

Cintia Yumi Fugiwara

Estudo de algumas atividades biológicas do  
extrato de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*  
Walker, 1855 (Lepidóptera, Saturniidae)  
preparado após diferentes períodos de  
armazenamento das cerdas

São Paulo  
2006

Cintia Yumi Fugiwara

Estudo de algumas atividades biológicas do  
extrato de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*  
Walker, 1855 (Lepidoptera, Saturniidae)  
preparado após diferentes períodos de  
armazenamento das cerdas

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo,  
para a obtenção de título de  
Mestre em Ciências, na Área de  
Fisiologia Geral.

Orientadora: Ida S. Sano  
Martins

São Paulo  
2006

Fujiwara, Cintia Yumi

Estudo de algumas atividades biológicas do extrato de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidoptera, Saturniidae) preparado após diferentes períodos de armazenamento das cerdas.  
**pg...**

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. *Lonomia obliqua* 2. armazenamento 3. atividade biológica I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral.

## Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

"Aprender uma coisa significa entrar em contato com um mundo do qual não se tem a menor idéia. É preciso ser humilde para aprender".

Paulo Coelho

Aos meus pais **Mituo e Atsuko Fujiwara**,  
por todas as oportunidades que me proporcionaram  
e ao apoio emocional e financeiro  
que contribuíram para realização desse trabalho.

**À Ida Siqueko Sano Martins,**  
por confiar no meu potencial  
possibilitando a oportunidade de desenvolver este trabalho,  
além da orientação, paciência e constante apoio.

"As coisas simples são as mais extraordinárias,  
e só os sábios conseguem vê-las".

Paulo Coelho

Às amigas

**Fernanda Peixoto Barbosa Nunes,**

**Anita Mitico Tanaka-Azevedo,**

**Silvana Pinho de Oliveira,**

**Márcia Sassahara**

**Sandra Corrallo de Tomy,**

**Aline Artioli Machado Yamamura,**

pelo apoio, amizade e constante incentivo.

"O homem que preserva seus amigos jamais é  
dominado pelas tempestades da existência; tem  
forças para ultrapassar as dificuldades e seguir  
adiante".

Paulo Coelho

## **AGRADECIMENTOS**

- ❖ Aos colaboradores deste trabalho: Roberto Henrique Pinto Moraes, Lab. de Parasitologia, IBu; Irineu Lorini, EMBRAPA – Passo Fundo; Lisete Maria Lorini, Carla Denise Tedesco, Universidade Federal de Passo Fundo; Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant’Anna, Lab. de Imunoquímica, IBu;
- ❖ Aos pesquisadores Anita Mitico Tanaka-Azevedo, Sandra Corrallo de Tomy, Luis Roberto de Camargo Gonçalves, Marcelo Larami Santoro, do Lab. de Fisiopatologia, IBu; Kátia Cristina Bárbaro, Lab. de Immunopatologia, IBu, por compartilharem seus conhecimentos, possibilitando a realização das metodologias utilizadas.
- ❖ À Carla Simone Seibert e Diva Danelle Spadacci Morena (pesquisadora do Lab. de Fisiopatologia, IBu) por compartilharem seus conhecimentos, auxiliando na correção dessa dissertação.
- ❖ Aos funcionários de apoio do Laboratório de Fisiopatologia, Alice, Ângela, Iracema, Juscelino, Neuceli, Neusa, Nicolau, Silvana, Terezinha, pelo auxílio constante e pela amizade.
- ❖ A todos os colegas do Lab. de Fisiopatologia que direta ou indiretamente tornaram possível a execução deste trabalho.
- ❖ Aos voluntários, que doaram sangue possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.
- ❖ A CAPES pela concessão da bolsa e ao apoio do CNPq (processo nº 520929/99-3).

# INDICE

## I. INTRODUÇÃO

1. ORDEM LEPIDOPTERA	1
2. LEPIDOPTEROS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA	1
3. ACIDENTES CAUSADOS PELO GÊNERO <i>Lonomia</i>	3
4. <i>Lonomia obliqua</i> (LEPIDOPTERA, SATURNIIDAE)	5
4.1. CICLO DE VIDA	5
4.2. COMPORTAMENTO	6
4.3. INIMIGOS NATURAIS DA LAGARTA <i>Lonomia obliqua</i>	8
5. ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO DE CERDAS DA LAGARTA <i>Lonomia obliqua</i>	10
6. ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO DO ENVENENAMENTO COM A <i>Lonomia obliqua</i>	13
6.1. ASPECTOS CLÍNICOS	13
6.1.1. <i>Lonomia obliqua</i>	13
6.1.2. <i>Lonomia achleous</i>	14
6.2. TRATAMENTO	15
7. PRODUÇÃO DO ANTIVENENO ANTI-LONÔMICO	16

## II. OBJETIVO

1. OBJETIVO	19
-------------	----

## III. MATERIAL E MÉTODOS

1. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE CERDAS DE <i>Lonomia obliqua</i>	20
2. DOSAGEM DE PROTEÍNA	21
3. DOSE MÍNIMA COAGULANTE	22
4. ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA	22
5. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA	23
6. ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDIRETA	23
7. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DIRETA	24



8. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-LONÔMICO EM CAMUNDONGOS	25
9. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS PELO MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	26
10. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS	27
11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
<b>IV. RESULTADOS</b>	
1. DOSAGEM DE PROTEÍNA	29
2. DOSE MÍNIMA COAGULANTE	30
3. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA	33
4. ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA	35
5. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DIRETA	35
6. ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDIRETA	36
7. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	38
8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	39
<b>V. DISCUSSÃO</b>	
43	
<b>VI. CONCLUSÕES</b>	53
<b>VII. RESUMO</b>	54
<b>VIII. ABSTRACT</b>	
56	
<b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	
58	

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número de acidentes humanos por contato com as lagartas <i>Lonomia</i> no Brasil, relatados no período de 1986 a 1998	5
<b>Tabela 2.</b> Árvores descritas como fonte de alimentação da lagarta <i>Lonomia obliqua</i>	8
<b>Tabela 3.</b> Atividades biológicas descritas nas toxinas das lagartas do gênero <i>Lonomia</i>	13
<b>Tabela 4.</b> Orientação terapêutica segundo classificação da gravidade no envenenamento por <i>Lonomia obliqua</i> .	16
<b>Tabela 5.</b> Protocolo experimental para atividade hemolítica indireta.	23
<b>Tabela 6.</b> Protocolo experimental para atividade hemolítica direta	24
<b>Tabela 7.</b> Concentração de proteína dos extratos de cerdas de <i>L. obliqua</i> dos lotes A, B e C	30
<b>Tabela 8.</b> Título de anticorpos dos camundongos imunizados com extrato de cerdas não congeladas e congeladas por 6 meses dos lotes A, B e C	38
<b>Tabela 9.</b> Dados parciais da análise densitométrica, da eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras (0, 2, 4 e 6 meses) do extrato de cerdas da lagarta <i>L. obliqua</i> (Lote A) expressos em porcentagem.	41
<b>Tabela 10.</b> Dados parciais da análise densitométrica, da eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras (0, 2, 4 e 6 meses) do extrato de cerdas da lagarta <i>L. obliqua</i> (Lote B) expressos em porcentagem	41
<b>Tabela 11.</b> Dados parciais da análise densitométrica, da eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras (0, 2, 4 e 6 meses) do extrato de cerdas da lagarta <i>L. obliqua</i> (Lote C) expressos em porcentagem	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema dos lepidópteros considerados de importância médica	2
<b>Figura 2.</b> Ciclo evolutivo da lagarta <i>Lonomia obliqua</i>	6
<b>Figura 3.</b> Comportamento gregário das lagartas <i>Lonomia obliqua</i> , agrupadas no tronco da árvore	7
<b>Figura 4.</b> Comportamento solitário de lagarta <i>Megalopyge albicolis</i>	7
<b>Figura 5.</b> <i>Enicospillus</i> sp inimigo natural da lagarta <i>Lonomia obliqua</i>	9
<b>Figura 6.</b> <i>Belvosia</i> sp inimigo natural da lagarta <i>Lonomia obliqua</i>	9
<b>Figura 7.</b> <i>Moreiria wiedemanni</i> inimigo natural da lagarta <i>Lonomia obliqua</i> .	9
<b>Figura 8.</b> <i>Lespesia affinis</i> inimigo natural da lagarta <i>Lonomia obliqua</i> .	9
<b>Figura 9.</b> <i>Alcaeorrhynchus grandis</i> (Dallas) inimigo natural da lagarta <i>Lonomia obliqua</i>	10
<b>Figura 10</b> <i>Hexamermis</i> sp inimigo natural da lagarta <i>Lonomia obliqua</i>	10
<b>Figura 11.</b> Vírus LoobMNPV inimigo natural da lagarta <i>Lonomia obliqua</i>	10
<b>Figura 12.</b> Esquema de preparação das cerdas de L. obliqua, para produção do extrato	21
<b>Figura 13.</b> Dose mínima coagulante (DMC) das amostras de 0, 2, 4 e 6 meses, do lote A	31
<b>Figura 14.</b> Dose mínima coagulante (DMC) das amostras de 0, 2, 4 e 6 meses, do lote B	32
<b>Figura 15.</b> Dose mínima coagulante (DMC) das amostras de 0, 2, 4 e 6 meses, do lote C	32
<b>Figura 16.</b> Atividade fosfolipásica das amostras de 0, 2, 4 e 6 meses, do lote A	34
<b>Figura 17.</b> Atividade fosfolipásica das amostras de 0, 2, 4 e 6 meses, do lote B	34
<b>Figura 18.</b> Atividade fosfolipásica das amostras de 0, 2, 4 e 6 meses, do lote C	35

<b>Figura 19.</b> Atividade hemolítica indireta das amostras de 0, 2, 4 e 6 meses, do lote A	36
<b>Figura 20.</b> Atividade hemolítica indireta das amostras de 0, 2, 4 e 6 meses, do lote B	37
<b>Figura 21.</b> Atividade hemolítica indireta das amostras de 0, 2, 4 e 6 meses, do lote C	37
<b>Figura 22.</b> Perfil eletroforético do controle, do padrão e das amostras de 0, 2, 4 e 6 meses, do lote A	40
<b>Figura 23.</b> Perfil eletroforético do padrão e das amostras de 0, 2, 4 e 6 meses, do lote B	40
<b>Figura 24.</b> Perfil eletroforético do padrão e das amostras de 0, 2, 4 e 6 meses, do lote C	40
<b>Figura 25.</b> Representação das estruturas conformacionais das proteínas	44

## **I. INTRODUÇÃO**

# I. INTRODUÇÃO

## 1. ORDEM LEPIDOPTERA

As borboletas e as mariposas pertencem à ordem lepidóptera e apresentam hábitos diurno e noturno respectivamente. Essa ordem, dentro da classe Insecta, é uma das que apresenta maior variedade de espécimes, contendo mais de 165.000 espécies, mas ainda há muitas a serem identificadas, particularmente entre as mariposas. Esses insetos são holometábolos, ou seja, possuem desenvolvimento completo, o qual consiste em um ciclo biológico com quatro fases: ovo, larva, pupa e fase adulta (Kawamoto & Kumada, 1984).

A maioria dos lepidópteros são considerados pragas na agricultura, pois no estágio de larva são fitófagos. Apenas alguns lepidópteros que estão dentro da subordem Ditrysia são considerados de importância médica (Moraes, 2003).

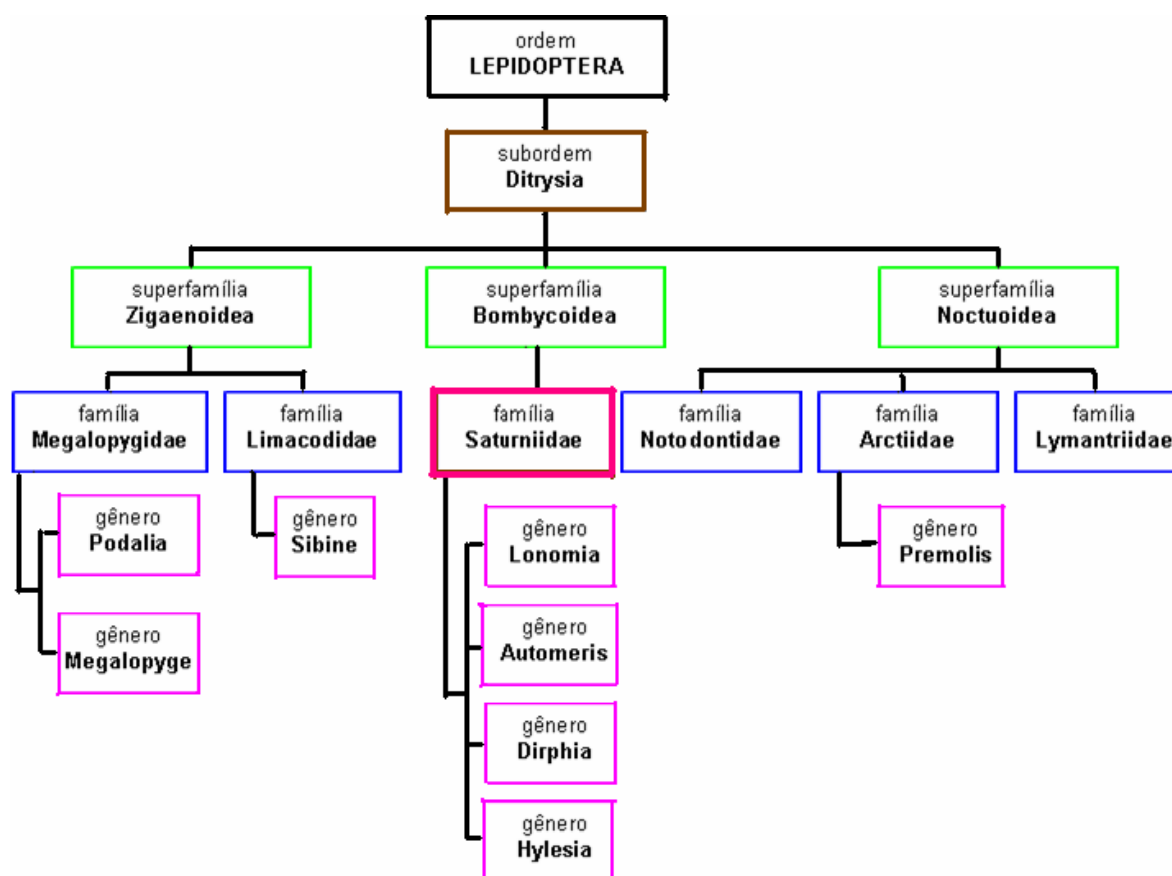
## 2. LEPIDÓPTEROS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA

Os lepidópteros considerados de importância médica podem causar danos ao homem na forma adulta (lepidopterismo) ou na forma de larva (erucismo) o que é mais comum (Pesce & Delgado, 1966). Dentro da subordem Ditrysia existem três superfamílias com suas famílias e gêneros que estão listadas na figura 1 (Fan, 2002).

Na maioria dos gêneros, o acidente com esses animais é causado no estágio larval, com exceção do gênero *Hylesia* que causa lepidopterismo. Nesse caso a mariposa solta as escamas que recobrem o corpo, que, em contato com a pele, causam dermatite pápulo pruriginosa. Geralmente, o contato com as lagartas causa dermatite urticante que, embora ocasione desconforto, não gera maiores problemas (Haddad Jr. & Cardoso, 2003).

A espécie *Premolis semirufa*, do gênero *Premolis*, conhecida popularmente como pararama, é responsável pelo acidente conhecido como pararamose. Inicialmente essa espécie foi descrita nos seringais da Amazônia causando acidentes por contato, principalmente nos membros superiores das pessoas que trabalham com as seringueiras. O contato com as cerdas causa inflamação aguda

e os pacientes poliarticulados podem apresentar inflamação crônica, causando espessamento das membranas sinovial articular, podendo levar a deformidades articulares, comuns às sinovites crônicas mono ou oligoarticulares, como na artrite reumatóide (Costa, 2003). Nesse estado, as lesões tornam-se irreversíveis comprometendo as funções do membro, com conseqüente aparecimento de quadro de periartrite falangeana, um acidente ocupacional que pode causar danos permanentes (Dias, 1986).



**Figura 1.** Esquema dos lepidópteros considerados de importância médica (Fan, 2002).

Outro gênero responsável por acidentes, com complicações mais graves, pertence ao gênero *Lonomia* (família Saturniidae), cujo contato com a lagarta pode ocasionar um quadro de síndrome hemorrágica (Kelen *et al.*, 1995).

### 3. ACIDENTES CAUSADOS PELO GÊNERO *Lonomia*

A primeira referência sobre quadro hemorrágico decorrente do contato com lagarta é do início do século (Alvarenga, 1912). Embora o agente causador não tenha sido identificado, a descrição do quadro clínico era compatível com o envenenamento por *Lonomia*, como mostra o seguinte relato:

“J.R.A., 36 anos, brasileiro, solteiro, nenhum antecedente mórbido.

Em 16 de dezembro do anno próximo passado, cerca de meio-dia, JRA roçou a mão sobre um grupo de taturana, alojadas nas folhas de um arbusto. Penetraram-lhe na pelle da eminencia tenar numerosas felpas da larva.

Imediatamente após, o paciente mastigou fumo e deitou-o, de mistura com a saliva, sobre o ponto offendido, produzindo-se allívio das dores, que haviam apparecido ao mesmo tempo do accidente.

Cerca de dez minutos depois do accidente sobrevieram cephalalgia intensa, rubor e intumescimento da mão no ponto offendido, faixa de lymphangite da eminecia tenar à axila, com um ponto doloroso na prega do cotovelo e adenite axilar.

Dia 17. Pela manhã, ao despertar-se, sentiu a bocca cheia de líquido: era saliva carregada de sangue. A saliva que se ia accumulando na bocca, em quantidade normal, vinha carregada de sangue das glandulas que a secretam.

A primeira micção, nessa mesma manhã, deu urina de cor avermelhada e as outras que se succederam, no correr do dia, eram fracamente sanguinolentas.

Cerca de uma hora antes do accidente, trabalhava no pomar e com um serrote de que se utilizava produziu uma levíssima excoriação da pelle. Depois do contacto com os pellos da lagarta começou a surdir sangue por esse ponto excoriado, durante por dois dias a pequena hemorragia...”.  
Alvarenga, 1912.



