzymes in the venoms of Central American Crotaline snakes. **Toxicon** 30: 815-823, 1992.
- VITAL BRAZIL, O. - History of the primordia of snake-bite accident serotherapy. **Memórias do Instituto Butantan** 49: 7-20, 1987.
- WALDMANN, T.A.; WHITE, J.D.; GOLDMAN, C.K., TOP, L.; GRANT, A.; BAMFORD, R.; ROESSLER, E.; HORAK, I.D.; ZAKNOEN, S.; KASTEN-SPORTES, C. The interleukin-2 receptor: a target for monoclonal antibody treatment of human T-cell lymphotropic virus I-induced adult T-cell leukemia. **Blood** 82: 1701-1712, 1993.

- WEILER, J.M. & HOBBS, M.V. - Role of the third component of complement in immunoregulation. **Concepts in Immunopathology** 4: 103-128, 1987.
- WILDE, H.; THIPKONG, P. SITPRIJA, V.; CHAIYABUTR, N. - Heterologous antisera and antivenins are essential biological: perspectives on a worldwide crisis. **Annals of International Medicine** 125: 233-236, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms**, Geneva, WHO, 1981. 44p.(WHO Offset Publication, 58)
- ZAMUDIO, K.R. & GREENE, H. W. - Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics and conservation. **Biological Journal of Linnus Society** 62: 421-442, 1997.