Na década de 60, na Venezuela, surgiram alguns pacientes que tiveram contato com lagartas e apresentaram sangramentos. Assim, Arocha-Piñango (1967) descreveu uma síndrome hemorrágica causada pelo contato com lagarta, que foi classificada por Lemaire (1972) como sendo *Lonomia achelous*.

No Brasil, os primeiros relatos de acidentes por lagartas surgiram em 1982, no Amapá e Ilha de Marajó. As ocorrências eram isoladas, e o agente responsável foi identificado como *Lonomia achelous* (Fraiha *et al.*, 1986), mesma espécie observada nos acidentes ocorridos na Venezuela. Porém, a partir de 1989, os acidentes com lagartas assumiram proporções epidêmicas no Sul do Brasil, principalmente no oeste de Santa Catarina, nas regiões próximas a Chapecó, no norte do Rio Grande do Sul e na região de Passo Fundo (Fan, 2002; Zanin *et al.*, 2003).

Os pacientes acidentados por contato com essas lagartas apresentaram distúrbios da coagulação, alguns com hemorragias graves e outros com insuficiência renal (Duarte *et al.*, 1990; Duarte *et al.*, 1994; Duarte *et al.*, 1996; Fan & Duarte, 2003). Ao contrário da Região Norte do Brasil, onde os relatos mostram que os acidentes ocorriam esporadicamente, os acidentes na Região Sul apresentaram uma maior frequência, passando a serem considerados problema de saúde pública. Porém, as lagartas responsáveis pelos acidentes na Região Sul do Brasil foram identificadas como *Lonomia obliqua* (Walker).

A tabela 1, mostra o aumento progressivo de acidentes registrados no período de 1986 a 1998 provocados por lagartas pertencentes ao gênero *Lonomia* no Brasil. Embora o maior número de acidentes continue ocorrendo ainda no Sul do Brasil, é também observado um aumento de casos na Região Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (Fan & Duarte, 2003).

Além do Brasil, há ainda relatos de acidentes esporádicos com gênero *Lonomia* na Guiana Francesa, Peru, Paraguai, Argentina e Colômbia (Arocha-Piñango & Guerrero, 2001).

**Tabela 1.** Número de acidentes humanos por contato com as lagartas *Lonomia* no Brasil, relatados no período de 1986 a 1998.

UF/ano	..86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98*	Total
AM/PA	26	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2	--	--	28
SP	--	--	1	--	1	1	--	2	1	4	7	2	1	20
PR	--	--	--	--	2	4	2	2	4	6	2	40	32	92
SC	--	--	--	--	30	30	8	--	32	75	90	170	230	665
RS	--	--	--	6	10	13	21	72	101	66	46	111	177	323
GO	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1	--	--	--
TOTAL	26	--	1	6	43	48	31	76	138	151	148	359	440	1129

(Fan & Duarte, 2003)

\*até março

#### 4. *Lonomia obliqua* (LEPIDOPTERA, SATURNIIDAE)

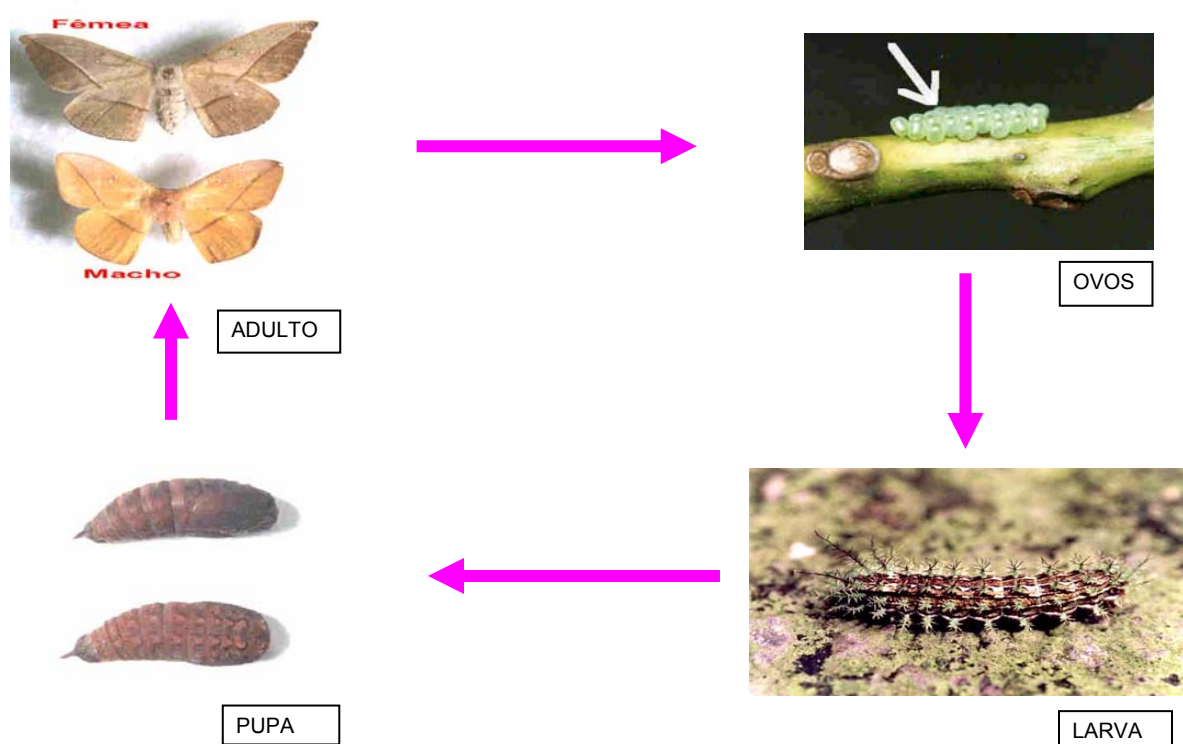
##### 4.1. Ciclo de vida

A espécie *Lonomia obliqua*, como todos os lepidópteros, apresenta metamorfose completa, com ciclo constituído por quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (fig. 2). Muitas espécies têm mais de um ciclo de vida ao ano, quando as condições são favoráveis. A estimativa do ciclo de vida da *L. obliqua*, feita com exemplares coletados da natureza e mantidos em cativeiro, apresentou ciclo médio igual a 6 meses (4-8 meses), como mostra trabalho de Lorini (1999).

Após o acasalamento, a fêmea faz a postura dos ovos nas folhas da plantas, essa fase dura em média 31 dias. Após a eclosão dos ovos, as larvas possuem seis estágios de desenvolvimento que vão do 1º ao 6º instar, com duração média de 90 dias. No 6º instar, o último estágio larval antes da fase de pupa, a lagarta pode atingir até 6 cm de comprimento. As lagartas param de se alimentar um pouco antes de se transformarem em pupa, e habitualmente ficam próximas à base do tronco das árvores. Algumas mudanças na coloração também são observadas e o corpo adquire aspecto contraído. As pupas possuem coloração castanha escura e ficam no solo entre as folhas secas, próxima a base

do tronco. Essa fase de pupa dura em média 70 dias, mas esse período pode variar de acordo com as condições climáticas (Lorini, 1999).

A fase adulta (mariposa) emerge da pupa, e vive em média 15 dias, acasalando nesse período e reiniciando o ciclo. O macho e a fêmea apresentam acentuado dimorfismo sexual, sendo o macho menor que a fêmea e de coloração mais viva. A fase adulta é a única fase que possibilita fazer uma classificação de forma mais precisa da espécie (Lorini, 1999).



**Figura 2.** Ciclo evolutivo da lagarta *Lonomia obliqua* (foto de Moraes, R.H.)

## 4.2. Comportamento

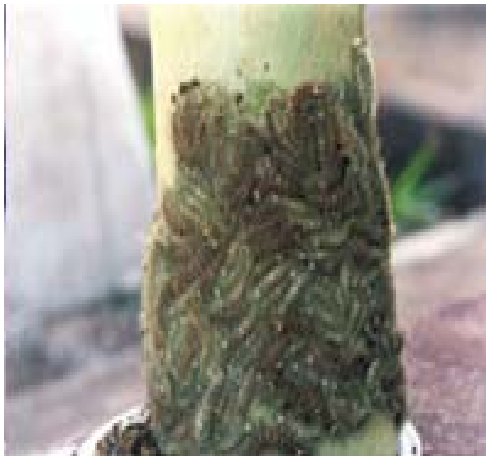
As lagartas de *Lonomia obliqua* possuem hábitos gregários (fig. 3), que é uma característica da família Saturniidae (Lorini, 1993; Moraes, 2003). Por outro lado, as lagartas da família Megalopygidae (fig. 4), que causam acidentes menos graves, ocasionando somente efeitos locais, são solitárias (Moraes, 2003).

As lagartas da espécie *Lonomia obliqua* vivem agrupadas (em média 50 exemplares ou mais), ficam no tronco das árvores durante o dia e durante a noite

vão para as copas das árvores para se alimentarem. Durante a fase larval, que é a única fase em que se alimentam de folhas, as lagartas, nos primeiros instares, ficam na parte mais alta das árvores e, entre o 5° e 6° instar, já se posicionam mais próximas à base das árvores, favorecendo assim a ocorrência dos acidentes humanos nesta fase (Lorini, 1999; Moraes, 2003).

Os números de acidentes no Brasil começam a aumentar a partir do mês de novembro, sendo que a maior incidência ocorre no verão, nos meses de janeiro, fevereiro e março (Fan & Duarte, 2003).

As larvas da *L. obliqua* podem se alimentar de folhas de diversas plantas, incluindo folhas de árvores frutíferas. Em seu habitat natural, nas matas nativas, a *Lonomia obliqua* pode se alimentar de plantas como Alcornia (Tapiá). Com o desmatamento para implantação da agricultura, essas lagartas se adaptaram muito bem a outras árvores listadas na tabela 2 (Lorini, 1999; Moraes, 2002).



**Figura 3.** Comportamento gregário de lagartas *L. obliqua* (Saturniidae) (foto de Moraes, R.H.)



**Figura 4.** Comportamento solitário de lagarta *Megalopyge albicolis* (Megalopygidae) (foto de Moraes, R. H.)

**Tabela 2.** Árvores descritas como fonte de alimento da lagarta *L. obliqua*.

<b>Nome científico</b>	<b>Nome popular</b>
<i>Cedrella fissilis</i>	Cedro
<i>Erythrina crista-galli</i>	Eritrina
<i>Ficus carica</i>	Figueira
<i>Ficus elástica</i>	Seringueira
<i>Ficus subtiplinervia</i>	Figueira-do-mato
<i>Persea gratissima</i>	Abacateiro
<i>Platanus acerifolia</i>	Plátano
<i>Pyrus communis</i>	Pereira
<i>Prunus domestica</i>	Ameixeira
<i>Prunus pérsica</i>	Pessegueiro
<i>Psidium guayava</i>	Goiabeira
<i>Rollinia emarginata</i>	Araticum
<i>Tabebuia pulcherrima</i>	Ipê

Lorini, 1999

#### 4.3. Inimigos naturais da lagarta *Lonomia obliqua*

Na década de 90 o aumento do número de acidentes ocasionados no Sul do Brasil pelas lagartas do gênero *Lonomia*, atingiram proporções epidêmicas, o que levantou questões sobre as possíveis causas desta súbita epidemia. Até então, os acidentes eram mais esporádicos e restritos à região Norte do Brasil, e relacionados com as pessoas que faziam a extração de borracha (Kelen *et al.*, 1995). Uma das possibilidades consideradas foi a implantação da agricultura na região, principalmente de milho e soja, além do desmatamento exagerado, que certamente destruiu o habitat natural desses lepidópteros. A introdução de agrotóxicos no meio ambiente, pode ter contribuído para a diminuição dos inimigos naturais da lagarta *L. obliqua*, além de outros desequilíbrios ecológicos (Kelen *et al.*, 1995; Lorini, 1999).

Entre os inimigos naturais da lagarta *Lonomia obliqua* estão as vespas pertencentes à espécie *Enicospilus* sp (Hymenoptera: Ichneumonidae) (fig. 5) e a mosca da espécie *Belvosia viedemanni* (Díptera: Tachinidae) (fig 6,) que foram

citadas como parasitóides por Lorini (1999). As moscas da espécie *Moreiria wiedemanni* e *Lespesia affinis* (Díptera: Tachinidae), figura 7 e 8 respectivamente foram identificadas como inimigos naturais de *L. obliqua*, sendo os insetos da espécie *Alcaeorrhynchus grandis* (Dallas) figura 9, (Hemíptera: Pentatomidae) considerados os seus predadores (Moraes, 2002).

Foram identificados também nematóides *Hexameris* sp, (Nematoda: Mermithidae) (fig.10), além de bactérias (Moraes, 2002) e vírus como o LoobMNPV (*Lonomia obliqua* Multiplo Nucleopolyhedrovirus) (fig.11), pertencentes ao grupo de vírus da poliedrose nuclear (NPV) que, de acordo com o autor, podem funcionar como controle biológico para a lagarta *L. obliqua* (Wolff *et al.*, 2002).



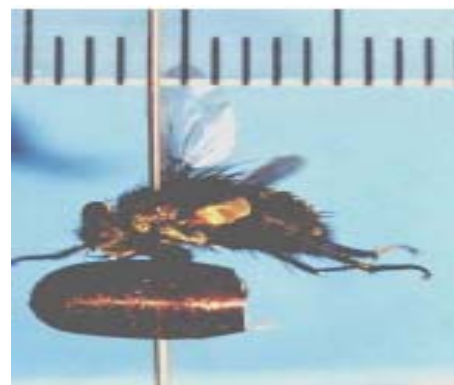
**Figura 5.** Adulto e pupário de *Enicospilus* sp (Hymenoptera-Ichneumonidae)  
(foto de Moraes, R. H.)



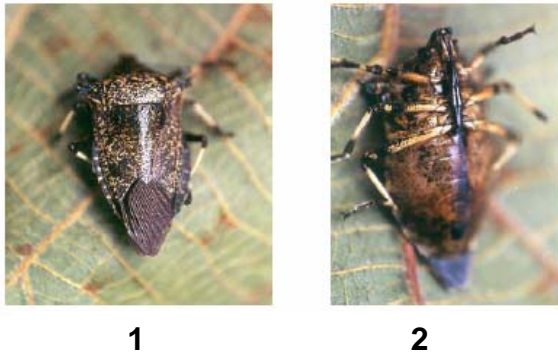
**Figura 6.** *Belvosia* sp (fêmea)  
(Díptera: Tachinidae)  
(foto de Moraes, R. H.)



**Figura 7.** *Moreiria wiedemanni*  
(fêmea) (Díptera: Tachinidae)  
(foto de Moraes, R. H.)



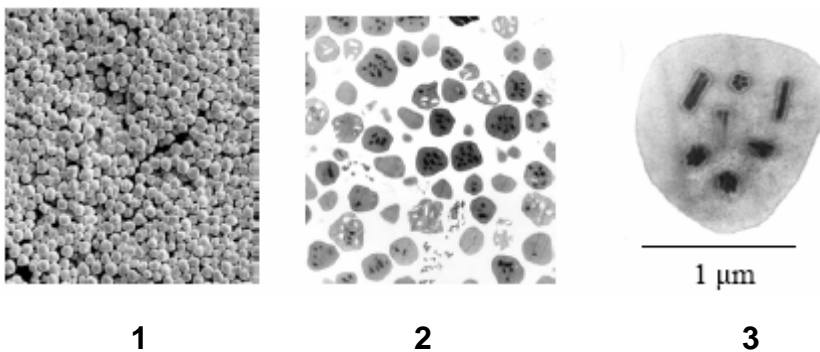
**Figura 8.** Fêmea e pupário de *Lespesia affinis* (Tawns, 1927)  
(Díptera-Tachinidae)  
(foto de Moraes, R. H.)



**Figura 9.** *Alcaeorrhynchus grandis* (Dallas) (Hemíptera: Pentatomidae). Predador de *L. obliqua* vista dorsal (1), vista ventral (2). (foto de Moraes, R.H.)



**Figura 10.** *Hexameris* sp (Nematoda: Mermithidae) (Moraes, R.H.)



**Figura 11.** Fotomicrografia de varredura (1), Fotomicrografia de transmissão (2) e detalhe do poliedro (3) de LoobMNPV – *Lonomia obliqua* Múltiplo Nucleopolyhedrovirus. ( Moraes, R. H.)

## 5. ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO DE CERDAS DA LAGARTA *Lonomia obliqua*

Os primeiros estudos sobre as toxinas de *Lonomia obliqua* foram realizados após o aparecimento dos primeiros casos no Sul do Brasil, nos finais dos anos 80, pois os únicos trabalhos disponíveis eram sobre envenenamento por

*Lonomia achelous*, na Venezuela e Norte do Brasil (Arocha-Piñango, 1967; Fraiha *et al.*, 1986; Kelen *et al.*, 1995).

A partir de 1995 foram publicados os primeiros estudos sobre as atividades do extrato de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*. Kelen *et al.* (1995), através de experimentos *in vitro* e *in vivo* em ratos, avaliaram a ação das toxinas presentes no extrato de cerdas de *L. obliqua*, correlacionando com o quadro clínico dos pacientes. Observaram que a injeção i.d. (intra-dérmica) do extrato bruto induziu incoagulabilidade sanguínea nos ratos, por consumo de fibrinogênio. Este quadro era semelhante ao observado no envenenamento humano, mostrando que o rato é um bom modelo animal para o estudo da fisiopatologia deste envenenamento. Nesta época, já se sabia que substâncias pro-coagulantes contidas nas cerdas poderiam ser responsáveis pelos distúrbios hemostáticos. Assim, Donato *et al.* (1998) verificaram a presença de componentes com atividade procoagulante no extrato, um ativador de protrombina e de fator X da coagulação sanguínea. Reis *et al.* (1999, 2001a) isolaram um ativador de protrombina do extrato de cerdas que foi denominado Lopap (*Lonomia obliqua* prothrombin activator protease). Esta proteína é uma serinoprotease dependente de  $Ca^{2+}$ , de 69 kDa de massa molecular, que não mostrou semelhança com outros ativadores de protrombina conhecidos em toxinas animais (Reis *et al.*, 2001a, b). Recentemente, uma proteína com atividade de fator Xa, de aproximadamente 21 kDa, foi purificada e parcialmente caracterizada (Lilla *et al.*, 2005).

Seibert *et al.* (2003) através de estudos *in vitro*, demonstraram que o extrato bruto hemolisa os eritrócitos humanos e de ratos Wistar, na presença de fosfatidilcolina exógena. Esta atividade, presente em outras toxinas animais, é comumente denominada de atividade hemolítica indireta e é causada por fosfolipase  $A_2$  (Doley & Mukherjee, 2003; Fletcher *et al.*, 1990; Grotendorst & Hessinger, 1999; Kelen *et al.*, 1960-62; Santoro *et al.*, 1999; Shukla & Hanahan, 1982; Slotta & Borchert, 1954; Toyama *et al.*, 2003; Watala & Kowalczyk, 1990). Mais recentemente Seibert *et al.*, 2006 purificaram e caracterizaram uma fosfolipase  $A_2$  que induz hemólise indireta. Também foi relatada a atividade hemolítica direta do extrato bruto, causada por atividade proteolítica do extrato na membrana dos eritrócitos, principalmente sobre a banda 3, uma proteína integral da membrana eritrocitária (Seibert *et al.*, 2003; Seibert *et al.*, 2005).



A presença de atividade fibrinogenolítica no extrato bruto de cerdas de *L. obliqua* foi relatada por Veiga *et al.* (2003). Essa atividade também foi descrita e a enzima purificada e caracterizada na hemolinfa da espécie *L. achelous* (Arocha-Piñango *et al.*, 1981; Amarant *et al.*, 1991). De acordo com Arocha-Piñango *et al.* (1981, 2003), a hemolinfa e o extrato das cerdas da lagarta *L. achelous* possuem as mesmas atividades.

Há controvérsias em relação à atividade fibrinolítica do extrato de cerdas da *L. obliqua*, pois o trabalho de Fritzen *et al.* (2003) mostrou que, para haver atividade fibrinogenolítica, induzindo a degradação da cadeia A- $\alpha$  do fibrinogênio, era necessário altas concentrações de extrato bruto e um longo período de incubação. Além disso, não se observou ativador de plasminogênio e nem atividade fibrinolítica na placa de fibrina.

Várias atividades já foram descritas, purificadas e caracterizadas no extrato, hemolinfa e secreções de *Lonomia achelous*, tais como: do tipo plasmina ou Lonomina II (Amarant *et al.*, 1991; Arocha-Piñango *et al.*, 1981), do tipo uroquinase ou Lonomina I e protease de fator XIII ou Lonomina V (Arocha-Piñango *et al.*, 1973; Arocha-Piñango & Pepper, 1981; Guerrero *et al.*, 1997a, b; Guerrero *et al.*, 1999; Arocha-Piñango *et al.*, 2000), inibidor de fator V ou Lonomina VI:i e ativador de fator V ou Lonomina VI:a (Lopez *et al.*, 2000), ativador direto de protrombina ou Lonomina III e atividade do tipo fator Xa ou Lonomina IV (Guerrero & Arocha-Piñango, 1992), atividade do tipo calicreína ou Lonomina VII (Arocha-Piñango & Pepper, 1981). Entretanto, com relação à *Lonomia obliqua* ainda há muito a ser estudado. Dentre as atividades biológicas presentes nas toxinas dessa lagarta estão relacionados, ativador de protrombina ou Lopap (Reis *et al.*, 1995; Reis *et al.*, 2001a, b), ativador de fator X (Donato *et al.*, 1998), atividade do tipo fator Xa (Lilla *et al.*, 2005), atividade fibrinogenolítica (*L. obliqua*  $\alpha$ -fibrinogenase) ou Lonofibrase (Veiga *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2006), fosfolipase do tipo A<sub>2</sub> (Seibert *et al.*, 2006). Na tabela 3, estão apresentadas as principais atividades descritas para o extrato de cerdas ou hemolinfa das lagartas do gênero *Lonomia*.

**Tabela 3.** Atividades biológicas descritas nas toxinas das lagartas do gênero *Lonomia*

Atividades Biológicas	
<i>Lonomia achelous</i>	<i>Lonomia obliqua</i>
Atividade do tipo plasmina (Lonomina II)	Ativador de protrombina (Lopap)
Atividade do tipo uroquinase (Lonomina I)	Ativador de fator X
Atividade proteolítica de fator XIII (Lonomina V)	Atividade fibrinogenolítica (Lonofibrase)
Inibidor de fator V (Lonomina VI:i)	Atividade do tipo fator Xa
Ativador de protrombina (Lonomina III)	Fosfolipase do tipo A <sub>2</sub>
Atividade do tipo fator Xa (Lonomina IV)	
Ativador de fator V (Lonomina VI:a)	
Atividade do tipo calicreína (Lonomina VII)	
Atividade proteolítica da matriz extracelular (Lonomina VIII)	

## 6. ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO DO ENVENENAMENTO COM A *Lonomia obliqua*

### 6.1. Aspectos Clínicos

#### 6.1.1. *Lonomia obliqua*

O quadro de envenenamento pela lagarta *L. obliqua* se manifesta após o contato acidental com as cerdas da lagarta. O paciente acidentado apresenta quadro local que permanece até 12 horas após o contato, que também é observado no erucismo causado por outros lepidópteros. As manifestações locais iniciam-se precocemente com dor do tipo queimadura, edema, hiperemia, prurido e adenopatia regional. Muitas vezes, é possível observar lesões puntiformes, eritematosas, características do contato das cerdas das lagartas do grupo Saturniidae. Entretanto, em acidentes por lagartas *L. obliqua*, além das manifestações locais, observam-se também alterações sistêmicas caracterizadas

principalmente por distúrbios hemostáticos. Nos pacientes, são observados equimose, petéquia, hematúria, gengivorragia, hematoma pós-punção e epistaxe, além de manifestações gerais como cefaléia, náuseas, vômitos e tontura. Os pacientes apresentam distúrbios de coagulação que estão relacionados ao consumo de fibrinogênio e fator V no plasma, diminuição da atividade de fator XIII, plasminogênio e  $\alpha$ -2 antiplasmina, bem como atividade de proteína C reduzida (Zannin *et al.*, 2003; Fan & Duarte, 2003; Kelen *et al.*, 1995).

Os pacientes acidentados com *L. obliqua* podem desenvolver insuficiência renal aguda. Casos já descritos relatam que os pacientes, após o contato com as lagartas, apresentaram oligúria severa e até anúria (Duarte *et al.*, 1990; Fan *et al.*, 1998; Gamborgi *et al.*, 2005).

Os distúrbios de coagulação observados em envenenamento humano e experimental estão relacionados principalmente ao ativador de protrombina e ao ativador de Fator X presentes no extrato de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*. As alterações da coagulação são também observadas em ratos (Kelen *et al.*, 1995; Reis *et al.*, 2001) e coelhos (Prezoto *et al.*, 2002), entretanto a hematúria que é relatada com frequência em acidentes humanos (Duarte *et al.*, 1990; Kelen *et al.*, 1995), não ocorre em animais experimentais. Em ratos é evidente a hemólise intravascular (Seibert *et al.*, 2004) causada pela fosfolipase e fator hemolítico direto do extrato (Seibert *et al.*, 2003; Seibert *et al.*, 2005; Seibert *et al.*, 2006).

### **6.1.2. *Lonomia achelous***

Pacientes humanos que têm contato acidental com a lagarta *L. achelous*, apresentam sintomas parecidos aos observados nos acidentes por *L. obliqua* (Kelen *et al.*, 1995).

Na descrição dos casos clínicos dos acidentes em humanos por *L. achelous*, os pacientes apresentaram, nos exames laboratoriais, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA) e tempo de trombina (TT) prolongados com diminuição dos níveis de fibrinogênio, plasminogênio, fator V e fator XIII. Os níveis de fator VIII, fator de von Willebrand e dos produtos de degradação da fibrina(ogênio) (PDF), se apresentaram

elevados. Em relação ao número de plaquetas e aos níveis de fator X, fator IX, fator XI, fator XII e antitrombina III, não foi observada nenhuma alteração (Arocha-Piñango *et al*, 1992).

Marval *et al.* (1999) mostraram que, no envenenamento experimental de coelhos, esses animais apresentaram alterações nos tempos de TP, TTPA, TT e lise na placa de fibrina, com diminuição nos níveis de fibrinogênio, plasminogênio e fator XIII, porém sem alterações nos níveis de fator II, X e V.

## 6.2. Tratamento

A orientação terapêutica é feita de acordo com a classificação da gravidade do envenenamento (tabela 4), Fan & Duarte, 2003.

A administração de soro antilonômico é indicada para os pacientes com tempo de coagulação alterado; para os que apresentam apenas manifestações locais, não são utilizados soro antilonômico, mas apenas tratamento sintomático, como mostra a tabela 3. Estudos recentes sobre a eficácia do soro anti-lonômico mostraram que a administração de 3 ampolas de soro foi tão eficiente quanto a administração de 5 ampolas, para reverter o quadro de incoagulabilidade (Caovilla *et al*, 2004). Assim, o soro é a única terapia eficaz para reverter os distúrbios hemostáticos observados no envenenamento por *L. obliqua*. O mais importante é que, a partir da utilização do antiveneno, não houve mais nenhum relato de óbito por envenenamento com *L. obliqua* (Rocha-Campos *et al*, 2001).

**Tabela 4.** Orientação terapêutica segundo a classificação do grau de gravidade no envenenamento por *L. obliqua*.

Gravidade	Manifestações	Tratamento
LEVE	-Local: dor, edema, eritema	Sintomático
MODERADO	-Local: presente ou ausente -Tempo de Coagulação: alterado -Sangramento: ausente ou presente em pele/mucosa	Sintomático + SALon 5 amp
GRAVE	-Local: presente ou ausente -Tempo de Coagulação: alterado -Sangramento: presente em vísceras	Sintomático + SALon 10 amp

Fan & Duarte, 2003

SALon (Soro antilonômico)

O soro antilonômico é produzido no Instituto Butantan a partir do extrato de cerdas da lagarta da espécie *L. obliqua* (Dias-da-Silva *et al.*, 1996), para o tratamento dos acidentes causados por essa espécie, mas o mesmo se mostrou eficaz também para o tratamento dos pacientes acidentados possivelmente com a lagarta *L. achelous*, na Colômbia.

Embora o uso de agentes antifibrinolíticos seja preconizado para o tratamento do envenenamento por *L. achelous*, onde a hemorragia parece estar relacionada a enzimas que degradam fator XIII e proteínas que ativam a fibrinólise (Arocha-Piñango *et al.*, 1992), o mesmo não é recomendado para *L. obliqua*, pois neste caso as manifestações de sangramento estão relacionadas à coagulopatia de consumo induzida pela presença de enzimas procoagulantes (Zannin *et al.*, 2003).

## 7. PRODUÇÃO DO ANTIVENENO ANTI-LONÔMICO

No início, quando os acidentes com *L. obliqua* surgiram nos arredores de Passo Fundo, os pacientes eram admitidos no Hospital São Vicente de Paulo, em Passo Fundo-RS. Durante o período de dezembro de 1989 a fevereiro de 1994, 155 pacientes foram admitidos e dentre esses, 4 pacientes foram a óbito, sendo 3 por hemorragia cerebral e um por hemorragia pulmonar (Kelen *et al.*, 1995). Uma

outra característica marcante em alguns desses pacientes era o desenvolvimento da insuficiência renal aguda, responsável pelo encaminhamento dos pacientes para o tratamento de hemodiálise (Duarte *et al.*, 1990; Duarte *et al.*, 1994).

A gravidade desse envenenamento foi um dos fatores que estimularam os pesquisadores a estudar melhor o envenenamento e encontrar um tratamento eficaz, diminuindo assim o índice de mortalidade. Em 1994, o soro antilonômico produzido no Instituto Butantan, que mostrou ser eficaz na neutralização das atividades do extrato das cerdas de *L. obliqua*, foi introduzido como tratamento para esses acidentes. Hoje, o tratamento preconizado para estes acidentes é o antiveneno isolado do soro de cavalos imunizados com extrato de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* (Fan, 2002; Caovila & Barros, 2004).

Para a produção do soro antilonômico, o extrato de cerdas é utilizado como antígeno, que é injetado em cavalos (via subcutânea) com reforços semanais, até a detecção de títulos de anticorpos adequados (Dias-da-Silva *et al.*, 1996; Rocha-Campos *et al.*, 2001).

Dias-da-Silva *et al.* (1996) observaram que, com pequenas quantidades de extrato, havia produção de anticorpos de longa duração e que os cavalos sensibilizados eram re-estimulados de forma eficiente, com dose reforço de antígeno, mesmo após um ano do primeiro contato com o antígeno.

As lagartas utilizadas para a produção do soro são procedentes das regiões onde a incidência dos acidentes é maior, como Passo Fundo (RS), Chapecó (SC) e arredores. As lagartas capturadas nessas regiões são enviadas vivas para o Instituto Butantan, onde os extratos são preparados imediatamente após as cerdas serem retiradas, conforme Dias-da-Silva *et al.* (1996). Os extratos são congelados e armazenados a -20°C e utilizados para imunizações de cavalos para produção do soro anti-ilonômico.

Um dos maiores problemas da obtenção do extrato para o Instituto Butantan, tem sido conseguir uma quantidade grande de exemplares de lagartas no mesmo período, que seja representativo da espécie, possibilitando a inclusão das possíveis variáveis que ainda não são conhecidas. Além disso, o envio de poucas lagartas, encontradas periodicamente, acarreta em alto custo de transporte. Recentemente, as poucas empresas aéreas que faziam o transporte, têm se recusado a fazê-lo, alegando os riscos que o transporte destes animais

poderia acarretar. Atualmente o transporte tem sido feito por via rodoviária, o que tem aumentado o tempo de transporte, o estresse das lagartas e a conseqüente perda das mesmas.

Uma alternativa provável seria a possibilidade de congelar as cerdas retiradas das lagartas, mesmo que em pequena quantidade, e armazená-las por um período até se obter uma quantidade representativa para preparar o extrato. Para isso, é fundamental que se tenha conhecimento se as propriedades principais do extrato não serão alteradas pelos processos de congelamento e armazenamento.

## **II. OBJETIVO**



## II. OBJETIVO

O extrato de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* utilizado para produção de antivenenos é preparado com cerdas que são cortadas e processadas em seguida. Frequentemente as lagartas são capturadas em pequena quantidade e não são enviadas ao Instituto devido ao alto custo do transporte. Por causa do processo de desenvolvimento das lagartas a alternativa mais viável para otimizar a utilização das mesmas seria o armazenamento a baixa temperatura das cerdas coletadas. Todavia, não existem relatos na literatura sobre as alterações que o congelamento e armazenamento das cerdas podem causar nas atividades biológicas do extrato.

Assim, o objetivo deste estudo foi comparar a atividade biológica do extrato de cerdas da *Lonomia obliqua* preparado com cerdas não congeladas, e congeladas a  $-20^{\circ}$  C, em diferentes tempos de armazenamento, para avaliar a utilização desses extratos na pesquisa e na produção de soro.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE CERDAS DE *Lonomia obliqua*

Para o preparo de cada lote foram utilizadas cerca de 400 lagartas de *Lonomia obliqua* de 5º e 6º instar, provenientes de Passo Fundo (RS).

As lagartas foram anestesiadas com CO<sub>2</sub>, e suas cerdas dorsais e laterais foram cortadas bem próximas à base. Essas cerdas foram separadas em 4 partes iguais: 1 parte dessas cerdas foi utilizada no mesmo dia para preparação do extrato; as outras 3 partes de cerdas foram congeladas e os extratos foram preparados após 2, 4 e 6 meses de congelamento a -20° C, como mostrado no esquema da figura 12.

Resumidamente, o extrato foi preparado a partir das cerdas cortadas e maceradas em tampão PBS gelado (pH 7,4). A solução foi centrifugada a 2100g por 5 min e o sobrenadante foi separado, filtrado, aliquoteado e congelado a -20° C (Dias-da-Silva *et al.*, 1996).

Para este estudo foram preparados 3 lotes de extrato (A, B e C), sendo o lote A preparado com cerdas de animais coletados em 2002 e lotes B e C de animais coletados em 2003. De cada lote de extrato foram preparadas 4 amostras diferentes de extratos, com cerdas cortadas e separadas da seguinte maneira:

- 1-Cerdas recém cortadas, não congeladas (amostra 0).
- 2-Cerdas cortadas e congeladas por 2 meses a -20° C (amostra 2).
- 3-Cerdas cortadas e congeladas por 4 meses a -20° C (amostra 4).
- 4-Cerdas cortadas e congeladas por 6 meses a -20° C (amostra 6).



**Figura 12.** Esquema de preparação das cerdas de *L. obliqua*, para a produção do extrato.

## TESTES REALIZADOS COM OS 3 LOTES DE EXTRATO:

### 2. DOSAGEM DE PROTEÍNA

Antes de iniciar os testes de atividades, foi determinada a concentração de proteína de cada amostra de extrato dos lotes A, B e C. Para isso foi utilizado o método de Lowry *et al.* (1951) modificado (Markwell *et al.*, 1978). Nesse método, o nitrogênio das ligações peptídicas reage com o cobre, do mesmo modo que na reação de biureto e os resíduos de tirosina e triptofano reagem com o reagente Folin-Ciocalteu.

Para esse método foi utilizada curva padrão de albumina, e as determinações de concentração protéica dos extratos foram feitas em triplicatas.

### 3. DOSE MÍNIMA COAGULANTE (DMC)

A dose mínima coagulante (DMC) é definida como a menor quantidade de proteína do extrato capaz de coagular o plasma em 60 segundos. Para determinar a DMC foi utilizado plasma humano normal, citratado, utilizando-se o método de Theakston & Reid (1983). O extrato foi diluído progressivamente (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32; 1:64; 1:128) e as concentrações de proteínas utilizadas variaram de 3,52 a 450,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para este teste, cerca de 100  $\mu\text{L}$  de plasma humano normal foi colocado num tubo de vidro e mantido em banho-maria a 37° C, onde foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  do extrato de cerdas e 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$ . A mistura foi homogeneizada e então foi determinado o tempo de coagulação. Foram realizadas 8 (n=8) dosagens por amostra.

### 4. ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

A atividade fibrinolítica foi determinada segundo o método de Granelli-Piperno & Reich (1978). Foram preparadas 7,5 mL de solução de agarose 2%, em tampão Tris 20 mM pH7,5 (contendo NaCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  0,7 mM e  $\text{CaCl}_2$  1,66 mM), e 7,5 mL de solução de fibrinogênio bovino, 3 mg/mL, diluído com tampão Tris 20 mM (pH 7,5). As duas soluções foram colocadas no banho-maria a 40° C. Na solução contendo agarose, foi adicionado 5 mL de trombina bovina (Sigma) 20 U/mL. As duas soluções foram rapidamente homogeneizadas e colocadas em uma placa de petri de 15 cm de diâmetro, contendo 0,5 mL de  $\text{CaCl}_2$ , disposta sobre nivelador, para polimerizar. Após a polimerização, foram recortados pocinhos onde as amostras foram aplicadas.

Nos pocinhos, foram aplicados 30  $\mu\text{L}$  (54  $\mu\text{g}$ ) de extrato de cerdas de *L. obliqua*, 30  $\mu\text{L}$  de PBS (pH 7,4) como controle negativo e 30  $\mu\text{L}$  de plasmina como controle positivo. As placas foram mantidas a 37° C por 18 horas, e as áreas de lise foram medidas com paquímetro.

## 5. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

Para a determinação da atividade fosfolipásica foi utilizado o método descrito por Lobo de Araújo & Radvanyi (1987) e modificado por Santoro *et al.* (1999).

O extrato foi diluído em série (1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32). Em uma cubeta de espectrofotômetro 15 µL de extrato diluído foi adicionado a 1,5 mL de reagente contendo NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Triton X 100 7 mM, lecitina de soja 0,265%, vermelho fenol 98,8 µM (pH 7,6). A solução foi homogeneizada e inserida em um espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro (558 nm) acoplado ao programa Swift II de reação cinética. A atividade enzimática foi registrada por 6 minutos e os resultados foram expressos como a diminuição da inclinação máxima da curva em absorbância/minuto.

## 6. ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDIRETA

Para medir a atividade hemolítica indireta foram utilizados eritrócitos humanos. O sangue foi coletado em solução de Alsever (1:1) e mantido em repouso por 7 dias a 4° C. Após esse período, os eritrócitos foram lavados 3 vezes (7 minutos a 165 g) com PBS (pH 7,4) e ressuspensos na mesma solução a fim de conter 0,5 x 10<sup>8</sup>/mL de eritrócitos. Foi preparada solução de lecitina contendo 120 µl de lecitina (1 mg/mL) (Sigma), 500 µl de CaCl<sub>2</sub> (0,01 M) e 380 µl de salina. As reações foram realizadas conforme o protocolo apresentado na tabela 5.

**Tabela 5.** Protocolo experimental para atividade hemolítica indireta.

Tubos	Eritrócitos	Água	PBS	Lecitina	Extrato
Hemólise espontânea	200 µl	---	100µl	100 µl	---
100% hemólise	200 µl	200 µl	---	---	---
Tubo teste	200 µl	---	---	100 µl	100 µl
Branco Amostra	---	---	200µl	100 µl	100 µl

Os tubos foram incubados por 1 hora a 37° C, e a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de PBS gelado em cada tubo, com exceção do tubo de 100% de hemólise, no qual foi adicionado o mesmo volume de H<sub>2</sub>O destilada gelada. As amostras foram então, centrifugadas por 7 min a 165g. A leitura do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro Ultrospec 2100, em comprimento de onda de 412 nm. A concentração de proteína do extrato bruto utilizado foi de 100 µg/mL, que induz 50% de hemólise em eritrócitos humanos (Seibert et al, 2003).

A porcentagem de hemólise foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{\text{Abs. Tubo teste} - \Sigma \text{ hem. espont. e branco do extrato}}{100\% \text{ hemólise}} \times 100$$

## 7. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DIRETA

Para a determinação da atividade hemolítica direta foram também utilizadas hemácias humanas, preparadas conforme descrito anteriormente para a atividade hemolítica indireta. A diferença entre as duas metodologias é que, para a atividade direta, não utilizamos a lecitina e o seu volume foi substituído por PBS, como pode ser observado na tabela 6.

**Tabela 6.** Protocolo experimental para atividade hemolítica direta.

Tubos	Eritrócitos	Água	PBS	Extrato
Hemólise espontânea	200 µl	---	200 µl	---
100% hemólise	200 µl	200 µl	---	---
Tubo teste	200 µl	---	100 µl	100 µl
Branco Amostra	---	---	300 µl	100 µl

Após colocar as amostras nos tubos conforme esquema da tabela 6, elas passaram pelo mesmo processo descrito anteriormente, para a atividade hemolítica indireta. Ou seja, foram incubadas a 37° C por 1 hora, a reação foi interrompida, as amostras centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para leitura da hemoglobina a 412 nm.

## 8. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-LONÔMICO EM CAMUNDONGOS

Para a produção de anticorpos foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c fêmeas, que foram imunizados com extrato bruto de cerdas de *Lonomia obliqua*.

Foram utilizados 2 grupos para cada lote e 1 grupo controle, formando um total de 7 grupos, sendo que para cada grupo foram usados 4 animais (n=4), com exceção do grupo controle onde foram utilizados apenas 3 animais (n=3):

- a) Grupo 1 (controle) que não recebeu antígeno;
- b) Grupo 2 e 3 que receberam extrato de cerdas do lote A (0 e 6 meses respectivamente);
- c) Grupo 4 e 5 que receberam extrato de cerdas do lote B (0 e 6 meses respectivamente);
- d) Grupo 6 e 7 que receberam extrato de cerdas do lote C (0 e 6 meses respectivamente).

Sendo: grupo 0 = cerdas não congeladas

grupo 6 = cerdas congeladas por 6 meses

Todos os grupos, com exceção do grupo controle, receberam 40 µg de extrato de cerdas em (200 µL). A primeira dose foi administrada com adjuvante incompleto de Freund e 31 dias após, recebeu um reforço sem adjuvante. Os animais foram submetidos a uma sangria, via plexo ocular, 41 dias após a primeira inoculação. Para a separação do soro, o sangue foi incubado a 37° C, por 60 minutos, para formação do coágulo, e em seguida centrifugado por 5 minutos a 1200 g; o soro sobrenadante separado, congelado e armazenado a -20° C.



## 9. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DE ANTICORPOS PELO MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

O título de anticorpos anti-Ionômico foi determinado através da técnica de ELISA.

Foram utilizadas placas de poliestireno Polysorp. Para sensibilização das placas, 100 µL de uma solução contendo 10 µg/mL de extrato bruto, diluído em tampão alcalino de baixa força iônica (tampão carbonato pH 9,6), foi colocada em cada poço da placa. As placas foram incubadas por 18 horas a 4° C, em câmara úmida. Após este período, elas foram submetidas a 3 lavagens sucessivas, com PBS contendo Tween 20 a 0,05%. A seguir, em cada poço foi adicionado 200 µL de solução bloqueadora contendo tampão carbonato pH 9,6 e leite em pó (Molico) 5%. Em seguida, a placa foi incubada por 1 hora, a 37° C, em câmara úmida. Após esse período, foram feitas 3 lavagens. Em cada poço foi adicionado 100 µL do soro de BALB/c, imunizado com extrato de cerdas não congeladas e congeladas por 6 meses dos lotes A, B e C, diluído 1/50 em tampão de incubação (tampão de lavagem contendo leite em pó (Molico) 3%). Foi feita nova incubação por 2 horas a 37° C, em câmara úmida. Após 3 lavagens sucessivas, de 5 minutos cada uma, as placas foram incubadas por 1 hora, a 37° C, com o respectivo conjugado enzimático (soro anti-Ig-G total anti-camundongo marcado com peroxidase), diluído 1:1000 com o tampão de incubação. Foram feitas mais 3 lavagens de 5 minutos cada e a reação foi revelada pela adição de 100 µL da mistura cromógena mais substrato da enzima (1 mg de ortofenilendiamina/mL em tampão citrato 0,2 M (pH 5,0), contendo água oxigenada 0,06%).

A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 8 N em cada poço. A intensidade da reação foi determinada pela leitura da absorbância, utilizando-se comprimento de onda de 492 nm em um leitor de microplacas SpectraMax 190. O título de anticorpos foi definido como a recíproca da diluição máxima de soro, capaz de resultar em uma leitura da absorbância em 492 nm maior que 0,100.

## 10. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS

Para analisar as proteínas dos extratos nos diferentes tempos de congelamento, foi realizada eletroforese pelo método de Laemmli (1970), em gel de poliacrilamida 12%.

Para a preparação do gel de poliacrilamida, utilizou-se quantidade adequada de solução estoque de acrilamida 30% e bis-acrilamida 0,8%, tampão Tris 0,375 M (pH 8,8), SDS 0,1%, Temed 0,05% e persulfato de amônio 0,05%. Após a adição dos dois últimos reagentes, a solução foi imediatamente colocada entre duas placas de vidro, separadas por um espaçador de 1 mm de espessura. Para formar os poços para aplicação da amostra, foi utilizado um pente de 1 mm de espessura com 10 canaletas. Ao extrato foi adicionado tampão de amostra (Tris 0,05 M (pH 6,8), SDS 1%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,004%) para a forma não reduzida e para forma reduzida foi adicionado ao tampão de amostra (2 $\beta$ -mercaptoetanol 0,5%). As amostras foram previamente fervidas por 5 minutos; o volume aplicado variou de 10 a 15  $\mu$ L/canaleta e a concentração de proteína do extrato foi de 1  $\mu$ g de proteína por canaleta. O tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% pH8,3). A corrida foi realizada em sistema Mighty Small II SE250/SE260, com voltagem constante de 100 V e 30 mA por placa (fonte BIO RAD modelo PowerPac 1000), até as amostras atingirem a extremidade inferior do gel. Os géis foram corados por prata utilizando-se método descrito por Blum *et al.* (1987). Foi utilizado padrão de peso molecular BIO RAD Broad Range (205 kDa a 6,5 kDa).

Para a análise densitométrica foi utilizado o programa total Lab e a análise foi feita nos géis das amostras não congeladas (0) e congeladas por 2, 4 e 6 meses, dos lotes A, B e C. Para comparar as amostras nos diferentes tempos de congelamento o parâmetro usado na análise densitométrica foi a % de banda.

## 11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, foi utilizada análise de variância (ANOVA), e para comparação das médias, o teste de Turkey. As análises foram realizadas no programa Graphpad InStat, sendo consideradas estatisticamente significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

## **IV. RESULTADOS**

## IV. RESULTADOS

### 1. DOSAGEM DE PROTEÍNA

Na tabela 7 estão apresentados os valores da concentração de proteínas do extrato bruto, preparado com cerdas não congeladas e congeladas em diferentes tempos de armazenamento.

Os lotes A e C apresentaram resultados semelhantes nas amostras 0 e 4 meses, enquanto que o lote B apresentou uma aparente redução de quantidade de proteína a partir de 2 meses de congelamento. Como as dosagens das proteínas foram feitas em triplicata, a análise estatística foi realizada com os 3 lotes (A, B e C), para avaliar as alterações ocorridas nas amostras de 0, 2, 4 e 6 meses de congelamento.

No lote A, observamos que houve diminuição significativa ( $p < 0,05$ ), na concentração protéica apenas nas amostras com 6 meses de congelamento.

No lote B, observamos diminuição significativa ( $p < 0,05$ ), a partir do quarto mês, que se manteve no sexto mês.

No lote C, houve redução da concentração protéica nas amostras com 6 meses de congelamento e essa diferença foi significativa comparada com as amostras de cerdas não congeladas e congeladas por 2 meses ( $p < 0,05$ ).

Assim, com 6 meses de congelamento verificamos redução significativa ( $p < 0,05$ ) da concentração protéica, quando comparado à amostra de cerdas não congeladas nos lotes A, B e C.

**Tabela 7.** Concentração média de proteína dos extratos de cerdas da *Lonomia obliqua* preparados com cerdas não congeladas e com cerdas congeladas em diferentes tempos de armazenamento.

Tempo congelamento (meses)	Lote A (mg/mL)	Lote B (mg/mL)	Lote C (mg/mL)
0	2,8 ± 0,27	2,2 ± 0,31	2,2 ± 0,073
2	2,5 ± 0,30	1,9 ± 0,12	2,3 ± 0,032
4	2,8 ± 0,19	1,7* ± 0,12	2,1 ± 0,094
6	1,8* ± 0,15	1,8* ± 0,15	1,9* ± 0,067

\* $p < 0,05$  comparação estatística com cerdas não congeladas

## 2. DOSE MÍNIMA COAGULANTE (DMC)

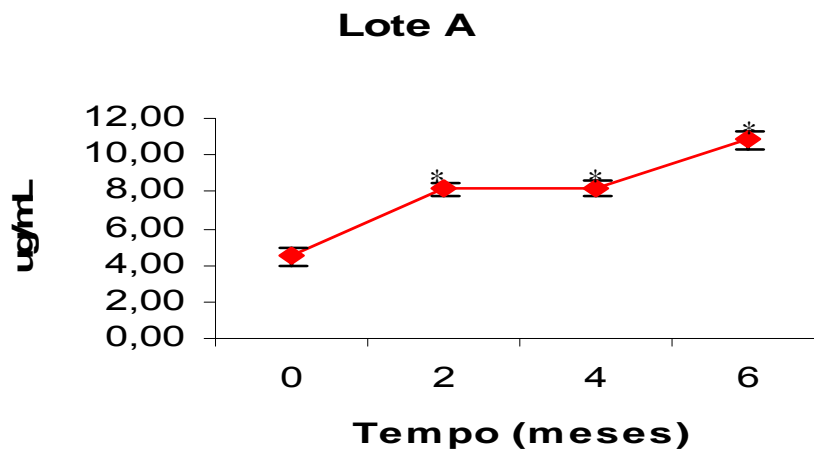
Nas figuras 13, 14 e 15 estão apresentados, respectivamente, os resultados da dose mínima coagulante das amostras dos lotes A, B e C dos extratos de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*.

No lote A (fig. 13), o extrato das cerdas congeladas por 2, 4 e 6 meses apresentou diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da sua atividade procoagulante, em relação às cerdas não congeladas. Além disso, entre as cerdas congeladas por 2 e 4 meses, não houve diferença de atividade, porém, após 6 meses, uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) foi observada em relação a 2 e 4 meses de congelamento.

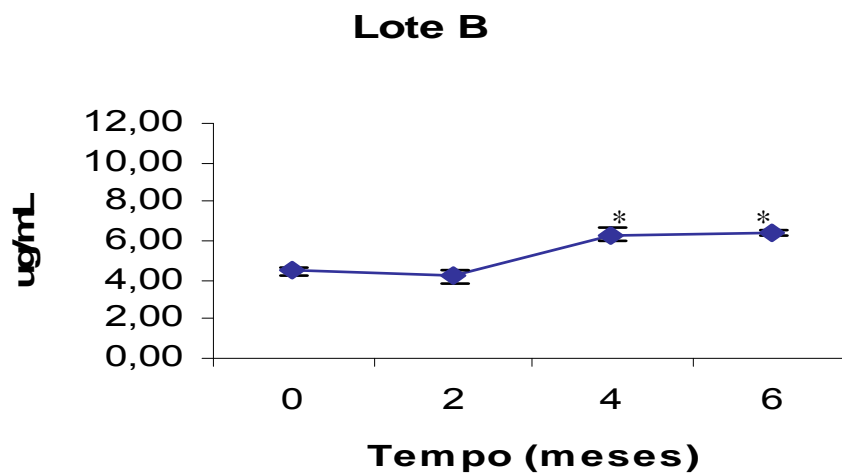
No lote B (fig. 14), não houve diferença significativa de atividade procoagulante entre os extratos de cerdas não congeladas e o de cerdas congeladas por 2 meses. Entretanto, as cerdas congeladas por 4 e 6 meses apresentaram redução significativa de atividade ( $p < 0,05$ ) em relação às cerdas não congeladas. Comparando a atividade procoagulante das cerdas congeladas por 4 e 6 meses não apresentou diferença estatística significativa entre eles.

No lote C (fig. 15), houve redução significativa da atividade procoagulante nos extratos com cerdas congeladas por 2, 4 e 6 meses em relação às cerdas não congeladas. Porém, não houve diferença significativa da atividade entre as amostras congeladas por 2, 4 e 6 meses.

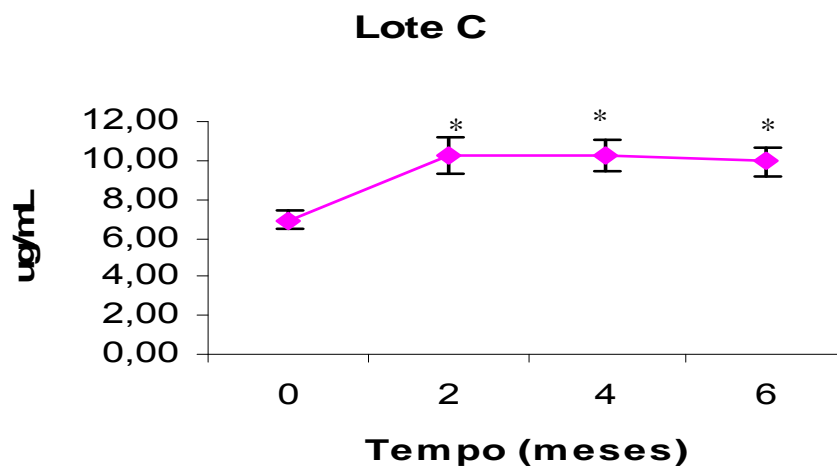
Assim, observamos que o lote A e C apresentaram redução de atividade procoagulante com as cerdas congeladas (2, 4 e 6 meses), enquanto que no lote B a redução de atividade ocorreu com cerdas congeladas somente a partir de 4 meses.



**Figura 13.** Dose mínima coagulante (DMC) dos extratos de cerdas da *L. obliqua* preparadas com cerdas não congeladas (0 meses) e cerdas congeladas por 2, 4 e 6 meses, do lote A. Os testes estatísticos, foram feitos em relação às cerdas não congeladas (0). Os resultados correspondem à média  $\pm$  e.p.m de 8 amostras por grupo \*  $p < 0,05$ . Lote A são de animais coletados em 2002.



**Figura 14.** Dose mínima coagulante (DMC) dos extratos de cerdas da *L. obliqua* preparadas com cerdas não congeladas (0 meses) e cerdas congeladas por 2, 4 e 6 meses, do lote B. Os testes estatísticos, foram feitos em relação às cerdas não congeladas (0). Os resultados correspondem à média  $\pm$  e.p.m de 8 amostras por grupo \*  $p < 0,05$ . Lote B são de animais coletados em 2003.



**Figura 15.** Dose mínima coagulante (DMC) dos extratos de cerdas da *L. obliqua* preparadas com cerdas não congeladas (0 meses) e cerdas congeladas por 2, 4 e 6 meses, do lote C. Os testes estatísticos, foram feitos em relação às cerdas não congeladas (0). Os resultados correspondem à média  $\pm$  e.p.m de 8 amostras por grupo \*  $p < 0,05$ . Lote C são de animais coletados em 2003.

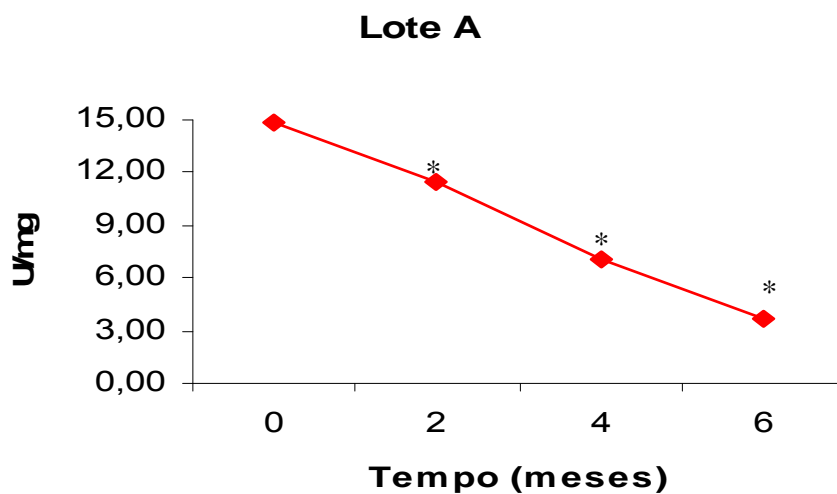


### 3. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

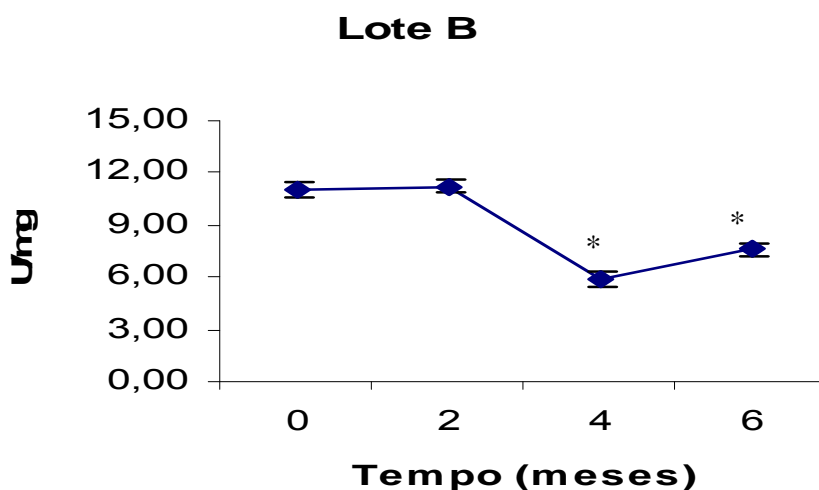
Nas figuras 16, 17 e 18 estão apresentados os resultados da atividade fosfolipásica das diferentes amostras dos lotes A, B e C dos extratos de cerdas da *Lonomia obliqua*, respectivamente.

Nos lotes A e C (fig. 16 e 18) houve diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da atividade fosfolipásica dos extratos preparados com cerdas congeladas por 2, 4 e 6 meses; entretanto, no lote B (fig. 17) não houve redução significativa da atividade com as cerdas congeladas por 2 meses, quando comparado com cerdas não congeladas. Neste lote, a diminuição significativa da atividade fosfolipásica, foi observada apenas nos extratos das cerdas congeladas por 4 e 6 meses, sendo a atividade fosfolipásica após 6 meses de congelamento significativamente maior do que o extrato de cerdas congeladas por 4 meses.

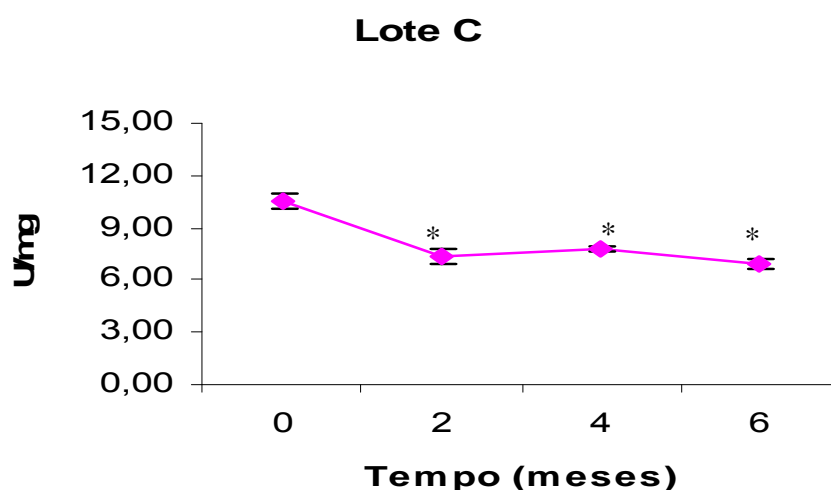
Os lotes A e C apresentaram comportamento semelhante, quando comparados com extrato de cerdas não congeladas e congeladas. Nestes lotes, o congelamento por 2 meses ou mais apresentou redução da atividade fosfolipásica, enquanto que, o lote B só apresentou redução desta atividade no extrato preparado com cerdas armazenadas por 4 meses ou mais.



**Figura 16.** Atividade fosfolipásica dos extratos de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*, preparado com cerdas não congeladas (0 meses) e cerdas congeladas por 2, 4 e 6 meses, do lote A. Os resultados correspondem à média  $\pm$  e.p.m. de 9 amostras por grupo.\*  $p < 0,05$ .



**Figura 17.** Atividade fosfolipásica dos extratos de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*, preparado com cerdas não congeladas (0 meses) e cerdas congeladas por 2, 4 e 6 meses, do lote B. Os resultados correspondem à média  $\pm$  e.p.m. de 9 amostras por grupo.\*  $p < 0,05$ .



**Figura 18.** Atividade fosfolipásica dos extratos de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*, preparado com cerdas não congeladas (0 meses) e cerdas congeladas por 2, 4 e 6 meses, do lote C. Os resultados correspondem à média  $\pm$  e.p.m. de 9 amostras por grupo.\*  $p < 0,05$ .

#### 4. ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

Nenhuma amostra dos lotes A, B e C do extrato de cerdas de *Lonomia obliqua* apresentaram atividade fibrinolítica sobre placa de fibrina agarose.

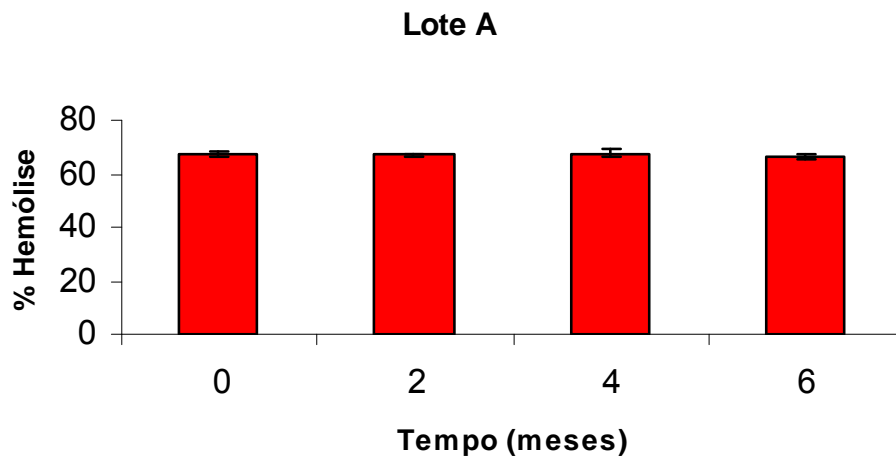
#### 5. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DIRETA

A atividade hemolítica direta não foi observada nas amostras de extratos preparados com cerdas da lagarta *L. obliqua* não congeladas e com cerdas congeladas nos diferentes tempos de congelamento, para os lotes A, B e C.

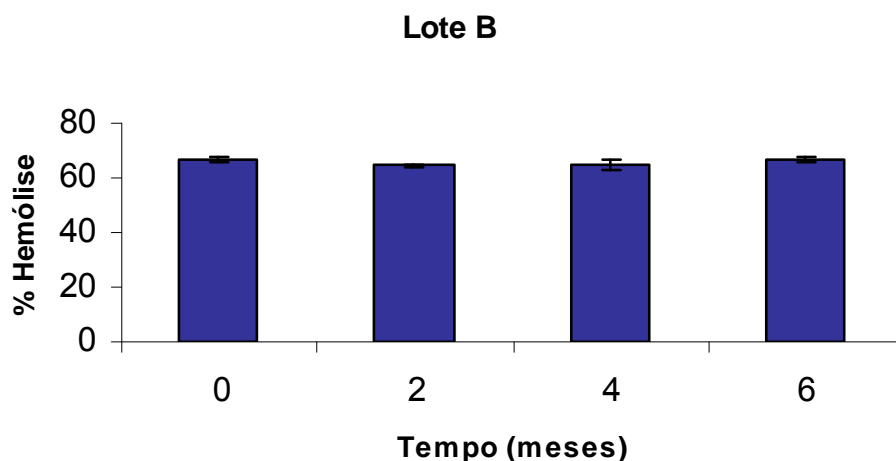
## 6. ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDIRETA

Os resultados da atividade hemolítica indireta das diferentes amostras dos extratos do lote A, B e C estão representados nas figuras 19, 20 e 21, respectivamente.

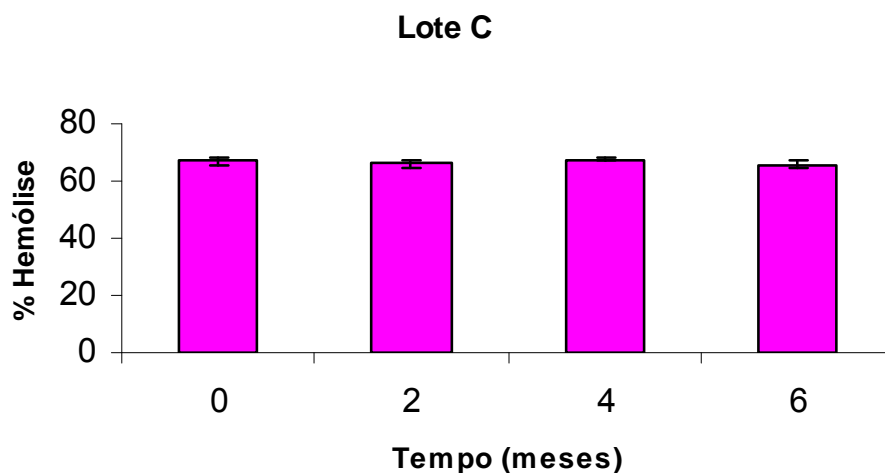
Não houve diferença significativa da atividade hemolítica indireta entre os extratos preparados com cerdas não congeladas e congeladas por 2, 4 e 6 meses, como podemos observar nas figuras 19 (lote A), 20 (lote B) e 21 (lote C).



**Figura 19.** Atividade hemolítica indireta dos extratos de cerdas da lagarta *L. obliqua*, preparados com cerdas não congeladas (0 meses) e com cerdas congeladas por 2, 4 e 6 meses, do lote A. Os resultados correspondem à média  $\pm$  e.p.m. de 7 amostras por grupo.



**Figura 20.** Atividade hemolítica indireta dos extratos de cerdas da lagarta *L. obliqua*, preparados com cerdas não congeladas (0 meses) e com cerdas congeladas por 2, 4 e 6 meses, do lote B. Os resultados correspondem à média  $\pm$  e.p.m. de 7 amostras por grupo.



**Figura 21.** Atividade hemolítica indireta dos extratos de cerdas da lagarta *L. obliqua*, preparados com cerdas não congeladas (0 meses) e com cerdas congeladas por 2, 4 e 6 meses, do lote C. Os resultados correspondem à média  $\pm$  e.p.m. de 7 amostras por grupo.

## 7. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Na dosagem dos títulos de anticorpos IgG anti-Ionômico, produzidos nos camundongos da linhagem BALB/c, não foram observadas alterações na capacidade imunogênica dos extratos. Não foi observada também diferença significativa em relação ao título de anticorpos produzidos pelos animais imunizados com extratos preparados com cerdas não congeladas e extratos preparados com cerdas congeladas por 6 meses.

Na tabela 8 estão os valores dos títulos de anticorpos obtidos dos extratos preparados com cerdas não congeladas e cerdas congeladas por 6 meses dos lotes A, B e C.

**Tabela 8.** Título de anticorpos dos camundongos da linhagem BALB/c, imunizados com extrato de cerdas da lagarta *L. obliqua* (lote A, B e C) preparados com cerdas não congeladas (0 meses) e extratos preparados com cerdas congeladas por 6 meses (6 meses).

<b>Lote</b>	<b>Título de Anticorpos 0 meses</b>	<b>Título de Anticorpos 6 meses</b>
<b>A</b>	<b>12800</b>	<b>25600</b>
<b>B</b>	<b>25600</b>	<b>51200</b>
<b>C</b>	<b>51200</b>	<b>25600</b>

## 8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA ( SDS-PAGE)

Os perfis eletroforéticos dos extratos de cerdas da lagarta *L. obliqua* dos lotes A, B e C, em diferentes tempos de armazenamento, em condições reduzidas (com 2 $\beta$ -mercaptoetanol), estão apresentados nas figuras 22, 23 e 24, respectivamente.

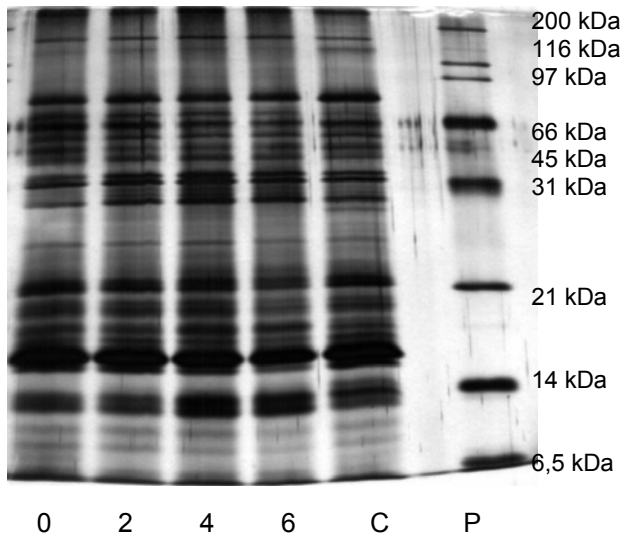
As massas moleculares das proteínas dos extratos das cerdas dos lotes A, B e C nos diferentes tratamentos, em condições reduzidas, foram analisadas por densitometria. O parâmetro utilizado para a comparação entre as bandas protéicas foi porcentagem da densidade das bandas (% banda).

Na análise densitométrica foi possível diferenciar 21 bandas, porém nas tabelas 9, 10 e 11 estão apresentadas apenas as bandas consideradas como as prováveis proteínas relatadas na literatura, como o Lopap 69 kDa, ativador de protrombina (Reis *et al.*, 1999), proteína com atividade de fator Xa de aproximadamente 21 kDa (Lilla *et al.*, 2005), e proteína com atividade fosfolipase de 15 kDa (Seibert *et al.*, 2006).

Embora o perfil eletroforético do extrato de cerdas nos géis (figuras 22, 23 e 24) parece não apresentar diferenças em relação à intensidade das bandas, a análise densitométrica mostrou diferenças sugestivas de degradação protéica (tabela 9, 10 e 11).

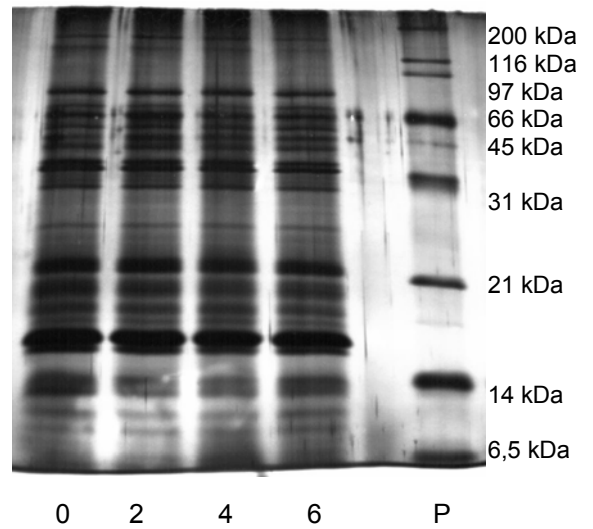
As diferenças nas porcentagens de banda foram observadas nos 3 lotes avaliados entre as amostras dos extratos com cerdas não congeladas (0) e com cerdas congeladas por 6 meses. No lote A (tab. 9), foi observada redução de 34% na porcentagem da banda 5 e de 22% e 24% nas bandas 18 e 19, respectivamente. No lote B (tab. 10), esta diferença também ocorreu na banda 5 (39%) e na banda 17, (21%). No entanto, a maior redução da porcentagem da banda 5 (60%), foi observada no lote C (tab. 11). Neste último lote houve redução também da porcentagem nas bandas 4 (21%), 11 (30%), 12 (27%) e 16 (34%).

**Lote A**



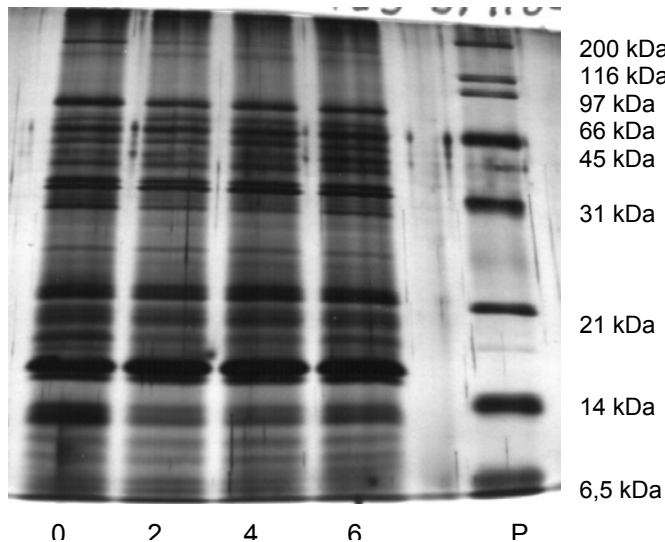
**Figura 22-** Perfil eletroforético das proteínas dos extratos das cerdas da lagarta *L. obliqua* do lote A em condições reduzidas: 0 meses, 2 meses, 4 meses e 6 meses; C- controle; P- padrão.

**Lote B**



**Figura 23-** Perfil eletroforético das proteínas dos extratos das cerdas da lagarta *L. obliqua* do lote B em condições reduzidas: 0 meses, 2 meses, 4 meses e 6 meses; P- padrão.

**Lote C**



**Figura 24-** Perfil eletroforético das proteínas dos extratos das cerdas da lagarta *L. obliqua* do lote C em condições reduzidas: 0 meses, 2 meses, 4 meses e 6 meses; P- padrão.



**Tabela 9.** Dados parciais da análise densitométrica da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de extrato das cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* (Lote A) expressos em porcentagem. Região das proteínas procoagulantes- bandas 3 a 5 (Lopap - 69 kDa) e 14 a 16 (fator Xa – 21 kDa); bandas 17 a 19 (Fosfolipase A<sub>2</sub> – 15 kDa).

Banda	Tempo de congelamento (meses) (%)				Peso molecular kDa
	0	2	4	6	
3	5.52	6.19	6.01	4.86	76,73
4	2.76	2.49	2.42	2.32	67,48
5	4.15	4.72	4.02	2.72	60,45
14	4.01	3.19	3.67	3.63	21,08
15	4.70	5.17	4.21	4.04	20,67
16	4.96	3.64	4.86	5.59	19,64
17	1.95	3.72	4.13	4.21	18,85
18	17.1	16.1	13.4	13.4	17,5
19	12.7	11.9	14.0	15.7	13,5

**Tabela 10.** Dados parciais da análise densitométrica da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de extrato das cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* (Lote B) expressos em porcentagem. Região das proteínas procoagulantes- bandas 3 a 5 (Lopap - 69 kDa) e 12 a 14 (fator Xa – 21 kDa); bandas 16 a 18 (Fosfolipase A<sub>2</sub> – 15 kDa).

Banda	Tempo de congelamento (meses) (%)				Peso molecular kDa
	0	2	4	6	
3	3,4	5,16	5,4	3,64	83,92
4	2,91	3,48	3,18	2,48	69,18
5	2,79	4,42	4,32	3,87	61,79
12	2,97	2,77	4,07	3,23	22,29
13	8,26	10,4	8,94	8,3	18,14
14	3,92	4,34	3,31	3,52	17,17
16	5,06	6,75	4,92	4,18	15,83
17	3,31	3,39	4,32	2,61	15,42
18	15,2	14,8	14,4	15,6	14,99

**Tabela 11.** Dados parciais da análise densitométrica da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de extrato das cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* (Lote C) expressos em porcentagem. Região das proteínas procoagulantes- bandas 3 a 5 (Lopap - 69 kDa) e 11 a 13 (fator Xa – 21 kDa); bandas 16 a 18 (Fosfolipase A<sub>2</sub> – 15 kDa).

Banda	Tempo de congelamento (meses) (%)				Peso molecular kDa
	0	2	4	6	
3	4,6	5,13	5,94	4,41	80,26
4	3,24	3,27	3,15	3,91	67,01
5	3,99	4,38	3,54	6,39	58,7
11	3,34	3,24	2,54	4,35	28,2
12	2,14	2,21	2,29	2,72	21,63
13	9,57	8,18	9,82	7,66	17,81
16	6,25	4,3	4,44	4,14	15,54
17	2,8	3,15	2,85	2,49	15,19
18	13,37	16,6	15,1	15,5	14,74

## **V. DISCUSSÃO**



## V. DISCUSSÃO

A dificuldade na obtenção de um número considerável de espécimes de *Lonomia obliqua*, aliado ao custo no transporte destas, pode acarretar em fator limitante para a preparação de soro anti-lonômico. Assim, decidimos realizar este estudo para avaliar a viabilidade de congelamento das cerdas destes animais a fim de facilitar a aquisição de matéria-prima para preparação do antiveneno.

Os nossos estudos mostram que o congelamento e o armazenamento das cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* por até 6 meses, pode alterar alguns parâmetros do extrato, tais como: concentração das proteínas, a atividade procoagulante e a atividade fosfolipásica. Por outro lado, nenhuma alteração foi observada na atividade hemolítica indireta e na resposta imunogênica entre as amostras de cerdas não congeladas e congeladas neste material. Além disso foi verificada ausência da atividade fibrinolítica e atividade hemolítica direta.

Na dosagem de proteínas, verificamos que houve redução significativa da concentração protéica das amostras preparadas com cerdas congeladas por 6 meses, quando comparada às amostras de cerdas não congeladas. Enquanto que os lotes A e C apresentaram diminuição da concentração protéica no sexto mês, o lote B apresentou redução desde o segundo mês de congelamento. Esta redução da concentração de proteína pode estar relacionada com a degradação das proteínas, através da quebra das suas ligações peptídicas, causada provavelmente pelas enzimas presentes nas cerdas.

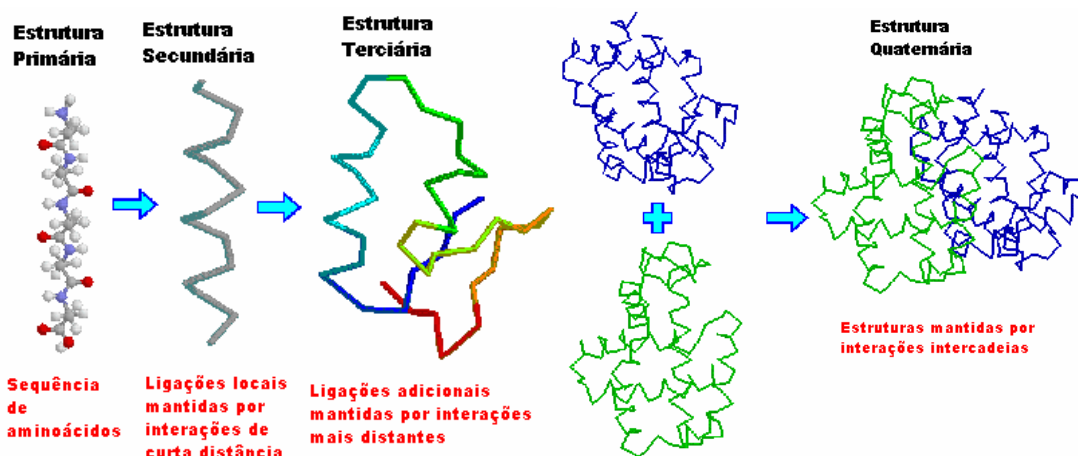
A dosagem bioquímica de proteínas também pode ser realizada através da quantificação de anéis aromáticos por espectrofotometria em A280, pela quantificação das ligações peptídicas por biureto ou ambos, pelos métodos de Bradford ou Lowry (Boyer, 1986). Quando as proteínas são degradadas, ocorrem quebras das ligações na estrutura primária da proteína (ligações covalentes). Conseqüentemente, com a diminuição do número de ligações peptídicas, diminuem o número de interações com o cobre, levando a diminuição da absorbância, já que o método de Markwell *et al.*, 1978 é um ensaio colorimétrico.

As proteínas possuem estrutura tridimensional, determinada pela seqüência de aminoácidos, e que representa uma determinada conformação espacial importante para a sua função. A estrutura tridimensional de uma proteína

é única, e as forças mais importantes que a estabilizam são as suas interações não covalentes (Lehninger *et al.*, 1995).

As estruturas das proteínas (figura 25) podem ser descritas como:

- 1) estrutura primária que inclui todas as ligações covalentes entre os aminoácidos, é definida pela seqüência dos aminoácidos unidos por ligações peptídicas e pela localização das pontes de dissulfeto;
- 2) estrutura secundária são arranjos regulares e recorrentes no espaço, de resíduos de aminoácidos adjacentes em uma cadeia polipeptídica. As estruturas mais conhecidas são: a estrutura em  $\alpha$ -hélice e a conformação  $\beta$ ;
- 3) estrutura terciária é o relacionamento espacial entre todos os aminoácidos em um polipeptídeo. A diferença entre estrutura secundária e terciária não é clara, pois vários tipos diferentes de estrutura secundária são freqüentemente encontrados no interior da estrutura tridimensional de uma proteína grande;
- 4) estrutura quaternária possui várias cadeias polipeptídicas, tem um nível de estrutura a mais, e não especifica a relação espacial dos polipeptídios, ou subunidades no interior de uma dada proteína (Lehninger *et al.*, 1995).



**Figura 25.** A figura mostra a representação das estruturas conformacionais das proteínas (foto retirada do site [www.icb.ufmg.br](http://www.icb.ufmg.br))

Em 1920 foram iniciados os principais estudos sobre as estruturas protéicas, sua função e estabilidade, nessa época os métodos de estudos eram mais limitados do que atualmente onde a cristalografia e raio-X possibilitaram

melhor conhecimento sobre a estrutura. Verificou-se assim que existe uma relação entre a estrutura da proteína e a atividade *in vitro* ou função que desempenha *in vivo* (Franks, 2002).

O termo desnaturação aplica-se a processos que não envolvem ruptura de ligação peptídica, mas que levam a mudança na estrutura tridimensional da proteína que, por sua vez, está associada à perda da função (Hatley & Franks, 1989 a, b; Franks, 2002).

Os fatores que podem levar à desnaturação das proteínas são: aquecimento, valores extremos de pH e alguns solventes orgânicos miscíveis tais como água, etanol, acetona, substâncias em solução como uréia e substâncias detergentes. Esses agentes representam um tratamento relativamente suave, já que não quebram nenhuma ligação covalente na cadeia polipeptídica. Solventes orgânicos, uréia e detergentes agem primariamente na ruptura de interações hidrofóbicas; valores extremos de pH alteram carga líquida da proteína, provocando repulsão eletrostática e rompimento de algumas pontes de hidrogênio (Franks *et al.*, 1988).

Em algumas proteínas a desnaturação em altas temperaturas promove ruptura das pontes de dissulfeto ou intercâmbio de dissulfeto (particularmente em pH alcalino), mas, geralmente, somente interações não covalentes são afetadas pelo calor. Algumas enzimas podem ser inativadas por exposição ao frio, mas na maioria dos casos elas podem ser reativadas, quando aquecidas adequadamente (Hatley & Franks, 1989a; Hatley & Franks, 1989b, Franks, 2002).

Como podemos observar, o processo de desnaturação está intimamente ligado à atividade biológica. No nosso caso, as condições de congelamento e armazenamento das cerdas das lagartas provavelmente induziram a desnaturação de algumas proteínas conforme os resultados obtidos para dose mínima coagulante e atividade fosfolipásica, nas quais observamos reduções significativas da atividade dos extratos preparados com as cerdas congeladas. No lote A, a capacidade do extrato de coagular o plasma diminuiu nas amostras de 2 meses, mantendo-se constante até o quarto mês e, com 6 meses de congelamento, houve uma nova redução de atividade, quando comparada com a amostra do extrato de cerdas não congeladas (0 meses). Com relação à atividade fosfolipásica as amostras apresentaram redução a partir de 2 meses, sofrendo

redução progressiva com 4 e 6 meses de congelamento. No lote B, em relação a atividade procoagulante, as amostras apresentaram redução de atividade no quarto e sexto mês de congelamento, quando comparados às amostras de 0 e 2 meses, que tiveram comportamento semelhante. Em relação à atividade fosfolipásica deste lote, as amostras apresentaram comportamento similar ao observado para atividade coagulante. No lote C, as atividades procoagulante e fosfolipásica apresentaram redução de atividade a partir do segundo mês de congelamento que se manteve constante até o sexto mês, quando comparada à amostra não congelada.

Essa diminuição de atividades pode estar relacionada com a desnaturação de proteína devido ao congelamento das cerdas. Como mostram os trabalhos de Hatley & Franks (1989a, 1989b); Franks, 2002; Cao *et al.* (2003) e Jiang & Nail (1998), o processo de congelamento é capaz de desnaturar proteína, e reduzir as atividades biológicas.

Não há estudos sobre os efeitos de diferentes condições de armazenamento do extrato de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*, porém, há estudos que mostram a influência da temperatura sobre a estabilidade de proteínas do veneno de serpentes (Kurth & Aurich, 1976; Munekiyo & Mackessy, 1998; Aung *et al.*, 1999). Munekiyo & Mackessy (1998) estudaram os efeitos de diferentes condições de armazenamento sobre a estabilidade do veneno, em ensaios eletroforéticos, de toxicidade e atividade enzimática. De modo geral, foi observado que o veneno da serpente *Crotalus molussus molussus* se apresentou estável para a maioria das amostras, nas diferentes condições de armazenamento, havendo variação somente entre os ensaios enzimáticos. Os autores acreditam que a estabilidade do veneno das serpentes frente a diferentes condições de armazenamento pode estar relacionada a estabilizadores ou inibidores endógenos presentes na glândula e no veneno armazenado no lúmen.

Além das diferenças observadas entre as amostras (0, 2, 4 e 6 meses) dentro de um mesmo lote, constatamos também que ocorreu uma variação entre diferentes lotes (A, B e C). Esta diferença de comportamento pode ser explicada por elas terem sido preparadas em épocas diferentes, ou mesmo, por estresse das lagartas provocado pelo transporte. As amostras do lote A apresentaram comportamento mais uniforme, com diminuição progressiva da atividade ao longo



do tempo de congelamento das cerdas. O lote A foi processado em Passo Fundo, onde foi preparado o extrato de cerdas não congeladas. Em seguida as cerdas foram congeladas, transportadas para o Instituto Butantan e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 2, 4 e 6 meses, para posterior preparação do extrato. Por outro lado, as amostras dos lotes B e C foram preparadas no Instituto Butantan sendo as lagartas transportadas vivas até São Paulo, por via rodoviária. As lagartas permaneceram no laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, onde passaram por uma triagem. As lagartas doentes foram separadas das lagartas sadias. As lagartas sadias foram mantidas por dois a três dias em caixas de acrílico (“glove box” adaptadas) medindo 120 x 60 x 60 cm, com tampa superior e aberturas circulares teladas. As lagartas foram alimentadas com folhas de nêspera, e o processamento das cerdas seguiu o mesmo tratamento do lote A. Os lotes B e C apresentaram comportamento variável para atividade procoagulante e hemolítica, sendo que o lote B apresentou diminuição desta atividade a partir do quarto mês mantendo-se assim até o sexto mês. Já o lote C apresentou redução com 2 meses que se manteve nos meses seguintes. Além disso, em relação à atividade fosfolipásica, as amostras dos lotes B e C apresentaram atividade significativamente menor, quando comparadas à do lote A. Embora não tenha sido feito nenhum trabalho para avaliar a influência do estresse sobre as toxinas da lagarta, os nossos resultados indicam a possibilidade do estresse ser um fator que interfere com as atividades destas proteínas.

Em relação à atividade hemolítica direta *in vitro*, não observamos esta atividade em nenhuma das amostras nos diferentes lotes testados. Entretanto, os estudos de Seibert *et al.* (2003) mostram claramente a presença dessa atividade encontrada em várias preparações de extrato. A ausência de atividade hemolítica direta nos três lotes pode estar relacionada a fatores como variação regional, climática e alimentação, observada em muitas toxinas de animais (Gubensek *et al.*, 1974; Aragon & Gubensek, 1981; Glenn *et al.*, 1982; Minton & Weinstein, 1986). Porém, não sabemos exatamente quais os fatores que podem influenciar na sua expressão, pois não há nenhum estudo específico com as toxinas desta lagarta.

A atividade hemolítica indireta não apresentou diferença significativa entre as amostras de um mesmo lote e, mesmo entre os diferentes lotes. A substância

responsável pela atividade hemolítica indireta é a fosfolipase A<sub>2</sub> (Seibert *et al.*, 2006). A fosfolipase A<sub>2</sub> é capaz de hidrolisar as fosfatidilcolinas e fosfatidiletanolaminas exógenas (lecitina), com a liberação de ácido graxo e formação de lisoderivados (lisolecitina). Esses compostos tensoativos alteram a permeabilidade da membrana celular ocasionando hemólise, considerada indireta (CONDREA, 1979). A ausência de diferença significativa na atividade hemolítica indireta, mesmo tendo sido observada diminuição importante da atividade fosfolipásica, pode ser decorrente da metodologia utilizada para a determinação da atividade. Foram utilizados 60 minutos de incubação das hemácias com o extrato. Esse tempo longo de incubação, provavelmente, compensou a diferença da quantidade de fosfolipase nas amostras de cerdas congeladas e que foi suficiente para desestruturar a membrana celular e levar ao seu rompimento.

Em relação à atividade fibrinolítica, esta não foi observada nas nossas amostras, corroborando os resultados descritos no trabalho de Fritzen *et al.* (2003). Porém, Veiga *et al.* (2003), verificaram atividade fibrinogenolítica no extrato bruto de cerdas de *L. obliqua*.

Os conhecimentos existentes sobre a biologia da lagarta *Lonomia obliqua* não permitem ainda explicar as diferenças de atividades observadas neste estudo, pois, não há estudos sobre a variação ontogenética, regional, climática, ou mesmo alimentar, relacionado com atividades biológicas do extrato de cerdas.

Marval *et al.* (1999), verificaram em seus experimentos que alguns lotes de hemolinfa (preparados com lagartas da *Lonomia achelous* no 3º e 4º instar), não ativaram plasminogênio e não afetaram a atividade de fator XII em coelhos. Eles atribuíram essas variações como sendo dependentes dos estágios de desenvolvimento das lagartas de *Lonomia achelous*, relatando também a dificuldade em determinar o estágio de desenvolvimento ou instar exato do animal na coleta. Foi mencionada também a influência do estágio de desenvolvimento sobre a atividade fibrinolítica direta e ativador de plasminogênio, observado apenas em animais do 1º ao 3º instar (Arocha-Piñango & Guerreiro, 1999). Devemos salientar que em nosso trabalho, foram utilizadas lagartas no último estágio de desenvolvimento (larvas de 5º e 6º instar), identificadas pelo entomologista Roberto H. Moraes do laboratório de parasitologia do Instituto Butantan. Porém, Veiga *et al.* (2003) que mostraram atividade fibrinolítica nos

extratos de cerdas da *L. obliqua*, não referem o estágio das larvas utilizadas dificultando assim uma conclusão definitiva.

É importante considerar que os métodos de preparação do extrato utilizados por diferentes grupos não são iguais e todos eles apresentam uma mistura complexa de várias proteínas que não estão relacionadas apenas com a atividade tóxica das cerdas. Pelas características das cerdas destas taturanas que não permitem a identificação de uma glândula especializada como a da serpentes peçonhentas (Veiga *et al.*, 2001), a extração das toxinas, sem o preparo do macerado, ainda é inviável. Assim, possivelmente algumas diferenças de atividades encontradas nos diferentes trabalhos podem ser ocasionadas por diferenças na preparação do extrato. Não podemos deixar de considerar o fato de que em *Lonomia achelous*, esta atividade fibrinolítica é bastante significativa e parece ser uma das principais atividades no envenenamento humano, de tal forma que, muitos pacientes acidentados por esta espécie foram tratados e recuperados com anti-fibrinolíticos (Arocha-Piñango *et al.*, 1992). Assim, parece bastante evidente que existem diferenças de atividade entre *Lonomia achelous* e *Lonomia obliqua*, principalmente relacionado com o sistema fibrinolítico.

O tratamento com antiveneno anti-lonômico foi iniciado no Brasil em 1994, cerca de 5 anos após o início dos acidentes na região Sul, com a lagarta *Lonomia obliqua* (Fan, 2002). Alguns tratamentos realizados com anti-fibrinolíticos, em pacientes internados no Hospital São Vicente de Paulo em Passo Fundo-RS, não apresentaram resultados satisfatórios (Fan, 2002), mostrando que possivelmente para acidentes com *L. obliqua* a atividade fibrinolítica não é tão importante como para *L. achelous*.

Embora não haja estudos sobre a influência desses fatores na composição das toxinas do extrato que possam reforçar ou mesmo esclarecer os nossos resultados, Marval *et al.* (1999) e Arocha-Piñango & Guerrero (1999) mencionaram a possível participação ontogenética na composição das toxinas presentes no extrato. Assim, as diferenças observadas na composição das toxinas presentes no extrato, possivelmente, podem ser influenciadas por vários fatores como variação individual, geográfica, sazonal e climática, alimentar, intra e interespécies e ontogenética. Existem vários trabalhos mostrando a influência desses fatores na composição e atividade do veneno de serpentes. Em relação à

variação ontogenética, foram observadas diferenças quantitativas e qualitativas na composição do veneno de filhotes e adultos de serpente (Bonilla *et al.*, 1973; Meier & Freyvogel, 1980; Lomonte *et al.*, 1983; Gutierrez *et al.*, 1990 e Furtado *et al.*, 1991). Foi mostrada também a influência da sazonalidade na composição do veneno, que pode variar de acordo com a época do ano, levando a ausência de duas frações letais nas amostras de inverno observadas por eletroforese (Bertand & Vladesco, 1942 e Gubensek *et al.*, 1974). Outro fator descrito foi a influência da variação geográfica na composição do veneno (Glenn & Straight, 1978; Aragon & Gubensek, 1981; Glenn *et al.*, 1982; Minton & Weistein, 1986 e Rodrigues *et al.*, 1998).

Nas serpentes, o veneno tem função importante na alimentação (Hayes, 1991). A função do veneno é auxiliar na apreensão da presa, cuja dieta varia com a idade. Os jovens preferem pequenos ectotérmicos (anuros, lagartos) e os adultos, da maioria das espécies, se alimentam quase exclusivamente de endotérmicos (pássaros e roedores). As propriedades biológicas do veneno auxiliam na imobilização e posterior morte da presa, portanto, a proporção e a composição do veneno, assim como o comportamento e a dieta, contribuem para o sucesso da predação (Hayes, 1991).

Ao contrário das serpentes, cujo veneno é produzido em um sistema secretor, e possui uma finalidade de defesa e alimentação, pouco se sabe sobre as toxinas das lagartas. Ainda não sabemos se há algum tecido especializado para produção das toxinas, qual a função dessas toxinas para a lagarta, e os fatores que podem influenciar na sua composição. Assim, as variações de atividades observadas nos extratos de cerdas da *Lonomia* ainda são pouco compreendidas.

O perfil eletroforético do extrato de cerdas das amostras 0, 2, 4 e 6 meses, aparentemente não apresenta diferenças na intensidade das bandas protéicas. Entretanto, ao quantificarmos as porcentagens das bandas observamos diferenças sugestivas de degradação de proteína, alterando assim seu peso molecular e levando ao aparecimento de novas bandas ou mesmo sobreposição das bandas já existentes. Porém, o grande número de proteínas presentes no extrato bruto de cerdas da lagarta *L. obliqua*, é um fator que interfere em uma análise mais detalhada dos géis. As bandas, muitas vezes próximas umas das

outras, dificultam uma marcação mais precisa e, além disso, há dificuldade em identificar as proteínas que estão sendo degradadas, pois ao serem quebradas as mesmas geram fragmentos que podem se sobrepor a outras bandas. Este processo de degradação protéica pode estar contribuindo na redução das atividades biológicas avaliadas.

Em relação à resposta imunológica, os extratos preparados com cerdas não congeladas e com cerdas congeladas por 6 meses, inoculados nos camundongos não apresentaram diferença significativa em relação a produção de anticorpos. Os anticorpos anti-Ionômico, produzidos com cerdas não congeladas e congeladas até 6 meses, reconheceram igualmente, por ELISA, tanto o extrato de cerdas não congeladas como o congelado por 6 meses. Assim, optamos por utilizar o extrato de cerdas não congelado para sensibilização das placas. Os resultados mostraram que, mesmo com atividade biológica reduzida, o extrato preparado com cerdas congeladas por 6 meses foi capaz de induzir resposta imune, e os anticorpos foram capazes de reconhecer tanto o extrato controle (preparado com cerdas não congeladas), como o extrato que sofreu desnaturação (preparado com cerdas congeladas por 6 meses). Estes resultados já eram esperados, pois a imunogenicidade de um antígeno nem sempre está relacionada à sua atividade biológica, tanto que substâncias inativadas podem continuar sendo excelentes imunógenos com capacidade de produzir anticorpos específicos. Rangel-Santos & Mota (2000), em um estudo sobre os efeitos do aquecimento sobre toxicidade e atividade imunogênica e imunossupressiva do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, observaram que a desnaturação por aquecimento das proteínas do veneno diminuíram sua toxicidade e atividade imunossupressora, mas não afetaram a atividade imunogênica, ou seja, não houve diferença significativa nos níveis de anticorpos dosados por ELISA entre a amostra controle e a desnaturada por aquecimento. Estes resultados sugerem que, apesar da desnaturação, alguns epítomos mantiveram a habilidade de estimular células imunes a produzir anticorpos. O mesmo foi observado em nosso trabalho, com perda parcial de atividade procoagulante e fosfolipásica do extrato congelado por 6 meses, sem contudo interferir na produção de anticorpos. Avaliação comparativa da eficácia desses anticorpos “*in vivo*” será feita futuramente.

Dessa forma, os nossos resultados mostraram que a desnaturação foi capaz de alterar a estrutura protéica, através da quebra das ligações covalentes e não covalentes, levando a modificação do peso molecular e conformação estrutural. Conseqüentemente, ocorreu perda de atividade biológica, porém a imunogenicidade não foi alterada.

Os mecanismos de desnaturação ou estresse por congelamento podem levar à diminuição de atividade biológica de um produto, pela ação da baixa temperatura, formação de gelo, concentração do soluto associado a cristalização de água, cristalização eutética dos solutos dos tampões resultando em mudança de pH (Cao *et al.*, 2003). Esses estresses por congelamento, no nosso caso, devem estar atuando sobre as cerdas congeladas da *Lonomia obliqua* antes do preparo do extrato, pois o extrato preparado e congelado por um tempo longo (até 6 meses) não tem apresentado alteração da sua atividade (observação pessoal).

## **VI. CONCLUSÕES**

## VI. CONCLUSÕES

Os estudos comparativos realizados com os extratos preparados com cerdas frescas e congeladas por 2, 4 e 6 meses mostraram que:

- 1) O congelamento e armazenamento das cerdas a  $-20^{\circ}\text{C}$  desnaturou algumas proteínas, diminuiu algumas atividades biológicas (pro-coagulante e fosfolipásica) do extrato das cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*, mostrando que, para a caracterização dessas atividades é recomendável a preparação do extrato com cerdas não congeladas.
- 2) O congelamento e armazenamento das cerdas a  $-20^{\circ}\text{C}$  não alterou a resposta imunogênica dos extratos. Os extratos preparados com cerdas não congeladas e congeladas por 6 meses, apresentaram resultados equivalentes em camundongos, sugerindo a viabilidade do uso do extrato preparado com cerdas congeladas para a produção do soro anti-lonômico em cavalos, para fins terapêuticos.
- 3) Além desses efeitos do congelamento e armazenamento das cerdas na atividade dos extratos, os nossos estudos evidenciaram ausência de algumas atividades como a fibrinolítica e hemolítica direta nos três lotes de extratos preparados, mostrando que vários fatores podem influenciar nas características biológicas do extrato. Verificamos que o estresse do transporte das lagartas também pode afetar a qualidade do extrato.

Desta forma, é fundamental adquirir mais conhecimentos sobre a mariposa *Lonomia obliqua*, que ainda são muito escassos. É importante um estudo mais controlado avaliando os efeitos da variação geográfica, climática, alimentar, ontogenética, intra e inter-específica, etc. na composição do extrato das cerdas, além de aperfeiçoar a metodologia da preparação do extrato das cerdas.



## **VII. RESUMO**

## VII. RESUMO

A síndrome hemorrágica induzida por contato com as cerdas da lagarta do gênero *Lonomia* pode causar distúrbios hemostáticos, com consumo de alguns fatores de coagulação. Os primeiros acidentes com *Lonomia* foram descritos na Venezuela, em 1967; no Norte do Brasil, foram relatados alguns casos no início da década de 1980. A partir de 1989, na região Sul do Brasil, principalmente na zona rural de Passo Fundo (RS) e Chapecó (SC), surgiram vários casos de acidentes por contato com essas lagartas. Atualmente estes acidentes continuam ocorrendo com maior frequência nesta região, com algumas notificações esporádicas em outras partes do Brasil, principalmente na região Central. Inicialmente os casos graves de acidentes com lagartas *Lonomia* foram tratados com antifibrinolíticos e infusão de glóbulos vermelhos, principalmente na Venezuela e no Brasil. Em 1994, um antiveneno específico que neutraliza os efeitos biológicos dos extratos das cerdas foi produzido no Instituto Butantan. Desde então, o tratamento para estes envenenamentos tem sido a soroterapia com antiveneno produzido com extrato das cerdas das lagartas originárias da região de maior ocorrência de acidentes.

O objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade de algumas atividades do extrato preparado com as cerdas frescas, sem congelar (0) e com as cerdas congeladas e armazenadas por 2, 4 e 6 meses a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Todas as cerdas utilizadas foram de lagartas no 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> instar.

Assim, para esta finalidade, foram preparados três lotes (A, B e C) de extrato de cerdas de taturanas provenientes da região de Passo Fundo (RS). Para cada lote foram separadas 4 amostras de cerdas que foram processadas sem congelar (0), e congeladas por 2, 4 e 6 meses.

Observamos que a atividade coagulante dos extratos dos lotes A e C foram reduzidas nas cerdas congeladas por 2 meses ou mais ( $p < 0,05$ ), mas a atividade do lote B reduziu apenas após 4 meses. Resultados semelhantes foram observados com a atividade fosfolipásica que reduziu nos extratos preparados com cerdas congeladas por 2 meses ou mais nos lotes A e C e após 4 meses ou mais no lote B ( $p < 0,05$ ). Entretanto, o armazenamento não afetou a atividade hemolítica indireta ou a imunogenicidade em nenhum dos lotes. Por outro lado, a atividade hemolítica direta e atividade fibrinolítica não

foram observadas em nenhum dos três lotes preparados. O perfil eletroforético dos extratos em SDS-PAGE, após diferentes períodos de congelamento, não mostraram alterações evidentes, mas a análise densitométrica das amostras indicaram degradação proteica além da desnaturação associadas com a redução da atividade biológica. Os nossos resultados indicam que o congelamento das cerdas por 2 meses ou mais reduzem a atividade procoagulante e fosfolipásica do extrato. Entretanto, os extratos preparados com as cerdas congeladas podem ser usados para produção de antiveneno visto que o congelamento das cerdas não afeta a qualidade do anticorpo produzido. Futuramente serão realizados testes de soro neutralização para verificar a eficácia desses anticorpos *in vivo*.

## **VIII. ABSTRACT**

## VIII. ABSTRACT

Contact with *Lonomia obliqua* caterpillar bristles may cause a consumptive hemostatic disturbance. The first human accident caused by *Lonomia* was described in Venezuela, in 1967. Thirty six cases were reported in Northern Region of Brazil by a retrospective study between 1978 and 1982, but since 1989 a high incidence of hemorrhagic syndrome, caused by contact with *L. obliqua* caterpillars has also been reported in Southern Brazil, mainly in rural areas around Passo Fundo (RS) and Chapecó (SC). The occurrence of such accidents has spread to central regions of Brazil and some sporadic notifications have been reported in other regions of South America. Initially, severe human accidental contact with *L. obliqua* caterpillars was treated with antifibrinolytics drugs and infusion of packed red cells in Venezuela and Brazil. Since 1994, nonetheless, a specific antivenom that neutralizes the biological effects of the bristle extract has been produced by Butantan Institute, using bristles obtained from caterpillars collected in areas of large prevalence. Thereafter, antivenom therapy has been used successfully in Brazil.

Taking into account that biological activities of extracts used for antivenom production may decrease during the storage period of bristles, the aim of this study was to compare their stability, using extracts prepared from fresh (without freezing) and frozen bristles stored for 2, 4 and 6 months at -20°C. Bristles were from caterpillars in instars 5 and 6. Three batches of bristle extract (A, B and C) were prepared from caterpillars collected in Passo Fundo area (RS); each batch of bristles were pooled, and used immediately or stored for 2, 4 and 6 months at -20°C, before being used for extract production.

Our results showed that the clotting activity of extracts of batches A and C were decreased in bristles frozen for 2 months or longer ( $p < 0.05$ ), while it was reduced in samples frozen for 4 months or longer in batch B. Similarly, phospholipase A<sub>2</sub> activity was reduced in extracts prepared with bristles frozen for 2 months or longer in batches A and C, and for 4 months or longer in batch B ( $p < 0.05$ ). On the other hand, storage affected neither the hemolytic activity evaluated indirectly, nor immunogenicity in samples of different batches. Additionally, direct hemolytic activity and fibrinolytic activity were not detected in any sample of the three batches. Electrophoretic protein profile of extract

batches on SDS-PAGE did not show evident alterations, but the densitometric analyses of samples indicated degradation and denaturation, which could be associated with the reduction of biological activities. Our results indicate that freezing bristles for two months or longer decrease both procoagulant and phospholipase A<sub>2</sub> activities of the extract. However, extracts prepared from frozen bristles can be used for antivenom production, since freezing affected neither the quantity nor quality of produced antibodies. Experiments will be accomplished to verify the effectiveness of these antibodies *in vivo*.

## **IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, Z. A taturana. **Rev. Fac. Méd. USP, Ann. VII Cong. Bras. Méd. Cir.**, v. 2, p. 132-135, 1912.

AMARANT, T.; BURKHART, W.; LEVINE, H.<sup>3rd</sup>; AROCHA-PIÑANGO, C.L.; PARIKH, I. Isolation and complete amino acid sequence of two fibrinolytic proteinases from the toxic Saturnid caterpillar *Lonomia achelous*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1079, n. 2, p. 214-221, 1991.

ARAGÓN, F.; & GUBENSEK, F. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. **Toxicon**, v. 19, n. 6, p. 797-805, 1981.

AROCHA-PIÑANGO, C.L. Fibrinolysis caused by contact with caterpillars: preliminary communication. **Acta Cient Venez.**, v.18, p. 136-139, 1967.

AROCHA-PIÑANGO, C.L.; MARSH, N.A.; ROBINSON, D. A fibrinolytic agent from a Saturnid caterpillar. Partial purification and characterization. **Thromb. Diath. Haemorrh.**, v. 29, p. 135-142, 1973.

AROCHA-PIÑANGO, C.L.; PERALES, J.; CARVAJAL, Z. Studies on the degradation of fibrinogen by proteolytic enzymes from the larvae of *Lonomia achelous* (Cramer). **Thromb. Haemost.**, v. 45, n. 3, p. 233-236, 1981.

AROCHA-PIÑANGO, C.L. & PEPPER, D.S. Studies of a fibrinolytic enzyme from the larvae of *Lonomia achelous* (Cramer) using chromogenic peptide substrates. **Thromb. Haemost.**, v. 46, n. 4, p. 710-713, 1981.

AROCHA-PIÑANGO, C.L.; de BOSCH, N.B.; TORRES, A.; GOLDSTEIN, C.; NOUEL, A.; ARGUELLO, A.; CARVAJAL, Z.; GUERRERO, B.; OJEDA, A.; RODRIGUEZ, A. Six new cases of a caterpillar-induced bleeding syndrome. **Thromb. Haemost.**, v. 67, n. 4, p. 402-407, 1992.



AROCHA-PIÑANGO, C.L. & GUERRERO, B. *Lonomia obliqua* and haemorrhagic syndrome. **Lancet**, v. 354, n. 9186, p. 1304, 1999.

AROCHA-PIÑANGO, C.L.; MARVAL, E.; GUERRERO, B. *Lonomia* genus caterpillars toxins. Biochemical aspects. **Biochemie**, v. 82, p. 937-942, 2000.

AROCHA-PIÑANGO, C.L. & GUERRERO, B. *Lonomia* genus caterpillar envenomation: clinical and biological aspects. **Haemostasis**, v. 31, p. 288-293, 2001.

AROCHA-PIÑANGO, C.L. & GUERRERO, B. Hemorrhagic syndrome induced by caterpillars. Clinical and experimental studies. Review, **Invest. Clin.**, v. 44, n. 2, p. 155-163, 2003.

AUNG, W.; HLAING, K.K.; KYAW, K.P.; WIN, M.M.; KYAW, A. Stability of Russell's Viper Venom Toxoid (Lyophilized Form) of Storage. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 52, n. 6, p. 234-237, 1999.

BONILLA, C.A.; FAITH, M.R.; MINTON JR, S.A. L-Amino acid oxidase, phosphodiesterase, total protein and other properties of juvenile timber rattlesnake (*C. h. horridus*) venom at different stages of growth. **Toxicon**, v.11, p. 301-303, 1973.

BOYER, R.F. **Modern experimental biochemistry**. Addison-Wesley Publishing Company, Inc. 1986. 584 p.

CAO, E.; CHEN, Y.; CUI, Z.; FOSTER, P.R. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 6, p. 685-690, 2003.

CAOVILLA, J.J. & BARROS, E.J. Efficacy of two different doses of antilonomic serum in the resolution of hemorrhagic syndrome resulting from envenoming by

*Lonomia obliqua* caterpillars: a randomized controlled trial. **Toxicon**, v. 43, n. 7, p. 811-818, 2004.

CARDOSO, J.L. Pararamose. In: CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.; FAN, H.W.; MÁLAQUE, C.M.; HADDAD, V., ed. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2003, p. 233-236.

CONDREA, E. Hemolytic effects of snake venoms. In: LEE, C.Y., ed. **Handbook of experimental pharmacology – Snake venoms**. New York: Springer –Verlag Berlim Heidelberg, 1979, p. 450-479.

DIAS-DA-SILVA, W.D.; CAMPOS, C.M.; GONÇALVES, L.R.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; HIGASHI, H.G.; YAMAGUSHI, I.K.; KELEN, E.M. Development of an antivenom against toxins of *Lonomia obliqua* caterpillars. **Toxicon**, v.34, n. 9, p. 1045-1049, 1996.

DIAS, L.B. Pararama. In: **Inst. Evandro Chagas, 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. Belém, Fundação Serviços de Saúde Pública, v. 2, p. 799-809, 1986.

DOLEY, R. & MUKHERJEE, A.K. Purification and characterization of an anticoagulant phospholipase A<sub>2</sub> from Indian monocled cobra (*Naja kaouthia*) venom. **Toxicon**, v. 41, p. 81-91, 2003.

DONATO, J.L.; MORENO, R.A.; HYSLOP, S.; DUARTE, A.; ANTUNES, E.; LE BONNIEC, B.F.; RENDU, F.; DE NUCCI, G. *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of factor X and prothrombin. **Thromb. Haemost.**, v. 79, n. 3, p. 539-542, 1998.

DUARTE, A.C.; CAOVILO, J.; LORINI, I.; LORINI, D.; MANTOVANI, G.; SUMIDA, J.; MANFRE, P.C.; SILVEIRA, R.C.; DE MOURA, S.P. Insuficiência renal aguda por acidentes com lagartas. **J. Bras. Nefrol.**, v. 12, n. 4, p. 184-187, 1990.

DUARTE, A.; WALFER, G.; BARROS, E.; LORINI, I. Insuficiência renal aguda nos acidentes com *Lonomia obliqua*. **Nefrol. Latinoamericana**, v. 1, p. 38-40, 1994.

DUARTE, A.C.; CRUSIUS, P.S.; PIRES, C.A.; SCHILLING, M.A.; FAN, H.W. Intracerebral haemorrhage after contact with *Lonomia* caterpillars. **Lancet**, v. 348, p. 1033, 1996.

FAN, H.W. **Ensaio clínico em três fases para avaliação de um antiveneno específico no tratamento da síndrome hemorrágica causada por lagartas do gênero *Lonomia***. Campinas, 2002. 183p. Tese (doutorado)-Universidade Estadual de Campinas-SP.

FAN, H.W.; CARDOSO, J.L.C.; OLMO, R.D.; ALMEIDA, F.J.; VIANA, R.P.; MARTINEZ, A.P.P. Hemorrhagic syndrome and acute renal failure in a pregnant woman after contact with *Lonomia* caterpillars: a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.40, p.119-120, 1998.

FAN, H.W. & DUARTE, A.C. Acidentes por *Lonomia*. In: CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.; FAN, H.W.; MÁLAQUE, C.M.; HADDAD, V., ed. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2003, p. 224-232.

FLETCHER, J.E.; JIANG, M.S.; TRIPOLITIS, L.; SMITH, L.A.; BEECH, J. Interactions in red blood cells between fatty acids and either snake venom cardiotoxin or halothane. **Toxicon**, v. 28, p. 657-667, 1990.

FRAIHA, H.; BALLARINI, H.; LEÃO, R.N.; COSTA JR, D.; DIAS, L.B. Síndrome hemorrágica por contato com larvas de mariposa (Lepidoptera, Saturniidae). **Instituto Evandro Chagas, 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. Fundação Serviços de Saúde Pública, Belém. V. 226, p. 811-820, 1986.

FRANKS, F. Protein stability: the value of 'old literature'. **Biophysical Chemistry**, v. 96, p. 117-127, 2002.

FRANKS, F.; HATLEY, R.H.M.; FRIEDMAN, H.L. The thermodynamics of protein stability cold destabilization as a general phenomom. **Biophysical Chemistry**, v. 31, p. 307-315, 1988.

FRITZEN, M.; SCHATTNER, M.; RIBEIRO, A.L.; BATISTA, I.F.; VENTURA, J.; PREZOTO, B.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. *Lonomia obliqua* venom action on fibrinolytic system. **Thromb. Res.**, v. 112, p. 105-110, 2003.

FURTADO, M.F.D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S.; ANTONIO, L.C.A comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v.29, n.2, p. 219-226, 1991.

GAMBORGI, G.P.; METCALF, E.B.; BARROS, E.J. Acute renal failure provoked by toxin from caterpillars of the species *Lonomia obliqua*. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 68-74, 2006.

GLENN. J.L. & STRAIGHT, R. Mojave rattlesnake *Crotalus scutulatus scutulatus* venom: variation in toxicity with geographical origin. **Toxicon**, v. 16, p. 81-84, 1978.

GLENN, J.L.; STRAIGHT, R.C.; WOLFE, M.C.; HARDY, D.L. Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) venom properties. **Toxicon**, v. 21, n. 1, p. 119-130, 1983.

GRANELLI-PIPERNO, A. & REICH, E. A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids. **J. Exp. Med.**, v. 148, n. 1, p. 223-234, 1978.

GUBENSEK, F.; SKET, D.; TURK, V.; LEBEZ, D. Fractionation of *Vipera ammodytes* venom and seasonal variation of its composition. **Toxicon**. v. 12, p. 167-171, 1974.

GUERRERO, B. & AROCHA-PIÑANGO, C.L. Activation of human prothrombin by the venom of *Lonomia achelous* (Cramer) caterpillars. **Thromb. Res.**, v. 66, p. 169-177, 1992.

GUERRERO, B.; AROCHA-PIÑANGO, C.L.; GIL SAN JUAN, A. Degradation of human factor XIII by lonomin V, a purified fraction of *Lonomia achelous* caterpillars. **Thromb. Res.**, v. 87, p. 171-181, 1997b.

GUERRERO, B.; AROCHA-PIÑANGO, C.L.; GIL SAN JUAN, A. *Lonomia achelous* caterpillar venom (LACV) selectively inactivate blood clotting factor XIII. **Thromb. Res.**, v. 87, p. 83-93, 1997a.

GUERRERO, B.; PERALES, J.; GIL, A.; AROCHA-PIÑANGO, C.L. Effect on platelet FXIII and partial characterization of Lonomin V, a proteolytic enzyme from *Lonomia achelous* caterpillars. **Thromb. Res.**, v. 93, n. 5, p. 243-252, 1999.

GUTIÉRREZ, J.M.; AVILA, C.; CAMACHO, Z.; LOMONTE, B. Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (Bushmaster) from Costa Rica. **Toxicon**, v. 28, n. 4, p. 419-426, 1990.

GROTENDORST, G.R. & HESSINGER, D.A. A purification and partial characterization of the phospholipase A<sub>2</sub> and co-litic factor from sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. **Toxicon**, v. 37, p. 1779-1796, 1999.

HADDAD, V. & CARDOSO, J.L.C. Erucismo e lepidopterismo. In: CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.; FAN, H.W.; MÁLAQUE, C.M.; HADDAD, V., ed. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2003, p. 220-223.

HATLEY, R.H.M. & FRANKS, F. The effect of aqueous methanol crysolvents on the heat- and cold-induced denaturation of lactate dehydrogenase. **Eur. J. Biochem.**, v. 184, p. 237-240, 1989a.

HATLEY, R.H.M.; & FRANKS, F. The cold-induced denaturation of lactate dehydrogenase at sub-zero temperatures in the absence of perturbants. **FEBS Lett.**, v. 257, n. 1, p. 171-173, 1989 b.

HAYES, W.K. Ontogeny of striking, prey-handling and envenomation behavior of prairie rattlesnakes (*Crotalus v. viridis*). **Toxicon**, v. 29, n. 7, p. 867-875, 1991.

JIANG, S. & NAIL, S.L. Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 45, n. 3, 249-257, 1998.

KAWAMOTO, F. & KUMADA, N. Biology of venoms of Lepidoptera. In Tu A. ed. **Handbook of Natural Toxins vol.2 Insect Poisons, Allergens and other Invertebrate Venoms**. Marcel Dekker Inc: New York, 1984, cap. 9, p. 291-330.

KELEN, E.M.A.; ROSENFELD, G.; NUDEL, F. Hemolytic activity of animal venoms. II – Variation in relation to erythrocyte species. **Mem. Inst. Butantan**, v. 30, p. 133-142, 1960-62.

KELEN, E.M.A.; PICARELLI, Z.P.; DUARTE, A.C. Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (Saturniidae, Hemileucinae). **J. Toxicol.-Toxin Rev.**, v. 14, n. 3, p. 283-308, 1995.

KURTH, J. & AURICH, H. The effect of pH value and temperature on the stability of L-aminoacidoxidase from the venom of the sand viper. **Acta Biol. Med Ger.**, v. 35, n. 2, p. 175-182, 1976.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo. Savier. 2 ed. 1995. 839p.

LEMAIRE, C. Revision du gene *Lonomia* Walker (Lep attaccidae). **Ann. Soc. Ent. Fr**, v. 8, p. 767-861, 1972.

LILLA, S.; PEREIRA, R.; HYSLOP, S.; DONATO, J.L.; LE BONNIEC, B.F.; DE NUCCI, G. Purification and initial characterization of a novel protein with factor Xa activity from *Lonomia obliqua* caterpillar spicules. **J. Mass Spectrom.**, v. 40, n. 3, p. 405-412, 2005.

LOBO de ARAUJO, A. & RADVANI, E. Determination of phospholipase A2 activity by a colorimetric assay using a pH indicator. **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1181-1188, 1987.

LOMONTE, B.; GENÉ, J.A.; GUTIÉRREZ, J.M.; CERDAS, L. Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. **Toxicon**, v. 21, n. 3, p. 379-384, 1983.

LOPEZ, M.; GIL, A.; AROCHA-PIÑANGO, C.L. The action of *Lonomia achelous* caterpillars venom on human factor V. **Thromb. Res.**, v. 98, p. 103-110, 2000.

LORINI, L.M. **A taturana: aspectos biológicos e morfológicos da *Lonomia obliqua***. Passo Fundo: EDIUPF, 1999, 67p.

MARKWELL, M.A.; HAAS, S.M.; BIEBER, L.L.; TOLBERT, N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Anal. Biochem.**, v. 87, n. 1, p. 206-210, 1978.

MARVAL, E.; GUERRERO, B.; AROCHA-PIÑANGO, C.L. The action of *Lonomia achelous* caterpillar venom on some blood coagulation and fibrinolysis parameters of the rabbit. **Toxicon**, v. 37, n. 11, p. 1491-1504, 1999.

MEIER, J. & FREYVOGEL, A. Comparative studies on venoms of the Fer-de-Lance (*Bothrops atrox*), carpet viper (*Echis carinatus*) and spitting cobra (*Naja nigricollis*) snakes at different ages. **Toxicon**, v. 18, p. 661-662, 1980.

MINTON, S.A. & WEINSTEIN, S.A. Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Toxicon**, v. 24, n. 1, p. 71-80, 1986.

MORAES, R.H.P. **Identificação dos inimigos naturais de *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidóptera, Saturniidae) e possíveis fatores determinantes do aumento da sua população.** Piracicaba, 2002. 58 p. Dissertação (mestrado)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (Esalq)-SP.

MORAES, R.H.P. Lepidópteros de importância médica. In: CARDOSO, J.L.; FRANÇA, F.O.; FAN, H.W.; MÁLAQUE, C.M.; HADDAD, V., ed. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Savier, 2003, p. 211-219.

MUNEKIYO, S.M. & MACKESSY, S.P. Effects of temperature and storage conditions on the electrophoretic, toxic and enzymatic stability of venom components. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 119, n. 1, p. 119-127, 1998.

PESCE, H. & DELGADO, A. Lepidopterism and erucismo. Epidemiology and clinical aspects in Peru. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 33, n. 3, p. 829-834, 1966.

PINTO, A.F.; DOBROVOLSKI, R.; VEIGA, A.B.; GUIMARÃES, J.A. Lonofibrase, a novel alpha-fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. **Thromb. Res.**, v. 113, n. 2, p. 147-154, 2004.



PINTO, A.F.; SILVA, K.R.; GUIMARÃES, J.A. Proteases from *Lonomia obliqua* venomous secretions: comparison of procoagulant, fibrin(ogen)olytic and amidolytic activities. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 113-121, 2006.

PREZOTO, B.C.; MAFFEI, F.H.; MATTAR, L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; CURI, P.R. Antithrombotic effect of *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract on experimental venous thrombosis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 6, p. 703-712, 2002.

RANGEL-SANTOS, A.C. & MOTA, I. Effect of heating on the toxic, immunogenic and immunosuppressive activities of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v.38, p. 1451-1457, 2000.

REIS, C.V.; FARSKY, S.H.; FERNANDES, B.L.; SANTORO, M.L.; OLIVA, M.L.; MARIANO, M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. In vivo characterization of Lopap, a prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom. **Thromb. Res.**, v. 102, n. 5, p. 437-443, 2001b.

REIS, C.V.; KELE, E.M.A.; PARASKY, S.H.P.; PORTARO, F.C.V.; SAMPAIO, C.A.M.; FERNANDES, B.L.; CAMARGO, A.C.M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A  $Ca^{2+}$  activated serin protease (LOPAP) could be responsible for the haemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. **Lancet**, v. 353, p. 1942, 1995.

REIS, C.V.; KELEN, E.M.; FARSKY, S.H.; PORTARO, F.C.; SAMPAIO, C.A.; FERNANDES, B.L.; CAMARGO, A.C.; CHUDZINSKI, A.M. A  $Ca^{++}$  activated serine protease (LOPAP) could be responsible for the haemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. *L. obliqua* Prothrombin Activator Protease. **Lancet**, v. 353, n. 9168, p. 1942, 1999.

REIS, C.V.; PORTARO, F.C.; ANDRADE, S.A.; FRITZEN, M.; FERNANDES, B.L.; SAMPAIO, C.A.; CAMARGO, A.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A prothrombin

activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (Lopap) biochemical characterization. **Throm. Res.**, v. 102, n. 5, p. 427-436, 2001a.

ROCHA-CAMPOS, A.C.; GONÇALVES, L.R.; HIGASHI, H.G.; YAMAGUSHI, I.K.; FERNANDES, I.; OLIVEIRA, J.E.; RIBELA, M.T.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; da SILVA, W.D. Specific heterologous F(ab')<sub>2</sub> antibodies revert blood incoagulability resulting from envenoming by *Lonomia obliqua* caterpillars. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 64, p. 283-289, 2001.

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; MANCIN, A.C.; FONTES, M.R.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 121, p. 215-222, 1998.

SANTORO, M.L.; SOUSA-e-SILVA, M.C.; GONÇALVES, L.R.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; CARDOSO, D.F.; LAPORTA-FERREIRA, I.L.; SAIKI, M.; PERES, C.A.; SANO-MARTINS, I.S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 122, n. 1, p. 61-73, 1999. Erratum in. **Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 123, n. 3, p. 293, 1999.

SEIBERT, C.S.; OLIVEIRA, M.R.; GONÇALVES, L.R.; SANTORO, M.L.; SANO-MARTINS, I.S. Intravascular hemolysis induced by *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract: na experimental model of envenomation in rats. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 793-799, 2004.

SEIBERT, C.S.; SHINOHARA, E.M.; SANO-MARTINS, I.S. In vitro hemolytic activity of *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract on human and Wistar rat erythrocytes. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 831-839, 2003.

SEIBERT, C.S. **Caracterização do processo hemolítico do extrato bruto das cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* e da sua fração com atividade fosfolipásica sobre os eritrócitos humanos**. 2005. 86 p. Tese de Doutorado, São Paulo: Universidade de São Paulo-USP.

SEIBERT, C.S.; TANAKA-AZEVEDO, A.M.; SANTORO, M.L.; MACKESSY, S.P.; SOARES TORQUATO, R.J.; LEBRUN, I.; TANAKA, A.S.; SANO-MARTINS, I.S. Purification of a phospholipase A<sub>2</sub> from *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 342, n. 4, p. 1027-1033, 2006.

SHUKLA, S.D. & HANAHAN, D.J. Identification of domains of phosphatidylcoline in human erythrocyte plasma membranes. Differential actions of acidic and basic phospholipases A<sub>2</sub> from *Agkistrodon halys blomhoffii*. **Journal Biol. Chem.**, v. 257, p. 2908-2911, 1982.

SLOTTA, K. & BORCHERT, P. Sobre o fator hemolítico dos venenos ofídicos. **Mem. Inst. Butantan**, v. 26, p. 297-309, 1954.

THEAKSTON, R.D. & REID, H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. **Bull. World Health Organ.**, v. 61, n. 6, 949-956, 1983.

TOYAMA, M.H.; OLIVEIRA, D.G.; BERIAM, L.O.S.; NOVELLO, J.C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA<sub>2</sub> isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 41, p. 1033-1038, 2003.

VEIGA, A.B.; BLOCHTEIN, B.; GUIMARÃES, J.A. Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae). **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1343-1351, 2001.

VEIGA, A.B.; PINTO, A.F.; GUIMARÃES, J.A. Fibrinolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. **Thromb. Res.**, v. 111, n. 1-2, p. 95-101, 2003.

WATALA, C. & KOWALCZYK, J.K. Hemolytic potency and phospholipase activity of some bee and wasp venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 97 C, p. 187-194, 1990.

WOLFF, J.L.C.; MORAES, R.H.P.; KITAJIMA, E.; de SOUSA LEAL, E.; de A. ZANOTTO, P.M. Identification and characterization of a baculovirus from *Lonomia obliqua* (Lepidóptera: Saturniidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 79, p. 137-145, 2002.

ZANNIN, M.; LOURENÇO, D.M.; MOTTA, G.; DALLA COSTA, L.R.; GRANDO, M.; GAMBORGI, G.P.; NOGUTI, M.A.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. Blood coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in Santa Catarina, southern Brazil. **Thromb. Haemost.**, v. 89, n. 2, p. 355-364, 2003.